ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์ | วิทยาศาสตร์

สาขา | **สายวิชา**

เรื่อง ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยบางชนิด

Antimicrobial and Antioxidant Properties of Some Essential Oils

นามผู้วิจัย นางสาวนงนุช อุตคุด

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(อาจารย์กฤตชญา อิสกุล, Dr.sc.agr)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์อรวรรณ ชุณชาติ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์วันเพ็ญ เหล่าศรีไพบูลย์, Ph.D.)

หัวหน้าสายวิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนวรรณ พาณิชพัฒน์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยบางชนิด

Antimicrobial and Antioxidant Properties of Some Essential Oils

โดย

นางสาวนงนุช อุตคุด

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นงนุช อุตคุด 2555: ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยบางชนิด ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์ สายวิชาวิทยาศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์กฤตชญา อิสกุล, Dr.sc.agr. 116 หน้า

การสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี Clevenger hydro - distillation จากพืช 15 ชนิด คือ เทียนข้าวเปลือก ผักชี จันทน์เทศ เปราะหอม ว่านน้ำ กานพลู พลู มะนาว อบเชยจีน ตะไคร้ ตะไคร้หอม แฝกหอม ยูคาลิปตัส มะกรูด และสน พบว่า กานพลูให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด คือ 13.68 เปอร์เซ็นต์ (v/w) ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยวิธี Agar disc diffusion วิธี Agar well diffusion และวิธี Vapor diffusion ผลการทดลองพบว่า การทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion และวิธี Agar well diffusion ให้ผลที่สอดคล้องกันคือ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจีน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบได้ดีที่สุด ในการทดสอบด้วยวิธี Vapor diffusion พบว่ามีเพียงน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจีนเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida albicans* ได้ แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ทำการทดสอบ เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจีนมาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) และเชื้อรา (MFC) โดยวิธี 96 well micro plate dilution พบว่า เชื้อ *C. albicans* มีความไวต่อน้ำมันหอมระเหยอบเชยจีนมากที่สุด โดยมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 0.075 µl/ml ขณะที่เชื้อ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* มีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.60 ถึง 5.00 µl/ml จากนั้นทำการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชทั้ง 15 ชนิด ด้วยวิธี DPPH radical scavenging (DPPH) วิธี ABTS radical scavenging (ABTS) วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และวิธี Hydrogen peroxide (H_2O_2) scavenging ผลการทดลองพบว่า กานพลู พลู และจันทน์เทศ แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งอนุมูล DPPH อนุมูล ABTS ได้สูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าพืชทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงสุดเช่นกัน สำหรับการทดสอบด้วยวิธี H_2O_2 scavenging พบว่า ตะไคร้แสดงฤทธิ์ยับยั้ง H_2O_2 ได้ดีที่สุด และทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากการทดสอบด้วยวิธี DPPH วิธี ABTS วิธี FRAP และวิธี H_2O_2 scavenging โดยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากการทดสอบด้วยวิธี DPPH วิธี ABTS และวิธี FRAP มีความสัมพันธ์กันสูง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.86 ถึง 0.99 ในขณะที่การทดสอบด้วยวิธี H_2O_2 scavenging พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับวิธีการทดสอบอื่นๆ

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nongnuch Utakud 2012: Antimicrobial and Antioxidant Properties of Some Essential Oils. Master of Science (Bioproducts Science), Major Field: Bioproducts Science, Division of Science. Thesis Advisor: Mr. Kritchaya Issakul, Dr.sc.agr. 116 pages.

Extraction of essential oils by Clevenger hydro – distillation of 15 plants i.e. fennel, coriander nutmeg, aromatic ginger, calamus, clove, betel, lime, Chinese cinnamon, lemon grass, citronella, vetiver, eucalyptus, kaffir lime and pine showed that clove gave the highest yield of 13.68 % (v/w). Essential oils were investigated for their inhibitory effect against pathogenic microorganisms by Agar disc diffusion method, Agar well diffusion method and Vapor diffusion method. Similar results were found between Agar disc diffusion and Agar well diffusion methods where essential oil extracted from Chinese cinnamon demonstrated the highest inhibitory efficiency against tested microorganisms. Vapor diffusion method was showed that only essential oil extracted from Chinese cinnamon had the inhibiting efficiency against *Candida albicans*. Whereas no inhibitory effect was found in all tested gram negative and positive bacteria. Ninety-six well micro plate dilution method was used for determine of minimal inhibitory concentration (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of essential oil from Chinese cinnamon. The experiment showed that *C. albicans* was the most sensitive microorganism with MIC and MFC values of 0.075 µl/ml. While, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidi*s expressed the MIC and MBC values ranging from 0.60 - 5.00 µl/ml. The antioxidant activities of 15 plants essential oils were evaluated by DPPH radical scavenging assay (DPPH), ABTS radical scavenging assay (ABTS), Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) and Hydrogen peroxide (H_2O_2) scavenging assay. Results found that clove nutmeg and betel showed the highest percentage inhibition of DPPH, ABTS radical. Furthermore, essential oils from these 3 plants also gave the highest reducing power activity. For the H_2O_2scavenging assay, lemongrass revealed the strongest H_2O_2 scavenging activity. The correlation among antioxidant activity measured in essential oil based on DPPH, ABTS, FRAP and H_2O_2scavenging assay determined by Person's correlation coefficient found that DPPH, ABTS and FRAP assay gave a high correlation with correlation coefficient (r) ranged between 0.86 - 0.99. While, H_2O_2 scavenging assay had no correlation with other assay.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ภายใต้ศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านทรัพยากรธรรมชาติเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ข้าพเจ้ารู้สึกเป็นเกียรติ และขอขอบพระคุณอย่างสูงมาไว้ ณ ที่นี้

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อ. ดร. กฤตชญา อิสกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษา อ. ดร. อรวรรณ ชุณหชาติ และ อ. ดร. วันเพ็ญ เหล่าศรีไพบูลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม เป็นอย่างสูง ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำทั้งในส่วนของการเรียนและงานวิจัย รวมทั้งให้คำปรึกษาและสละเวลาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ อ. ดร. รัชพล พะวงศ์รัตน์ ประธานการสอบ และ อ. ดร. สุขุมาภรณ์ สุขขุม ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่อบรมสั่งสอน ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่สาขาวิชาพฤกษศาสตร์และสาขาวิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่คอยอำนวยความสะดวกการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับงานวิจัย รวมไปถึงคำแนะนำ และคำปรึกษาต่างๆ ขอขอบพระคุณบริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย จีนจำกัด และร้าน Botanicessence ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบ ขอขอบคุณพี่ก้อย พี่ฝน พี่หนูนา อุมาพร ศรัญญา และคุณรักษ์ รวมถึงเพื่อนๆ และน้องๆ ที่ได้ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในด้านต่างๆ อีกทั้งยังคอยให้กำลังใจเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ พ่อท้าว แม่น้อย น้าตุ๋ม และญาติผู้ใหญ่ทุกๆ ท่าน ที่ให้การอบรมสั่งสอน มอบแรงกายแรงใจให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา เป็นกำลังใจที่ดีตลอดการศึกษาและการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วง

นงนุช อุตคุด

กันยายน 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	28
ผลและวิจารณ์	36
สรุปและข้อเสนอแนะ	93
สรุป	93
ข้อเสนอแนะ	94
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	96
ภาคผนวก	111
ภาคผนวก ก สูตรที่ใช้ในการคำนวณ เปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหย	112
ภาคผนวก ข สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	114

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สรรพคุณของพืชสมุนไพร 15 ชนิด	37
2	ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร	38
3	ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชชนิดต่างๆ	40
4	ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี Agar disc diffusion	43
5	ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* โดยวิธี Agar disc diffusion	44
6	ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี Agar disc diffusion	45
7	ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยวิธี Agar disc diffusion	46
8	ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี Agar disc diffusion	47
9	ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี Agar well diffusion	55
10	ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* โดยวิธี Agar well diffusion	56
11	ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี Agar well diffusion	57
12	ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยวิธี Agar well diffusion	58
13	ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี Agar well diffusion	59
14	ค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์จากการทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion กับวิธี Agar well diffusion โดยใช้สถิติวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson's correlation)	66

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	ผลของไอน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี Vapor diffusion	71
16	ค่า MIC และ MBC/MFC ของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจีน	74
17	ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 ของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี DPPH	77
18	ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 ของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี ABTS	82
19	ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide (H_2O_2) ของน้ำมันหอมระเหย	86
20	ค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์จากการเปรียบเทียบผลการทดลองของแต่ละวิธีทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยใช้สถิติวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson's correlation)	88

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี Agar disc diffusion	48
2	ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* โดยวิธี Agar disc diffusion	49
3	ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี Agar disc diffusion	50
4	ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยวิธี Agar disc diffusion	51
5	ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี Agar disc diffusion	52
6	ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี Agar well diffusion	60
7	ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* โดยวิธี Agar well diffusion	61
8	ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี Agar well diffusion	62
9	ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยวิธี Agar well diffusion	63
10	ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี Agar well diffusion	64
11	ความสัมพันธ์ระหว่าง inhibition zone ในการต้านการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากวิธี Agar disc diffusion และวิธี Agar well diffusion	67
12	ประสิทธิภาพของไอน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี Vapor diffusion	72

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี DPPH	76
14	ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี ABTS	81
15	ความสามารถในการเป็นสารรีดิวซ์ (reducing power) ของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี FRAP	84
16	ความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างวิธีการทดสอบต่างๆ	90

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยบางชนิด

Antimicrobial and Antioxidant Properties of Some Essential Oils

คำนำ

ปัจจุบันการแพร่ระบาดของโรคอาหารเป็นพิษเกิดขึ้นอย่างกว้างขวางและส่งผลถึงขั้นเสียชีวิต โดยมีผลมาจากการปนเปื้อนและการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารและน้ำดื่ม ซึ่งทุกๆ ปี มีประชากรในประเทศอุตสาหกรรมราวร้อยละ 30 ได้รับผลกระทบจากโรคอาหารเป็นพิษ โดยในปี 2000 องค์การอนามัยโลก พบว่าประชากรอย่างน้อย 2.1 ล้านคนทั่วโลก เสียชีวิตจากอาการท้องร่วง (World Health Organization [WHO], 2002) ขณะที่ในประเทศออสเตรเลีย มีผู้ป่วยด้วยโรคนี้ประมาณ 5.4 ล้านรายต่อปี สำหรับสถานการณ์โรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากข้อมูลของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค พบว่าตั้งแต่วันที่ 1 ม.ค. - 25 เม.ย. 2554 พบผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษสะสมรวมจำนวน 30,524 ราย หรือคิดเป็น 48.05 ต่อประชากรแสนคน ซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมาก เนื่องจากมีผลกระทบโดยตรงต่อการทำงานและสุขภาพของผู้ป่วย เกิดการสูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาล การขาดงาน และเสียภาพพจน์การท่องเที่ยวของประเทศไทย และยังทำให้อาหารเกิดการเสียคุณภาพ และคุณค่าทางด้านโภชนาการ นอกจากนี้ผลกระทบที่เกิดจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหารก็ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านคุณภาพ และคุณค่าทางโภชนาการเช่นเดียวกัน โดยไขมันที่ถูกออกซิไดซ์ในปริมาณมากๆ จะก่อให้เกิดสารพิษ อีกทั้งอนุมูลอิสระก็ยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพร่างกายของมนุษย์ โดยเหนี่ยวนำให้เกิดโรคร้ายแรง เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดและหัวใจ และโรคที่เกิดจากภาวะเซลล์เสื่อม (Weecharangsan and Opanasopit, 2004)

ด้วยเหตุนี้ทำให้ทั่วโลกมีแนวความคิดที่จะทำการสำรวจทางเลือกใหม่โดยให้ความสำคัญกับวิธีการที่จะช่วยลดอัตราการเกิดโรคและหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค (Nedorostova *et al.,* 2009) ดังนั้นการศึกษาทางเลือกโดยใช้สารจากธรรมชาติจึงได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคบางชนิด หรือสารสังเคราะห์ที่ใช้เติมลงในอาหาร (Gupta *et al*., 2008b) ตัวอย่างเช่น สารกันเสีย ซึ่งเป็นสารที่ใช้ใส่ลงในอาหารเพื่อช่วยให้อาหารคงสภาพ รส กลิ่น ไว้ได้นานเหมือนเมื่อแรกผลิต สารประเภทนี้ได้แก่ สารกันหืน สารกันบูด หรือสารป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่เนื่องจากในปัจจุบัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผู้บริโภคไม่นิยมบริโภคอาหารที่ใช้สารกันเสียสังเคราะห์ เนื่องจากมีความเป็นพิษและเป็นสาเหตุนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็ง จึงได้มีการพยายามนำเครื่องเทศและสมุนไพรมาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะและเพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษาอาหารที่เกิดการเน่าเสียจากทั้งปฏิกิริยาทางเคมีและจุลินทรีย์ (ปทุมและคณะ, 2550) เนื่องจากมีผลข้างเคียงน้อย ราคาค่อนข้างถูก หาได้ตามธรรมชาติ และอาจช่วยแก้ปัญหาเรื่องการดื้อยาได้ อีกทั้งยังช่วยปรุงแต่งกลิ่นรสและสีของอาหารให้น่ารับประทานยิ่งขึ้น โดยนำมาใช้ในรูปน้ำมันหอมระเหย โดยน้ำมันหอมระเหยมีสรรพคุณต่างๆ มากมาย เช่น ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านเชื้อรา ต้านไวรัส เป็นสารฆ่าแมลง และต้านอนุมูลอิสระ ใช้รักษาโรคมะเร็ง ใช้ยืดอายุของอาหาร ใช้ในอโรมาเธอราปี รวมไปถึงอุตสาหกรรมน้ำหอมอีกด้วย ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ดีกว่ารูปที่พบโดยทั่วไป (Pranoto *et al*., 2005; Gupta *et al*., 2008b)

ดังนั้นการคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศมาศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงเป็นอีกสิ่งหนึ่งที่น่าสนใจ ทั้งนี้เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้แทนยาปฏิชีวนะเพื่อการรักษาโรค ชะลอการเสื่อมเสียของอาหาร รักษาการสูญเสียคุณภาพทางด้านคุณค่าทางโภชนาการ และยังช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารให้นานขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มทางเลือกให้กับผู้บริโภคในเรื่องความปลอดภัย และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรและเครื่องเทศที่มีอยู่ในประเทศให้สูงขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

อาหารเป็นแหล่งการเจริญเติบโตที่สมบูรณ์ของจุลินทรีย์หลากหลายชนิด จุลินทรีย์บางชนิดอาจจะเป็นจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติของวัตถุดิบต่างๆ ทั้งพืชและสัตว์ อย่างไรก็ตาม อาหารที่ไม่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคหรือไม่ได้มาตรฐานควรค่าแก่การบริโภคนั้นมีสาเหตุมาจากหลายประการ โดยสาเหตุประการหนึ่งคืออาหารมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยมีที่มาของการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหาร ได้แก่

1.1 Cross contamination

หมายถึง การแพร่เชื้อแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์อาหารชนิดหนึ่งไปยังอีกชนิดหนึ่ง เช่น การสัมผัสระหว่างวัตถุดิบที่ยังไม่ผ่านการปรุงกับวัตถุดิบที่ผ่านการปรุงสุกแล้ว

1.2 Poor sanitation

หมายถึง สุขอนามัยที่ไม่ดี เช่น ภาชนะที่ใช้บรรจุอาหารไม่สะอาด เมื่อมีการนำมาบรรจุอาหารจึงเกิดการปนเปื้อนได้

1.3 Poor personal hygiene

หมายถึง สุขลักษณะส่วนบุคคลของผู้ปฏิบัติงานไม่ดี เช่น ผู้ประกอบการด้านอาหารเข้าห้องน้ำแล้วล้างมือไม่สะอาด เมื่อมีการปฏิบัติงานจึงเกิดการปนเปื้อนแบคทีเรียที่มือลงไปในอาหาร

อาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ส่งผลเสียต่อสุขภาพอนามัย เป็นสาเหตุให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารต่างๆ และเกิดโรคจากอาหารที่เป็นพิษ เป็นต้น นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดความเสียหายทั้งทางเศรษฐกิจและสังคมเป็นอย่างมาก (ชุติมา, 2545)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคที่สำคัญ

จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ หรือทำให้อาหารเกิดการเสื่อมเสียก่อปัญหาให้กับหลายประเทศทั่วโลก โดยทำให้เกิดความเสียหายทั้งชีวิต ทรัพย์สินและความเชื่อมั่นของผู้บริโภค ทั้งยังก่อให้เกิดการสูญเสียดุลทางการค้าของประเทศ จึงถือเป็นปัญหาที่มีความสำคัญอย่างมาก ในช่วงเวลาที่ผ่านมามีรายงานจากองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) เกี่ยวกับการเกิดโรคทางอาหารซึ่งมีปริมาณสูงขึ้นในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น จึงทำให้ผู้บริโภคทั่วโลกเริ่มตระหนักถึงบทบาทความสำคัญของจุลินทรีย์ที่เจริญ หรือปนเปื้อนในอาหารซึ่งก่อให้เกิดโรคและการเสื่อมเสียในอาหารมากขึ้น (สุภาธร, 2552) จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษมีมากมายหลายชนิด โรคอาหารเป็นพิษในมนุษย์เกิดได้จากการบริโภคอาหาร หรือน้ำที่มีการปนเปื้อนด้วยเซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิต หรืออาหาร/เครื่องดื่มที่มีการปนเปื้อนของสารพิษ (toxins) ที่สร้างจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียและรา (สุดสาย, 2545) คณะกรรมาธิการนานาชาติสำหรับเกณฑ์ทางด้านจุลชีววิทยาทางอาหาร (The International Commission on Microbiological Specifications For Foods; ICMSF) ได้แบ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารตามระดับความรุนแรงออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

1) อันตรายขั้นรุนแรง มีผลกระทบโดยตรงต่อสุขภาพ เช่น *Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium botulinum* และ *Salmonella typhi* เป็นต้น

2) อันตรายปานกลาง แต่อาจแพร่กระจายได้ เช่น *Salmonella* sp., pathogenic *E. coli* (เช่น enterotoxigenic) และ *Shigella* sp. เป็นต้น

3) อันตรายปานกลาง สามารถควบคุมได้ เช่น *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Yersinia enterocolitica, Campylobacter jejuni, Vibrio parahaemolyticus* และ *Clostridium perfringens* เป็นต้น

จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหารจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอาหารที่ผู้บริโภคไม่สามารถยอมรับได้ ทั้งในแง่ของกลิ่น สี รสชาติ เนื้อสัมผัสและรูปลักษณะของอาหาร เป็นต้น ในบางกรณีจุลินทรีย์ไม่ได้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในอาหารโดยตรงแต่จะส่งผลให้จุลินทรีย์ธรรมชาติ (microflora) สามารถเจริญและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น เช่น กรณีของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แบคทีริโอฟาจ (bacteriophages) ซึ่งจะเข้าไปเจริญภายในเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ประโยชน์และทำให้จุลินทรีย์นั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงไปและเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหารได้ (วราวุฒิ, 2548)

2.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม มักพบเป็นคู่เกาะกันด้วยสายสั้นๆ เป็นกิ่ง หรือเป็นลักษณะพวงองุ่น โคโลนีมีสีเหลือง หรือทอง ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ดี ในสภาพที่มีออกซิเจน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 35 – 40 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอชที่เหมาะสมคือ 7-7.5 ค่า water activity (a_w) ต่ำที่สุดสำหรับการเจริญในสภาพมีออกซิเจนประมาณ 0.86 สภาพไม่มีออกซิเจน 0.90 เชื้อชนิดนี้บางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ผลิตสารพิษที่เรียกว่า เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) สามารถพบได้ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำ อาหารและนม หรืออาหารบรรจุเสร็จ อาหารที่มักพบเชื้อชนิดนี้ ได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์จากไข่ อาหารประเภทสลัด ผลิตภัณฑ์ขนมอบและผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น การปนเปื้อนในอาการมักมีสาเหตุมาจากคนงานผู้สัมผัสและการจัดการด้านสุขลักษณะที่ไม่ดี เช่น คนงานมีบาดแผลที่ผิวหนัง ไม่มีการใช้ผ้าปิดปาก ปิดจมูกในขณะปฏิบัติงาน เป็นต้น (สุภาธร, 2552)

2.2 *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจน สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) พบได้ทั่วไปบนร่างกายมนุษย์ (normal skin flora) เป็นเชื้อฉวยโอกาสก่อโรคในผู้ป่วยที่มีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย (Bukhari, 2004)

2.3 *Escherichia coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ เจริญได้ในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophile) ในช่วง 7-10 องศาเซลเซียสจนถึง 50 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 4.4-8.5 ค่า water activity (a_w) ต่ำที่สุดที่สามารถเจริญได้คือ 0.95 เชื้อชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ อาการอุจจาระร่วง โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ Enterotoxigenic (ETEC) Enteroinvasive (EIEC) Enteropathogenic (EPEC) Enterohemorrhagic (EHEC) และ Enteroaggregative (EaggEC) ซึ่งใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แต่ละกลุ่มก่อให้เกิดโรคด้านพยาธิสภาพที่แตกต่างกัน การเกิดโรค คุณสมบัติเฉพาะด้านความรุนแรงของเชื้อและลักษณะพิเศษตาม O:H Serotypes ในบางกรณีอาจมีความแตกต่างในกลุ่มอาการคลินิกและลักษณะทางระบาดวิทยา เป็นเชื้อที่บ่งชี้ถึงการปนเปื้อนที่เกี่ยวเนื่องกับระบบขับถ่าย (อุจจาระ) ในอาหารหรือเครื่องดื่ม เช่น เนื้อบด น้ำนมดิบ ผักสด เป็นต้น (สุภาธร, 2552)

2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน หรือโค้งเล็กน้อย โคโลนีมีขนาดใหญ่ กระจายและมักเป็นเงาคล้ายโลหะ (metallic sheen) สร้างสารเรืองแสง เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา ไม่สร้างสปอร์ จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญทนต่อความเข้มข้นของเกลือได้สูง เจริญในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 10 - 42 องศาเซลเซียส แต่โดยส่วนใหญ่เชื้อชนิดนี้สามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ ดิน ผักและอุจจาระของคน เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหารที่แช่หรือเก็บในตู้เย็น หรือที่อุณหภูมิต่ำ (สุภาธร, 2552)

2.5 *Candida albicans*

C. albicans เป็นยีสต์ รูปร่างกลม รูปไข่ รูปทรงกระบอก หรือทรงยาว สืบพันธุ์ด้วยการแตกหน่อแบบมัลติโพลาร์ บัดดิง (multipolar budding) ไม่มีการสร้างแอสโคสปอร์ ไม่มีเม็ดสี แคโรทีนอยด์ จึงทำให้เห็นการสร้างสีของเซลล์ได้ อาจมีการสร้างโพลีแซคคาไรด์ขึ้นภายนอกเซลล์ จึงอาจเกิดปฏิกิริยาเชิงบวกกับไอโอดีนได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 37 องศาเซลเซียส ยีสต์ชนิดนี้สามารถพบได้ในอาหารทั้งประเภทเนื้อสัตว์ สัตว์ปีกและประเภทผักและผลไม้อีกทั้งยังเป็นเชื้อ normal flora ในร่างกายของมนุษย์ ซึ่งเชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่พบมากที่สุดและมีความรุนแรงที่สุด ก่อโรคที่ผิวหนัง ช่องคลอด และปาก (สุภาธร, 2552)

3. ความหมายของสมุนไพร

สมุนไพร หมายถึง พืช สัตว์ และแร่ธาตุที่มีแหล่งกำเนิดจากธรรมชาติซึ่งมีความสำคัญต่อชีวิตมนุษย์โดยเฉพาะทางด้านการส่งเสริมสุขภาพและรักษาโรค ในปัจจุบันมีการใช้สมุนไพรต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากส่วนใหญ่มีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อคนและสัตว์ รวมทั้งมีราคาถูกกว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารเคมีสังเคราะห์ สมุนไพรส่วนใหญ่มักหาได้ง่าย และสามารถเตรียมได้เอง สมุนไพรที่ได้จากพืชมาจากส่วนสำคัญ 5 ส่วน คือ ราก ลำต้น ใบ ดอก และผล ในการนำพืชสมุนไพรมาใช้ประโยชน์จะต้องคำนึงถึงธรรมชาติของสมุนไพรแต่ละชนิดรวมทั้งปัจจัยต่างๆ เช่น สายพันธุ์ของสมุนไพร สภาวะแวดล้อม การปลูก ฤดูกาล และช่วงเวลาของการเก็บเกี่ยวสมุนไพร โดยปัจจัยเหล่านี้มีความสำคัญต่อคุณภาพของสมุนไพร องค์ประกอบที่มักพบในสมุนไพรได้แก่ สารในกลุ่ม alcohol aldehydes, esters, ketone, oxides, phenol และ terpenes องค์ประกอบเหล่านี้อาจอยู่ในรูปของแข็งของเหลว หรือกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งมีสมบัติทางเคมีและกายภาพรวมทั้งความคงสภาพที่แตกต่างกัน สารสกัดจากสมุนไพรในรูปของเหลวที่มีการนำมาใช้แพร่หลายลักษณะหนึ่งคือ น้ำมันหอมระเหย (อาภากร, 2551)

3.1 น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยเป็นผลิตผลจากการสกัดพืชสมุนไพรและเครื่องเทศนานาชนิด ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้น มักมีกลิ่นหอม ระเหยง่าย พบได้ตามส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล เมล็ด กลีบเลี้ยง มีลักษณะเป็นน้ำมันที่มีกลิ่นและรสเฉพาะตัว น้ำมันหอมระเหยเป็นกลุ่มของสารอินทรีย์ในพืชที่มีคุณสมบัติระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิปกติ เนื่องจากมีจุดเดือดต่ำ เบากว่าน้ำ ไม่มีสี แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้นานๆ อาจถูกออกซิไดส์ (oxidized) ทำให้สีเข้มขึ้น จึงต้องเก็บไว้ในขวดสีชาที่ปิดสนิท โดยปกติน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดจะมีสารประกอบทางเคมีตั้งแต่ 50-500 ชนิด ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมี อัตราส่วนของสารประกอบทางเคมีที่ผสมกันและคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป ขึ้นกับชนิดของพืช ฤดูกาล ระยะพัฒนาการ (เช่น ระยะใบ ระยะออกดอก ระยะผลแก่ เป็นต้น) สารประกอบทางเคมีเหล่านี้นอกจากให้กลิ่นหอมเฉพาะตัวแล้ว สารบางชนิดมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ หรือฆ่าแมลง บางชนิดมีรสชาติเผ็ด ขม หวาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อสารประกอบเหล่านี้ผสมผสานกัน ยิ่งทำให้เกิดคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ของน้ำมันหอมระเหยของพืชแต่ละชนิดที่เหมาะต่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่างกันออกไป วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ การกลั่นด้วยไอน้ำ และการใช้สารเคมีเป็นตัวทำละลาย ซึ่งน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จะแยกจากชั้นของน้ำ (อาภากร, 2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

กลุ่มของสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยแบ่งเป็น 7 กลุ่ม (อาภากร, 2551) ซึ่งในแต่ละกลุ่มจะออกฤทธิ์แตกต่างกันดังนี้

3.2.1 กลุ่มแอลกอฮอล์ (alcohols)

พืชจะมีการสร้างสารในกลุ่มนี้เพื่อตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้น สารในกลุ่มแอลกอฮอล์ไม่มีความเป็นพิษ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา ได้อย่างกว้างขวาง โดยมีผลทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์สูญเสียสภาวะปกติในการควบคุมสารผ่านเข้าออกเซลล์ ตัวอย่างของสารในกลุ่มแอลกอฮอล์ ได้แก่ เบนซิลแอลกอฮอล์ (benzyl alcohol) ลินาลอล (linalol) ซิโตรเนลลอล (citronellol) เจอรานิออล (geraniol) บอร์นีออล (borneol) เมนธอล (menthol) นีรอล (nerol) และเทอร์พินีออล (terpineol) เป็นต้น

3.2.2 กลุ่มแอลดีไฮด์ (aldehydes)

สารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการระงับประสาท ยกระดับจิตใจ ลดการอักเสบ ลดความอ้วน ขยายหลอดเลือด และมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรค มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อราได้ดีโดยเฉพาะกับแบคทีเรีย ตัวอย่างของสารในกลุ่มแอลดีไฮด์ ได้แก่ ซิทรอล (citral) หรือเจอราเนียล (geranial) ซิโตรเนลลัล (citronellal) และนีเรล (neral) เป็นต้น

3.2.3 กลุ่มเอสเทอร์ (esters)

สารในกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดี มีคุณสมบัติระงับประสาท สงบอารมณ์ ลดอาการเกร็งของกล้ามเนื้อ และลดการอักเสบ ตัวอย่างของสารในกลุ่มเอสเทอร์ ได้แก่ ลินาลิลอะซีเตต (linalyl acetate) เจอรานิลอะซีเตต (geranyl acetate) บอร์มิลอะซีเตต (bormyl acetate) ยูจีนิลอะซีเตต (eugenyl acetate) และลาเวนดูลิลอะซีเตต (lavendulyl acetate) เป็นต้น

3.2.4 กลุ่มคีโตน (ketones)

สารคีโตนมีคุณสมบัติช่วยขยายหลอดลม ละลายเสมหะ เสริมสร้างเนื้อเยื่อ และลดการอักเสบ ตัวอย่างของสารในกลุ่มคีโตน ได้แก่ จัสโมน (jasmone) เฟนโคน (fenchone) แคมเฟอร์ (camphor) คาร์โวน (carvone) และเมนโธน (menthone) เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2.5 กลุ่มออกไซด์ (oxides)

สารกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี นอกนั้นพบสารที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นระบบประสาท ตัวอย่างของสารในกลุ่มออกไซด์ ได้แก่ ลินาลอลออกไซด์ (linalol oxide) แอสคาริดอล (ascaridol) ไบซาโบลอลออกไซด์ (bisabololoxide) และซินีออล (cineol) เป็นต้น

3.2.6 กลุ่มฟีนอล (phenols)

สารในกลุ่มนี้มีความสำคัญเนื่องจากเป็นสารที่ให้สีและกลิ่นในพืช มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อราได้ดีและกว้างขวาง โดยเฉพาะกับแบคทีเรีย สารประกอบฟีนอลิก เช่น ยูจีนอล (eugenol) ยูจีนอลอะซีเตต (eugenol acetate) คาร์วาครอล (carvacrol) ไธมอล (thymol) และฟีนอล (phenol) เป็นต้น

3.2.7 กลุ่มเทอร์พีน (terpenes)

สารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อและลดการอักเสบ ประกอบด้วย แคมฟีน (camphene) คาดินีน (cadinene) คาร์โยฟิลลีน (caryophyllene) ซีดรีน (cedrene) ไดเพนทีน (dipentene) เทอร์ไพนีน (terpinene) ซาบินีน (sabinene) ไมร์ซีน (myrcene) สารเซสควิเทอร์พีนส์ (sesquiterpenes) เช่น คามาซูลีนฟาร์นีซอล (chamazulene farnesol) มีฤทธิ์ในการลดการอักเสบและต้านเชื้อแบคทีเรีย ลิโมนีน (limonene) มีคุณสมบัติต้านไวรัส และไพนีน (pinene) มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ เป็นต้น

4. การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

ปริมาณสารสำคัญในสมุนไพรขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ฤดูกาลเก็บเกี่ยว ระยะเวลาที่เก็บพืช สภาพดิน สภาพอากาศ ปริมาณน้ำ ชนิดและปริมาณสัดส่วนของปุ๋ยและอาหารเสริม เป็นต้น ฤดูกาลที่เก็บพืชสมุนไพรมีความสำคัญมากต่อปริมาณและชนิดขององค์ประกอบสำคัญในพืชสมุนไพร ควรเก็บในฤดูกาลและระยะเวลา (อายุ) ที่มีปริมาณองค์ประกอบสำคัญสูงสุดในส่วนของพืชที่ต้องการ อายุของพืชเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดปริมาณและชนิดขององค์ประกอบสำคัญที่ผลิตขึ้น โดยทั่วไปหลักการเก็บส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพรมีดังนี้ (รัตนา, 2547)

1) รากและเหง้า เก็บหลังจากที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่แล้วและหยุดการเจริญเติบโต หาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พืชล้มลุกควรเก็บเมื่อต้นตาย

2) เปลือกต้น เก็บในระยะเวลาที่เหมาะสม เช่น เปลือกต้นซิงโคนา (cinchona) เก็บเมื่อต้นมีอายุ 3-9 ปี

3) ใบและยอด เก็บก่อนที่พืชจะออกดอกหรือก่อนที่ดอกจะบาน

4) ดอก เก็บขณะที่ดอกกำลังจะบานหรือก่อนถึงเวลาผสมเกสร

5) ผล เก็บเมื่อผลเจริญเติบโตเต็มที่แต่ยังไม่สุกหรือสุกเต็มที่ แล้วแต่ชนิดของพืชสมุนไพร

6) เมล็ด เก็บเมื่อแก่เต็มที่แล้ว แต่ควรเก็บก่อนที่ผลจะแตกออก

ตัวอย่างที่แสดงให้เห็นความสำคัญของระยะเวลาการเก็บเกี่ยวต่อคุณภาพของสมุนไพร เช่น การเก็บเกี่ยวฝักมะขามแขก ควรเก็บฝักอ่อน ซึ่งเป็นระยะที่เริ่มมีเมล็ดใสๆ อายุราว 21 - 23 วัน หากเมล็ดเจริญเต็มที่จนแก่ น้ำหนักของพืชจะเพิ่มขึ้นและมีปริมาณสารสำคัญเซนโนไซด์ (sennosides) ลดลง หรือดอกไพรีทรัม (pyrethrum) ถ้าเก็บเมื่อดอกยังตูม จะให้องค์ประกอบสำคัญที่มีฤทธิ์ฆ่าแมลงสูงสุด หากเก็บเมื่อดอกเริ่มบานหรือบานเต็มที่ องค์ประกอบดังกล่าวลดลงเกือบเท่าตัว เป็นต้น (รัตนา, 2547; Huopalahti and Linko, 1983)

5. วิธีการสกัดสารจากพืชสมุนไพร

5.1 Maceration

วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด โดยเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารที่อยู่ในสมุนไพร แล้วนำสมุนไพรไปแช่ในภาชนะที่ปิดเขย่าเป็นเวลา และแช่ไว้อย่างน้อย 2-7 วัน จากนั้นนำมากรองเอาสารสกัดออกมาจากสมุนไพรให้ได้มากที่สุดนำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออก แล้วจึงนำสารที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อ วิธีนี้มีข้อดีคือ สารสกัด จะไม่ถูกความร้อน จะทำให้เกิดการสลายตัวของสารสกัดในสมุนไพรน้อยลง แต่ข้อเสียคือ จะสิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.2 Soxhlet extraction

เป็นวิธีที่ใช้ความร้อนในการสกัดและต้องอาศัยการควบแน่นเข้าช่วยเป็นการสกัดแบบต่อเนื่อง จึงไม่เหมาะสมกับการสกัดสารจากสมุนไพรซึ่งมีสารระเหยง่ายเป็นองค์ประกอบ วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสำหรับการสกัดสารที่มีองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อน และใช้ตัวทำละลายน้อย ไม่สิ้นเปลือง

5.3 Extraction of volatile oil

ใช้สำหรับการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีการต่างๆ หลายวิธี เลือกใช้ตามความเหมาะสมของพืชแต่ละชนิด เช่นการดูดซับ การใช้ตัวทำละลาย วิธีการบีบ การกลั่นโดยน้ำหรือไอน้ำ(ประสาทพร และคณะ, 2551)

6. การทดสอบความไวของสารต้านจุลชีพ

วิธีทดสอบความไวต่อเชื้อของสารทดสอบมีหลายวิธี หากเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรียและราสามารถทำได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยจะมีวิธีการทดสอบหลักๆ อยู่ 2 วิธี คือ

6.1 Agar diffusion test

วิธีที่ใช้กันมากที่สุดคือวิธี Disc diffusion ตามวิธีของ Kirby-Bauer เนื่องจากมีความสะดวก ประหยัดและจะใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่าวิธีอื่นๆ วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ แต่ไม่สามารถทราบค่า MIC (Minimum inhibition concentration คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์) และไม่เหมาะสมต่อการทดสอบเชื้อที่เจริญช้า และเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic) หลักการทั่วไป คือ การทำให้สารสกัดสมุนไพรที่หยดลงบนแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ซึมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ที่ได้ทำการป้ายเชื้อไว้แล้ว จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโต วิธีการอ่านผลการทดสอบทำโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บริเวณรอบ disc จะไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอยู่ในบริเวณนั้นเลย ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจะแปรผันตามขนาดของวงใส วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งของสมุนไพรเพียงความเข้มข้นเดียวและใช้เป็นการตรวจสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อของสมุนไพรเบื้องต้น นอกจากขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่ได้จะแปรผันตรงกับความไวของเชื้อทดสอบแล้ว ยังอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการเช่น ขนาดโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพรความสามารถในการละลายหรือซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของสารสกัดสมุนไพร อัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรด-ด่างและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อ สำหรับรองรับสมุนไพร (drug reservoir) ที่ใช้มักใช้เป็นกระดาษซับวงกลม (filter paper disc) หรืออาจเรียกว่า Dish sensitivity test หรืออาจจะเป็นหลุมที่เจาะลงไปในเนื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการทำ Agar diffusion test สามารถทำได้โดย เตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบโดยเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลววัดความขุ่นของเชื้อเพื่อให้ได้จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมกับการทดสอบ แล้วทำการป้ายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งให้ทั่ว จุ่มกระดาษกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร ในสารสกัดสมุนไพร และวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการป้ายเชื้อไว้ก่อนแล้ว ควรทำกลุ่มควบคุม คือกระดาษกรองปลอดเชื้อที่จุ่มในตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสมุนไพรด้วย หรืออาจจะใช้วิธีการเจาะหลุม (Hole-plate diffusion) โดยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหลุมเป็น 5 มิลลิเมตร แล้วหยดสารสกัดสมุนไพรลงไปประมาณ 40 ไมโครลิตร/หลุม บ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกของยาปฏิชีวนะที่ทราบปริมาณยาที่แน่นอน การแปรผลของวิธีนี้จะสามารถบอกได้เพียงว่าสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นนั้นๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากหรือน้อยตามขนาดของวงใสเท่านั้นและอาจจะใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เกิดจากยาปฏิชีวนะมาตรฐานก็ได้ (ประสาทพร และคณะ, 2551)

6.2 Broth dilution test

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Broth dilution test จะเป็นการทดสอบในเชิงปริมาณ เพราะสามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถทำลายเชื้อได้ นิยมใช้ทดสอบเชื้อที่เจริญได้ช้า ใช้ทดสอบเพื่อยืนยันผลของวิธี Paper disc diffusion เพื่อว่าจะสามารถใช้สารสกัดสมุนไพรนั้นในจำนวนสูงๆได้ และใช้ทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใช้อากาศในการเจริญ (anaerobic) หลักการโดยทั่วไปของวิธีทดสอบแบบ Broth และ Agar diffusion test จะคล้ายคลึงกัน คือ เจือจางสารสกัดสมุนไพรในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นจึงใส่เชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดสมุนไพรอยู่ ภายหลังการบ่มเพาะ สังเกตความขุ่นใสของอาหารเลี้ยงเชื้อว่า มีหรือไม่มีเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยค่าความเข้มข้นที่สังเกตได้จะเป็นค่า MIC จากนั้นนำหลอดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเพื่อศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimal lethal concentration, MLC) ที่ทำการทดสอบได้ ซึ่งจะรายงานเป็นค่า Minimal bactericidal concentration (MBC) หรือ Minimal fungicidal concentration (MFC) (ประสาทพร และคณะ, 2551)

7. อนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระ คือโมเลกุล อะตอม หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่หรือมีอิเล็กตรอนเดี่ยว เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนอื่น ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะคือ มีความไวสูงในการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ อย่างไรก็ตามยังคงมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความเสถียร ไม่ไวในการเกิดปฏิกิริยาและสามารถคงอยู่ในสภาพอนุมูลได้นาน แต่มีจำนวนน้อยชนิดมาก

ตัวอย่างของอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\bullet-}$) อนุมูลไฮดรอกซี ($^{\bullet}OH$) อนุมูลอัลคอกซี ($RO^{\bullet}$) และอนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี ($HO_2^{\bullet}$) อนุมูลเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก ขณะที่ไนตริกออกไซด์ (NO) หรืออนุมูลไนตริกออกไซด์ ($^{\bullet}NO$) อนุมูลวิตามินซี และอนุมูลวิตามินอี เป็นอนุมูลอิสระที่มีความไวสูงรองลงมา โดยที่อนุมูลอิสระมีทั้งในสภาวะที่เป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลอิสระที่มีประจุไฟฟ้าซึ่งมีทั้งที่มีประจุบวกและประจุลบ

อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระที่มีบทบาทในทางชีววิทยา แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, ROS) (โอภา, 2550)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ซึ่งเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมตามปกติในร่างกาย หรือเกิดจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมา เพื่อสู้กับเชื้อโรคบางชนิด และอนุมูลอิสระอีกหนึ่งประเภท คืออนุมูลอิสระที่มาจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งได้แก่ สารเคมีและสิ่งปนเปื้อนที่มากับอากาศที่เราหายใจเข้าไป สารเติมแต่งอาหาร สีผสมอาหาร สารเคมีปนเปื้อนในอาหาร สารกันบูด หรือสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเกษตร

8. วิธีการทดสอบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

จากการที่ร่างกายและเซลล์มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้หลายชนิด จึงมีระบบควบคุมป้องกันไม่ให้มีอนุมูลอิสระเกินสมดุลทำให้เกิดอันตราย ระบบป้องกันอันตรายจากอนุมูลประกอบด้วย (ก) สารขจัดอนุมูลอิสระ หรือสารต้านออกซิเดชัน ซึ่งมีทั้งสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น อัลบูมิน เฟอร์ริติน และสารมีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น วิตามินซี และกรดยูริก เป็นต้น และ (ข) เอนไซม์ขจัดอนุมูลอิสระซึ่งมีหลายชนิดด้วยกัน (โอภา, 2550)

การใช้ดัชนีจากการหาปริมาณสารต้านออกซิเดชันเดี่ยวๆ หรือการวัดปริมาณการเกิดชีวโมเลกุลที่ถูกอนุมูลอิสระทำให้เสียหายเป็นดัชนีวัดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลว่ามีระดับมากน้อยเพียงใดนั้น อาจจะไม่เป็นค่าที่สะท้อนถึงภาพรวมของภาวะออกซิเดชันของร่างกายหรือสารตัวอย่าง ดังนั้นจึงมีการหาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งเป็นการรวมองค์ประกอบทั้งหมดหรือภาวะรีดอกซ์โดยรวม และในการวิเคราะห์มีหลักการที่สำคัญคือ

1) การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (hydrogen atom transfer, HAT) เช่น วิธี ORAC (Oxygen radical absorbance capacity assay) และวิธี TRAP (total radical – trapping antioxidant parameter)

2) การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transfer, ET หรือ SET) ได้แก่วิธี FRAP (Ferric reducing antioxidant power assay) หรือวิธี TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity assay) เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.1 วิธี DPPH radical scavenging (DPPH)

การทดสอบนี้เป็นการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging method) โดยใช้สาร DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ หลักการ คือ อิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ (unpaired electron) ในโมเลกุลของอนุมูล DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 517 นาโนเมตร ทำให้มองเห็นเป็นสีม่วง และเมื่ออนุมูล DPPH ถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติเป็น hydrogen donor อนุมูล DPPH จะเปลี่ยนเป็น DPPH-H ดังสมการ

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

1, 1-diphenly-2-picrylhydrazyl free radical	antioxidant compound	stable molecule	free radical

โดยการได้รับไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนดังกล่าวจะทำให้อนุมูล DPPH สามารถดูดกลืนพลังงานแสงได้น้อยลง สารดังกล่าวจึงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะแปรผันกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้นการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH (สีอ่อนลง) บ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดหรือยับยั้งอนุมูลอิสระ (ปิยาภัทร, 2550; Brand-William *et al.*, 1995)

ข้อดีของวิธีนี้คือเป็นวิธีการที่ง่าย สะดวกรวดเร็ว จึงนิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารธรรมชาติ

ข้อเสียของวิธีการนี้คือ อนุมูล DPPH มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีการนี้จึงไม่สามารถใช้จัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้

8.2 วิธี ABTS radical scavenging (ABTS)

การทดสอบนี้เป็นวิธีวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Radical scavenging method) ซึ่งเป็นวิธีวัดทางอ้อม โดยใช้สาร 2, 2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid) (ABTS) ทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต เกิดเป็นอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีสีน้ำเงิน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เขียว ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ซึ่งก่อนการทดสอบจะทำการปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เป็น 0.70±0.02 เมื่อเติมสารที่ต้องการทดสอบซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน จะทำให้ปริมาณของอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ลดลง และทำให้สารละลายสีน้ำเงินเขียวจางลง (สุพิศา, 2547; Reberta *et al.,* 1999)

ข้อดีของวิธีการนี้คือ ทำได้ง่าย อนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ละลายได้ทั้งในน้ำและสารละลายอินทรีย์

ข้อเสียของวิธีการนี้คือไม่เป็นสารธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลในเซลล์หรือร่างกาย

8.3 วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

การทดสอบนี้เป็นการวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนหรือวัดความสามารถในการรีดิวซ์ของสารตัวอย่าง (reducing power) โดยสารที่เป็นรีดิวซิงเอเจนต์ สามารถจ่ายอิเล็กตรอนให้กับอะตอมหรือโมเลกุลในตระกูลของโลหะที่สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้ (เช่น เหล็ก ทองแดง เป็นต้น) หลักการคือ เหล็กในรูปเฟอร์ริคไอออน (Fe^{3+}) มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนจากสารอื่นๆได้ดี โดยจะอยู่ในรูปของสารละลายสีเหลือง เมื่อถูกรีดิวซ์หรือได้รับอิเล็กตรอนจากสารตัวอย่างจะอยู่ในรูปเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสารละลายน้ำเงินเขียว ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร (Arulpriya *et al.,* 2010) ดังสมการ

$$\text{potassium ferricyanide + ferric chloride} \xrightarrow{\text{antioxidant}} \text{potassium ferrocyanide + ferrous chloride}$$

ค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผันตามความเข้มข้นของเฟอรัสไอออนที่เกิดขึ้น ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงจะบ่งบอกถึงความสามารถในการเป็นรีดิวซิงเอเจนต์หรือแสดงถึงความสามารถในการลดทอนฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ (ปรียนันท์, 2549; Thaipong *et al.,* 2006; Zhang *et al.,* 2010)

ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ค่าใช้จ่ายน้อย รวดเร็ว ขั้นตอนในการทดสอบง่าย มีความสามารถในการทำซ้ำได้ดี (reproducibility)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสียคือกลไกของปฏิกิริยาที่ใช้ในการวัดไม่เกี่ยวข้องกับกลไกในร่างกาย

8.4 วิธี Hydrogen peroxide (H_2O_2) scavenging

Hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นสารที่เกิดขึ้นในระบบของสิ่งมีชีวิต (Macdonald-Wicks *et al.,* 2006) สามารถเกิดขึ้นได้จากหลายปฏิกิริยา มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาสูง (reactive species, RS) มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive oxygen species, ROS) (โอภา และคณะ, 2550) ทั้งตัวของ hydrogen peroxide เองยังมีคุณสมบัติผ่านเมมเบรนและเข้าไปออกซิไดซ์สร้างความเสียหายให้แก่สารภายในเซลล์ได้ นอกจากนี้ hydrogen peroxide ยังเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระที่สำคัญ เช่น อนุมูลไฮดรอกซิล ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีความรุนแรงและมีความไวในการทำปฏิกิริยาสูง จึงมีความเป็นพิษหรืออันตรายต่อเซลล์มากกว่า (Samoijlik *et al.,* 2010; Bhatia *et al*., 2011) ดังนั้นการกำจัด hydrogen peroxide ออกจากระบบจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ ทั้งนี้เพื่อป้องกันในเรื่องของสุขภาพชีวิต รวมไปถึงการป้องกันการเสื่อมในระบบของอาหารและยา (Gulcin *et al.,* 2006; Nabavi *et al.,* 2009; Samoijlik *et al.,* 2010)

ในการศึกษาความสามารถในการกำจัด hydrogen peroxide ทำได้โดยเตรียมสารละลาย hydrogen peroxide ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ ที่ระยะเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร (Dehpour *et al*., 2011)

ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ขั้นตอนในการทดสอบง่าย ไม่ซับซ้อน ใช้เวลาในการทดสอบน้อย

ข้อเสีย คือ ไม่สามารถทำได้ที่ความเข้มข้นสูงๆ เนื่องจากจะเกิดความขุ่นและไม่สามารถวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุภิญญา และคณะ (2548) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าเปราะหอม (*Kaempferia galanga*) ที่กลั่นด้วยน้ำ พบสารสำคัญหลักคือ ethyl-*p*-methxycinnamate ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยวิธี Agar disc diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าเปราะหอมมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์หลายชนิด โดยค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 8.0 - 31.0 มิลลิเมตร และจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถต้านการเกิดอนุมูลอิสระได้

Devkatte *et al.* (2005) ทำการคัดเลือกพืชน้ำมันหอมระเหย 38 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* 4 สายพันธุ์ โดยวิธี Agar plate dilution พบว่ามี 23 ชนิดของพืชที่คัดเลือกแสดงฤทธิ์ยับยั้ง โดยที่ตะไคร้ (lemongrass) เป็นพืชที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยใบกานพลู อบเชย ตามลำดับ จากนั้นศึกษาค่า MIC และ MFC ของพืชที่ทำการทดสอบด้วยวิธี Broth dilution โดยแบ่งการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยออกเป็นสามกลุ่มคือ กลุ่มที่มีฤทธิ์มาก กลุ่มที่มีฤทธิ์ปานกลาง และกลุ่มที่มีฤทธิ์น้อย พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่แสดงฤทธิ์มากที่สุดได้แก่ น้ำมันหอมระเหยอบเชย (cinnamon) ตะไคร้ (lemongrass) กานพลู (clove) สะระแหน่ญี่ปุ่น (japanese mint) เจอราเนียม (geranium) มอเทีย โรชา (motia rosha) และจินเจอร์กลาส (ginger grass) โดยมีค่า MIC และ MFC ในช่วงร้อยละ 0.01 – 0.15 ในส่วนของกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลางจะมีค่า MIC และ MFC ในช่วงร้อยละ 0.16 -1.0 โดยมีน้ำมันหอมระเหยในกลุ่มนี้ 8 ชนิดด้วยกัน และกลุ่มสุดท้ายคือกลุ่มที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งน้อยจะมีค่า MIC และ MFC มากกว่าร้อยละ 1.0 ขณะที่น้ำมันหอมระเหยอีก 15 ชนิดไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำการทดสอบ

Prabuseenivasan *et al.* (2006) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 21 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิด คือ *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *Klebsiella pneumonia* โดยวิธี Agar disc diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหย 19 ชนิดแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ โดยน้ำมันหอมระเหยอบเชย (cinnamon oil) กานพลู (clove oil) เจอราเนียม (geranium oil) เลมอน (lemon oil) มะนาว (lime oil) ส้ม (orange oil) และโรสแมรี (rosemary oil) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อมากที่สุด มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.8 – 12.8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Akin-Osanaiye *et al*. (2007) ทำการทดสอบประสิทธิภาพการต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) และยูคาลิปตัส 2 ชนิด คือ *Eucalyptus citriodora* และ *Eucalyptus camadulensis* ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *Salmonella typhimurium* และ *E. coli* พบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทั้งสามชนิดได้ดีที่สุด ส่วนน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัสมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. typhimurium* และ *S. aureus* ได้ดี ตามลำดับ

Oussalah *et al.* (2007) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร 28 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. typhimurium* และ *S. aureus* พบว่าน้ำมันหอมระเหยไธม์จากสเปน (*Corydothymus capitatus*) อบเชยจีน (*Cinnamomum cassia*) ออริกาโน (*Origanum heracleoticum*) วินเทอร์ ซาโวรี่ (*Satureja montana*) และส่วนเปลือกของอบเชย (*Cinnamomum verum*) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบได้ดี

Gupta *et al.* (2008a) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสีย โดยวิธี Agar well diffusion พบว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชยและกานพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดีที่สุด รองลงมาคือ สะระแหน่และยูคาลิปตัส และต่อมา Gupta *et al.* (2008b) ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอบเชยในรูปน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบ โดยพบว่าอบเชยที่อยู่ในรูปน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบสูงว่าอบเชยที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบ โดยปริมาณต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยอบเชยที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อ คือ ร้อยละ 1.25 ซึ่งสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ cinnamaldehyde โดยจะไปจับกับโปรตีน ป้องกันการเกิด amino acid decarboxylation ของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร

Silva *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ (lemongrass) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida* ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Disc diffusion ที่ระดับความเข้มข้น 2, 4 และ 8 ไมโครลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 2 ไมโครลิตรแสดง inhibition zone ใกล้เคียงกับ 20 ไมโครลิตรของยาปฏิชีวนะ Nystatin ที่ 4 และ 8 ไมโครลิตรยังแสดง inhibition zone สูงกว่ายาปฏิชีวนะอีกด้วย โดยน้ำมันหอมระเหยตะไคร้สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด โดยแสดง inhibition zone มากกว่า 35 มิลลิเมตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปทุม และคณะ (2550) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรที่นิยมใช้ในครัวเรือนไทย ได้แก่ กระเพา (holy basil) ตะไคร้ (lemongrass) ตะไคร้หอม (citronella) ผลมะกรูด (kaffir lime) ใบมะกรูด (kaffir lime leaf) พริกไทยดำ (black pepper) โหระพา (sweet basil) และ พฤกษเคมีบางชนิดที่เป็นองค์ประกอบของสมุนไพรที่ได้ใช้ในการทดสอบ คือ bomeol และ geraniol ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยการเปรียบเทียบค่า MIC ด้วยวิธี Agar dilution พบว่า geraniol และน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาได้ดีที่สุดโดยมีค่า MIC อยู่ในช่วงร้อยละ 0.04 - 0.08 และ 0.1- 0.5 ตามลำดับ

Khalid and Kiong (2010) ทำการศึกษาน้ำมันหอมระเหยที่เป็นพืชสมุนไพรของมาเลเซียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อยีสต์ และเชื้อรา พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู (clove) แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด ในส่วนของเชื้อยีสต์ พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและตะไคร้ (lemongrass) แสดงฤทธิ์ยับยั้ง และน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรที่ทำการทดสอบไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้

Sokovic *et al.* (2010) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสมุนไพรที่ใช้บริโภคทั่วไป ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในคน พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่แสดงฤทธิ์สูงที่สุดสามารถยับยั้งเชื้อที่ทำการทดสอบได้หลายชนิด คือ น้ำมันหอมระเหยออริกาโน (*Origanum vulgare*) สารสำคัญหลัก คือ carvacrol โดยน้ำมันหอมระเหยจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดรู จึงเกิดการสูญเสียสารอาหาร และเอนไซม์ที่สำคัญ ทำให้เซลล์ตาย

นอกจากมีการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในรูปของเหลวหรือเรียกอีกแบบว่าการทดสอบฤทธิ์ทางตรงแล้ว ยังมีการทดสอบน้ำมันหอมระเหยในรูปของไอระเหยหรือการทดสอบฤทธิ์ทางอ้อมด้วย ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Inouye *et al.* (2006) ได้ทำการทดสอบไอของ terpenoid quinines และน้ำมันหอมระเหย 72 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* โดยวิธี Box vapor พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบหลักมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมากที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยที่มีแอลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบหลักและน้ำมันหอมระเหยที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบหลัก ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nedorostova *et al.* (2009) ทำการทดสอบไอของน้ำมันหอมระเหย 27 ชนิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 5 ชนิดคือ *E. coli, L. monocytogenes, Salmonella enteritidis, S. aureus* และ *P. aeruginosa* โดยวิธี Agar vapor พบว่าน้ำมันหอมระเหยฮอสแรดิช (*Armoracia rusticana*) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยกระเทียม (*Allium sativum*) และน้ำมันหอมระเหยออริกาโน (*Origanum vulgare*) ตามลำดับ และงานวิจัยที่คล้ายกันคือ Lopez *et al*. (2005) ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ เชื้อยีสต์ และเชื้อรา ของไอน้ำมันหอมระเหย 6 ชนิด คือ โหระพา ขิง อบเชย กานพลู (*Syzygium aromaticum*) โรสแมรี่ (*Rosmarinus officinalis*) และผักชีลาว (*Anethum graveolens*) พบว่าไอน้ำมันหอมระเหยของอบเชยและกานพลูมีฤทธิ์ที่ดีในทุกเชื้อที่ทดสอบ ในขณะที่ไอน้ำมันหอมระเหยของโรสแมรี่และโหระพาไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่ทำการทดสอบ

จักรพันธ์ และคณะ (2549) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชในวงศ์ *Zingiberaceae* ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ ข่า ขมิ้นชัน ขมิ้นขาว ไพล ไพลดำ โดยในพืชแต่ละชนิดได้ทำการศึกษาสารสกัด 3 อย่างด้วยกันได้แก่ สารสกัดน้ำ สารสกัดแอลกอฮอล์ ทำการสกัดโดยวิธีการ continuous extraction และน้ำมันหอมระเหยเตรียมโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (2,2’-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) เปรียบเทียบกับ Trolox (milligram of trolox per gram of sample) ผลการทดลองพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอลกอฮอล์ของขมิ้นชัน น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดน้ำของไพล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในแต่ละกลุ่ม โดยมีค่าเท่ากับ 187.543, 56.469 และ 32.058 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ

ปิยะฉัฐ (2549) ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจาก เทียนข้าวเปลือก เปราะหอม และอบเชย โดยวิธี 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazil radical (DPPH) พบว่า พืชทั้ง 3 ชนิดแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมโดยเทคนิค gas chromatography-mass spectoscopy (GC-MS) พบว่าน้ำมันหอมระเหยมีองค์ประกอบหลักทางเคมี คือ trans-anethole, pentadecane และ cinnamaldehyde ตามลำดับ

จุรีพร และคณะ (2552) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ รวมทั้งองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะนาว (*Citrus aurantifolia*) โดยสกัดน้ำมันหอมระเหย ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วย gas chromatography-mass

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

spectrometry (GC-MS) ได้น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 0.53 สารประกอบหลักได้แก่ limonene (ร้อยละ 29.5), geranial (ร้อยละ 24.0), neral (ร้อยละ 18.6), geraniol (ร้อยละ 4.7) ตามลำดับ นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยแสดงค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 165.82 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธีการยับยั้ง 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazil radical (DPPH) และยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ได้แก่ *E. coli* *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* และ *Aspergillus flavas* โดยวิธี Agar diffusion

Wongwattananukul *et al.* (2006) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย (essential oil) และสารหอม (absolute) จากพืชหอมและเครื่องเทศไทย ซึ่งมาจากพืช 12 วงศ์ จำนวน 19 ชนิด โดยวิธี 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ trolox, quercetin และ kaempferol พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากกระเพามีฤทธิ์ดีที่สุด (*Ocimum Sanctum* Linn., โดยแสดงค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 0.6294 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมาคือ น้ำมันไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb., IC_{50} เท่ากับ 1.0599 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และน้ำมันขิง (*Z. officinale*, IC_{50} เท่ากับ 4.385 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในส่วนของสารหอมจากดอกไม้ พบว่า สารหอมจากดอกสารภีมีฤทธิ์ดีที่สุด (*Mammea Siamemsis* Kosterm., IC_{50} เท่ากับ 0.3271 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมาคือ ดอกจำปี (*Michelia alba*, IC_{50} เท่ากับ 0.7155 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และดอกลีลาวดี (*Plumeria alba*, IC_{50} เท่ากับ 1.0766 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

Politeo *et al.* (2006) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ 12 ชนิด โดยทำการทดสอบ 4 วิธี คือ 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Ferric reducing antioxidant power (FRAP), Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) และ Oxidative stability of fat จากผลการทดลองสามารถเรียงลำดับในการต้านอนุมูลอิสระของเครื่องเทศทั้ง 12 ชนิดจากมากไปหาน้อย ดังนี้ clove (*Syzygium aromaticum* L.) > basil (*Ocimum basilicum* L.) > laurel (*Laurus nobilis* L.) > coriander (*Coriandrum sativum* L.) > nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) > black pepper (*Piper nigrum* L.) > everlast (*Helichrysum italicum* G. (Roth) Don) > mint (*Mentha piperita* L.) > marjoram (*Marjorana hortensis* Moench.) > cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Nees) > sage (*Salvia officinalis* L.) > fennel (*Foeniculum vulgare* Muller)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Schmidt *et al*. (2006) ทำการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากใบของอบเชย (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) จากศรีลังกาด้วยวิธี gas chromatography - flame ionization detector และ GC-MS พบสาร eugenol (ร้อยละ 74.9), caryophyllene (ร้อยละ 4.1), benzyl benzoate (ร้อยละ 3.0), linalool (ร้อยละ 2.5), eugenyl acetate (ร้อยละ 2.1) และ cinnamyl acetate (ร้อยละ 1.8) และได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบของอบเชยสามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าสารมาตรฐานซึ่งได้แก่ eugenol, butylated hydroxytoluene (BHT) และ butylated hydroxyanisole (BHA) อีกทั้งยังสามารถยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลและสามารถจับกับเหล็กได้ดี และยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมัน

Singh *et al.* (2009) ทำการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากใบของยูคาลิปตัส (*Eucalyptus tereticornis*) 2 แบบ คือ ใบสด (fresh) และใบที่หลุดร่วง (decaying) ซึ่งพบสารหลักของน้ำมันหอมระเหยในใบสด คือ α-pinene และ 1,8-cineole ขณะที่ใบที่หลุดร่วงนั้น พบ β-citronellal, isopulegol และ β-citronellol และทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), วิธี hydroxyl ($OH^{\cdot}$) radical และวิธี superoxide anion ($O_2^{-\cdot}$) จากผลการทดลองพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากส่วนของใบทั้งสองแบบนั้น แสดงฤทธิ์ที่ดีต่อการยับยั้งอนุมูล $DPPH^{\cdot}$ โดยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 110 และ 139.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นที่ 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งอนุมูล $OH^{\cdot}$ และอนุมูล $O_2^{-\cdot}$ ได้

Viuda-Martos *et al.* (2010) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอาหารเมดิเตอร์เรเดียน 5 ชนิด ได้แก่ ออริกาโน (*Origanum vulgare*) ไทม์ (*Thymus vulgaris*) โรสแมรี่ (*Rosmarinus offi cinalis*) เสจ (*Salviaoffi cinalis*) และกานพลู (*Syzygium aromaticum*) โดยพบว่า น้ำมันหอมระเหยกานพลูแสดงฤทธิ์สูงที่สุดในการยับยั้งอนุมูล $DPPH^{\cdot}$ (ร้อยละ 98.74) และยังมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงที่สุด ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากไทม์ แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันสูงสุด (ร้อยละ 89.84) ในส่วนการทดสอบความสามารถในการจับเหล็กนั้น พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ทำการทดสอบทั้งหมดแสดงความสามารถในการจับเหล็ก โดยที่น้ำมันหอมระเหยโรสแมรี สามารถจับเหล็กได้ดีที่สุด (ร้อยละ 76.06) ส่วนน้ำมันหอมระเหยออริกาโนนั้นแสดงความสามารถในการยับยั้งการเกิดความหืนในไขมันได้ดีที่สุดในการทดสอบด้วยวิธี Rancimat test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Gulcin *et al.* (2010) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู โดยทำการทดสอบด้วยกัน 7 วิธี ได้แก่ DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, Ferric thiocyanate, Reducing power, Superoxide anion radical scavenging Hydrogen peroxide scavenging (H_2O_2) และ Ferrous ions (Fe^{2+}) chelating activities จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ของกรดไขมันลิโนเลอิกได้ถึงร้อยละ 97.3 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), α-tocopherol และ trolox ที่ความเข้มข้น 45 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสามารถยับยั้งได้ร้อยละ 95.4, 99.7, 84.6 และ 95.6 ตามลำดับ นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูยังมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล $DPPH^{\cdot}$, $ABTS^{\cdot+}$, $O_2^{-\cdot}$ และ H_2O_2 รวมไปถึงความสามารถในการจับเหล็กและการเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) (Tomy model sS-325, Japan)

1.2 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (Vortex genie-2 model G-560E, USA)

1.3 เครื่องชั่งแบบละเอียด (Model Dragon 204, Mettler Toledo, Spain)

1.4 ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย (Clevenger apparatus)

1.5 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงช่วงยูวีวิสิเบิล (UV-vis Spectrophotometer) (Model T60U, Bangkok high lab, Thailand)

1.6 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Model UM-500, Memmert, Germany)

1.7 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) (Model BM-500, Memmert, Germany)

1.8 เครื่องกวนสารให้ความร้อน แบบแท่งแม่เหล็ก (Hotplate stirrer magnetic) (Model SP46920, Thermolyne, USA)

1.9 ไมโครปิเปต ขนาด 1-10 ไมโครลิตร, ขนาด 20-100 ไมโครลิตร, ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร และขนาด 1000-5000 ไมโครลิตร (Micropipette) (Boeco, Germany)

1.10 เครื่องวัดพีเอช (pH mether) (Model 420A, Orion Research Inc., USA)

1.11 เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (Rotary Evaporator) (Model R-124, Buchi, Switzerland)

1.12 จานเพาะเชื้อ (Petri dish) (Anumba, Germany)

1.13 จานหลุม 96 well (96-well microplate) (Corning Incorporated, USA)

1.14 กระดาษกรองเบอร์ 1 (Filter papers) (Whatman, England)

2. สารเคมี

2.1 เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (ethanol) (Commercial grad, Thailand)

2.2 เมทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (methanol) (J.T. Baker, USA)

2.3 Tween 80 (Ajax Finechem, Australia)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.4 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Ajax Finechem, Australia)

2.5 แบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2$) (Ajax Finechem, Australia)

2.6 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) (Merck, Germany)

2.7 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) (Merck, Germany)

2.8 บิวทิเลทไฮดรอกซีโทลูอีน (BHT) (Panreac Quimica SA, Spain)

2.9 2,2'- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Germany)

2.10 2,2'- azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (Sigma-Aldrich, Germany)

2.11 โพแทสเซียม เปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) (Lobachemie, India)

2.12 ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Ajax Finechem, Australia)

2.13 เฟอร์รัส คลอไรด์ ($FeCl_2$) (Sigma-Aldrich, Germany)

2.14 โพแทสเซียม เฟอร์ริไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$) (Fisher scientific, India)

2.15 ไตรคลอโรอะซิติก แอซิด (CCl_3COOH) (Merck, Germany)

2.16 แอลฟา-โทคอฟีรอล (α-tocopherol) (Sigma, Germany)

2.17 แอสคอร์บิค แอซิด (ascorbic acid) (Rankem, India)

2.18 ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) (Commercial grad, Thailand)

2.19 โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) (Merck, Germany)

3. เชื้อจุลินทรีย์

3.1 *Staphylococcus aureus* TISTR 029 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

3.2 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.3 *Pseudomonas aeruginosa* ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการจัดตั้งสายวิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

3.4 *Escherichia coli* ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการจัดตั้งสายวิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

3.5 *Candida albicans* ATCC 10231 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

4.1 Brian heart infusion (Oxoid, England)

4.2 Beef extract (Himedia, India)

4.3 Peptone (Merck, Germany)

4.4 Agar (Pear mermaid, Thailand)

วิธีการ

1. การคัดเลือกพืชสมุนไพร

คัดเลือกพืชสมุนไพรอย่างน้อย 15 ชนิด ที่มีประวัติในการเป็นสารฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคจากแหล่งข้อมูลทุติยภูมิ

2. การสกัดน้ำมันหอมระเหย

2.1 สกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี Clevenger hydro-distillation

2.2 ทำการเก็บตัวอย่างสมุนไพรที่คัดเลือกจากข้อ 1 นำส่วนต่างๆ ของพืชที่คัดเลือกมาล้างทำความสะอาด บดหรือหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ผึ่งให้แห้ง และนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (กรณีใช้ตัวอย่างแห้งในการสกัด) จนน้ำหนักคงที่

2.3 นำตัวอย่างพืชบรรจุลงภาชนะแก้วก้นกลมในชุดกลั่น เติมน้ำพอท่วม ไอน้ำที่เกิดจากการให้ความร้อนที่แทรกอยู่กับพืช จะเป็นตัวพาน้ำมันหอมระเหยจากพืช ไปยังบริเวณควบแน่น (condenser) แล้วกลั่นตัวเป็นของเหลว ของเหลวที่ได้จะเป็นน้ำมันหอมระเหยที่ผสมอยู่กับน้ำ เก็บของเหลวที่ได้ไปแยกน้ำมันหอมระเหยต่อไป

2.4 การแยกน้ำมันหอมระเหย โดยใส่ของเหลวที่ได้จากการสกัด ในกรวยแยกแล้วเติมไดคลอโรมีเทน และโซเดียมซัลเฟต ชนิดปราศจากน้ำ (anhydrous) ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น หลังจากนั้นกรองโซเดียมซัลเฟตออกด้วยกระดาษกรอง และระเหยไดคลอโรมีเทน ออกด้วยเครื่องระเหย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) เก็บน้ำมันหอมระเหยที่ได้ในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส จนกว่าจะเริ่มทดสอบ

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยในสถานะของเหลว

3.1 วิธี Agar disc diffusion

3.1.1 เลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแต่ละชนิดลงในอาหาร nutrient agar ยกเว้น *S. epidermidis* ใช้อาหาร brain heart infusion agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในน้ำเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland ระดับ 0.5 (เชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml)

3.1.2 ใช้ไม้พันสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในหลอดเชื้อข้อ 3.1.1 นำมาป้าย (swab) ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร nutrient agar จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งหมาดๆ ประมาณ 3-5 นาที

3.1.3 หยดน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่างๆ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 และ 5.00 โดยปริมาตร) 5 ไมโครลิตรลงบนกระดาษกรอง (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว คีบกระดาษกรองวางลงบนอาหารที่ผ่านการป้ายเชื้อเรียบร้อยแล้ว กดเบาๆ เพื่อให้กระดาษกรองติดอาหารทั้งแผ่น โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละระดับความเข้มข้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1.4 ใช้ Ampicillin sodium 30 ไมโครกรัมต่อ disc และ Tetracycline hydrochloride 30 ไมโครกรัมต่อ disc เป็น positive control สำหรับเชื้อแบคทีเรีย สำหรับเชื้อยีสต์ใช้ Amphotericin B 20 ไมโครกรัมต่อ disc และใช้ Dimethyl sulfoxide เป็น negative control

3.1.5 ตรวจดู inhibition zone ที่เกิดขึ้นแล้วหาค่าเฉลี่ยของ inhibition zone

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 วิธี Agar well diffusion

3.2.1 เลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแต่ละชนิดลงในอาหาร nutrient agar ยกเว้น *S. epidermidis* ใช้อาหาร brain heart infusion agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในน้ำเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland ระดับ 0.5 (เชื้อประมาณ 1.5 x 10^8 CFU/ml)

3.2.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar และ brain heart infusion agar มาเจาะหลุมขนาด 6.0 มิลลิเมตร ใช้ไม้พันสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจุ่มในหลอดเชื้อข้อ 3.2.1 นำมาป้าย (swab) ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งหมาดๆ ประมาณ 3-5 นาที

3.2.3 ปิเปตน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 และ 5.00 โดยปริมาตร) ลงในหลุม หลุมละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 ซ้ำในแต่ละระดับความเข้มข้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.4 ใช้ Ampicillin sodium 30 ไมโครกรัมต่อหลุม และ Tetracycline hydrochloride 30 ไมโครกรัมต่อหลุม เป็น positive control สำหรับเชื้อแบคทีเรีย สำหรับเชื้อยีสต์ใช้ Amphotericin B 20 ไมโครกรัมต่อหลุม และใช้ Dimethyl sulfoxide เป็น negative control

3.2.5 ตรวจดู inhibition zone ที่เกิดขึ้นแล้วหาค่าเฉลี่ยของ inhibition zone

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยในสถานะไอระเหยโดยวิธี Vapor diffusion (Tyagi and Malik, 2010)

4.1 เลี้ยงเชื้อที่ทดสอบแต่ละชนิดลงในอาหาร nutrient agar ยกเว้น *S. epidermidis* ใช้อาหาร brain heart infusion agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในน้ำเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland ระดับ 0.5 (เชื้อประมาณ 1.5 x 10^8 CFU/ml)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 ใช้ไม้พันสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจุ่มในหลอดเชื้อข้อ 4.1 นำมาป้าย (swab) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารจากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งหมาดๆ ประมาณ 3-5 นาที

4.3 ทำการติดกระดาษกรองกับส่วนฝาของจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทปกาว เพื่อให้กระดาษกรองอยู่กับที่ไม่เคลื่อนย้าย จากนั้นปิเปตน้ำมันหอมระเหย 5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นร้อยละ 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 และ 5.00 โดยปริมาตร) ลงบนกระดาษกรอง (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละระดับความเข้มข้น

4.4 ใช้พาราฟิล์ม ปิดส่วนฝาและตัวของจานอาหาร เพื่อป้องกันไอระเหยของน้ำมันหอมระเหยรั่วออกมา

4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.6 ตรวจดู inhibition zone ที่เกิดขึ้นแล้วหาค่าเฉลี่ยของ inhibition zone

5. การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดเฉพาะสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีโดยวิธี 96 well micro plate dilution (Tyagi and Malik, 2010)

5.1 เตรียม stock solution ของ Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 โดยปริมาตร (ช่วยให้น้ำมันหอมระเหยกับอาหาร nutrient broth ผสมเข้ากันได้ดี) ยกเว้น *C. albicans* ใช้ Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร

5.2 เตรียมเชื้อทดสอบที่ความขุ่นของเซลล์เท่ากับ McFarland ระดับ 0.5 (เชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml)

5.3 เจือจางน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจีนด้วย stock solution ของ Tween 80 ในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.4 หลังจากนั้นปิเปตอาหาร nutrient broth ปริมาตร 90 ไมโครลิตร เชื้อทดสอบ 10 ไมโครลิตรและน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ ที่ทำการเจือจางแล้ว 100 ไมโครลิตรลงในหลุม ซึ่งในแต่ละความเข้มข้นที่ทดสอบจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.5 ใช้ Ampicillin sodium และ Tetracycline hydrochloride เป็น positive control สำหรับเชื้อแบคทีเรีย สำหรับเชื้อ *C. albicans* ใช้ Amphotericin B และ Tween 80 เป็น negative control

5.6 ตรวจผลโดยดูจากความขุ่น (เทียบจาก positive control และ negative control)

6. การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย

6.1 วิธี DPPH radical scavenging activity (DPPH assay) (Dasgupta and De, 2004)

6.1.1 เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้นร้อยละ 0.004 โดยมวล/ปริมาตร ในเมทานอล

6.1.2 เจือจางน้ำมันหอมระเหยในเมทานอล ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

6.1.3 ปิเปตน้ำมันหอมระเหยที่ทำการเจือจาง 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH 3 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

6.1.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง

6.1.5 ใช้เมทานอล แทนสารตัวอย่างเพื่อใช้เป็นแบลงค์ และ butylhydroxytoluene (BHT) ascorbic acid และ α- tocopherol เป็น positive control

6.1.6 คำนวณร้อยละของการยับยั้งการเกิดสีของสารตัวอย่าง

$$\text{ร้อยละการยับยั้งการเกิดสี} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของแบลงค์} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของแบลงค์}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2 วิธี ABTS radical scavenging activity (ABTS assay) (ดัดแปลงจาก สุพิศา, 2547)

6.2.1 เตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

6.2.2 เจือจางน้ำมันหอมระเหยในเมทานอล ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

6.2.3 นำสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ในข้อ 6.2.1 มาเจือจางด้วยเมทานอลให้มีค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.70±0.02

6.2.4 ปิเปตสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ที่เจือจางแล้ว 2 มิลลิลิตรผสมกับน้ำมันหอมระเหยที่เจือจางปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ เมทานอล 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่มืด 10 นาที

6.2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

6.2.6 ใช้เมทานอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แทนสารตัวอย่างเพื่อใช้เป็นแบลงค์ และ butylhydroxytoluene (BHT) ascorbic acid และ α- tocopherol สำหรับเป็น positive control

6.2.7 คำนวณร้อยละของการยับยั้งของการเกิดสีของสารตัวอย่าง

$$\text{ร้อยละยับยั้งการเกิดสี} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของแบลงค์} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของแบลงค์}} \times 100$$

6.3 วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay) (Zhang *et al*., 2010)

6.3.1 เจือจางน้ำมันหอมระเหยในเมทานอล ให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.2 มิลลิลิตร ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมล/ลิตร pH 7.2 และ 1 มิลลิลิตรของโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.3.2 หลังจากนั้นใส่ ไตรคลอโรอะซิติก แอซิด ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวล/ปริมาตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นทำมาปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที

6.3.3 นำสารส่วนบนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับเฟอริกคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.35 โดยมวล/ปริมาตร ปริมาตร 0.35 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

6.3.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

6.3.5 ใช้เมทานอล แทนสารตัวอย่างเพื่อใช้เป็นแบลงค์ และ butylhydroxytoluene (BHT) ascorbic acid และ α- tocopherol สำหรับเป็น positive control

6.4 วิธี Hydrogen peroxide scavenging (H_2O_2 assay) (Dehpour *et al*., 2011)

6.4.1 เตรียมสารละลาย hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร (pH 7.4)

6.4.2 เจือจางน้ำมันหอมระเหยในเมทานอล ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

6.4.3 ปิเปตน้ำมันหอมระเหยที่เจือจางปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย hydrogen peroxide ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

6.4.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

6.4.5 ใช้เมทานอล แทนสารตัวอย่างเพื่อใช้เป็นแบลงค์ และ butylhydroxytoluene (BHT) ascorbic acid และ α- tocopherol สำหรับเป็น positive control

6.4.6 คำนวณร้อยละของการยับยั้ง hydrogen peroxide (H_2O_2) ของสารตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ร้อยละการยับยั้ง H_2O_2 = $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของแบลงค์ – ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของแบลงค์}}$ x 100

7. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และใช้สถิติวิเคราะห์สหสัมพันธ์ด้วยวิธีของเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16.0 for Windows

8. สถานที่ทำการทดลอง

8.1 ห้องปฏิบัติการพฤกษศาสตร์ สายวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

8.2 ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สายวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

8.3 ห้องปฏิบัติการกลาง ศูนย์ส่งเสริมการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยี (ศสวท) คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

9. ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

การทดลองนี้เริ่มตั้งแต่ มิถุนายน 2553 สิ้นสุดเดือนมิถุนายน 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การคัดเลือกพืชสมุนไพร

จากการศึกษาคุณสมบัติของพืชสมุนไพรที่มีประวัติในการเป็นสารฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคจากแหล่งข้อมูลทุติยภูมิ พบว่ามีพืชสมุนไพร 15 ชนิด ที่สนใจนำมาศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ เทียนข้าวเปลือก (*Foeniculum vulgare* Mill.) ผักชี (*Coriandrum sativum* Linn.) จันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) เปราะหอม (*Kaempferia galanga* Linn.) ว่านน้ำ (*Acorus calamus* Linn.) กานพลู (*Eugenia caryophyllus*) พลู (*Piper betel* Linn.) มะนาว (*Citrus aurantifolia* Swing.) อบเชยจีน (*Cinnamomum cassia* Blume.) ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* L.) ตะไคร้หอม (*Cymbopogon nardus* L.) แฝกหอม (*Vetiveria zizanoides*) ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus globules* Labill.) มะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) และสน (*Pinus sylvestris*) โดยพืชที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ จำพวกแบคทีเรีย และรา ได้แก่ เทียนข้าวเปลือก ผักชี จันทน์เทศ เปราะหอม ว่านน้ำ กานพลู พลู มะนาว อบเชยจีน ตะไคร้ ตะไคร้หอม แฝกหอม ยูคาลิปตัส มะกรูด และสน นอกจากมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์แล้ว พืชที่คัดเลือกยังมีฤทธิ์อื่นๆ อีก เช่น เปราะหอม มีฤทธิ์กระตุ้นประสาทส่วนกลาง ต้านการอักเสบ รักษาอาการปวดท้องในผู้หญิง โรคไขข้ออักเสบ ต้านมะเร็ง มะนาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยูคาลิปตัส มีฤทธิ์ระงับอาการปวด ตะไคร้หอม มีความสามารถในการฆ่าแมลง เป็นต้น (ตารางที่ 1)

2. การสกัดน้ำมันหอมระเหย

คัดเลือกพืชสมุนไพรทั้งหมด 15 ชนิด โดยทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร 10 ชนิด ด้วยวิธี Clevenger hydro-distillation พบว่า กานพลูให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหย เท่ากับ 13.68 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ตะไคร้ มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหย เท่ากับ 3.33 เปอร์เซ็นต์ และเปราะหอม มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหย เท่ากับ 1.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับพืชที่ให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยน้อยที่สุดคือ มะนาว มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหย เท่ากับ 0.19 เปอร์เซ็นต์ และพืชสมุนไพรอีก 5 ชนิด คือ ตะไคร้หอม ยูคาลิปตัส มะกรูด แฝกหอม และสน ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเครื่องหอมไทยจีน จำกัด (ตารางที่ 2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 สรรพคุณของพืชสมุนไพร 15 ชนิด

ลำดับที่	พืช	สรรพคุณ
1	เทียนข้าวเปลือก (*Foeniculum vulgare* Mill.)	ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา (Gulfraz *et al.,* 2008; Anwar *et al*., 2009)
2	ผักชี (*Coriandrum sativum* Linn.)	ต้านจุลินทรีย์ (Delaquis *et al.,* 2002)
3	จันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.)	ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Dorman and Deans, 2000; Gupta *et al.*, 2008a)
4	เปราะหอม (*Kaempferia galanga* Linn.)	ต้านจุลินทรีย์ (Tungtrongjit, 1978; Tewtrakul *et al*., 2005) กระตุ้นประสาทส่วนกลาง (Mokkhasmit *et al*.,1971) ต้านการอักเสบ รักษาอาการปวดท้องในผู้หญิง โรคไขข้ออักเสบ (Hirschhornn, 1983) ต้านมะเร็ง (Zheng *et al*., 1993)
5	ว่านน้ำ (*Acorus calamus* Linn.)	ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Radusiene *et al*., 2008)
6	กานพลู (*Eugenia caryophyllus*)	ต้านเชื้อแบคทีเรีย (ณิชากรและคณะ, 2546; Nanasombat and Lohasupthawee, 2005; Gupta *et al.*, 2008a)
7	พลู (*Piper betel* Linn.)	ต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านเชื้อรา (อุไรวรรณและคณะ, 2546; อุดมเอกและคณะ, 2547)
8	มะนาว (*Citrus aurantifolia* Swing.)	ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา และต้านอนุมูลอิสระ (จุรีพรและคณะ, 2552)
9	อบเชยจีน (*Cinnamomum cassia* Blume.)	ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Oussalah *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2008b)
10	ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* L.)	ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา (Adegoke and Odesola, 1996; Cimanga *et al.*, 2002; Jaisai and Lamlertthon, 2007)
11	ตะไคร้หอม (*Cymbopogon nardus* L.)	ต้านเชื้อรา (Pattnaik *et al.*, 1996) ฆ่าแมลง (Abramson *et al*., 2006)
12	แฝกหอม (*Vetiveria zizanoides*)	ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Hammer *et al.,* 1999) ต้านอนุมูลอิสระ (Kim *et al.,* 2005)
13	ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus globules* Labill.)	ต้านจุลินทรีย์ (Pattnaik *et al.*, 1996; Delaquis *et al.,* 2002; Gupta *et al.*, 2008a) ฤทธิ์ระงับปวด (Silva *et al.*, 2003)
14	มะกรูด (*Citrus hystrix* DC.)	ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Nanasombat and Lohasupthawee, 2005; Jaisai and Lamlertthon, 2007)
15	สน (*Pinus sylvestris*)	ต้านเชื้อรา (Motiejūnaitė and Pečiulytė, 2004)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร

พืช	ส่วนที่ใช้	การสกัด	น้ำหนักที่ใช้ (g)	% น้ำมันหอมระเหย (v/w)
เทียนข้าวเปลือก	ผล	แห้ง	500	0.40
ผักชี	ผล	แห้ง	600	0.73
จันทน์เทศ	ผล	แห้ง	500	0.56
เปราะหอม	เหง้า	แห้ง	300	1.80
ว่านน้ำ	เหง้า	แห้ง	480	1.75
กานพลู	ดอกตูม	แห้ง	380	13.68
พลู	ใบ	สด	1720	0.81
มะนาว	ใบ	สด	850	0.19
อบเชยจีน	เปลือกลำต้น	แห้ง	464	0.86
ตะไคร้	ส่วนที่อยู่เหนือดิน	แห้ง	360	3.33
ตะไคร้หอม	ใบ	สด	-	-
แฝกหอม	ราก	แห้ง	-	-
ยูคาลิปตัส	ใบ	สด	-	-
มะกรูด	ผิว	สด	-	-
สน	ใบ	สด	-	-

หมายเหตุ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม แฝกหอม ยูคาลิปตัส มะกรูด และสน ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเครื่องหอมไทย จีน จำกัด

จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี Clevenger hydro-distillation พบว่า ดอกตูมกานพลูให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหยมากที่สุดในการสกัดครั้งนี้ โดยมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 13.68 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับณิชากรและคณะ (2546) ซึ่งได้สกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกตูมของกานพลูด้วยวิธี water distillation ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 14.41 เปอร์เซ็นต์ และยังมีความใกล้เคียงกับข้อกำหนดคุณลักษณะของกานพลู คือ ในดอกกานพลูจะมีน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 14 ถึง 21 ขณะที่ในดอกบานพบน้ำมันหอมระเหยในปริมาณที่ต่ำมาก (รัตนา, 2547)

สำหรับ ผักชี เปราะหอม ว่านน้ำ พลู และตะไคร้ แสดงเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหยมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการวิจัยอื่น โดยในเมล็ดผักชี ให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหย 0.73 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ Rahman *et al*. (1999) ซึ่งได้ทำการศึกษาองค์ประกอบน้ำมันหอม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระเหยและฤทธิ์ต้านเชื้อราของเครื่องเทศบางชนิดจากปากีสถาน พบว่าเมล็ดผักชีให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหย 0.20 เปอร์เซ็นต์ การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าเปราะหอมในการทดลองนี้ให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 1.80 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า Tewtrakul *et al*. (2005) ซึ่งได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าเปราะหอม พบว่าเหง้าเปราะหอมให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 1.11 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับขวัญสุดา (2552) ซึ่งได้สกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าเปราะหอม (ตารางที่ 3) การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 1.75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งขวัญสุดา (2552) สกัดน้ำมันหอมระเหยได้เพียง 0.53 เปอร์เซ็นต์ ใบพลูให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหย 0.81 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับอุดมลักษณ์และคณะ (2547) ที่สกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี water – steam distillation ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 0.47 เปอร์เซ็นต์ และส่วนเหนือดินของตะไคร้ให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหย 3.33 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า Koffi *et al*. (2009) ซึ่งได้ทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตะไคร้ ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 1.60 เปอร์เซ็นต์

ส่วนพืชที่ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหยน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานบุคคลอื่น คือ เทียนข้าวเปลือก จันทน์เทศ อบเชยจีน และมะนาวซึ่งให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยน้อยที่สุดจากการสกัดในครั้งนี้ โดยเมล็ดเทียนข้าวเปลือกให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหย 0.40 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่า Anwar *et al*. (2009) ซึ่งทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดเทียนข้าวเปลือกได้น้ำมันหอมระเหย 2.81 เปอร์เซ็นต์ การสกัดในครั้งนี้ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหยที่น้อยกว่าอาจเนื่องมาจากเมล็ดเทียนข้าวเปลือกที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ผ่านการบด ทำให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับเมล็ดเทียนข้าวเปลือกที่บดเป็นผงแล้ว ซึ่งก่อนการสกัดจะต้องมีการย่อยขนาดให้เล็กลงเพื่อให้การสกัดสารสำคัญจากพืชได้ผลดี โดยองค์ประกอบสำคัญจะอยู่ภายในเซลล์ ในสภาพผลึกหรือผงละเอียด เมื่อได้สัมผัสกับตัวทำละลาย องค์ประกอบเหล่านั้นจะละลายออกมา การสกัดจะสมบูรณ์ ถ้าเซลล์แตกออกและตัวทำละลายเข้าไปสัมผัสองค์ประกอบสำคัญได้มากที่สุด ดังนั้นในการสกัดพืชสมุนไพรจึงจำเป็นต้องบดพืชสมุนไพรให้เป็นผงละเอียด เพื่อทำลายเซลล์และเพิ่มพื้นที่ผิวของสมุนไพรที่จะสัมผัสกับตัวทำละลาย และการลดขนาดของพืชสมุนไพรให้เป็นผงควรคำนึงถึงโครงสร้างของพืชสมุนไพรเป็นหลัก (รัตนา, 2547) ลูกจันทน์เทศให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหย 0.56 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่า Rahman *et al*. (1999) ที่สกัดได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหย เท่ากับ 2.28 เปอร์เซ็นต์ เปลือกอบเชยจีนให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหย 0.86 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าฉิชากรและคณะ (2546) ซึ่งได้สกัดน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ โดยให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหย 1.45 เปอร์เซ็นต์ โดยในขั้นตอนการบดอบเชยจีนในงานวิจัยนี้ใช้ครกหิน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บดตัวอย่างหยาบๆ ทำให้ชิ้นส่วนพืชมีความละเอียดน้อยกว่าการบดพืชด้วย Grinder ที่สามารถกำหนดความละเอียดได้ ซึ่งอาจเป็นผลทำให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้มีปริมาณน้อยกว่า สำหรับใบมะนาวให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหยน้อยที่สุดในการสกัดครั้งนี้ โดยให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยเพียง 0.19 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าจุรีพรและคณะ (2552) ซึ่งสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำได้น้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 0.53 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชชนิดต่างๆ

พืช	% น้ำมันหอมระเหย	% น้ำมันหอมระเหย (อ้างอิง)
เทียนข้าวเปลือก	0.40	2.81 (Anwar *et al*., 2009)
ผักชี	0.73	0.20 (Rahman *et al*., 1999)
จันทน์เทศ	0.56	2.28 (Rahman *et al*., 1999)
เปราะหอม	1.80	1.11 (Tewtraku *et al*., 2005)
ว่านน้ำ	1.75	0.53 (ขวัญสุดา, 2552)
กานพลู	13.68	14.41 (ณิชากรและคณะ, 2546)
พลู	0.81	0.47 (อุดมลักษณ์และคณะ, 2547)
มะนาว	0.19	0.53 (จุรีพรและคณะ, 2552)
อบเชยจีน	0.86	1.45 (ณิชากรและคณะ, 2546)
ตะไคร้	3.33	1.60 (Koffi *et al*., 2009)

จะเห็นว่าพืชแต่ละชนิดให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยต่างกัน แม้แต่ในพืชชนิดเดียวกัน หากพันธุกรรมต่างกัน สายพันธุ์พืชต่างกัน จะให้น้ำมันหอมระเหยปริมาณต่างกัน นอกจากนี้สิ่งแวดล้อมรอบๆ รวมไปถึงอายุและช่วงเวลาที่เก็บเกี่ยวพืช ยังมีความสำคัญต่อปริมาณและชนิดขององค์ประกอบสำคัญในพืช เช่น กานพลู (*Eugenia caryophyllus*) ในดอกตูมมีน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 14-21 ในขณะที่ดอกบานพบน้ำมันหอมระเหยในปริมาณที่ต่ำมาก (รัตนา, 2547) ผักชี (*Coriandrum sativum*) มีการเปลี่ยนแปลงในองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย โดยเมื่ออยู่ในช่วงต้นอ่อน จะพบสารในกลุ่ม aliphatic aldehydes ในขณะที่เริ่มออกดอกและออกผล สารที่พบส่วนใหญ่เป็น linalool และสารในกลุ่ม monoterprenes (Bhuiyan *et al.,* 2009)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย

3.1 วิธี Agar disc diffusion

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 15 ชนิด ได้แก่ เทียนข้าวเปลือก ผักชี จันทน์เทศ เปราะหอม ว่านน้ำ กานพลู พลู มะนาว อบเชยจีน ตะไคร้ ตะไคร้หอม แฝกหอม ยูคาลิปตัส มะกรูด และสน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00, 1.00, 0.50, 0.25 และ 0.10 โดยปริมาตร ในตัวทำละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *S. epidermidis* แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *E. coil* และ *P. aeruginosa* และเชื้อยีสต์ 1 ชนิด คือ *C. albicans* ด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่ามีน้ำมันหอมระเหยทั้งหมด 8 ชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำการทดสอบได้อย่างน้อยที่สุดหนึ่งเชื้อ ซึ่งได้แก่ อบเชยจีน กานพลู ตะไคร้ พลู ว่านน้ำ แฝกหอม มะนาว และสน โดยแสดง inhibition zone ระหว่าง 0.67 ถึง 2.40 เซนติเมตร (ตารางที่ 4, 5, 6, 7 และ 8)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* และ *S. epidermidis* พิจารณาที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด ขณะที่ความเข้มข้นอื่นที่ทดสอบไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าว โดยพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตะไคร้สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด (0.88 เซนติเมตร) รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากรากแฝกหอม (0.83 เซนติเมตร) และน้ำมันหอมระเหยจากใบมะนาว (0.80 เซนติเมตร) ตามลำดับ (ภาพที่ 1) โดยน้ำมันหอมระเหยจากพืชดังกล่าวมีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ Tetracycline hydrochloride และ Ampicillin sodium ซึ่งแสดง inhibition zone เท่ากับ 2.45 และ 1.03 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4) สำหรับการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร น้ำมันหอมระเหยที่ทำการทดสอบมีประสิทธิภาพต่ำ โดยมี inhibition zone อยู่ที่ 0.68 และ 0.67 เซนติเมตรเท่านั้น (ตารางที่ 5) ซึ่งน้ำมันหอมระเหยที่แสดงแนวโน้มในการยับยั้งคือ น้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู น้ำมันหอมระเหยจากรากแฝกหอม และน้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตะไคร้ (ภาพที่ 2)

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coil* และ *P. aeruginosa* พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร สามารถ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด โดยน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coil* ได้ดีที่สุด (0.97 เซนติเมตร) รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากใบพลู (0.82 เซนติเมตร) และน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีน (0.75 เซนติเมตร) ตามลำดับ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 3) ส่วนความเข้มข้นอื่นที่ทดสอบไม่แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อ และสำหรับการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่ามีเพียงน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตรเท่านั้น ที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ (0.78 เซนติเมตร) (ภาพที่ 4) อีกทั้งยังพบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* สามารถต้านยา Ampicillin sodium ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมได้ โดยไม่ปรากฏ inhibition zone (ตารางที่ 7) อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบดังกล่าวยังคงมีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับ positive control

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อยีสต์ *C. albicans* พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด ขณะที่ความเข้มข้นอื่นๆ ที่ทำการทดสอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยพบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดอย่างเด่นชัด โดยมี inhibition zone ถึง 2.40 เซนติเมตร รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตะไคร้ (0.96 เซนติเมตร) และน้ำมันหอมระเหยจากกิ่งและใบของสน (0.90 เซนติเมตร) (ภาพที่ 5) ตามลำดับ และยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนมีประสิทธิภาพสูงกว่า Amphotericin B (20 ไมโครกรัม) ซึ่งเป็น positive control แสดง inhibition zone เพียง 1.97 เซนติเมตร โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 8)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Agar disc diffusion

พืชสมุนไพร	**ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (ซม.) ของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ±SD***				
	5.00	**1.00**	**0.50**	**0.25**	**0.10**
อบเชยจีน	0.67 ±0.03a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
กานพลู	0.68 ±0.03a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ตะไคร้	0.88 ±0.08c	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
มะนาว	0.80 ±0.00b	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ตะไคร้หอม	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
พลู	0.67 ±0.03a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
เทียนข้าวเปลือก	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ผักชี	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
จันทน์เทศ	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
เปราะหอม	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ว่านน้ำ	0.67 ±0.03a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
แฝกหอม	0.83 ±0.03bc	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ยูคาลิปตัส	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
มะกรูด	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
สน	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
Tetracycline	2.45±0.10e	2.45±0.10c	2.45±0.10c	2.45±0.10c	2.45±0.10c
Ampicillin	1.03 ±0.12d	1.03 ±0.12b	1.03 ±0.12b	1.03 ±0.12b	1.03 ±0.12b
DMSO	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c ตัวอักษรที่กำกับไว้เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Agar disc diffusion

พืชสมุนไพร	**ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (ซม.) ของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ±SD***				
	5.00	**1.00**	**0.50**	**0.25**	**0.10**
อบเชยจีน	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
กานพลู	0.68 ±0.06a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ตะไคร้	0.67 ±0.03a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
มะนาว	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ตะไคร้หอม	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
พลู	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
เทียนข้าวเปลือก	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ผักชี	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
จันทน์เทศ	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
เปราะหอม	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ว่านน้ำ	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
แฝกหอม	0.67 ±0.03a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ยูคาลิปตัส	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
มะกรูด	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
สน	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
Tetracycline	0.95±0.22b	0.95±0.22b	0.95±0.22b	0.95±0.22b	0.95±0.22b
Ampicillin	2.05 ±0.13c	2.05 ±0.13c	2.05 ±0.13c	2.05 ±0.13c	2.05 ±0.13c
DMSO	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c ตัวอักษรที่กำกับไว้เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E.coli* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Agar disc diffusion

พืชสมุนไพร	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (ซม.) ของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ±SD*				
	5.00	**1.00**	**0.50**	**0.25**	**0.10**
อบเชยจีน	0.75 ±0.05cd	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
กานพลู	0.97 ±0.03e	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ตะไคร้	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
มะนาว	0.67 ±0.03ab	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ตะไคร้หอม	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
พลู	0.82 ±0.13d	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
เทียนข้าวเปลือก	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ผักชี	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
จันทน์เทศ	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
เปราะหอม	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ว่านน้ำ	0.70 ±0.00bc	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
แฝกหอม	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ยูคาลิปตัส	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
มะกรูด	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
สน	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
Tetracycline	3.20±0.10f	3.20±0.10b	3.20±0.10b	3.20±0.10b	3.20±0.10b
Ampicillin	3.23 ±0.06f	3.23 ±0.06b	3.23 ±0.06b	3.23 ±0.06b	3.23 ±0.06b
DMSO	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c ตัวอักษรที่กำกับไว้เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Agar disc diffusion

พืชสมุนไพร	**ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (ซม.) ของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ±SD***				
	5.00	**1.00**	**0.50**	**0.25**	**0.10**
อบเชยจีน	0.78 ±0.03b	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
กานพลู	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ตะไคร้	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
มะนาว	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ตะไคร้หอม	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
พลู	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
เทียนข้าวเปลือก	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ผักชี	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
จันทน์เทศ	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
เปราะหอม	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ว่านน้ำ	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
แฝกหอม	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ยูคาลิปตัส	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
มะกรูด	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
สน	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
Tetracycline	1.03±0.00c	1.03±0.00b	1.03±0.00b	1.03±0.00b	1.03±0.00b
Ampicillin	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
DMSO	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c ตัวอักษรที่กำกับไว้เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

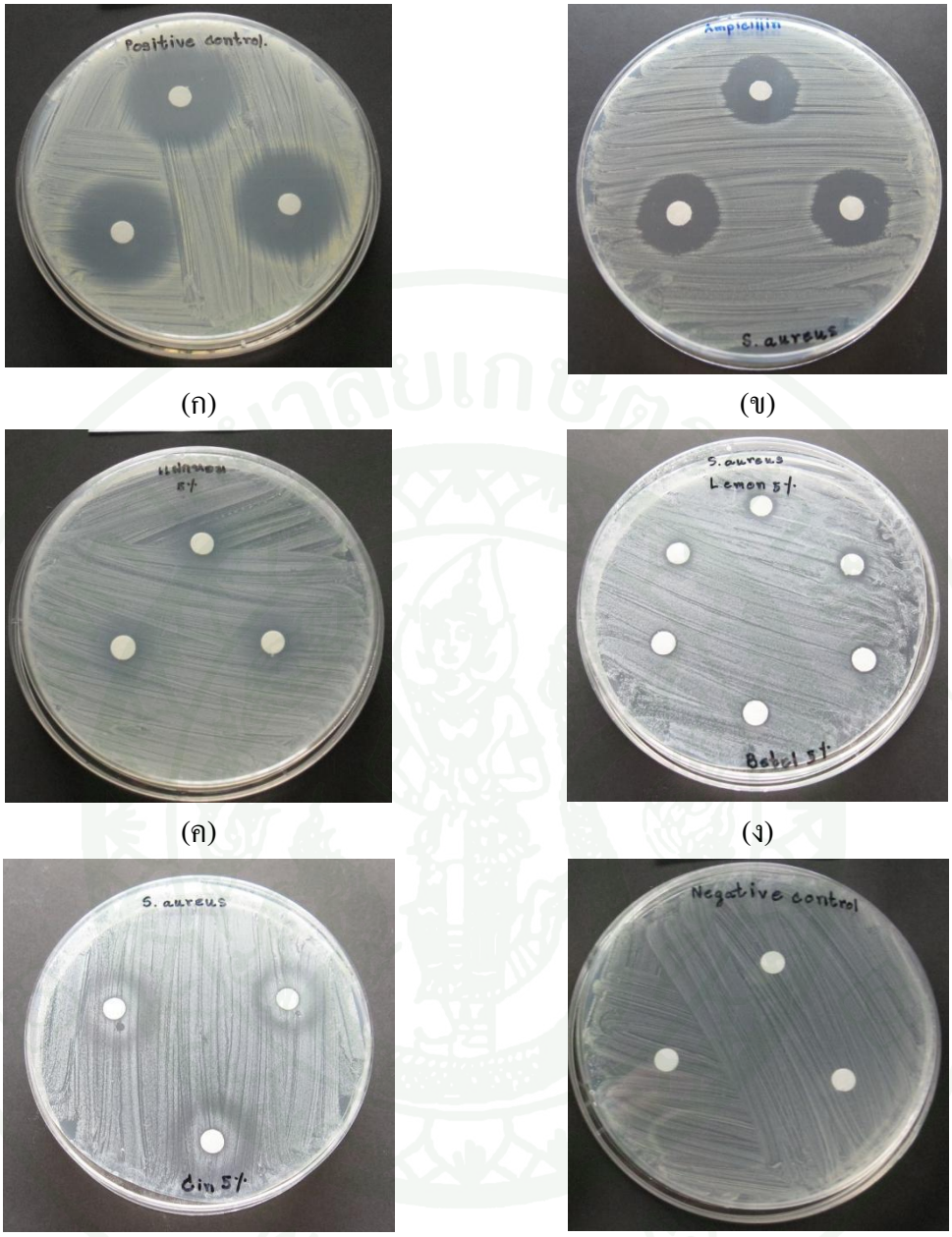
ตารางที่ 8 ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Agar disc diffusion

พืชสมุนไพร	**ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (ซม.) ของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ±SD***				
	5.00	**1.00**	**0.50**	**0.25**	**0.10**
อบเชยจีน	2.40±0.00f	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
กานพลู	0.67 ±0.03ab	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ตะไคร้	0.96 ±0.05d	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
มะนาว	0.67 ±0.03ab	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ตะไคร้หอม	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
พลู	0.70 ±0.00b	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
เทียนข้าวเปลือก	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ผักชี	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
จันทน์เทศ	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
เปราะหอม	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ว่านน้ำ	0.84 ±0.01c	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
แฝกหอม	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
ยูคาลิปตัส	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
มะกรูด	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
สน	0.90 ±0.05c	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a
Amphotericin B	1.97±0.11e	1.97±0.11b	1.97±0.11b	1.97±0.11b	1.97±0.11b
DMSO	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a	0.60 ±0.00a

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c ตัวอักษรที่กำกับไว้เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(ก) (ข)

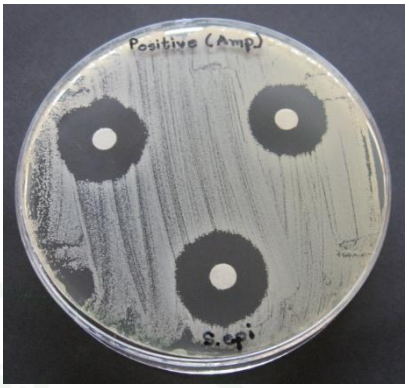
(ค) (ง)

(จ) (ฉ)

ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี Agar disc diffusion; Tetracycline hydrochloride 30 ไมโครกรัมต่อdisc (ก) Ampicillin sodium 30 ไมโครกรัมต่อdisc (ข) แฝกหอมความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ค) มะนาวและพลูความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ง) อบเชยจีนความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (จ) negative control (DMSO) (ฉ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ก)



(ข)

(ค)

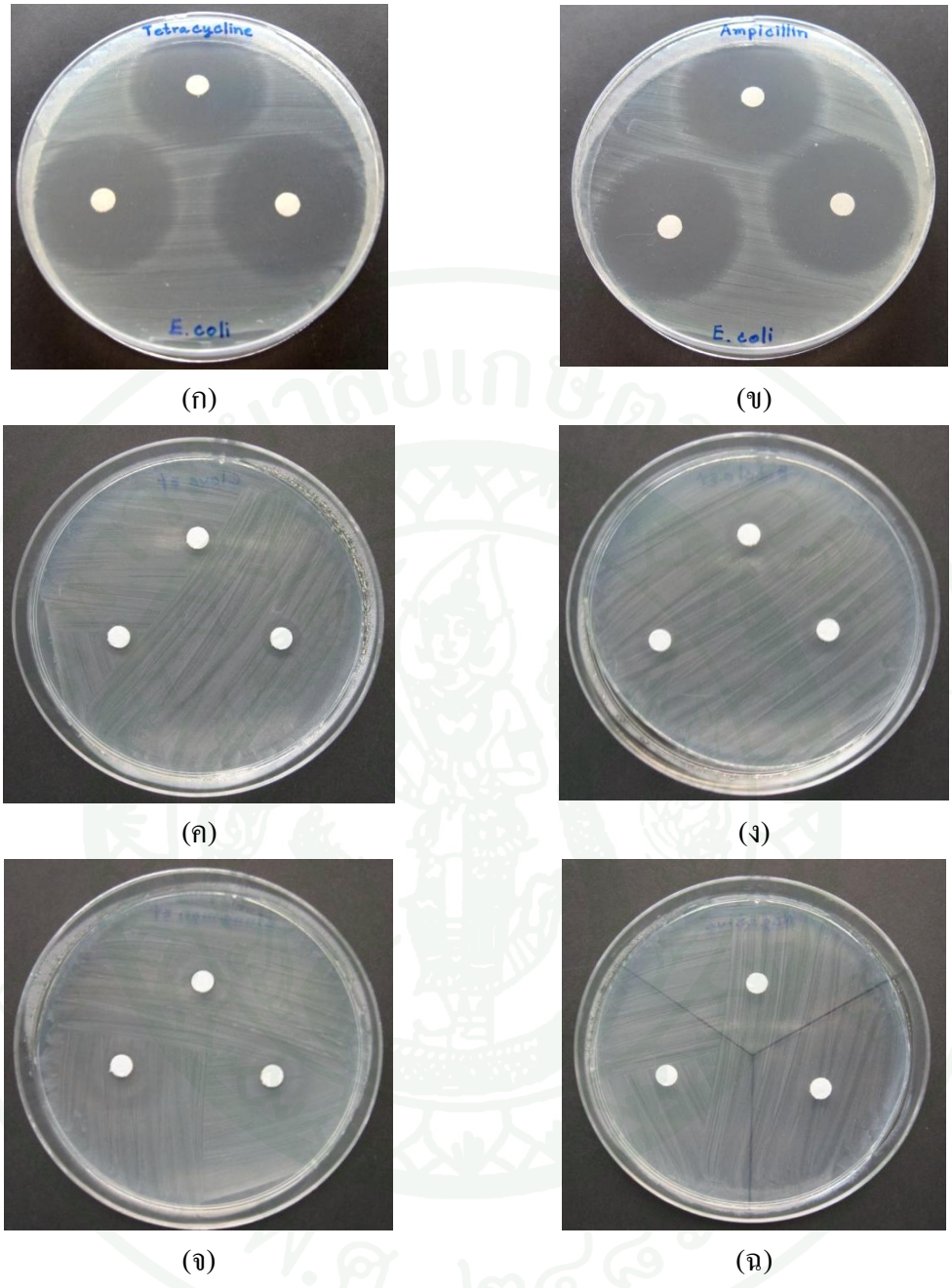
(ง)

(จ)

(ฉ)

ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* โดยวิธี Agar disc diffusion; Tetracycline hydrochloride 30 ไมโครกรัมต่อdisc (ก) Ampicillin sodium 30 ไมโครกรัมต่อdisc (ข) กานพลูความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ค) แฝกหอมเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ง) ตะไคร้ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (จ) negative control (DMSO) (ฉ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



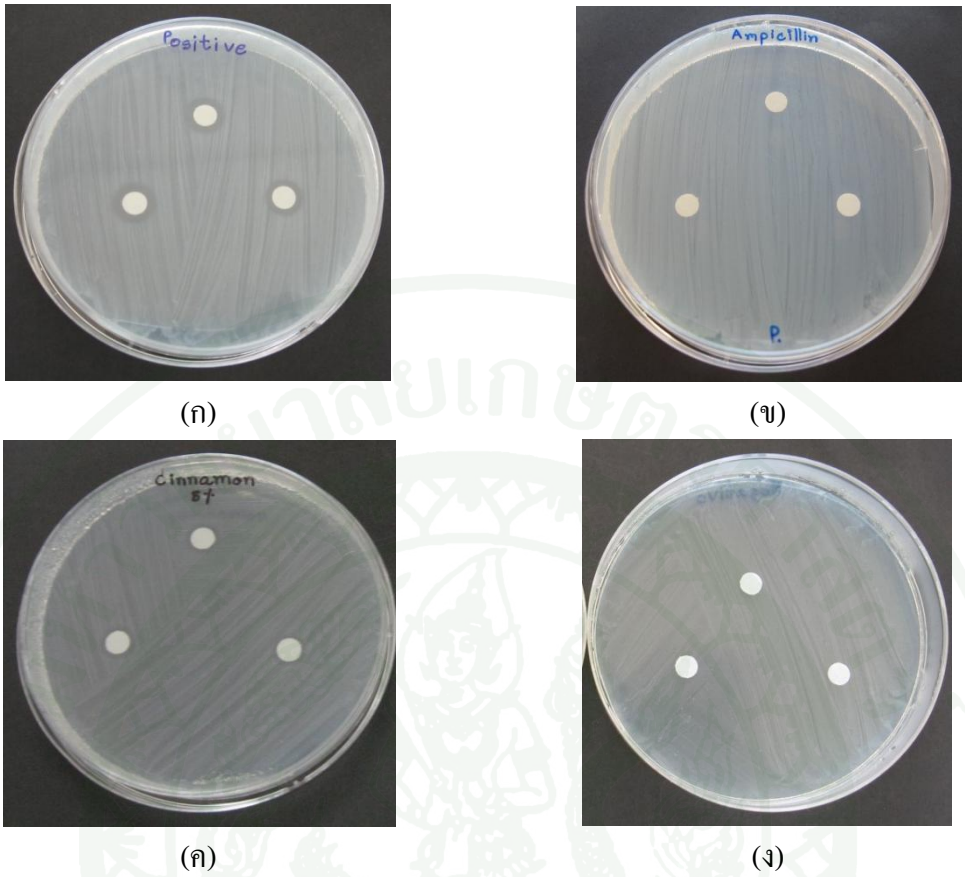
(ก) (ข)

(ค) (ง)

(จ) (ฉ)

ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี Agar disc diffusion **;** Tetracycline hydrochloride 30 ไมโครกรัมต่อdisc (ก) Ampicillin sodium 30 ไมโครกรัมต่อdisc (ข) กานพลูความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ค) พลูความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ง) อบเชยจีนความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (จ) negative control (DMSO) (ฉ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

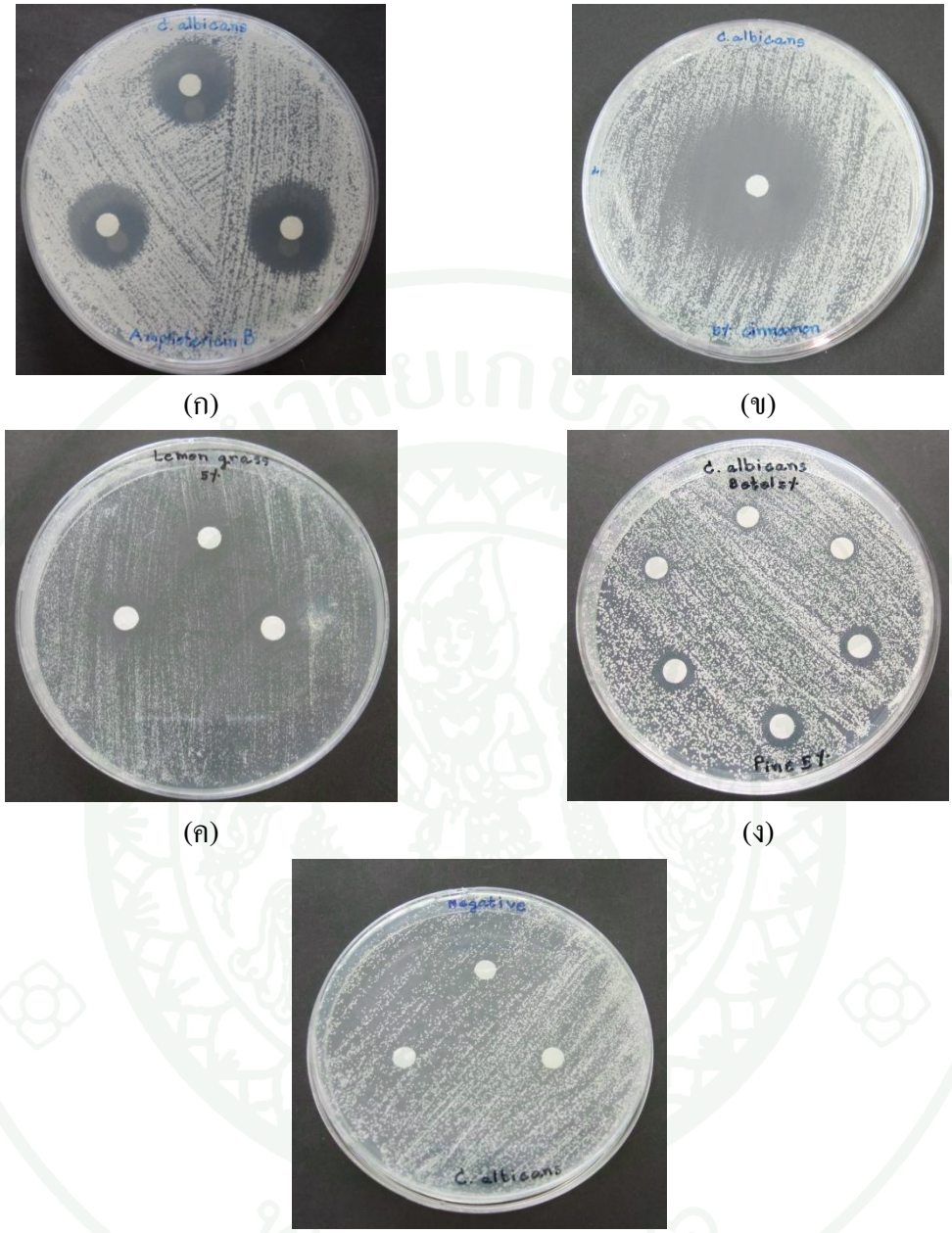


(ก) (ข)

(ค) (ง)

ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยวิธี Agar disc diffusion; Tetracycline hydrochloride 30 ไมโครกรัมต่อdisc (ก) Ampicillin sodium 30 ไมโครกรัมต่อdisc (ข) อบเชยจีนความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ค) negative control (DMSO) (ง)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(ก) (ข)

(ค) (ง)

(จ)

ภาพที่ 5 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี Agar disc diffusion; Amphotericin B 20 ไมโครกรัมต่อdisc (ก) อบเชยจีนความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ข) ตะไคร้ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ค) สนและพลูความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ง) negative control (DMSO) (จ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 วิธี Agar well diffusion

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 15 ชนิด ได้แก่ เทียน ข้าวเปลือก ผักชี จันทน์เทศ เปราะหอม ว่านน้ำ กานพลู พลู มะนาว อบเชยจีน ตะไคร้ ตะไคร้หอม แฝกหอม ยูคาลิปตัส มะกรูด และสน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00, 1.00, 0.50, 0.25 และ 0.10 โดยปริมาตร ในตัวทำละลาย DMSO ต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *S. epidermidis* แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *E. coil* และ *P. aeruginosa* และเชื้อยีสต์ 1 ชนิด คือ *C. albicans* ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าผลการทดลองให้ผลไปในทางเดียวกันกับการทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยมีน้ำมันหอมระเหย 9 ชนิด ได้แก่ อบเชยจีน กานพลู ตะไคร้ พลู ว่านน้ำ แฝกหอม มะนาว สน และผักชี ที่อย่างน้อยที่สุดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำการทดสอบได้หนึ่งเชื้อทดสอบ ซึ่งมี inhibition zone อยู่ในช่วง 0.70 ถึง 4.52 เซนติเมตร (ตารางที่ 9, 10, 11, 12 และ 13)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก พิจารณาที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำการทดสอบได้ดีที่สุด พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีน สามารถยับยั้งการเจริญ *S. aureus* ได้ดีที่สุด (2.03 เซนติเมตร) รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตะไคร้ (1.58 เซนติเมตร) น้ำมันหอมระเหยจากใบและกิ่งสน (1.53 เซนติเมตร) และน้ำมันหอมระเหยจากรากแฝกหอม (1.10 เซนติเมตร) ตามลำดับ (ภาพที่ 6) โดยพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนแสดงประสิทธิภาพที่สูงกว่า Ampicillin sodium (1.69 เซนติเมตร) อย่างมีนัยสำคัญ แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่า Tetracycline hydrochloride (2.21เซนติเมตร) (ตารางที่ 9) สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุดเช่นกัน (1.37 เซนติเมตร) รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากรากแฝกหอม (0.90 เซนติเมตร) และน้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตะไคร้ (0.87 เซนติเมตร) (ภาพที่ 7) ตามลำดับ โดยน้ำมันหอมระเหยจากพืชดังกล่าวมีประสิทธิภาพดีกว่า Tetracycline hydrochloride (0.70 เซนติเมตร) แต่มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับ Ampicillin sodium (2.08 เซนติเมตร) (ตารางที่ 10)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ในการทดสอบกับเชื้อ *E.coil* พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถยับยั้งได้ทั้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 และความเข้มข้นร้อยละ 1.00 โดยปริมาตร มี inhibition zone 2.67 เซนติเมตร และ 0.80 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับพืชที่มีประสิทธิภาพรองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลูความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (1.50 เซนติเมตร) และน้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตะไคร้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตรเช่นกัน (1.33 เซนติเมตร) (ภาพที่ 8) อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหยจากพืชดังกล่าวยังคงมีประสิทธิภาพต่ำกว่า Tetracycline hydrochloride และ Ampicillin sodium (ตารางที่ 11) และสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่า มีน้ำมันหอมระเหยเพียง 2 ชนิด คือ อบเชยจีนและสนที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตรเท่านั้น ที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ โดยมี inhibition zone เท่ากับ 1.10 เซนติเมตร และ 0.87 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 9) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชดังกล่าวกับ Tetracycline hydrochloride และ Ampicillin sodium พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนมีประสิทธิภาพไม่ต่างทางสถิติกับ Tetracycline hydrochloride ขณะที่ Ampicillin sodium ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (ตารางที่ 12)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *C. albicans* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00, 1.00 และ 0.50 โดยปริมาตร (4.52, 2.60 และ 1.50 เซนติเมตร ตามลำดับ) ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากใบพลู ดอกกานพลู ใบและกิ่งสน ส่วนเหนือดินของตะไคร้ ใบมะนาว และเหง้าว่านน้ำ สามารถยับยั้งการเจริญได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร เท่านั้น โดยที่น้ำมันหอมระเหยจากพืชดังกล่าว แสดง inhibition zone อยู่ในช่วง 0.90 ถึง 1.80 เซนติเมตร (ภาพที่ 10) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชดังกล่าวกับ positive control พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจีนมีประสิทธิภาพสูงกว่า positive control โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 13)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion

พืชสมุนไพร	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (ซม.) ของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ±SD*				
	5.00	**1.00**	**0.50**	**0.25**	**0.10**
อบเชยจีน	2.03 ±0.10g	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
กานพลู	0.77 ±0.06b	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ตะไคร้	1.58 ±0.08e	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
มะนาว	0.90 ±0.05c	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ตะไคร้หอม	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
พลู	0.72 ±0.03b	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
เทียนข้าวเปลือก	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ผักชี	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
จันทน์เทศ	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
เปราะหอม	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ว่านน้ำ	0.72 ±0.03b	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
แฝกหอม	1.10 ±0.00d	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ยูคาลิปตัส	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
มะกรูด	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
สน	1.53 ±0.09e	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
Tetracycline	2.21±0.03h	2.21±0.03c	2.21±0.03c	2.21±0.03c	2.21±0.03c
Ampicillin	1.69±0.10f	1.69±0.10b	1.69±0.10b	1.69±0.10b	1.69±0.10b
DMSO	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c ตัวอักษรที่กำกับไว้เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion

พืชสมุนไพร	**ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (ซม.) ของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ±SD***				
	5.00	**1.00**	**0.50**	**0.25**	**0.10**
อบเชยจีน	1.37 ±0.08e	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
กานพลู	0.85 ±0.05d	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ตะไคร้	0.87 ±0.03d	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
มะนาว	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ตะไคร้หอม	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
พลู	0.75 ±0.05c	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
เทียนข้าวเปลือก	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ผักชี	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
จันทน์เทศ	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
เปราะหอม	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ว่านน้ำ	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
แฝกหอม	0.90 ±0.05d	0.70 ±0.00b	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ยูคาลิปตัส	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
มะกรูด	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
สน	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
Tetracycline	0.70±0.00b	0.70±0.00b	0.70±0.00b	0.70±0.00b	0.70±0.00b
Ampicillin	2.08±0.03f	2.08 ±0.03c	2.08 ±0.03c	2.08 ±0.03c	2.08 ±0.03c
DMSO	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c ตัวอักษรที่กำกับไว้เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion

พืชสมุนไพร	**ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (ซม.) ของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ±SD***				
	5.00	**1.00**	**0.50**	**0.25**	**0.10**
อบเชยจีน	2.67 ±0.11h	0.80 ±0.00d	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
กานพลู	1.50 ±0.17g	0.72 ±0.03bc	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ตะไคร้	1.33 ±0.06f	0.73 ±0.06c	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
มะนาว	1.02 ±0.03d	0.70 ±0.00b	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ตะไคร้หอม	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
พลู	1.13 ±0.06e	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
เทียนข้าวเปลือก	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ผักชี	0.70 ±0.00b	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
จันทน์เทศ	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
เปราะหอม	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ว่านน้ำ	0.92 ±0.03c	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
แฝกหอม	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ยูคาลิปตัส	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
มะกรูด	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
สน	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
Tetracycline	3.23±0.03j	3.23±0.03f	3.23±0.03c	3.23±0.03c	3.23±0.03c
Ampicillin	3.06 ±0.03i	3.06 ±0.03e	3.06 ±0.03d	3.06 ±0.03d	3.06 ±0.03d
DMSO	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c ตัวอักษรที่กำกับไว้เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion

พืชสมุนไพร	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (ซม.) ของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ±SD*				
	5.00	**1.00**	**0.50**	**0.25**	**0.10**
อบเชยจีน	1.10 ±0.00c	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
กานพลู	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ตะไคร้	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
มะนาว	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ตะไคร้หอม	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
พลู	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
เทียนข้าวเปลือก	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ผักชี	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
จันทน์เทศ	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
เปราะหอม	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ว่านน้ำ	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
แฝกหอม	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ยูคาลิปตัส	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
มะกรูด	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
สน	0.87 ±0.06b	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
Tetracycline	1.16±0.03c	1.16±0.03b	1.16±0.03b	1.16±0.03b	1.16±0.03b
Ampicillin	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
DMSO	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c ตัวอักษรที่กำกับไว้เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

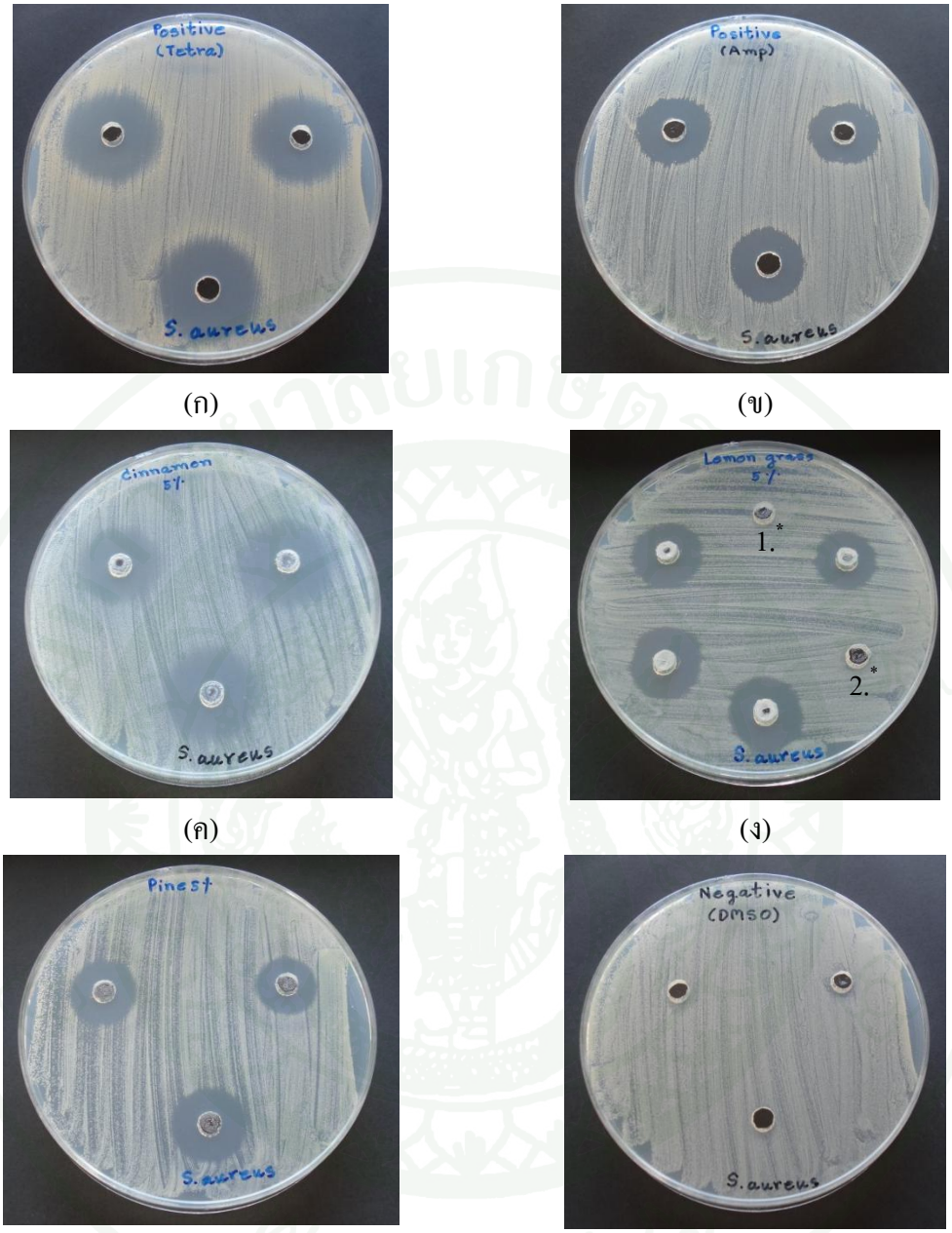
ตารางที่ 13 ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion

พืชสมุนไพร	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (ซม.) ของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ±SD*				
	5.00	**1.00**	**0.50**	**0.25**	**0.10**
อบเชยจีน	4.52±0.18h	2.60±0.36c	1.50 ±0.00b	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
กานพลู	1.60 ±0.00e	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ตะไคร้	1.13 ±0.06c	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
มะนาว	0.93 ±0.06b	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ตะไคร้หอม	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
พลู	1.72 ±0.10f	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
เทียนข้าวเปลือก	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ผักชี	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
จันทน์เทศ	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
เปราะหอม	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ว่านน้ำ	0.96 ±0.05b	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
แฝกหอม	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
ยูคาลิปตัส	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
มะกรูด	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
สน	1.23 ±0.03d	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a
Amphotericin B	2.03±0.03g	2.03±0.03b	2.03±0.03c	2.03±0.03b	2.03±0.03b
DMSO	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a	0.00 ±0.00a

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

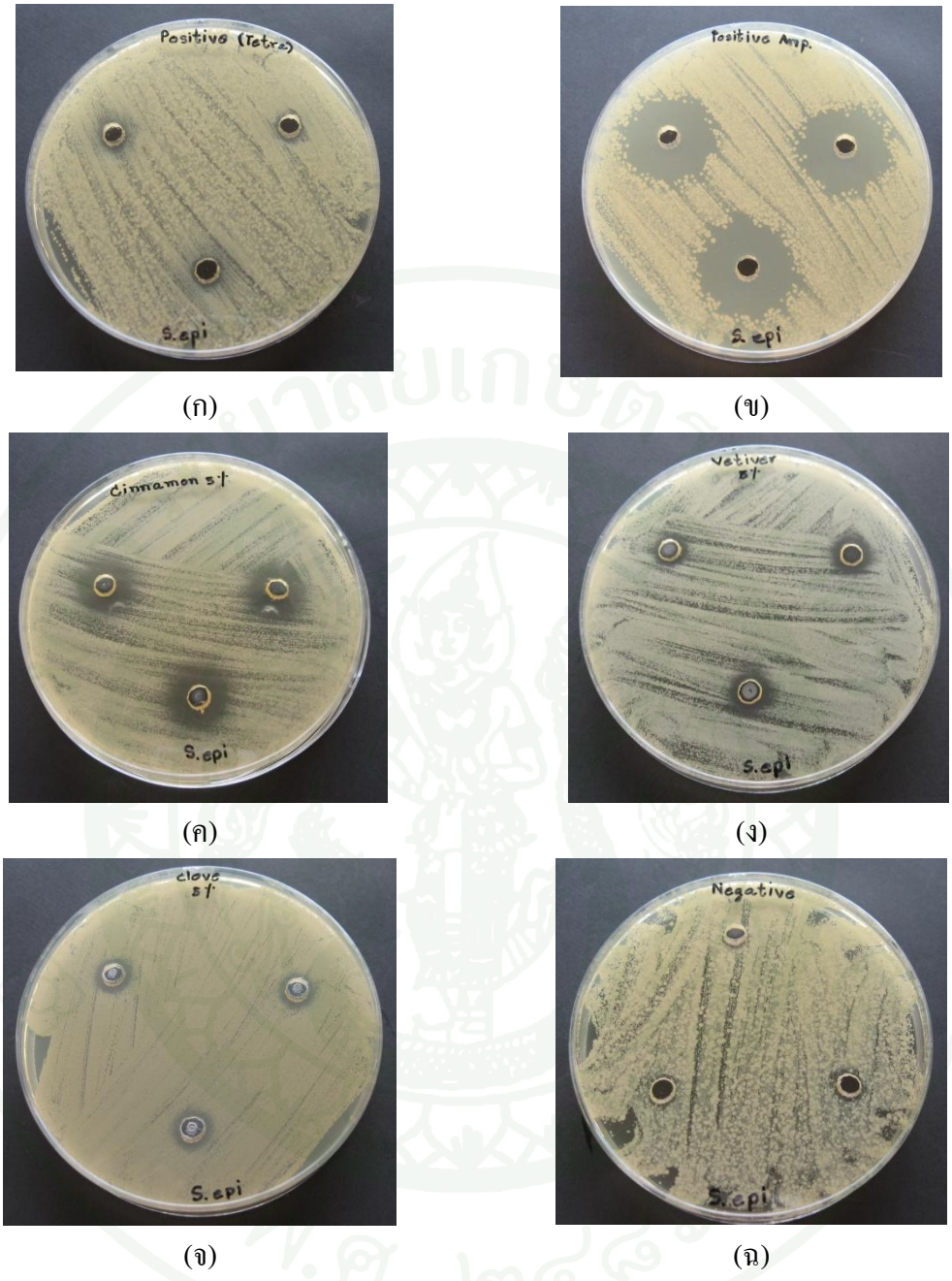
a, b, c ตัวอักษรที่กำกับไว้เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี Agar well diffusion; Tetracycline hydrochloride 30 ไมโครกรัม (ก) Ampicillin sodium 30 ไมโครกรัม (ข) อบเชยจีนความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ค) ตะไคร้ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร, 1.* และ 2.* คือ หลุมที่ไม่มีสารตัวอย่าง (ง) สนความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (จ) negative control (DMSO) (ฉ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



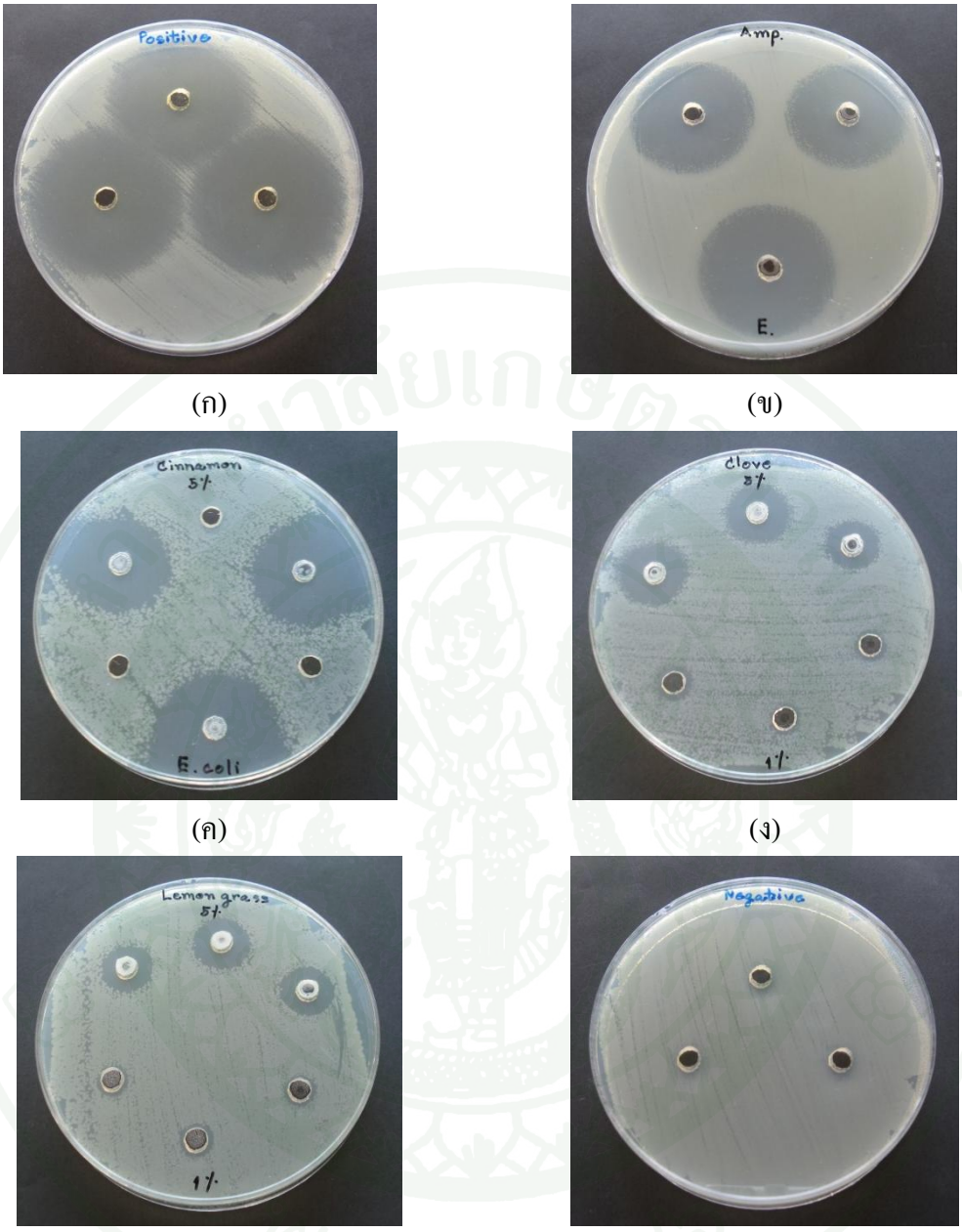
(ก) (ข)

(ค) (ง)

(จ) (ฉ)

ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* โดยวิธี Agar well diffusion; Tetracycline hydrochloride 30 ไมโครกรัม (ก) Ampicillin sodium 30 ไมโครกรัม (ข) อบเชยจีนความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ค) แฝกหอมความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ง) กานพลูความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (จ) negative control (DMSO) (ฉ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



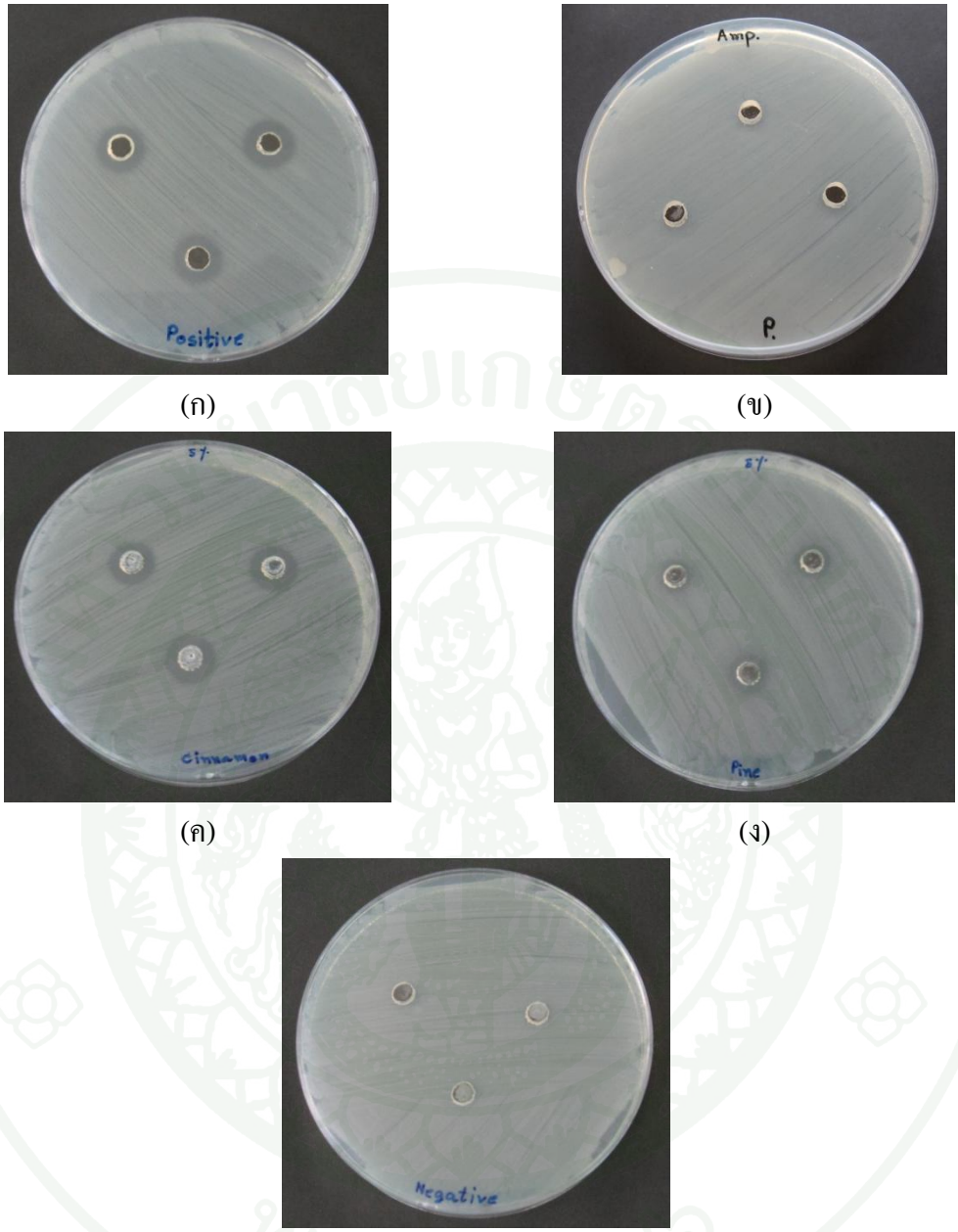
(ก) (ข)

(ค) (ง)

(จ) (ฉ)

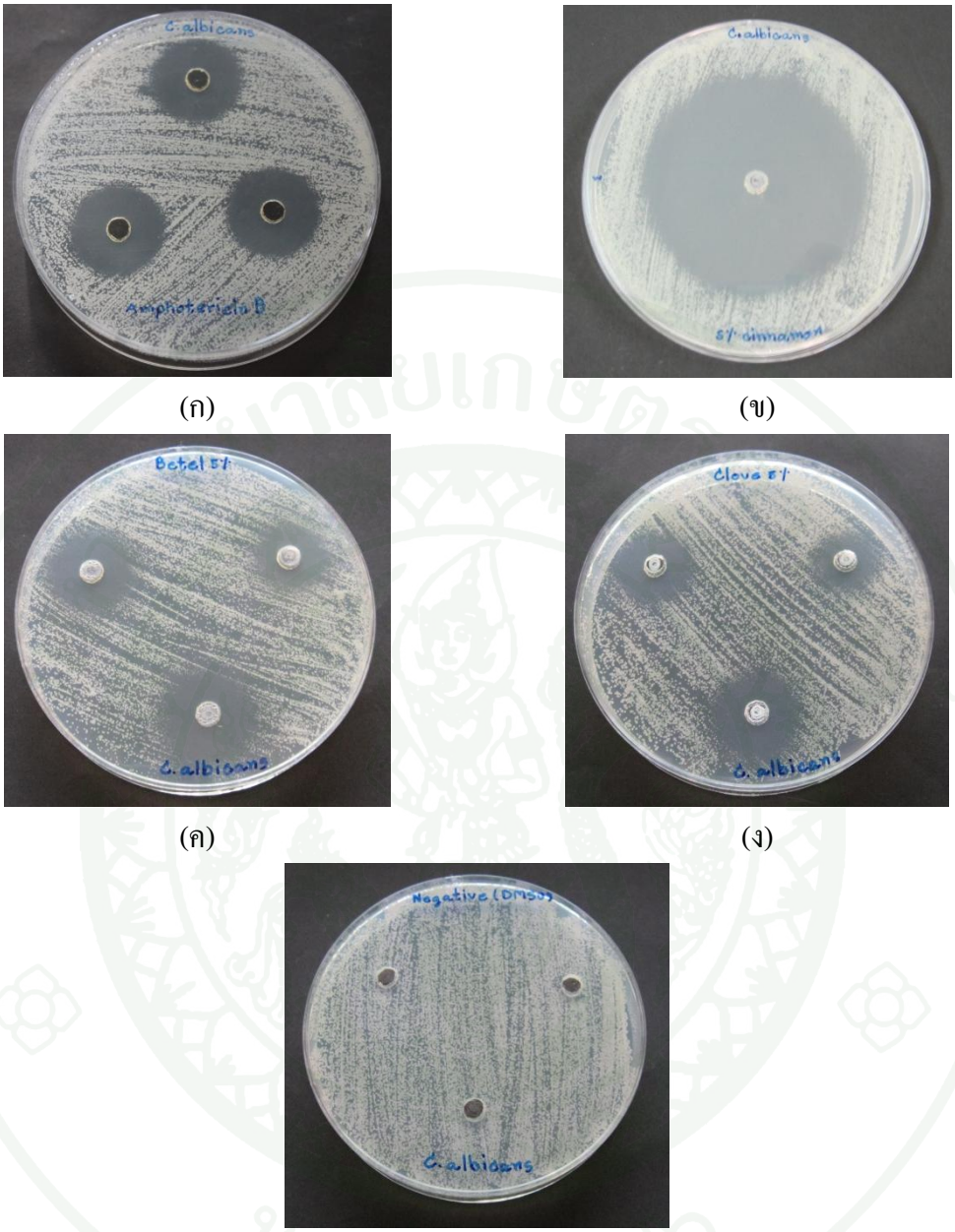
ภาพที่ 8 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coil* โดยวิธี Agar well diffusion; Tetracycline hydrochloride 30 ไมโครกรัม (ก) Ampicillin sodium 30 ไมโครกรัม (ข) อบเชยจีนความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ค) กานพลูความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ง) ตะไคร้ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (จ) negative control (DMSO) (ฉ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยวิธี Agar well diffusion; Tetracycline hydrochloride 30 ไมโครกรัม (ก) Ampicillin sodium 30 ไมโครกรัม (ข) อบเชยจีนความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ค) สนความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ง) negative control (DMSO) (จ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(ก) (ข)

(ค) (ง)

(จ)

ภาพที่ 10 ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี Agar well diffusion; Amphotericin B 20 ไมโครกรัม (ก) อบเชยจีนความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ข) พลูความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ค) กานพลูความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ง) negative control (DMSO) (จ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากผลการทดสอบการต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี Agar disc diffusion ซึ่งพิจารณาที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร สรุปได้ว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำการทดสอบได้ทุกชนิด ยกเว้น *S. epidermidis* เช่นเดียวกับน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลูที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำการทดสอบได้ทุกชนิด ยกเว้น *P. aeruginosa* แต่น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่าสำหรับน้ำมันหอมระเหยจากใบพลูแสดงการต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก 1 ชนิด แกรมลบ 1 ชนิด และเชื้อยีสต์ จากเชื้อที่ทำการทดสอบทั้งหมด 5 ชนิด ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตะไคร้แสดงการต้านการเจริญของเชื้อยีสต์ได้ และสามารถต้านการเจริญแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี แต่ไม่แสดงการต้านแบคทีเรียแกรมลบ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบได้มากกว่า น้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู น้ำมันหอมระเหยจากใบพลู และน้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตะไคร้

สำหรับผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี Agar well diffusion ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร สรุปได้ว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนสามารถต้านเชื้อที่ทำการทดสอบได้ทุกชนิด โดยแสดง inhibition zone ได้สูงที่สุดในทุกเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ น้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู ส่วนเหนือดินของตะไคร้และใบพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำการทดสอบได้ทุกชนิด ยกเว้น *P. aeruginosa* ซึ่งจะเห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำการทดสอบได้มากกว่าน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับวิธี Agar disc diffusion

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของผลการทดลองของทั้งสองวิธี (Agar disc diffusion และ Agar well diffusion) โดยเปรียบเทียบจาก inhibition zone ของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์สูงสุด 5 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยใช้สถิติวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient) สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 14 ซึ่งแสดงผลเป็นค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ซึ่งเป็นค่าที่บอกความสัมพันธ์ของค่าในแกน x (วิธี Agar disc diffusion) และแกน y (วิธี Agar well diffusion) (ภาพที่ 11) โดยปกติค่า r จะมีค่าตั้งแต่ -1 ถึง 1 ค่าลบแสดงความสัมพันธ์ทางลบหรือทางตรงกันข้าม ค่าบวกแสดงความสัมพันธ์ทางบวกหรือทางเดียวกัน ขณะที่ r เท่ากับ 0.00 ถือว่าข้อมูลไม่มีความสัมพันธ์กัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ที่ได้จากการเปรียบเทียบ inhibition zone ในแต่เชื้อทดสอบจากวิธี Agar disc diffusion กับวิธี Agar well diffusion โดยใช้สถิติวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson's correlation)

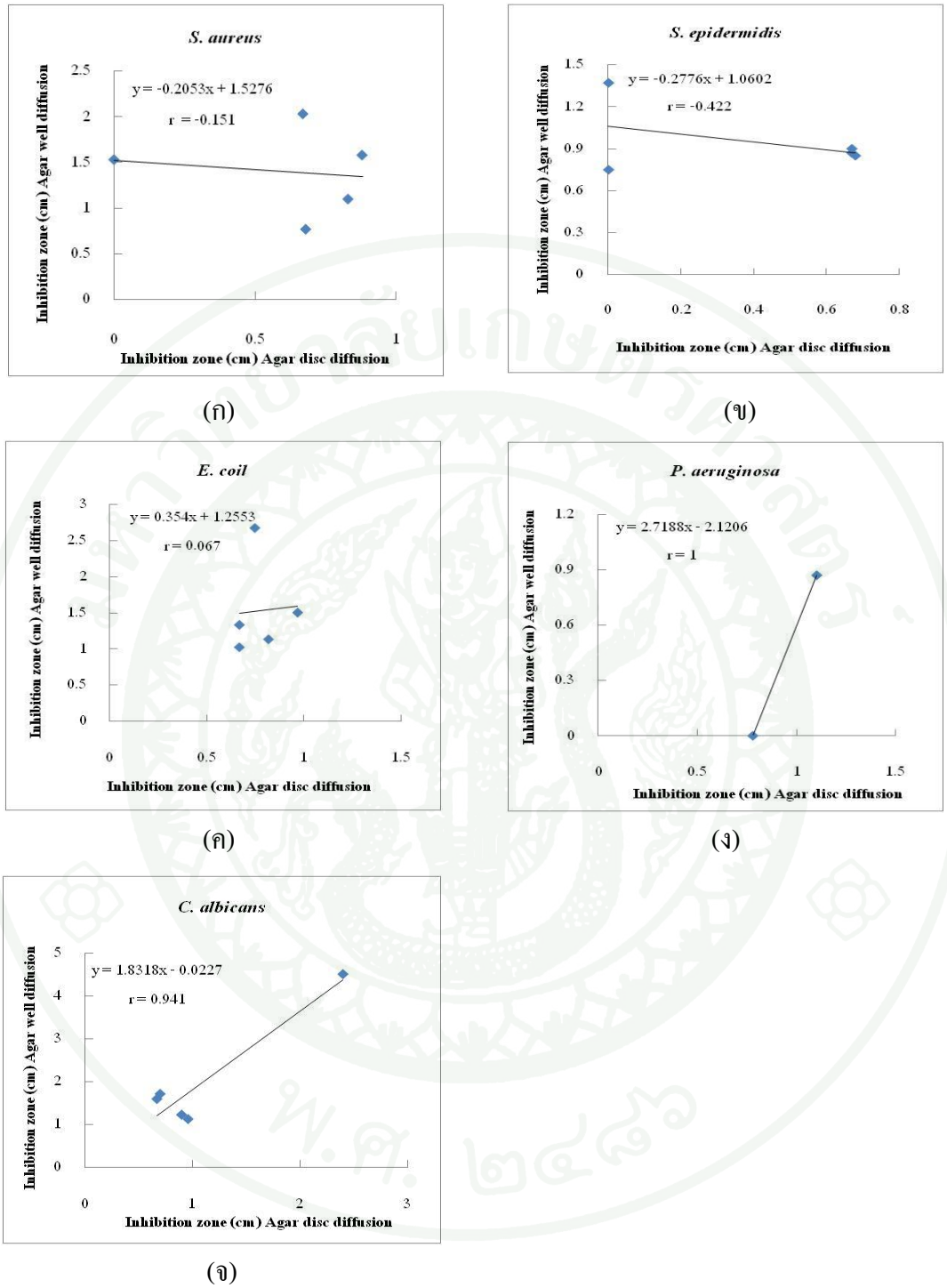
เปรียบเทียบ inhibition zone ของเชื้อทดสอบในแต่ละวิธี	ค่า Correlation coefficient (r)
S. aureus จากวิธี Agar disc diffusion กับ Agar well diffusion	- 0.151
S. epidermidis จากวิธี Agar disc diffusion กับ Agar well diffusion	- 0.422
E. coli จากวิธี Agar disc diffusion กับ Agar well diffusion	0.067
P. aeruginosa จากวิธี Agar disc diffusion กับ Agar well diffusion	1.00
C. albicans จากวิธี Agar disc diffusion กับ Agar well diffusion	0.941

ความสัมพันธ์ของ inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ของน้ำมันหอมระเหยในการทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion และวิธี Agar well diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ทำการทดสอบจากวิธีการทั้งสองมีความสัมพันธ์ทางลบในระดับต่ำ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีค่า r เท่ากับ - 0.422 และ - 0.151 ตามลำดับ นั่นคือความสามารถในการต้านการเจริญ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ของน้ำมันหอมระเหยจากการทดสอบทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกันน้อย และเป็นไปในทางตรงกันข้าม (ภาพที่ 11ก และ 11ข)

ความสัมพันธ์ของ inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ของน้ำมันหอมระเหย โดยวิธี Agar disc diffusion และวิธี Agar well diffusion พบว่า ผลของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญ *E. coli* จากวิธีการทดสอบทั้งสองแสดงความสัมพันธ์ทางบวกในระดับที่ต่ำ โดยมีค่า r เท่ากับ 0.067 ขณะที่ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่า วิธีการทดสอบทั้งสองมีความสัมพันธ์ทางบวกในระดับสูงอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า r เท่ากับ 1.00 (ภาพที่ 11ค และ 11ง)

ความสัมพันธ์ของ inhibition zone จากการยับยั้งการเจริญเชื้อยีตส์ *C. albicans* ของน้ำมันหอมระเหย ด้วยวิธี Agar disc diffusion และวิธี Agar well diffusion พบว่า ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากวิธีการทดสอบทั้งสองมีความสัมพันธ์ทางบวกในระดับสูงอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกับ เชื้อ *P. aeruginosa* โดยมีค่า r เท่ากับ 0.941 (ภาพที่ 11จ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่าง inhibition zone ในการต้านการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากวิธี Agar disc diffusion และ Agar well diffusion; *S. aureus* (ก) *S. epidermidis* (ข) *E. coli* (ค) *P. aeruginosa* (ง) *C. albicans* (จ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จะเห็นว่าความสามารถของน้ำมันหอมระเหยในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *S. aureus, S. epidermidis, E. coli, P. aeruginosa* และ *C. albicans* จากวิธี Agar disc diffusion และวิธี Agar well diffusion ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน โดยน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีน ดอกกานพลู ส่วนเหนือดินของตะไคร้และใบพลู สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำการทดสอบได้ดี ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนแสดงการยับยั้งได้ดีที่สุด ดังนั้นจากข้อมูลนี้สามารถเลือกใช้วิธี Agar disc diffusion หรือ Agar well diffusion วิธีการใดวิธีการหนึ่งในการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยได้ ทั้งนี้การเลือกรูปแบบวิธีการทดสอบจะต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่างที่สำคัญ เช่น ชนิดของเชื้อและจำนวนของเชื้อที่ทำการทดสอบ ชนิดของสารตัวอย่าง เป็นต้น (ประสาทพรและคณะ, 2551) อย่างไรก็ตามการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยมีขนาด inhibition zone ที่สูงกว่า (larger activity) การทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion ทั้งนี้เนื่องมาจากการทดสอบในวิธี Agar well diffusion ใช้สารตัวอย่างในปริมาณที่มากกว่า (ประสาทพรและคณะ, 2551) โดยงานวิจัยในครั้งนี้ ใช้สารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรสำหรับวิธี Agar well diffusion ในขณะที่วิธี Agar disc diffusion ใช้สารตัวอย่างเพียง 5 ไมโครลิตร ซึ่งการใช้สารในปริมาณที่น้อยๆ จะทำให้ผลการทดลองที่ได้ไม่ชัดเจน ทำให้มีผลต่อการสรุปผลการทดลอง ดังนั้นควรพิจารณาถึงปริมาณของสารตัวอย่างให้เหมาะสมเพื่อให้ผลการทดลองชัดเจนยิ่งขึ้น

จากการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย สรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีน ดอกกานพลู ส่วนเหนือดินของตะไคร้และใบพลู สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำการทดสอบได้ดี โดยน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนแสดงการยับยั้งได้ดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเชื้อ *C. albicans* ผลที่ได้สอดคล้องกับ Devkatte *et al*. (2005) ซึ่งศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 38 ชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* พบว่ามีพืช 23 ชนิดแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. albicans* โดยน้ำมันหอมระเหยอบเชยมีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งสามารถยับยั้งได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลู ตะไคร้ สระแหน่ญี่ปุ่น (Japanese mint) เจอราเนียม (geranium) มอเทีย โรชา (motia rosha) จิงเจอร์กลาส (ginger grass) มีค่า MIC และ MFC อยู่ระหว่างร้อยละ 0.01 ถึง 0.15 (โดยปริมาตร) โดยสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยอบเชย เป็นผลมาจากสาร cinnamaldehyde (Sanla-Ead *et al.,* 2006)

Smith - Palmer *et al.* (1998) ศึกษาความสามารถของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 5 ชนิด พบว่าน้ำมันหอมระเหยเบย์ (bay) อบเชย กานพลู และไทม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(thyme) มีความสามารถในการต้านการเจริญของแบคทีเรียที่ทำการทดสอบได้สูงสุด ซึ่งได้แก่ *E. coli, Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *S. aureus* และ *Listeria monocytogenes* สอดคล้องกับ Gupta *et al.* (2008a) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 10 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในอาหาร ผลการทดลองพบว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชยและกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำการทดสอบได้ดีที่สุด ซึ่งน้ำมันหอมระเหยอบเชย แสดงค่า MIC เท่ากับ ร้อยละ 1.25 โดยปริมาตร ขณะที่น้ำมันหอมระเหยกานพลูมีค่า MIC เท่ากับ ร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร เช่นเดียวกับการศึกษาของ Prabuseenivasan *et al.* (2006) ซึ่งได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 21 ชนิด พบว่าน้ำมันหอมระเหยอบเชย กานพลูและมะนาว (lime) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสูงสุด โดยน้ำมันหอมระเหยอบเชยมีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงที่สุด แสดงค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.8 ถึง 3.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รองลงมา คือ น้ำมันหอมระเหยกานพลู แสดงค่า MIC อยู่ระหว่าง 1.6 ถึง 6.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยสารสำคัญหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยอบเชยคือ cinnamaldehyde

สารประกอบกลุ่มต่างๆ ที่พบในสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจะแสดงกิจกรรมการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยไม่จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์ใดเซลล์หนึ่งแต่มีหลายๆ เป้าหมายในเซลล์ (Carson *et al*., 2002) โดยสารจะเข้าไปทำลายผนังเซลล์ทำให้เกิดการฉีกขาด จากนั้นจะเข้าไปทำลายฟอสโฟลิปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์เมมเบรน (cytoplasmic membrane) โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrance protiens) ถูกทำลาย ทำให้ชั้นของไขมัน (lipid bilayer) แยกออกจากกัน เกิดการรั่วของสารในไซโตพลาสซึม ส่วนประกอบของเซลล์ถูกทำลาย ทำให้น้ำผ่านเข้าไปได้มาก ซึ่งเป็นเหตุให้เกิดการปลดปล่อยองค์ประกอบต่างๆ ในเซลล์ หรืออาจทำให้สารในไซโตพลาสซึมเกิดการตกตะกอน อีกทั้งยังลดกิจกรรม ATP และลดพีเอช (pH) ภายในเซลล์ และอาจเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ในผนังเซลล์ หรือรบกวนการทำงานของ Protein motive force หรือรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างพลังงานและสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ (Burt, 2004) ส่วนน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสารในกลุ่มเทอร์ปีนจะมีผลต่อฟอสโฟลิปิดบนเยื่อหุ้มเซลล์เมมเบรน โดยโมเลกุลของส่วนที่ไม่ชอบน้ำของน้ำมันหอมระเหยจะละลายในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในไขมันโดยเฉพาะในสเตอรอลและฟอสโฟลิปิด (Ghfir *et al.,* 1994) และส่วนที่ชอบน้ำเข้าสู่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดการยับยั้งเอนไซม์ เมื่อมีการฉีกขาดของผนังเซลล์จะเกิดการรั่วไหลของไอออนจำเพาะต่างๆ ถึงแม้ว่าผนังเซลล์แบคทีเรียจะเกิดรอยแตกร้าว แต่ยังคงมีชีวิตรอดได้ แต่เมื่อรอยร้าวนั้นครอบคลุมบริเวณกว้างมากขึ้น ทำให้เซลล์สูญเสียองค์ประกอบภายในเซลล์ โมเลกุลและไอออนต่างๆ เกิดภาวะวิกฤตส่งผลให้แบคทีเรียตายในที่สุด โดย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

cinnamaldehyde เป็นสารสำคัญที่พบในน้ำมันหอมระเหยอบเชย (บัญญัติ, 2527; Prabuseenivasan *et al.*, 2006) ซึ่งหมู่คาร์บอนิลของ cinnamaldehyde จะเป็นตัวจับกับโปรตีนยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase (Wendakoon and Sakaguchi, 1995) อีกทั้ง cinnamaldehyde ยังเป็นสารที่มีความสามารถในการดึงดูดอิเล็กตรอนสูง ซึ่งจะรบกวนกระบวนการทางชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายโอนอิเล็กตรอนและทำปฏิกิริยากับสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น โปรตีนและกรดนิวคลิอิก ดังนั้นจึงสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Gupta *et al*., 2008b) เมื่อพิจารณาสารออกฤทธิ์ของดอกกานพลูและใบพลู พบว่าสารประกอบหลัก คือ eugenol ซึ่งกลไกในการยับยั้งจุลินทรีย์เกิดจากหมู่ไฮดรอกซิลของ eugenol ทำหน้าที่จับกับโปรตีนซึ่งไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในจุลินทรีย์และยังขัดขวางขบวนการละลายของไขมันที่เซลล์เมมเบรน เป็นผลให้ความสามารถในด้านออสโมติคแบร์ริเออร์ (osmotic barrier) ลดลง เซลล์ของจุลินทรีย์จึงตายได้ (บัญญัติ, 2527; Wendakoon and Sakaguchi, 1995; Bennis, *et al*., 2004; Gill and Holley, 2004) ส่วนสารสำคัญที่พบในน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ คือ citral ออกฤทธิ์โดยแพร่เข้าไปในเซลล์ทำลายโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน (Meincken *et al.*, 2005) ยับยั้งการสังเคราะห์เซลล์เมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์ (Harris, 2002) ทำให้เซลล์หดตัวและโครงสร้างของเซลล์บางส่วนสลายไป เป็นผลให้เชื้อไม่สามารถรอดชีวิตได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมันหอมระเหย สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยชนิดนั้นๆ ความเข้มข้นที่ใช้ รวมถึงสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของไอน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีVapor diffusion

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของไอน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี Vapor diffusion ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10.00 โดยปริมาตร พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 15 ชนิดมีเพียงน้ำมันหอมระเหยอบเชยจีนเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* โดยแสดง inhibition zone เท่ากับ 5.16 เซนติเมตร แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus, S. epidermidis*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* ได้ จากนั้นจึงทำการทดสอบฤทธิ์ของไอน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจีนต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.00, 1.00, 0.50, 0.25 และ 0.10 โดยปริมาตร ซึ่งพบว่ามีเพียงความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตรเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้โดยมี inhibition zone เท่ากับ 3.40 เซนติเมตร (ภาพที่ 12) ขณะที่ความเข้มข้นอื่นที่ทดสอบไม่เกิด inhibition zone (ตารางที่ 15)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 15 ผลของไอน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี Vapor diffusion

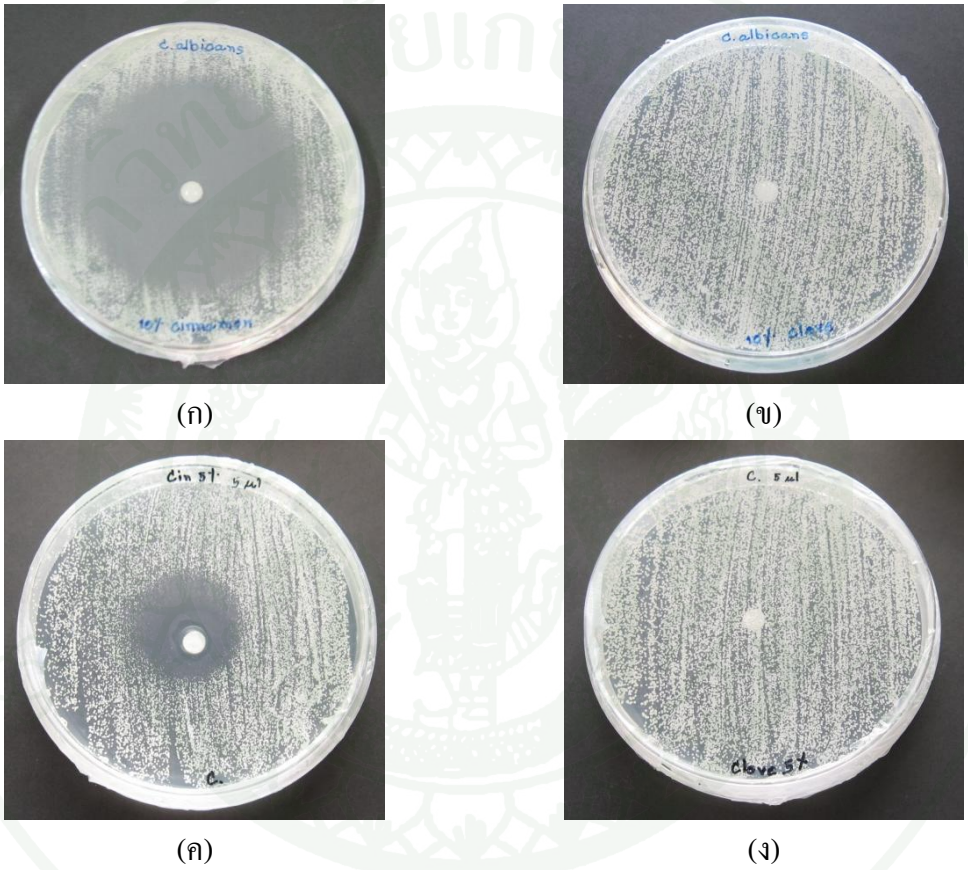
พืชสมุนไพร	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (ซม.) ของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ					
	10.00	**5.00**	**1.00**	**0.50**	**0.25**	**0.10**
กานพลู	-	-	-	-	-	-
ตะไคร้	-	-	-	-	-	-
มะนาว	-	-	-	-	-	-
ตะไคร้หอม	-	-	-	-	-	-
พลู	-	-	-	-	-	-
เทียนข้าวเปลือก	-	-	-	-	-	-
ผักชี	-	-	-	-	-	-
จันทน์เทศ	-	-	-	-	-	-
เปราะหอม	-	-	-	-	-	-
ว่านน้ำ	-	-	-	-	-	-
แฝกหอม	-	-	-	-	-	-
ยูคาลิปตัส	-	-	-	-	-	-
มะกรูด	-	-	-	-	-	-
สน	-	-	-	-	-	-
อบเชยจีน	5.16	3.40	-	-	-	-

หมายเหตุ - ไม่ปรากฏ inhibition zone

ไอน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* แต่ไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ โดยผลการทดลองแตกต่างกับงานวิจัยของ Lopez *et al.* (2005) ซึ่งได้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด แกรมลบ 4 ชนิด ยีสต์ 1 ชนิด และราอีก 2 ชนิด ของไอน้ำมันหอมระเหย 6 ชนิด คือ โหระพา ขิง อบเชย กานพลู โรสแมรี่ และผักชีลาว พบว่าไอน้ำมันหอมระเหยของอบเชยและกานพลูมีฤทธิ์ที่ดีในทุกเชื้อที่ทดสอบ ในขณะที่ไอน้ำมันหอมระเหยของโรสแมรี่และโหระพาไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เลย นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยของ Tyagi and Malik (2010) ซึ่งได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของไอน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่ความเข้มข้น 20, 40 และ 60 ไมโครลิตร ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 40 ไมโครลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

C. albicans ได้อย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ghalem and Mohamed (2008) พบว่าใช้ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ทดสอบถึง 50 ไมโครลิตร จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ จะเห็นว่างานวิจัยส่วนใหญ่ใช้น้ำมันหอมระเหยในปริมาณที่มากกว่าเมื่อเทียบกับงานวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งใช้น้ำมันหอมระเหยเพียง 5 ไมโครลิตร เป็นผลให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบได้



(ก) (ข)

(ค) (ง)

ภาพที่ 12 ประสิทธิภาพของไอน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี Vapor diffusion; อบเชยจีนความเข้มข้นร้อยละ 10.00 โดยปริมาตร (ก) กานพลูความเข้มข้นร้อยละ 10.00 โดยปริมาตร (ข) อบเชยจีนความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ค) กานพลูความเข้มข้นร้อยละ 5.00 โดยปริมาตร (ง)

ข้อดีของการทดสอบน้ำมันหอมระเหยแบบฤทธิ์ทางอ้อม (น้ำมันหอมระเหยอยู่ในรูปไอระเหย) คือ ฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีการทดสอบน้ำมันหอมระเหยแบบฤทธิ์ทางตรง (น้ำมันหอมระเหยอยู่ในรูปของเหลว) เนื่องจากไอของน้ำมันหอมระเหยสัมผัส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยตรงกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ ขณะที่ฤทธิ์ทางตรงมีข้อกำจัดในการละลายและการแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ (Tyagi and Malik, 2010) อย่างไรก็ตามการทดสอบแบบฤทธิ์ทางอ้อมมีข้อเสีย คือ สิ้นเปลืองแรงงานและสิ้นเปลืองอุปกรณ์ในการทดสอบ เพราะในหนึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทดสอบได้เพียงหนึ่งความเข้มข้นและหนึ่งซ้ำเท่านั้น (Nedorostova *et al.,* 2009)

เมื่อพิจารณากิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยที่ศึกษา พบว่าน้ำมันหอมระเหยเปลือกอบเชยจีน สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้กว้างทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบและเชื้อยีสต์ ดังนั้นจึงได้นำมาศึกษาความเข้มข้นน้อยสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้

5. การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดเฉพาะสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี 96 well micro plate dilution

จากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนมีประสิทธิภาพสูงสุด จึงได้นำมาศึกษาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ (minimal inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ (minimal lethal concentration, MLC) ซึ่งอาจใช้ค่าที่จำเพาะเจาะจงกว่า คือ minimal bactericidal concentration, MBC สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และสำหรับเชื้อรา ใช้คำว่า minimal fungicidal concentration, MFC (ประสาทพรและคณะ, 2551)

จากการทดสอบหาค่า MIC และ MBC/MFC ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีน พบว่าน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ *E. coil* และ *P. aeruginosa* ตามลำดับ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.075, 0.60 และ 0.60 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ตามลำดับ และแสดงค่า MFC เท่ากับ 0.075 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร สำหรับ *C. albicans* ขณะที่เชื้อ *E. coil* และ *P. aeruginosa* แสดงค่า MBC เท่ากับ 0.60 และ 1.25 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ตามลำดับ แบคทีเรียแกรมบวกถูกยับยั้งได้น้อยที่สุดจากเชื้อทั้งหมดที่ทำการทดสอบ แสดงค่า MIC และ MBC อยู่ระหว่าง 1.25 – 5.00 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร โดย *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 1.25 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ค่า MBC เท่ากับ 2.50 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร และ *S. epidermidis* มีค่า MIC เท่ากับ 2.50 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ค่า MBC เท่ากับ 5.00 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 16)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 16 ค่า MIC และ MBC/MFC ของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจีน

เชื้อ	**MIC** (µl/ml)	**MBC/MFC (**µl/ml)
Staphylococcu aureus	1.25	2.50
Staphylococcus epidermidis	2.50	5.00
Escherichia coli	0.60	0.60
Pseudomonas aeruginosa	0.60	1.25
Candida albicans	0.075	0.075

จะเห็นว่าผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองในขั้นต้นที่พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วแบคทีเรียแกรมบวกจะถูกยับยั้งโดยสารต้านจุลินทรีย์ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ แต่เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยเป็นสารประกอบที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นอาจทำให้สารดังกล่าวสามารถละลายได้ดีในชั้นไขมันของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ จึงสามารถแพร่ผ่านและเข้าไปทำลายผนังเซลล์จุลินทรีย์ หรือทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดเป็นรู จึงเกิดการสูญเสียความสามารถในการเข้าออกของสารอาหาร เอนไซม์สำคัญต่างๆ และยังทำให้องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์มีการรั่วไหลออกมา จุลินทรีย์จึงตายได้

รายงานการวิจัยอื่นๆ ศึกษาค่า MIC และ MBC/MFC ของน้ำมันหอมระเหยอบเชยจีน ซึ่งแสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่สูงสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ เช่น รายงานของ Devkatte *et al.* (2005) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธีเจือจางในอาหารเหลว พบว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชยมีประสิทธิภาพสูงสุดจากพืชทั้งหมดที่คัดเลือกมา โดยแสดงค่า MIC และ MFC เท่ากับ 0.10 และ 0.30 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ขณะที่น้ำมันหอมระเหยกานพลูและตะไคร้ มีค่า MIC และ MFC อยู่ระหว่าง 0.60 ถึง 1.20 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร Gupta *et al.* (2008a) ศึกษากิจกรรมการต้านการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของน้ำมันหอมระเหยอบเชย ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก 7 ชนิด และแบคทีเรียแกรมลบ 3 ชนิด โดยวิธี Agar well diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยอบเชยแสดงประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียแกรมลบ (MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) ได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (MIC เท่ากับ 25.0 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) ยกเว้น *P. aeruginosa* ที่สามารถต้านทานต่อสารต้านจุลินทรีย์ที่ทดสอบ ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากพืชชนิดอื่นที่ทำการทดสอบจะไวต่อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เช่นเดียวกับ Prabuseenivasan *et al.* (2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศึกษากิจกรรมของน้ำมันหอมระเหย 21 ชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อที่ทำการทดสอบ โดยแสดงค่า MIC ในช่วง 0.8 ถึง 3.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งการที่ค่า MIC ในแต่ละงานวิจัยต่างกัน เนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ เช่นความแตกต่างของสารประกอบในพืช ซึ่งอาจเกิดจากสายพันธุ์ แหล่งเพาะปลูก อายุของพืช ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยว การที่พืชเสื่อมสภาพจากการเก็บเป็นเวลานาน เป็นต้น (วารุณี, 2547) วิธีที่ใช้ในการสกัดสาร การเลือกชิ้น ส่วนของพืชที่นำมาใช้สกัดและปริมาณของเชื้อทดสอบ วิธีการทดสอบ ความเข้มข้นของสารทดสอบ ความแตกต่างจากปัจจัยที่ได้กล่าวมาจะส่งผลถึงการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนั้น (อุทัย, 2551; Burt, 2004)

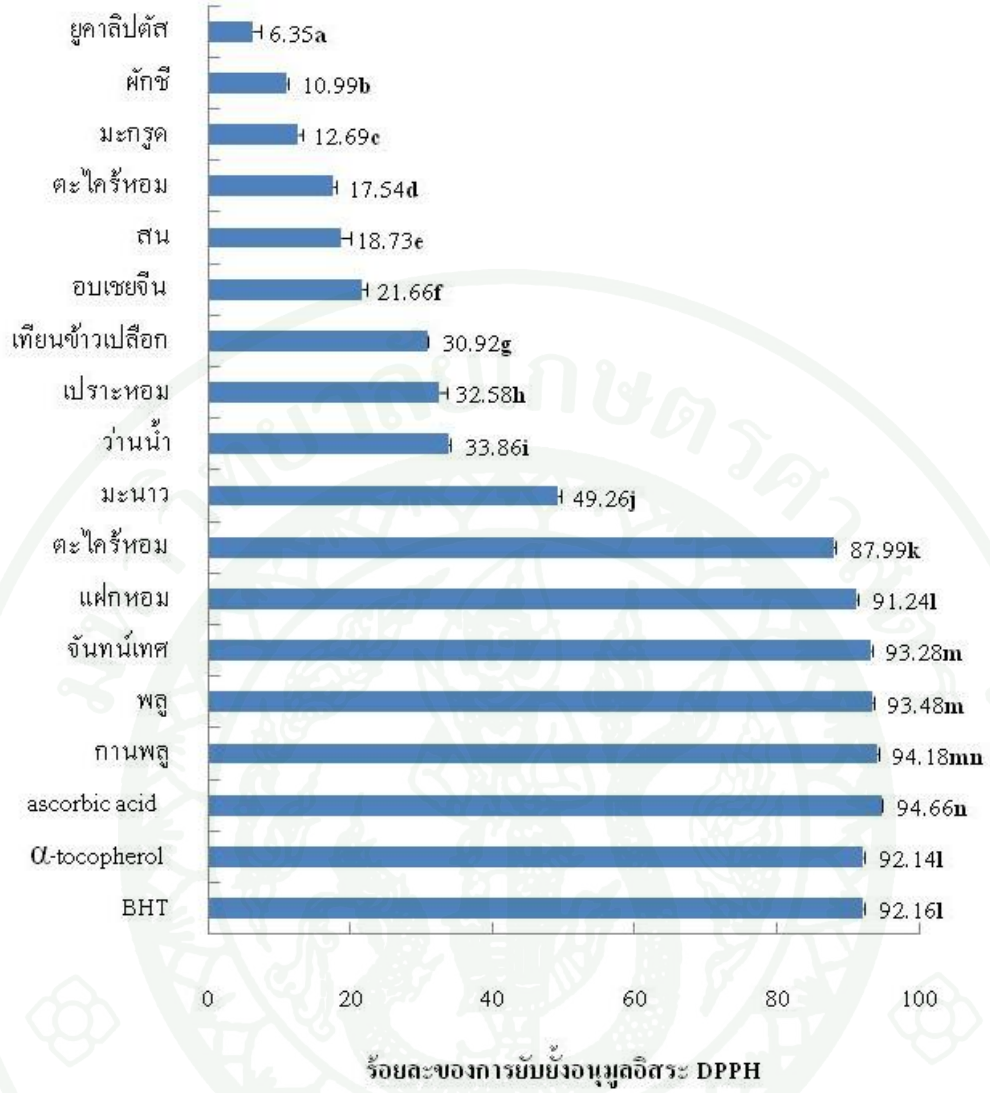
6. การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย

6.1 วิธี DPPH radical scavenging (DPPH assay)

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH· ของน้ำมันหอมระเหย 15 ชนิด ได้แก่ เทียนข้าวเปลือก ผักชี จันทน์เทศ เปราะหอม ว่านน้ำ กานพลู พลู มะนาว อบเชยจีน ตะไคร้ ตะไคร้หอม แฝกหอม ยูคาลิปตัส มะกรูด และสน ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู แสดงฤทธิ์สูงสุดในการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยแสดงค่าร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ เท่ากับ 94.18±0.11 รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากใบพลู (93.48±0.17) น้ำมันหอมระเหยจากลูกจันทน์เทศ (93.28±0.16) น้ำมันหอมระเหยจากรากแฝกหอม (91.24±0.23) ตามลำดับ ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากใบมะนาว เมล็ดเทียนข้าวเปลือก เหง้าว่านน้ำ เหง้าเปราะหอม เปลือกอบเชยจีน ใบและกิ่งสน ส่วนเหนือดินของตะไคร้ ผิวมะกรูด เมล็ดผักชีและน้ำมันหอมระเหยจากใบยูคาลิปตัส แสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระน้อยกว่าร้อยละ 50 (ภาพที่ 13)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวกับ positive control คือ butylated hydroxytoluene (BHT), α - tocopherol และ ascorbic acid พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู ใบพลู และลูกจันทน์เทศ มีประสิทธิภาพไม่ต่างจาก ascorbic acid อีกทั้งยังสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูงกว่า BHT และ α- tocopherol ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากรากแฝกหอม พบว่ามีประสิทธิภาพไม่ต่างกับ BHT และ α- tocopherol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 13 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยวิธี DPPH (a, b, c ตัวอักษรที่กำกับไว้เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's multiple test (DMRT))

จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูล DPPH· ที่มีประสิทธิภาพมาทดสอบ เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู ใบพลู ลูกจันทน์เทศ รากแฝกหอม และจากส่วนเหนือดินของตะไคร้หอม จากผลการทดสอบ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลูมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด เท่ากับ 0.20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากใบพลู (0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) น้ำมันหอมระเหยจากลูกจันทน์เทศ (8.83 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตะไคร้หอม (12.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และน้ำมันหอมระเหยจากรากแฝกหอม (32.08 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 ค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ด้วยวิธี DPPH

น้ำมันหอมระเหย	IC_{50} (mg/ml)
กานพลู	0.20
พลู	0.25
จันทน์เทศ	8.83
ตะไคร้หอม	12.05
แฝกหอม	32.08

ผลของค่า IC_{50} จากการศึกษาในครั้งนี้เปรียบเทียบกับรายงานของประภัสสรและวัชรี (2011) ซึ่งศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของน้ำมันหอมระเหย โดยใช้สารละลาย DPPH ต่อน้ำมันหอมระเหยในอัตราส่วน 1:1 (50ไมโครลิตร: 50ไมโครลิตร) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader พบค่า IC_{50} ของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู ส่วนเหนือดินของตะไคร้หอม และน้ำมันหอมระเหยจากรากแฝกหอม เท่ากับ 0.134±0.005, 0.657±0.138 และ 0.635±0.036 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่าค่า IC_{50} จากรายงานของประภัสสรและวัชรี (2011) ต่ำกว่าการศึกษาในครั้งนี้ ทั้งนี้เนื่องจากอัตราส่วนของสารละลาย DPPH ต่อน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ต่างกัน ซึ่งในการทดสอบครั้งนี้ใช้อัตราส่วนถึง 30:1 คือสารละลาย DPPH 3 มิลลิลิตรต่อน้ำมันหอมระเหย 100 ไมโครลิตร ซึ่งทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ จึงเป็นผลให้ค่า IC_{50} ที่ได้มีค่าสูงกว่า นอกจากปริมาตรของสารละลาย DPPH และปริมาตรของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบจะเป็นปัจจัยที่ทำให้ค่า IC_{50} ที่ได้มีความแตกต่างกันแล้ว เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาก็มีผลด้วย ดังเช่นการศึกษาของ Jukic *et al.* (2006) พบค่า IC_{50} ของน้ำมันหอมระเหยจากลูกจันทน์เทศเท่ากับ 22 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของ DPPH และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาแตกต่างกัน ทำให้ค่า IC_{50} ที่ได้จากการทดสอบมีความต่างกัน

น้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลูแสดงร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดจากน้ำมันหอมระเหยทั้งหมดที่นำมาศึกษา สอดคล้องกับ Viuda-Martos *et al.* (2010) ศึกษา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอาหารเมดิเตอร์เรเนียน พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู แสดงฤทธิ์สูงที่สุดในการยับยั้งอนุมูล DPPH· โดยสามารถยับยั้งได้สูงกว่าสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสังเคราะห์ คือ BHT และ ascorbic acid เช่นเดียวกับ Politeo *et al.* (2006) ทำการคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ 12 ชนิด เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ จากผลการทดสอบพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู แสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีผลมาจาก eugenol ซึ่งเป็นสารสำคัญหลักที่พบในปริมาณสูง

นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Muhammad *et al.* (2011) ซึ่งได้เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและโป๊ยกั๊ก (*Illicium verum* Hook.) โดยใช้ BHT เป็นสารอ้างอิงมาตรฐาน โดยวิธีทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/4 มิลลิลิตร พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู แสดงร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ขณะที่ BHT และน้ำมันหอมระเหยโป๊ยกั๊กมีร้อยละในการยับยั้งอนุมูลต่ำกว่า โดยความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระเป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งในน้ำมันหอมระเหยกานพลูมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด คือ 934.34±1.6 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 1 กรัม ขณะที่โป๊ยกั๊กมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพียง 85.36±0.28 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่ให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระและหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระในขั้นต้น (initiation)

น้ำมันหอมระเหยจากใบพลูแสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีรองลงมาจากน้ำมันหอมระเหยกานพลู เช่นเดียวกับรายงาน Row and Ho (2009) ซึ่งศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดของใบพลูโดยใช้น้ำและเมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด พบสารสำคัญหลัก คือ eugenol โดยสารสกัดเมทานอลและน้ำจากใบพลูแสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีเช่นเดียวกันกับน้ำมันหอมระเหยที่แสดงร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูงเช่นกัน โดยกิจกรรมการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นผลเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลิกที่พบในส่วนของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหย

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากลูกจันทน์เทศในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าให้ผลรองจากกานพลูและพลู ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Kim *et al.* (2010) ศึกษา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยจากลูกจันทน์เทศและองค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าน้ำมันหอมระเหยดังกล่าว แสดงประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งอนุมูลอิสระ และพบ eugenol, methoxy eugenol และ isoeugenol เป็นองค์ประกอบทางเคมีหลักในน้ำมันหอมระเหย อีกทั้งนี้ยังได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ขององค์ประกอบทางเคมีหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหย จากการศึกษาพบว่า eugenol มีประสิทธิภาพมากกว่าสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสังเคราะห์ BHT และ α-tocopherol ขณะที่ isoeugenol แสดงความสามารถต่ำสุดในการเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระ การที่ eugenol มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูง เนื่องจากเป็นสารประกอบฟีนอลิกโดยมีหมู่ ไฮดรอกซิลเป็นหมู่ทำหน้าที่ในการให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ สอดคล้องกับ Reberto and Baratta (2000) ศึกษาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหย 98 ชนิดและองค์ประกอบทางเคมี พบว่าสารทดสอบที่มีโมโนเทอร์ปีนคาร์บอนจะแสดงฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับหมู่ทำหน้าที่ของสารทดสอบชนิดนั้นๆ ด้วย

น้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลูแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด เนื่องจากพบ eugenol ซึ่งเป็นสารสำคัญหลักที่พบในปริมาณสูงคือ ร้อยละ 91 (Politeo *et al.*, 2006) ขณะที่พลูและจันทน์เทศพบ eugenol ในปริมาณร้อยละที่น้อยกว่า ทำให้มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกานพลู ซึ่ง eugenol เป็นสารประกอบฟีนอลิก โดยออกซิเจนจะทำให้ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงขึ้น (Kulisic *et al.,* 2004) ซึ่งในโครงสร้างของ eugenol มีออกซิเจนอยู่ถึง 2 อะตอม ทำให้มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนเข้าหาตัวเองได้ดี (ค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตีสูง) จึงมีความเป็นลบมาก ดังนั้นไฮโดรเจนที่อยู่ในโครงสร้างก็จะมีความเป็นบวกมาก และหลุดออกได้ง่าย (ประภัสสร และวัชรี, 2554) ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากรากแฝกหอม และน้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตะไคร้หอม มีสารสำคัญหลักคือ vetivone (Kim *et al*, 2005) และ geraniol (นิจศิริ, 2534) ซึ่งในโครงสร้างมีออกซิเจนเพียง 1 อะตอม เป็นผลทำให้ความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนน้อยกว่า ดังนั้นความสามารถในการให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระจึงน้อยกว่าด้วย อีกทั้งโครงสร้างของ eugenol เป็นวงแหวนเบนซีนประกอบกับมีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่ทำหน้าที่ ทำให้อิเล็กตรอนสามารถเคลื่อนย้ายได้ทั่วโครงสร้าง (delocalization) จึงแสดงกิจกรรมการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้สูงกว่า (โอภาและคณะ, 2550; Pietta, 2000)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

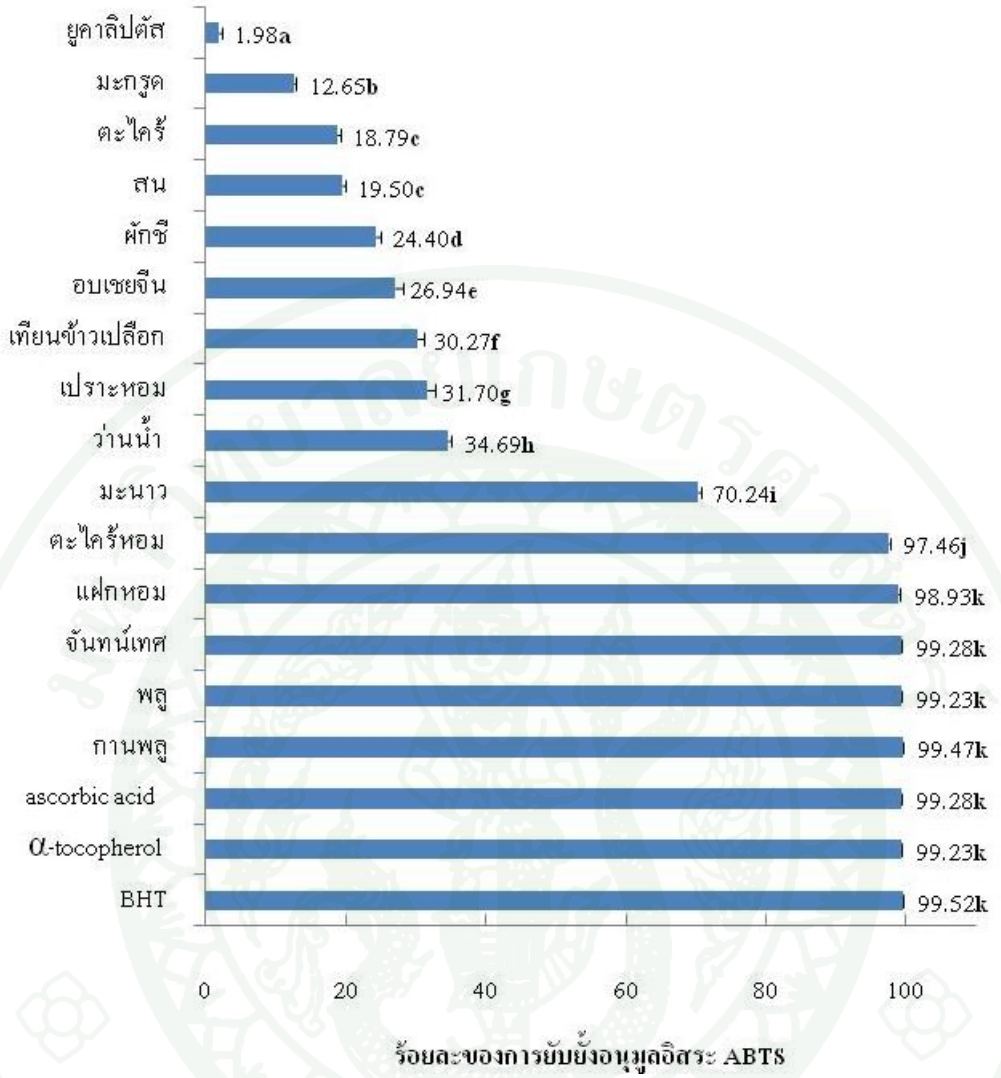
6.2 วิธี ABTS radical scavenging (ABTS assay)

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ของน้ำมันหอมระเหย 15 ชนิด คือ เทียนข้าวเปลือก ผักชี จันทน์เทศ เปราะหอม ว่านน้ำ กานพลู พลู มะนาว อบเชยจีน ตะไคร้ ตะไคร้หอม แฝกหอม ยูคาลิปตัส มะกรูด และสน ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู แสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยแสดงร้อยละของการยับยั้งเท่ากับ 99.47±0.09 รองลงมา คือน้ำมันหอมระเหยจากลูกจันทน์เทศ (99.28±0.07) น้ำมันหอมระเหยจากใบพลู (99.23±0.00) และน้ำมันหอมระเหยจากรากแฝกหอม (98.93±0.19) ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวกับ positive control คือ BHT, α-tocopherol และ ascorbic acid พบว่าน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ไม่แตกต่างทางสถิติกับ positive control (ภาพที่ 14)

ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตะไคร้หอมและน้ำมันหอมระเหยจากใบมะนาวแสดงร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 97.46±0.20 และ 70.24±0.42 ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพต่ำกว่า positive control ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่ทำการศึกษาอีก 9 ชนิด ซึ่งได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำ เมล็ดเทียนข้าวเปลือก เหง้าเปราะหอม เปลือกอบเชยจีน ใบและกิ่งของสน ส่วนเหนือดินของตะไคร้ ผิวมะกรูด เมล็ดผักชีและน้ำมันหอมระเหยจากใบยูคาลิปตัส แสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ น้อยกว่าร้อยละ 50 (ภาพที่ 14)

จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพมาทดสอบ เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ซึ่งได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู ใบพลู ลูกจันทน์เทศ รากแฝกหอม และจากส่วนเหนือดินของตะไคร้หอม จากการทดสอบพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู แสดงความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ คือ 0.19 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากใบพลู (0.40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) น้ำมันหอมระเหยจากลูกจันทน์เทศ (8.84 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) น้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตะไคร้หอม (12.19 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และน้ำมันหอมระเหยจากรากแฝกหอม (26.89 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ (ตารางที่ 18)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยวิธี ABTS (a, b, c ตัวอักษรที่กำกับไว้เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's multiple test (DMRT))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 18 ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี ABTS

น้ำมันหอมระเหย	IC_{50} (mg/ml)
กานพลู	0.19
พลู	0.40
จันทน์เทศ	8.84
ตะไคร้หอม	12.19
แฝกหอม	26.89

จะเห็นได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลูสามารถยับยั้งอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ได้ดีที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Glucin *et al.* (2010) ที่พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลูมีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ และไม่แตกต่างกับ BHA และ BHT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เช่นเดียวกับ Wang *et al.* (2010) ศึกษากิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลูและองค์ประกอบทางเคมีหลัก โดยวิธีการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า eugenol ซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีหลักที่พบในปริมาณสูงแสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากกว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู ขณะที่ eugenol acetate และ β - caryophyllene เป็นองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลูที่แสดงกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระน้อยที่สุด ดังนั้นการที่ eugenol มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูง เนื่องจากเป็นสารประกอบฟีนอลิก มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่ทำหน้าที่ โดยการให้โฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระและหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระในขั้นต้น (initiation) เช่นเดียวกับการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

Arenas *et al.* (2011) ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู eugenol และอนุพันธ์ของ eugenol ผลการทดสอบพบว่า eugenol และอนุพันธ์ของ eugenol มีศักยภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระมากกว่าสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสังเคราะห์ ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลูแสดงประสิทธิภาพต่ำกว่า จะเห็นว่าสารสำคัญหลักในน้ำมันหอมระเหย แสดงกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำมันหอมระเหย ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าสารสำคัญหลักในน้ำมันหอมระเหยเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้น้ำมันหอมระเหยชนิดนั้นๆ แสดงกิจกรรมการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้มากหรือน้อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.3 วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

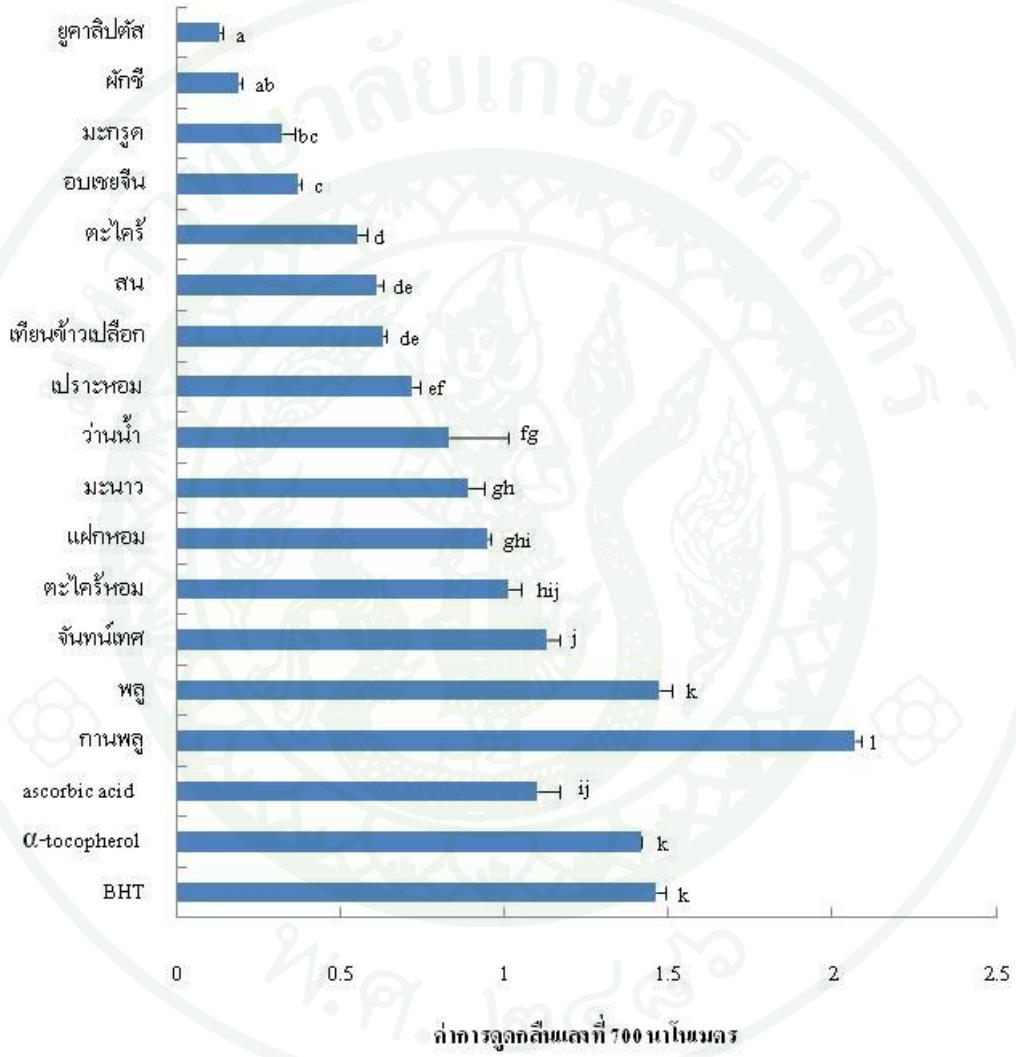
จากการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์ (reducing power) ของน้ำมันหอมระเหย 15 ชนิด ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู แสดงความสามารถสูงสุดในการรีดิวซ์ สำหรับพืชที่มีประสิทธิภาพรองลงมา คือ น้ำมันหอมระเหยจากใบพลู ลูกจันทน์เทศ ส่วนเหนือดินของตะไคร้หอม และน้ำมันหอมระเหยจากรากแฝกหอม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวกับ positive control พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลูมีประสิทธิภาพสูงกว่า positive control ทั้ง 3 ชนิด คือ BHT, α-tocopherol และ ascorbic acid น้ำมันหอมระเหยจากใบพลูแสดงประสิทธิภาพสูงกว่า ascorbic acid และประสิทธิภาพไม่ต่างจาก BHT และ α-tocopherol นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยจากลูกจันทน์เทศ ส่วนเหนือดินของตะไคร้หอม และน้ำมันหอมระเหยจากรากแฝกหอม มีประสิทธิภาพไม่ต่างจาก ascorbic acid แต่ประสิทธิภาพต่ำกว่า BHT และ α-tocopherol ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากใบมะนาว เมล็ดเทียนข้าวเปลือก เหง้าเปราะหอม เปลือกอบเชยจีน ใบและกิ่งของสน ส่วนเหนือดินของตะไคร้ ผิวมะกรูด เมล็ดผักชี และน้ำมันหอมระเหยจากใบยูคาลิปตัส มีประสิทธิภาพต่ำกว่า positive control ที่ใช้ในการศึกษา (ภาพที่ 15)

ผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Viuda-Martos *et al.* (2009); Muhammad *et al.* (2011) ซึ่งพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลูแสดงความสามารถสูงสุดในการเป็นสารรีดิวซ์จากพืชทั้งหมดที่ทำการทดสอบ โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในน้ำมันหอมระเหย อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพดีกว่า BHT และ α-tocopherol (Gulcin *et al.,* 2010) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Wang *et al.* (2010) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบอบเชย ดอกกานพลู แสดงความสามารถสูงสุดในการเป็นรีดิวซ์ซิงเอเจนต์ ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากไทม์แดง แสดงฤทธิ์ในการเป็นตัวรีดิวซ์น้อยกว่าอบเชยและกานพลู เนื่องจากพบว่ามี thymol ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบทางเคมีหลักซึ่งพบในปริมาณน้อยกว่า (ร้อยละ 63.65) eugenol ที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีหลักที่พบในใบอบเชยและดอกกานพลู (ร้อยละ 82.87 และ 82.32)

น้ำมันหอมระเหยจากใบพลู แสดงความสามารถที่ดีในการเป็นรีดิวซ์ซิงเอเจนต์รองลงมาจากน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู สอดคล้องกับ Row and Ho (2009) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบพลูแสดงฤทธิ์ที่ดีในการเป็นสารรีดิวซ์ นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยจากลูก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จันทน์เทศ ยังแสดงความสามารถที่ดีในการเป็นสารรีดิวซ์ โดยมีประสิทธิภาพรองลงมาจากดอกกานพลู และใบพลู ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Paiaru *et al.* (2012) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากลูกจันทน์เทศ มีศักยภาพดีในการเป็นสารรีดิวซ์ และยังพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ของก้อนมะเร็งได้ (antiangiogenic activity)



ภาพที่ 15 ความสามารถในการเป็นสารรีดิวซ์ (reducing power) ของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี FRAP

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.4 วิธี Hydrogen peroxide scavenging (H_2O_2 assay)

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide ของน้ำมันหอมระเหย 15 ชนิด เปรียบเทียบกับ positive control คือ ascorbic acid, BHT และ α-tocopheral ที่ความเข้มข้น 75, 50 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าน้ำมันหอมระเหย 7 ชนิด คือตะไคร้ อบเชยจีน เทียนข้าวเปลือก ว่านน้ำ มะนาว พลู และเปราะหอม ไม่สามารถทดสอบได้ที่ความเข้มข้น 75 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 19) เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นดังกล่าวดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 นาโมเมตร ซึ่งสอดคล้องกับ Ghaisas *et al.* (2008) ที่กล่าวไว้ว่าการทดสอบด้วยวิธีการนี้ พบว่าตัวอย่างที่ทำการทดสอบมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนี้ ดังนั้นจึงต้องทำการวัดแบลงค์ (blank) ของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่ปราศจากสารละลาย hydrogen peroxide และเมื่อน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวทำปฏิกิริยากับสารละลาย hydrogen peroxide ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มมากขึ้น มีผลต่อการอ่านด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ดังรายงานของ Samoijlik *et al.* (2010) ที่กล่าวว่าสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยสามารถทำปฏิกิริยากับ hydrogen peroxide เกิดการรบกวนที่ความยาวคลื่นที่ทำการทดสอบ (230 นาโนเมตร) และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นยังมีผลต่อการทดสอบอีกด้วย โดยเฉพาะน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นสูงๆ สอดคล้องกับงานของ ภัทราพรและธัญญรัตน์ (2553) ซึ่งพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างให้สูงขึ้น จะไม่สามารถทำการทดสอบได้ ทั้งนี้เพราะเมื่อนำสารตัวอย่างทำปฏิกิริยาแล้ว เกิดความขุ่นจึงไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้

จากการศึกษาที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่ได้แสดงผลอยู่ในช่วงกว้าง โดยพบว่า ascorbic acid แสดงร้อยละของการยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide สูงที่สุด เท่ากับ 82.08±0.38 รองลงมา คือ น้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตะไคร้และน้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดเทียนข้าวเปลือก มีร้อยละในการยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide เท่ากับ 66.49±0.81 และ 54.02±0.74 ตามลำดับ โดยที่ α-tocopheral และ BHT มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำในการทดสอบด้วยวิธีนี้ สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดผักชี แสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide น้อยที่สุด (ร้อยละ 5.87±0.10) (ตารางที่ 19) ซึ่งจากการทดสอบพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยให้สูงขึ้น ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide จะเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ebrahimzadeh *et al.* (2010) ซึ่งพบว่าความสามารถในยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide เพิ่มสูงขึ้น เมื่อความเข้มข้นของตัวอย่างที่ใช้สูงขึ้นเช่นกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 19 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide (H_2O_2) ของน้ำมันหอมระเหย

ตัวอย่าง	ร้อยละการยับยั้งอนุมูล **hydrogen peroxide±SD** *		
	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)		
	75	**50**	**25**
BHT	58.39±0.76	42.68±0.41	17.41±0.41d
ascorbic acid	-	-	82.08±0.38o
α-tocopheral	58.76±0.49	46.33±0.21	30.54±0.16i
กานพลู	73.96±0.18	53.33±0.66	24.16±1.65g
มะกรูด	18.79±0.82	16.32±0.91	7.66±0.38b
ผักชี	7.74±0.20	6.34±0.00	5.94±0.10a
ยูคาลิปตัส	14.60±0.20	9.98±0.09	8.17±0.76b
สน	24.48±0.33	18.82±0.5	16.32±0.66d
ตะไคร้	-	-	66.49±0.81n
อบเชยจีน	-	-	28.28±0.31h
เทียนข้าวเปลือก	-	-	54.02±0.74m
ว่านน้ำ	-	-	40.45±0.43l
ตะไคร้หอม	22.11±1.61	12.64±0.76	12.59±0.20c
แฝกหอม	37.45±1.03	29.84±0.1	21.50±0.37f
มะนาว	-	-	38.39±1.61k
จันทน์เทศ	42.08±0.99	29.95±0.45	19.67±0.72e
พลู	-	-	17.24±0.54d
เปราะหอม	-	-	36.49±0.95j

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

– ไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้

a, b, c ตัวอักษรที่กำกับไว้เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's multiple test (DMRT)

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่างๆ ตัวอย่าง เช่น Majnooni *et al.* (2012) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide ของน้ำมันหอมระเหยจากใบของ *Citrus aurantium* พบสารสำคัญหลัก คือ limonene ในปริมาณ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ร้อยละ 57 โดยน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวมีกิจกรรมยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide ต่ำกว่าสารมาตรฐานอ้างอิง BHA การศึกษาของ Samojlik *et al.* (2010) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดของยี่หร่า (*Carum carvi*) สามารถยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide ได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดของผักชี (*Coriandrum sativum*) IC_{50} น้อยกว่า 2.5 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ขณะที่เมล็ดของผักชี มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.05 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร และยังมีการศึกษากับสารสกัดจากพืช เช่น การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide ของสารสกัดจากใบของต้นกระรอกน้ำข้าว (*Glycosmis pentaphylla*) และใบของต้นเสี้ยวดอกขาว (*Bauhinia variegata*) ด้วยเอทานอล ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากใบของต้นดอกเสี้ยวขาวด้วยเอทานอล มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide สูงกว่าสารมาตรฐาน ascorbic acid ขณะที่สารสกัดจากใบกระรอกน้ำข้าว แสดงความสามารถต่ำในการยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide (Bhatia *et al.,* 2011) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide ของสารสกัดเบญจมาศ (*Chrysanthemum morifolium*) ด้วยน้ำ มีความสัมพันธ์สูงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบ (Duh *et al.,* 1999) เช่นเดียวกับ Benkeblia (2005) พบว่าสารสกัดกระเทียม (*Allium sativum*) ด้วยเมทานอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide สูงกว่าสารสกัดหอมหัวใหญ่ (*Allium cepa*) 4 ชนิด คือ ชนิดสีเขียว สีเหลือง สีแดง และสีม่วง โดยในสารสกัดกระเทียมพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด

อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบนี้มีการใช้ยังไม่แพร่หลายนัก อาจเนื่องมาจากมีข้อกำจัดดังที่กล่าวมาข้างต้น โดยส่วนใหญ่การทดสอบความสามารถในการกำจัดหรือยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide จะทำในระบบของกรดไขมันลิโนลีอิก (Ferric thiocyanate method) (Duan *et al.,* 2007; Anwer *et al.,* 2009; Ju-Sung and Myong -Jo, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Hui *et al.,* 2010) โดยกรดไขมันจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่มีในระบบ ซึ่งใช้ความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นจึงทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศได้ hydrogen peroxide เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปทำปฏิกิริยา สารต้านอนุมูลอิสระจะทำงานโดยให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น จึงสามารถลดการเกิดเป็นอนุมูลอิสระของกรดลิโนลีอิกได้ ซึ่งการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงจะเป็นตัวบ่งบอกถึงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการเกิด hydrogen peroxide ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.5 การหาความสัมพันธ์ของผลการทดลองจากวิธีการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย

ตารางที่ 20 แสดงค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ซึ่งเป็นค่าที่บอกความสัมพันธ์ของแต่ละวิธีที่ใช้ในการทดสอบความสามารถการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของงานวิจัยในครั้งนี้ โดยใช้สถิติวิเคราะห์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson's correlation) ซึ่งพบว่า การทดสอบโดยวิธี DPPH วิธี ABTS และวิธี FRAP ทั้งสามวิธีมีความสัมพันธ์ทางบวกในระดับสูงอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่การทดสอบด้วยวิธี H_2O_2 กับการทดสอบวิธีอื่นๆ ไม่มีความสัมพันธ์กัน โดยผลการเปรียบเทียบของวิธี DPPH กับวิธี ABTS มีค่า r มากที่สุด คือ 0.990 (ภาพที่ 16ก) สำหรับผลการเปรียบเทียบที่มีค่า r รองลงมาคือ วิธี DPPH กับวิธี FRAP และวิธี ABTS กับวิธี FRAP โดยมีค่าเท่ากับ 0.883 และ 0.863 ตามลำดับ (ภาพที่ 16ข และ ภาพที่ 16ค) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธี DPPH และวิธี ABTS เป็นวิธีที่ใช้วัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging assay) โดยการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระเหมือนกันจึงทำให้มีความสอดคล้องกันมากกว่าวิธีอื่น (ปรียนันท์, 2549) สำหรับวิธี FRAP เป็นวิธีที่วัดความสามารถในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระ ให้เป็นไอออน ซึ่งเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่เช่นเดียวกันกับวิธีการกำจัดอนุมูลอิสระ แต่วิธีการนี้รายงานผลอยู่ในรูปค่าการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงมีผลทำให้ค่า r น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี DPPH และวิธี ABTS อย่างไรก็ตามค่า r ที่ได้ยังคงมีความสัมพันธ์ในทางบวก อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 16ข และ ภาพที่ 16ค)

ตารางที่ 20 ค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ที่ได้จากการเปรียบเทียบผลการทดลองในแต่ละวิธีการทดสอบการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สถิติวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson's correlation)

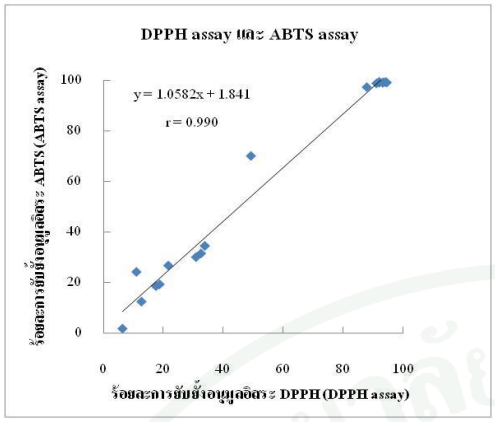
วิธีการทดสอบที่นำมาเปรียบเทียบ	ค่า Correlation coefficient (r)
DPPH assay กับ ABTS assay	0.990
DPPH assay กับ FRAP assay	0.883
DPPH assay กับ H_2O_2 assay	0.057
ABTS assay กับ FRAP assay	0.863
ABTS assay กับ H_2O_2 assay	0.047
FRAP assay กับ H_2O_2 assay	0.087

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

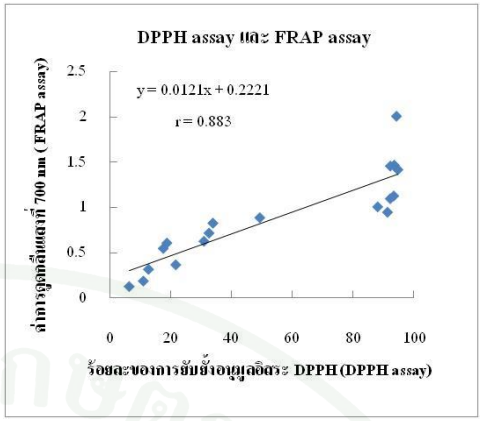
จากผลการศึกษาจะเห็นว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี DPPH วิธี ABTS และวิธี FRAP มีความสัมพันธ์ทางบวกในระดับสูง โดยทั้งสามวิธีอาศัยกลไกการออกฤทธิ์โดยการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transfer reaction) เหมือนกัน (Miguel, 2010) ทำให้ผลของการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ผลที่สอดคล้องกันไปในทิศทางเดียวกัน สอดคล้องกับรายงานของปรียนันท์ (2549) ซึ่งได้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของแต่ละวิธีในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างน้ำชาชงและตัวอย่างน้ำชาชวด โดยใช้ regression analysis พบว่าวิธี DPPH กับวิธี ABTS มีความสอดคล้องกันทั้งในตัวอย่างของน้ำชาชงและน้ำชาขวด โดยมีค่า r เท่ากับ 0.9940 และ 0.9732 ตามลำดับ เช่นเดียวกับ นันท์นภัส (2551) พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักและผลไม้ด้วยวิธี FRAP และวิธี ABTS มีความสัมพันธ์กันสูงในเชิงบวก (r เท่ากับ 0.994) โดยวิธีการทั้งสองมีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกัน ผลที่ได้จึงมีความสอดคล้องกัน นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP และวิธี ABTS มีความสัมพันธ์กับสารประกอบฟีนอลิกที่พบในผักและผลไม้ที่ได้ทำการทดสอบ โดยพืชที่มีสารประกอบฟีนอลิกในประมาณต่ำก็มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำร่วมด้วย ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอลิกที่พบในผักและผลไม้

ทำนองเดียวกันกับการศึกษาของ Thaipong *et al.* (2006) ซึ่งได้ศึกษาความสัมพันธ์ของวิธีการที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลฝรั่ง ซึ่งได้แก่ วิธี ABTS วิธี DPPH วิธี FRAP และวิธี Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) โดยใช้สถิติสหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson's correlation) พบว่าวิธี ABTS และวิธี FRAP มีความสัมพันธ์กันในระดับสูง (r เท่ากับ 0.97) ส่วนวิธี DPPH และวิธี ORAC แสดงความสัมพันธ์ในระดับต่ำ (r เท่ากับ 0.68) ทั้งนี้เนื่องมาจากทั้งสองวิธีมีกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน คือวิธี DPPH มีกลไกการออกฤทธิ์โดยการส่งผ่านอิเล็กตรอน ขณะที่วิธี ORAC อาศัยการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (hydrogen atom transfer) โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบทั้ง 4 วิธี มีความสัมพันธ์กับปริมาณของ ascorbic acid และสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัด โดยพืชแต่ละชนิดมีสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน เนื่องมาจากชนิดของพืชที่แตกต่างกัน สถานที่ในการเพาะปลูกที่แตกต่างกัน ความอุดมสมบูรณ์ วิธีการเก็บรักษาพืช ความสดใหม่ของพืช ระดับความสุก กระบวนการแปรรูป รวมถึงวิธีการสกัดและวิธีการวิเคราะห์ซึ่งวิธีการทั้งหมดที่กล่าวมามีผลทำให้สารประกอบฟีนอลิกและความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระของพืชในแต่ละชนิดและพื้นที่แตกต่างกัน (นิธิยา และคนัย, 2548; โอภา และคณะ, 2549)

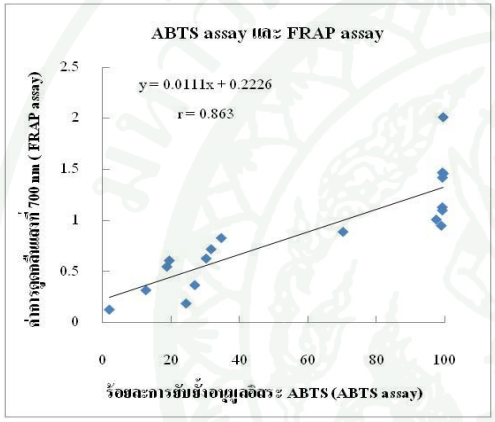
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



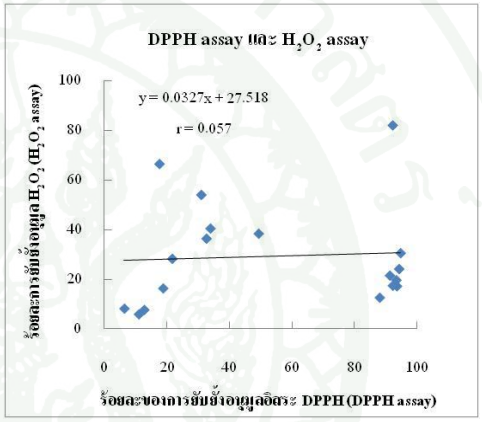
(ก)



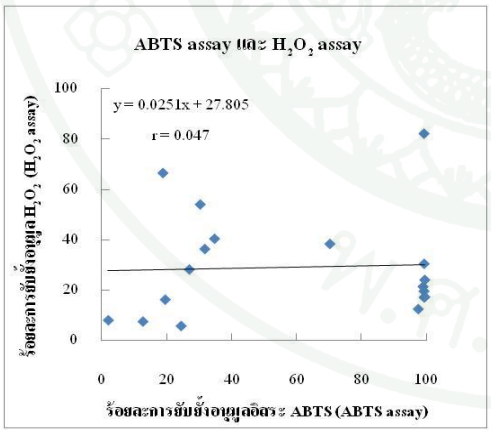
(ข)



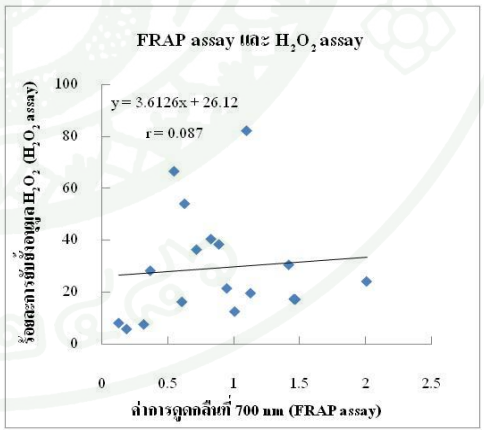
(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

ภาพที่ 16 ความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างวิธีการทดสอบต่างๆ; วิธี DPPH กับ วิธี ABST (ก) วิธี DPPH กับ วิธี FRAP (ข) วิธี ABTS กับวิธี FRAP (ค) วิธี DPPH กับวิธี H_2O_2 (ง) วิธี ABTS กับวิธี H_2O_2 (จ) วิธี FRAP กับวิธี H_2O_2 (ฉ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide ของน้ำมันหอมระเหยที่ทำการทดสอบด้วยวิธี H_2O_2 ไม่สัมพันธ์กับผลการทดลองทั้ง 3 วิธี คือ DPPH วิธี ABTS และวิธี FRAP โดยมีค่า r เท่ากับ 0.057, 0.047 และ 0.087 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 20 (ภาพที่ 16ง, 16จ และ 16ฉ) เนื่องจากการทดสอบด้วยวิธี H_2O_2 เป็นการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ไม่ได้อยู่ในรูปอนุมูลอิสระ (non-free radical) ขณะที่วิธี DPPH วิธี ABTS และวิธี FRAP เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ทำให้ผลที่ได้ไม่มีความสอดคล้องกับการทดสอบวิธีการอื่นๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในการทดสอบโดยวิธี H_2O_2 ไม่เหมาะสม เช่น ตัวทำละลาย อุณหภูมิ หรือวิธีที่ใช้ในการทดสอบไม่เหมาะสมทำให้การแพร่กระจายของสารเกิดขึ้นได้ไม่ดี อย่างไรก็ตามวิธีการนี้เป็นวิธีที่มีความแปรปรวนสูง เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ทดสอบมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ใช้สำหรับทดสอบของวิธีการนี้ (Ghaisas *et al.*, 2008) อีกทั้งยังมีข้อกำจัดในเรื่องของความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (Samoijlik *et al.,* 2010)

จากการทดลองที่ได้ พบว่าความสามารถในการยับยั้งหรือป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากการทดสอบในแต่ละวิธีมีความแตกต่างกัน ซึ่งในแต่ละวิธีจะมีความจำเพาะและความไวในปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน นอกจากนี้แต่ละวิธีทดสอบใช้ปริมาณสารของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลการต้านอนุมูลอิสระได้ เนื่องจากการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระหรือการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยให้ได้ผลที่ถูกต้อง ขึ้นอยู่กับวิธีการในการทดสอบ ความเข้มข้นที่เหมาะสม ความต่างทางสิ่งแวดล้อมและความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชในแต่ละชนิด ส่วนประกอบของพืชที่ใช้ในการทดสอบและเวลาที่ใช้ในการทดสอบ เป็นต้น (Kulisic *et al*., 2004) และในปัจจุบันยังไม่มีดัชนีชี้วัดตัวใดที่มีคุณสมบัติตามความต้องการต่างๆ ครบถ้วน (โอภา และคณะ, 2550)

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากการทดลองทั้ง 4 วิธีข้างต้น พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู ใบพลู ลูกจันทน์เทศ รากแฝกหอม และส่วนเหนือดินของตะไคร้หอม แสดงฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีในการทดสอบจาก 3 วิธี คือวิธี DPPH วิธี ABTS และวิธี FRAP ขณะที่น้ำมันหอมระเหยดังกล่าวมีประสิทธิภาพน้อยในการทดสอบด้วยวิธี H_2O_2 ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้สามารถยืนยันได้ว่าการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพียง 1 วิธีไม่เพียงพอต่อการประเมินในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยได้ ซึ่งจะเห็นจากการทดสอบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยวิธี H_2O_2 ที่มีความแปรปรวนสูง ซึ่งอาจทำให้ข้อมูลที่ได้ไม่ชัดเจน และนำไปสู่แนวทางในการสรุปข้อมูลที่ผิดได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. คัดเลือกและสกัดพืช 15 ชนิด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ เทียนข้าวเปลือก (*Foeniculum vulgare* Mill.) ผักชี (*Coriandrum sativum* Linn.) จันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) เปราะหอม (*Kaempferia galanga* Linn.) ว่านน้ำ (*Acorus calamus* Linn.) กานพลู (*Eugenia caryophyllus*) พลู (*Piper betel* Linn.) มะนาว (*Citrus aurantifolia* Swing.) อบเชยจีน (*Cinnamomum cassia* Blume.) ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* L.) ตะไคร้หอม (*Cymbopogon nardus* L.) แฝกหอม (*Vetiveria zizanoides*) ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus globules* Labill.) มะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) และสน (*Pinus sylvestris*)

2. พืชที่ให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงสุด คือ กานพลู โดยมีเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 13.68 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ตะไคร้ มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหย เท่ากับ 3.33 เปอร์เซ็นต์ และเปราะหอม มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหย เท่ากับ 1.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับพืชที่ให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยน้อยที่สุดคือ มะนาว มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหย เท่ากับ 0.19 เปอร์เซ็นต์

3. จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Agar disc diffusion และวิธี Agar well diffusion พบว่า ให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกันคือ น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีน ดอกกานพลู ใบพลู และส่วนเหนือดินของตะไคร้ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดีที่สุด และการทดสอบประสิทธิภาพของไอน้ำมันหอมระเหยจากพืชโดยวิธี Vapor diffusion พบว่าไอของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *C. albicans* ขณะที่ไอของน้ำมันหอมระเหยจากพืชชนิดอื่นที่ทำการคัดเลือกไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบ

4. จากการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจีน ซึ่งมีฤทธิ์ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นที่คัดเลือกมา โดยหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) และค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MLC) โดยวิธี 96 well micro plate dilution พบว่าน้ำมันหอมระเหยอบเชยจีนสามารถต้านการเจริญของ *C. albicans* ได้ดี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่สุด โดยมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 0.075 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.60 ถึง 2.50 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ขณะที่ค่า MBC อยู่ในช่วง 0.60 ถึง 5.00 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร

5. จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH วิธี ABTS วิธี FRAP และวิธี H_2O_2 พบว่าน้ำมันหอมระเหยทั้ง 15 ชนิด ที่ทำการทดสอบแสดงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการทดสอบด้วยวิธี DPPH วิธี ABTS และวิธี FRAP ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน คือน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากใบพลู และน้ำมันหอมระเหยจากลูกจันทน์เทศ ตามลำดับ ขณะที่การทดสอบด้วยวิธี H_2O_2 พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับวิธีการทดสอบอื่นๆ โดยน้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตะไคร้ แสดงความสามารถสูงสุดในการยับยั้งอนุมูล hydrogen peroxide สำหรับพืชที่มีประสิทธิภาพรองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดเทียนข้าวเปลือก และน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำ ตามลำดับ

6. จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกกานพลู ใบพลู และใบมะนาว เป็นน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพเด่นชัดมากที่สุด ทั้งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และการต้านอนุมูลอิสระจากพืชทั้งหมดที่ทำการคัดเลือก ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นสารกันบูดและควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นแหล่งข้อมูล เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ตลอดจนเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์และพัฒนาให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารจากธรรมชาติ

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดสอบประสิทธิภาพของไอน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี Vapor diffusion ควรพิจารณาถึงความเหมาะสมในการเลือกวัสดุในการยึดแผ่น disc ให้ติดกับฝาของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสามารถดัดแปลงได้ตามความเหมาะสม เช่น การใช้เทปกาวปราศจากเชื้อช่วยในการติดแผ่น disc กับกระดาษกรองและใช้น้ำที่ปราศจากเชื้อหยดบริเวณรอบๆ ขอบกระดาษกรองเพื่อให้ติดกับฝาของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หรืออาจใช้อาหารวุ้นเทบางๆ ที่ฝาของจานอาหารเลี้ยงเชื้อแทนการใช้กระดาษกรองก็ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ตัวอย่างพืชที่ซื้อมาจากร้านขายยา อาจมีคุณภาพต่ำ กล่าวคือ อาจมีการเก็บรักษาไว้ในที่ไม่เหมาะสม เช่นมีความชื้นมากเกินไป อากาศไม่หมุนเวียน หรืออาจมีการเก็บสมุนไพรไว้นานๆซึ่งความชื้นจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ซึ่งง่ายต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งยังเพิ่มน้ำหนักสมุนไพร

3. ในการศึกษาวิจัยครั้งต่อไปควรทำการศึกษาหาองค์ประกอบของสารสำคัญจากน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพดีและตรวจสอบโครงสร้างของเชื้อทดสอบโดยใช้ภาพถ่ายจาก Scanning electron microscope

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ขวัญสุดา ประคำมินทร์. 2552. **การยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดแผ่นฟิล์มชีวภาพโดยน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย.** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

จุรีพร เจียมใจ, บุญสม เหลี่ยวเรืองรัตน์, สายสุนีย์ เหลี่ยวเรืองรัตน์, สุวรรณา เวชอภิกุล, อภิวัฒน์ บารมี และ พิสัณห์ กิจสวัสดิไพบูลย์. 2552. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์รวมทั้งองค์ประกอบทางเคมีจากน้ำมันหอมระเหยของใบ *Citrus aurantifolia* Swing. *ใน* **การประชุมวิชาการทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่35.** มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

จักรพันธ์ จุลศรีไกวัล, สุนีย์ จันทร์สกาว, สุวรรณา เวชอภิกุล และ ไชยวัฒน์ ไชยสุต. 2549. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดของพืชวงศ์ *Zingiberaceae* ในประเทศไทย. *ใน* **การประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติครั้งที่ 32.** ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิตติ์, กรุงเทพฯ.

ชุติมา วิไลพันธ์. 2545. **การพัฒนาน้ำยาฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนบนมือแบบสำเร็จรูปสำหรับผู้ประกอบการด้านอาหาร.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิจศิริ เรืองรังษี. 2534. **เครื่องเทศ.** สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

นิธิยา รัตนปนนท์ และ ดนัย บุญยเกียรติ. 2548. **การปฏิบัติการภายหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้.** โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

นันท์นภัส เติมวงศ์. 2551. ความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีโนลิกส์กับความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระในพืช. **ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์** 8: 114-124.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ณิชากร เจริญกุล, หทัยรัตน์ ริมคีรี, เพ็ญขวัญ ชมปรีดา, อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์ และ ชื่นจิตต์ แจ้งเจนกิจ. 2546. ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจีน กานพลู และขมิ้นชันในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อสิว, น. 236-241. *ใน* **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 (สาขาอุตสาหกรรมเกษตร).** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2527. **เครื่องเทศที่ใช้เป็นสมุนไพร เล่ม 1.** ศิลปาบรรณาคาร, กรุงเทพฯ.

ปทุม อรุณวิชรินทร์, อาภากร สุภาพิพัฒน์ และ จิตศิริ ราชตนะพันธุ์. 2550. การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย, น. 508-515. *ใน* **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (สาขาส่งเสริมการเกษตรและคหกรรมศาสตร์ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร).** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปิยะฉัฐ หทโยทัย. 2549. **การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเทียนข้าวเปลือก เปราะหอม และอบเชย.** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปิยาภัทร ไตรสนธิ. 2550. **ผลของความสูงพื้นที่และสายพันธุ์ต่อกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระของตะไคร้ต้น.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ประภัสสร วีระพันธ์ และ วัชรี คุณกิตติ. 2554. คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยในหลอดทดลอง. **ว. เภสัชศาสตร์อีสาน.** 7: 30-38.

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญบุตร และ สาธร พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ, น. 91-101. *ใน* **รายงานการประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ครั้งที่ 9.** มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

ปรียนันท์ บัวสด. 2549. **การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนตี้ออกซิเดนท์ของเครื่องดื่มชาโดยวิธี ไซคลิกโวลแทมเมตรี.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภัทราพร ผูกคล้าย และ ธัญญรัตน์ เชื้อสะอาด. 2553. **รายงานผลการวิจัย การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระในพรอพอลิส 2551-2553.** 53 หน้า.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร.** สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2548. **จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

วารุณี จิรวัฒนาพงศ์. 2547. **เอกสารการควบคุมคุณภาพและกำหนดมาตรฐานสมุนไพร.** สำนักงานยาและวัตถุเสพติด.

สุดสาย ตรีวานิช. 2545. **จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์เกษตร.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุพิศา สมโต. 2547. **คุณลักษณะทางกายภาพและเคมี และความคงตัวของข้าวไทยที่มีรงควัตถุ** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สุภาธร ศรีเนาวรัตน์กุล. 2552. **ประสิทธิภาพของฟิล์มต้านจุลินทรีย์และปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งมีสารสกัดธรรมชาติจากพืชสำหรับการบรรจุอาหาร.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภิญญา ติ๋วตระกูล, สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์, โสภา คำมี และลัทธยา อัศวจารุวรรณ. 2548. การศึกษาองค์ประกอบเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันจากเหง้าเปราะหอม. **ว. สงขลานครินทร์ ฉบับวทท.** 27: 503-507.

อาภากร สุภาพิพัฒน์. 2551. **การกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยเพื่อต้านฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุณยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. 2550. **สารต้านอนุมูลอิสระ.** พี. เอส. พริ้นท์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุดมเอก สุขอุตตะ, อุไรวรรณ ดิลกคุณานนท์, ฉิชากร เจริญกุล, ประภัสสร รักถาวร และ สิริพร ศิริวรรณ. 2547. ประสิทธิภาพของสารสกัดพลูและน้ำมันพลูในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนังบางชนิด, น. 299-303. *ใน* **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 (สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม).** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อุทัย โสธนะพันธุ์. 2551. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร (Herbal extract preparation). *ใน* **โครงการประชุมวิชาการเรื่อง จับกระแส : การรักษาและยาใหม่ 3 (Natural Sources & Active Compound Discover).** ห้องกิ่งเพชร โรงแรมเอเชีย, กรุงเทพฯ.

อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, ประภัสสร รักถาวร, ยุพา มงคลสุข, สุดประสงค์ สุวรรณเลิศ และ นคร เหลืองประเสริฐ. 2546. การออกฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำมันพลู น้ำมันทีทรี และน้ำมันเสม็ดขาว, น. 245-252. *ใน* **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 (สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม).** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Abramson, C.I., P.A. Wanderley, M.J.A. Wanderley, A.J.S. Miná and O.B. de Souza. 2006. Effect of essential oil from citronella and alfazema on fennel aphids *Hyadaphis foeniculi* passerini (Hemiptera: aphididae) and its predator *Cycloneda sanguinea* L. (Coleoptera: coccinelidae). **Am. J. Environ. Sci.** 3 (1): 9-10.

Adegoke, G.O. and B.A. Odesola. 1996. Storge of microbial powder maize and cowpea and inhibition of agent of biodeterioration using the powder and essential oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus*). **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 95: 81-84.

Akin-Osanaiye, B.C., A.S. Agbaji and M.A. Dakare. 2007. Antimicrobial activity of oils and extracts of *Cymbopogon citratus* (lemongrass), *Eucalyptus citriodora* and *Eucalyptus camaldulensis*. **J. Med. Sci.** 7: 694-697.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Anwar, F., M. Ali, A.I. Hussain and M. Shahid. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. **Flavour Fragr. J.** 24: 170-176.

Arenas, D.R.M., A.M. Acevedo, L.Y.V. Mendez, V.V. Kouznetsov. 2011. Scavenger activity evaluation of the clove bud essential oil (*Eugenia caryophyllus*) and eugenol derivatives employing $abts^{+\bullet}$ decolorization. **Sci. Pharm.** 79: 779–791.

Arulpriya, P., P. Lalitha and S. Hemalatha. 2010. *In vitro* antioxidant testing of the extracts of *Samanea saman* (Jacq.). **Der Chemica Sinica** 1: 73-79.

Benkeblia, N. 2005. Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 48 (5): 753-759.

Bennis, S., F. Chami, N. Chami, T. Bouchikhi and A. Remmal. 2004. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. **Lett. Appl. Microbiol.** 36: 454-458.

Bhatia, L., H. Bishnoi, P. Chauhan, K. Kinja and S. Shailesh. 2011. *In-vitro* comparative antioxidant activity of ethanolic extracts of *Glycosmis pentaphylla* and *Bauhinia variegate*. **Rec Res Sci Tech.** 3: 1-3.

Bhuiyan, N.I.Md., J. Begum and M. Sultana. 2009. Chemical composition of leaf and seed essential oil of *Coriandrum sativum* L. from Bangladesh. **Bangladesh J. Phamacol.** 4: 150 -153.

Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.** 28: 25-30.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bukhari, M. 2004. ***Staphylococcus epidermidis*.** Available Source: http://uconn.edu/mcbstaff/graf/Student%20presentation/S%20epidermidis/sepidermidis.htm1, September 1, 2012.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in food. **Int. J. Food Microbiol.** 94: 223-253.

Carson, C.F., B.J. Mee and T.V. Riley. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time –kill, lysis, leakage and salt tolerance assay and electron microscopy. **Antimicrob. Agents Chemother.** 46: 1914-1920.

Chang, S.T., P.F. Chen and S.C. Chang. 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **J. Ethnopharmacol.** 77: 123-127.

Cimanga, K., K. Kambu, L. Tona, S. Apers, T. Bruyne and N. Hermans. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the demcocratic republic of Cogo. **J. Ethnopharmacol.** 79: 213-20.

Dasgupta, N. and B. De. 2004. Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract in vitro. **Food Chem.** 88: 219-224.

Dehpour, A.A., M.A. Ebrahimzadeh, A. Roudgar, S.F. Nabavi and S.M. Nabavi. 2011. Antioxidant and antibacterial activity of *Consolida orientalis*. **WASET.** 73: 162-166.

Delaquis, P.J., K. Stanich, B. Girard and G. Mazza. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **Int. J. Food Microbiol.** 74:101-9.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Devkatte, A.N., G.B. Zore and S.M. Karuppayil. 2005. Potential of plant oils as inhibitors of *Candida albicans* growth. **FEMS Yeast Res.** 5: 867-73.

Dorman, H.J.D. and S.G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J. Appl. Microbiol.** 88: 308-316.

Duan, X.W., Y.M. Jiang, X.G. Su, Z.Q. Zhang and J. Shi. 2007. Antioxidant properties of anthocyanins extracted from Litchi (*Litchi chinenesis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. **Food Chem.** 10: 1365-1371.

Duh, P.D., Y.Y. Tu and G.C. Yen. 1999. Antioxidant activity of water extracts of Harng Jyur (C*hrisanthemun morifolium* Ramat). **Lebensm. Wiss. Technol.** 32: 269-277.

Ebrahimzadeh, M.A., S.M. Nabavi, S.F. Nabavi, F. Bahramian and A.R. Bekhradnia. 2010. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Hyssopus officinalis L.* var. *angustifolius*, *Viola odorata*, *Buxus hyrcana* and *Colchicum speciosum*. **Pak. J. Pharm. Sci.** 23 (1): 29-34.

Ghalem, R.B. and B.B. Mohamed. 2008. Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. **Afr. J. Pharm. Pharacol.** 2: 211-215.

Gill, A.O. and R.A. Holley. 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Appl. Environ. Microbiol.** 70 (10): 5750–5755.

Ghaisas, M.M., V.V. Navghare, A.R. Takawale, V.S. Zope and A.D. Deshpande. 2008. *In-vitro* antioxidant activity of *Tectona grandis* Linn. **Pharmacologyonline** 3: 296-305.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ghfir, B., J.L. Fonvieille, Y. Koulali, R. Ecalle and R. Dargent. 1994. Effect of essential oil of *Hyssopus officinalis* on the lipid composition of *Aspergillus fumigatus*. **Mycopathogia** 126: 163-167.

Gulcin, I. 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology** 217: 213-220.

Gulcin, I., M. Elmastas and H.Y. Aboul-Enein. 2010. **Antioxidant activity of clove oil-a powerful antioxidant source.** Available Source: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535210001899, December, 20, 2011.

Gulfraz, M., S. Mehmood, N. Minhas, N.J. Rehana, K.K. Jabeen and G. Arshad. 2008. Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*. **Afr. J. Biotechnol.** 7 (24): 4364-4368.

Gupta, C., A.P. Garg, C.R. Uniyal and A. Kumari. 2008a. Antimicrobial activity of some herbal oils against common food-borne pathogens. **Afr. J. Microbiol. Res.** 2: 258-261.

_____ and _____. 2008b. Comparative analysis of the antimicrobial activity of cinnamon oil and cinnamon extract on some food-borne microbes. **Afr. J. Microbiol. Res.** 2: 247-251.

Hammer, K.A., C.F. Carson and T.V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **J. Appl. Microbiol.** 86 (6): 985-90.

Harris, R. 2002. Progress with superficial mycoses using essential oils. **Int. J. Aromather.** 12: 83-91.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hirschhorn, H.H. 1983. Botanical remedies of the former dutch east Indies (Indonesia). **J. Ethnopharmacol.** 72: 123-156.

Hui L., L. He, L. Huan, L. XiaoLan and Z. AiGuo. 2010. Chemical composition of lavender essential oil and its antioxidant activity and inhibition against rhinitisrelated bacteria. **Afr. J. Microbiol. Res.** 4: 309-313.

Huopalahti, R. and R.R. Linko. 1983. Composition and content of aroma compounds in dill, *Anethum graveolens* L., at three different growth stages. **J. Agric. Food Chem.** 31: 331-333.

Inouye, S., K. Uchida, T. Takizawa, H. Yamaguchi and S. Abe. 2006. Evaluation of the effect of terpenoid quinones on *Trichophyton mentagrophytes* by solution and vapor contact. **J. Infect. Chemother.** 12: 100 - 4.

Jaisai, N. and S. Lamlertthon. 2007. Inhibition effects of lime' s peel oil on *Bicillus cereus* in cooked rice. **Naresuan University Journal** 15 (3): 195-203.

Jukic, M., O. Politeo and M. Milos. 2006. Chemical composition and antioxidant effect of free volatile aglycones from nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) compared to its essential oil. **Croat. Chem. Acta.** 79: 209-214.

Ju-Sung, K. and K. Myong-Jo. 2010. *In vitro* antioxidant activity of *Lespedeza cuneata* methanolic extracts. **J. Med. Plant. Res.** 4: 674-679.

Kim, H.J., F.Chen, X. Wang, H.Y. Chung and Z. Jim. 2005. Evaluation of antioxidant activity of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) oil and identification of its antioxidant constituents. **J. Agric. Food Chem.** 53: 7691-7695.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kim, H.J., F. Chen, X. Wang, Y. Wang, J. McGregor and Y.M. Jiang. 2010. Characterization of antioxidants in nutmeg (*Myristica fragrans* Houttuyn) oil. pp. 235-252. *In* M.C. Qian and A.M. Rimando, eds. **Flavor and Health Benefits of Small Fruits.** ACS, USA.

Khalid, K. and L.H. Kiong. 2010. Screening of some Malay medicated oils for antimicrobial activity. **Arch. Biol. Sci.** 62: 393-395.

Koffi, K., S. Komla, G. Catherine, R. Christine, C. Jean-Pierre and N. Laurence. 2009. *In vitro* cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. **Bangladesh J. Pharmacol.** 4: 29-34.

Kulisic, T., A. Radonic, V. Katalinic and M. Milos. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chem.** 85: 633-640.

Lopez, P., C. Sanchez, R. Battle and C. Nerin. 2005. Solid and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **J. Agric. Food Chem.** 53: 6939 - 46.

Macdonald-Wicks, L.K., L.G. Wood and M. L. Garg. 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*. **J. Sci. Food Agric.** 86: 2046–2056.

Majnooni, M.B., K. Mansouri, M.B. Gholivand, A. Mostafaie, H.R. Mohammadi-Motlagh, N.S. Afnanzade, M.R. Abolghasemi and M. Piriyaei. 2012. Chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activities of the essential oil from the leaves of *Citrus aurantium* L. **Afr. J. Biotechnol.** 11 (2): 498-503.

Meincken, M., D.L. Holroyd and M. Rautenbach. 2005. Atomic force microscopy study of the effects of antimicrobial peptides on the cell envelope of *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 49: 4085-92.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Miguel, M.G. 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. **Flavour Fragr. J.** 25: 291-312.

Mokkhasmit, M., K. Swatdimongkol and P. Satrawah. 1971. Study on toxicity of Thai medicinal plants. **Bull. Dept. Med. Sci.** 12: 36-65.

Motiejūnaitė, O. and D. Pečiulytė. 2004. Fungicidal properties of *Pinus sylvestris* L. for improvement of air quality. **Medicina (Kaunas)** 40: 787-794.

Muhammad, A.A., T. Riaz, M.I. Umar, A.U. Rehman, T. Shahzadi, K.M. Khan and V.U. Ahmad. 2011. Comparison of antioxidant potential of volatile oils of *Syzygium aromaticum* and *Illicium verum* relative to conventionally used standards. **J. Chem. Soc. Pak.** 33: 200-204.

Nabavi S.F., S.M., Nabavi, S. Eslami and M.A., Ebrahimzadeh. 2009. Antioxidant activity of some b complex vitamies; a prelimiary study. **Pharmacologyonline** 2: 225-229.

Nanasombat, S. and P. Lohasupthawee. 2005. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against salmonellae and other enterobacteria. **KMITL Sci. Tech. J.** 5: 527-538.

Nedorostova, L., P. Kloucek, L. Kokoska, M. Stolcova and J. Pulkrabek. 2009. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. **J. Food Cont.** 20: 157-160.

Oussalah, M., S. Caillet, L. Saucier and M. Lacroix. 2007. Inhibitory effects of selected plantessential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control.** 18: 414-420.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pattnaik, S., V.R. Subramanyam and C. Kole. 1996. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils *in vitro*. **Microbios.** 86: 237-46.

Piaru, S.P., R. Mahmud, A.M. Abdul Majid and Z.D. Mahmoud Nassar. 2012. Antioxidant and antiangiogenic activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia.* **Asian Pac. J. Trop. Med.** 5: 294-8.

Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.** 63: 1035-1042.

Politeo, O., M. Jukic and M. Milos. 2006. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil of twelve spice plants. **Croat. Chem. Acta.** 79: 545-552.

Prabuseenivasan, P., M. Jayakumar and S. Ignacimuthu. 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complement. Altern. Med.** 6: 39.

Pranoto, Y., V.M. Salokhe and S.K. Rakshit. 2005. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. **Food Res. Int.** 38: 267-272.

Radusiene, J., D. Peciulyte and A. Judzentiene. 2008. Volatile constituents of *Acorus calamus* and their antimicrobial activity. **Plants as Food and Medicine** 765: 35-42.

Rahman, A., I.M. Choudhary, A. Farooq, A. Ahmed, Z.M. Iqbal, B. Demirci, F. Demirc and K.H.C. Baser. 1999. **Antifungal activities and essential oil constituents of some spices from Pakistan.** Available Source: http://pages.unibas.ch/mdpi/ecsoc-3/d0002/d0002.html, June, 22, 2010.

Reberta, R., P. Nicoletta, P. Anna, M. Yang and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biol. Med.** 26: 1231-1237.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Row, L.C.M. and J.C. Ho. 2009. The antimicrobial activity, mosquito larvicidal activity, antioxidant property and tyrosinase inhibition of *Piper betle*. **J. Chin. Chem. Soc.** 56 (3): 653-658.

Ruberto, G. and M.T. Baratta. 2000. Antioxidant activity of selected essential oils components in two lipid model systems. **Food Chem.** 69: 167-174.

Samoijlik, I., N. Lakic, N. Mimica-Dukic, K. Dakovic-Svajcer and B. Bozin. 2010. Antioxidant and hepatoprotective potential of essential oils of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and caraway (*Carum carvi* L.) (Apiaceae). **J. Agric. Food Chem.** 58: 8848-8853.

Sanla-Ead, N., A. Jangchud, V. Chonhenchob, P. Suppakul. 2006. Antimicrobial activity of cinnamon, clove and galangal essential oils and their principal constituents and possible application in active packaging. *In* **The 15th IAPRI World Conference on Packaging.** Tokyo, Japan.

Schmidt, E., L. Jirovetz., G. Buchbauer, G.A. Eller, I. Stoilova, A. Krastanov, A. Stoyanova and M. Geissler. 2006. Composition and antioxidant activities of the essential oil of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) leaves from Sri Lanka. **Jeobp.** 9: 170 - 182.

Silva, C.B., S.S. Guterres, V. Weisheimer and E.E. Schapoval. 2008. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. **BJID.** 12: 63-66.

Silva, J., W. Abebe, S.M. Sousa, V.G. Duatre, M.I.L. Machado and F.J.A. Matos. 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalptus. **J. Ethnopharmacol.** 89: 227-283.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Singh, P.H., S. Mittal, S. Kaur, D.R. Batish and R.K. Kohli. 2009. Characterization and antioxidant activity of essential oils from fresh and decaying leaves of *Eucalyptus tereticornis*. **J. Agric. Food Chem.** 57: 6962-6966.

Smith-Palmer, A., J. Stewart and L. Fyfe. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Lett. Appl. Microbiol.** 26**:** 118-122.

Sokovic, M., J. Glamoclija. P.D. Marin, D. Brkic and L.J.L.D. Griensven. 2010. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. **Molecules.** 15: 7532-7546.

Tewtrakul, S., S. Yuenyongsawad, S. Kummee and L. Atsawajaruwan. 2005. Chemical components and biological activites of volatile oil of *Kaempferia galanga* Linn. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 27 (2): 503-507.

Thaipong, K., U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos and D.H. Byrne. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts**. J. Food Compos. Anal.** 19: 669-675.

Tungtrongjit, K. 1978. **Pramuan Suphakhun ya Thai 2nd Edition**. Bangkok.

Tyagi, A.K. and A. Malik. 2010. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus.* **BMC Complement. Altern. Med.** 10: 65.

Viuda-Martos, M., Y.R. Navajas, E.S. Zapata, J. Fernandez-Lopez and J.A. Perez-Alvarez. 2010. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. **Flavour Fragr. J.** 25: 13-19.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Wang, H.F, K.H. Yih and K.F. Huang. 2010. Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potential active components**. J. Food Drug Anal.** 18 (1): 24-33.

Weecharangsan, W. and P. Opanasopit. 2004. An overview of free radicals and *in vitro* antioxidant activity tests in plant extracts. **SWU J Pharm Sci.** 9 (1): 73-80.

Wendakoon, C.N. and M. Sakaguchi. 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active component in spices. **J. Food Prot.** 58: 280-283.

Wongwattananukul, N., S. Chansakaow, C. Chaiyasut and P. Leelapornisit. 2006. Antioxidant activity of Thai aromatic plants and spices. *In* **Proceedings of the 32nd Congress on Sciences and Technology of Thailand**. Bangkok, Thailand.

World Health Organization. 2002. Food safety and foodborne illness. **World Health Organization Fact sheet 237.** Revised January 2002. WHO, Geneva, Swilzerland.

Zhang, J., J. Dou, S. Zhang, Q. Liang and Q. Meng. 2010. Chemical composition and antioxidant properties of the essential oil and methanol extracts of rhizoma *Alpinia officinarum* from China *in vitro*. **Afr. J. Biotechnol.** 9: 4264-4271.

Zheng, G.Q., P.M. Kenny and L.M.T. Lam. 1993. Potential anticarcinogenic natural products isolated from lemon grass oil and galanga root oil. **J. Agric. Food Chem.** 41(2): 153-156.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ เปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การคำนวณเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหย

การคำนวณ เปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหย (v/w) สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหย} = \frac{\text{ปริมาตรน้ำมันหอมระเหย (มิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักสมุนไพรที่ใช้ (กรัม)}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร หลังจากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2. Nutrient broth (NB)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร หลังจากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

3. Brain heart infusion agar

Brain heart infusion	37.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร หลังจากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. Brain heart infusion broth

Brain heart infusion	37.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร หลังจากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์