รายงานการวิจัย

ฤทธิ์การต้านเชื้อราและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิด

Antifungal and antioxidant activities of some plant essential oils

นางสาวสุรีย์ นานาสมบัติ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2560

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์การต้านเชื้อราและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิด

Antifungal and antioxidant activities of some plant essential oils

นางสาวสุรีย์ นานาสมบัติ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 149357
วัน. เดือน. ปี 13 ก.ย. 2561
.b 00265929
.i.....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2560

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย III

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ VI

กิตติกรรมประกาศ VIII

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 16

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 25

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 44

เอกสารอ้างอิง 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย)	ฤทธิ์การต้านเชื้อราและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิด
แหล่งเงิน	เงินรายได้
ประจำปีงบประมาณ 2557	จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 1 ปี	ตั้งแต่ ตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึง กันยายน พ.ศ. 2560
หัวหน้าโครงการวิจัย:	รศ .ดร .สุรีย์ นานาสมบัติ
หน่วยงานต้นสังกัด:	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สจล.

บทคัดย่อ

ในการศึกษากิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อรา 12 ชนิด โดยน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย 9 ชนิด ได้แก่ ว่านน้ำ (*Acorus calamus*) ข่า (*Alpinia galanga*) โกฐเชียง (*Angelica sinensis*) โกฐจุฬาลัมพา (*Artemisia annua*) อบเชย (*Cinnamomum verum*) ว่านนางคำ (*Curcuma aromatica*) ว่านเต่าเกียด (*Homalomena aromatica*) เปราะหอม (*Kaempferia galanga*) และกานพลู (*Syzygium aromaticum*) น้ำมันอบเชยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทุกชนิดที่ทดสอบได้ดีที่สุดโดยเฉพาะเชื้อรา *Alternaria alternata, Aspergillus flavus, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Aspergillus versicolor, Fusarium moniliforme, Geotrichum candidum* และ *Penicillium citrinum* ไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันอบเชยมากที่สุด (ค่า Minimum Inhibitory Concentration หรือ MIC เท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนเชื้อรา *Aspergillus niger, Aspergillus parasiticus, Rhizopus stolonifer* และ *Trichoderma harzianum* ถูกยับยั้งได้โดยน้ำมันอบเชยที่ค่า MIC เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทุกชนิดที่ทดสอบที่ค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อรา *A. versicolor* ไวต่อการถูกยับยั้งการเจริญโดยน้ำมันว่านเต่าเกียดมากที่สุด (มีค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ขณะที่เชื้อรา *A. parasiticus, F. moniliforme, P. citrinum* และ *T. harzianum* ไวต่อการถูกยับยั้งการเจริญโดยน้ำมันเปราะหอมมากที่สุด (มีค่า MIC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้เชื้อรา *A. flavus, F. moniliforme* และ *T. harzianum* ไวต่อการถูกยับยั้งการเจริญโดยน้ำมันว่านน้ำมากที่สุด (มีค่า MIC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้น้ำมันคู่ผสม 3 คู่ i) น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันกานพลู ii) น้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และ iii) น้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียด ให้ปฏิสัมพันธ์ที่เสริมฤทธิ์กันบางส่วนต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus, A. niger, A. ochraceus, A. parasiticus, A.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

terreus, *P. citrinum* และ *T. harzianum* (Fractional Inhibitory Concentration Index หรือ FICI มีค่าเท่ากับ 0.56-0.66)

สำหรับกิจกรรมการต้านการเจริญของยีสต์ 8 ชนิด โดยน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยทั้ง 9 ชนิด พบว่าน้ำมันว่านน้ำมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ทุกชนิดที่ทดสอบได้ดีที่สุดโดยเฉพาะ *Candida lipolytica* และ *Hanseniaspora uvarum* ไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันว่านน้ำมากที่สุดโดย (ค่า MIC เท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนยีสต์ *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe* และ *Zygosaccharomyces rouxii* ถูกยับยั้งได้โดยน้ำมันว่านน้ำที่ค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันอบเชยและน้ำมันว่านเต่าเกียดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ทุกชนิดที่ทดสอบ (ค่า MIC เท่ากับ 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ยีสต์ *C. lipolytica* ไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันกานพลูมากที่สุด ส่วนยีสต์ *D. hansenii* ไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันเปราะหอมมากที่สุด (ค่า MIC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) น้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลูให้ปฏิสัมพันธ์ที่เสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการยับยั้งการเจริญของ *H. uvarum* (FICI เท่ากับ 0.75) แต่น้ำมันผสมคู่นี้แสดงปฏิสัมพันธ์ที่ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans*, *P. membranaefaciens* และ *R. glutinis* (FICI มีค่าเท่ากับ 1.0) คู่ผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียดแสดงปฏิสัมพันธ์ที่เสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของ *P. membranaefaciens* (FICI มีค่าเท่ากับ 0.31) แต่น้ำมันผสมคู่นี้แสดงปฏิสัมพันธ์ที่เสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans*, *H. uvarum* และ *R. glutinis* (FICI มีค่าเท่ากับ 0.56-0.75) นอกจากนี้คู่ผสมของน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียดแสดงปฏิสัมพันธ์ที่เสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของ *R. glutinis* (FICI มีค่าเท่ากับ 0.31) แต่น้ำมันผสมคู่นี้แสดงปฏิสัมพันธ์ที่เสริมฤทธิ์กันบางส่วนในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans*, *H. uvarum* และ *P. membranaefaciens* (FICI มีค่าเท่ากับ 0.56-0.75)

ในการศึกษาสมบัติทางพฤกษเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยทั้ง9 ชนิด น้ำมันมูลอิสระได้ดีที่สุดในบรรดาน้ำมันหอมระเหยทั้งหมดที่ทดสอบโดยกานพลูมีคุณสมบัติในการต้านอนุ ค่าIC_{50} เท่ากับ0.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของน้ำมันโดยวิธี2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging มีค่า ferric reducing capacity เท่ากับ3. 69 มิลลิโมลFe (II) ต่อกรัมโดยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) และสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ได้ค่าความเข้มข้นเท่ากับ 998.62 มิลลิกรัมโทรล็อกซ์ต่อกรัมโดยวิธี ABTS radical cation decolorization นอกจากนี้น้ำมันกานพลูยังมีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในปริมาณที่สูงมีค่าเท่ากับ มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำมัน และ 141.91 889.17 มิลลิกรัมคาเทชินต่อกรัมของน้ำมัน ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยชนิดที่อื่นมีกิจกรรมต้านอนุมูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิสระ ปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์สูงรองลงมาคือน้ำมันข่า น้ำมันว่านนางคำ น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา น้ำมันเปราะหอม น้ำมันว่านเต่าเกียด น้ำมันว่านน้ำ และน้ำมันอบเชย

คำสำคัญ : สมุนไพรไทย วิธีการแพร่บนอาการวุ้น กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Antifungal and antioxidant activities of some plant essential oils

Researcher: Associate Professor Dr. Suree Nanasombat

Faculty of Science, Department of Biology, KMITL

ABSTRACT

Antifungal activity of essential oils extracted from 12 Thai medicinal plants including calamus (*Acorus calamus*), greater galangal (*Alpinia galanga*), dong quai (*Angelica sinensis*), sweet wormwood (*Artemisia annua*), cinnamon (*Cinnamomum verum*), wild turmeric (*Curcuma aromatica*), sugandh mantri (*Homalomena aromatica*), cekor (*Kaempferia galanga*) and clove (*Syzygium aromaticum*) was studied. Cinnamon oil exhibited broad antifungal action. The most susceptible mold strains to the cinnamon oil were *Alternaria alternate*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Fusarium moniliforme*, *Geotrichum candidum* and *Penicillium citrinum* (minimum inhibitory concentration, MIC of 0.125 mg/ml). However, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Rhizopus stolonifer* and *Trichoderma harzianum* were inhibited by cinnamon oil at higher MIC (0.25 mg/ml). Clove oil was effective to inhibit of all mold species tested with the MIC of 0.5 mg/ml. *A. versicolor* was the most sensitive mold strain to sugandh mantri oil (0.5 mg/ml MIC), while *A. parasiticus*, *F. moniliforme*, *P. citrinum* and *T. harzianum* were the most vulnerable mold species to cekor oil (2 mg/ml MIC). In addition, *A. flavus*, *F. moniliforme* and *T. harzianum* were sensitive to calamus oil (2 mg/ml MIC). In addition, three oil combinations: i) cinnamon and clove oils ii) cinnamon and sugandh mantri oils, and iii) clove and sugandh mantri oils showed partial synergism to inhibit the growth of *A flavus*, *A. niger*, *A ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. terreus*, *P. citrinum* and *T. harzianum* (0.56-0.66 Fractional Inhibitory Concentration index, FICI).

The antifungal activity of plant essential oils against eight yeast species was evaluated. Calamus oil had the highest antifungal activity against all yeast strains tested. *Candida lipolytica* and *Hanseniaspora uvarum* (0.125 mg/ml MIC), while *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

glutinis, *Schizosaccharomyces pombe* and *Zygosaccharomyces rouxii* were sensitive to calamus oil with the MIC of 0.5 mg/ml. Cinnamon and sugandh mantri oils were effective to inhibit the growth of all yeast strains tested with the MIC of 0.5 and 1.0 mg/ml, respectively. *C. lipolytica* were the most sensitive to clove oil (0.25 mg/ml MIC), whereas *D. hansenii* was the most sensitive to cekor oil (1.0 mg/ml MIC). Cinnamon and clove oil combination exhibited partial synergism to inhibit the growth of *H. uvarum* (0.75 FICI), but this oil combination exhibited no effect to inhibit the growth of *C. albicans*, *P. membranaefaciens* and *R. glutinis* (1.0 FIC). The combination of cinnamon and sugandh mantri oils showed synergism to inhibit the growth of *P. membranaefaciens* (0.31 FICI), but this oil combination exhibited partial synergism to inhibit the growth of *C. albicans*, *H. uvarum R. glutinis* (0.56–0.75 FICI). In addition, combination of clove and sugandh mantri oils had synergism to inhibit the growth of *R. glutinis* (0.31 FICI), but this oil combination showed partial synergism to inhibit the growth of *C. albicans*, *H. uvarum* and *P. membranaefaciens* (0.56–0.75 FICI).

The phytochemical properties of nine plant essential oils were studied. Among all oils tested, clove oil had the best antioxidant activity with IC_{50} of 0.58 mg/ml using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, 3.69 mmol Fe(II)/g ferric reducing capacity using ferric reducing antioxidant power (FRAP) method and 998.62 mg trolox/g oil inhibiting $ABTS^{\bullet+}$ free radical formation using ABTS radical cation decolorization assay. In addition, clove oil had total phenolics and flavonoids of 889.17 mg gallic acid equivalent/g oil and 141.91 mg catechin equivalent/g oil, respectively. Other oils with relatively strong antioxidant activity, total phenolics and flavonoids were oils of greater galangal, wild turmeric, sweet wormwood, cekor, sugandh mantri, calamus and cinnamon oils.

Keyword: Thai medicinal plants, disc diffusion method, antifungal activities

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยเรื่องนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารประกอบที่ซับซ้อนได้จากธรรมชาติซึ่งระเหยได้พบใน aromatic plant เป็นสารเมแทบอไลซ์ทุติยภูมิของพืชซึ่งได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) หรือกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) น้ำมันหอมระเหยถูกสังเคราะห์มาจากส่วนต่างๆ ของพืชได้แก่ ดอกตูม ดอก ใบ ลำต้น กิ่งไม้ เมล็ด ผล ราก ไม้หรือเปลือกได้ ในธรรมชาติน้ำมันหอมระเหยมีกิจกรรมต้านแบคทีเรีย กิจกรรมต้านเชื้อรา และฆ่าแมลงได้ซึ่งเป็นผลมาจากการที่น้ำมันหอมระเหยมีสารประกอบที่หลากหลายซับซ้อนซึ่งมีประมาณ 20-60 สารประกอบ แต่ส่วนใหญ่มีสารประกอบหลักที่มีปริมาณมากอยู่เพียง 2-3 ชนิด ซึ่งพบที่ความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 20-70) และมีสารประกอบชนิดอื่นอีกหลายชนิดในปริมาณเพียงเล็กน้อย (Bakkali และคณะ, 2008)

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลายโดยสามารถก่อโรคกับพืชหลายชนิดและเป็นต้นเหตุที่ทำให้อาหารหลายชนิดเน่าเสียซึ่งอาหารที่เน่าเสียโดยเชื้อราจะมีลักษณะปรากฏเปลี่ยนแปลงไปทั้งสี กลิ่นรส และลักษณะเนื้อสัมผัสนอกจากนี้เชื้อราบางชนิดยังสามารถสร้างสารก่อภูมิแพ้ในอาหารได้ด้วย (Filtenborg และคณะ, 1996; Montville และ Matthews, 2005) สำหรับเชื้อรามีรายงานว่าทำให้ผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิดได้รับความเสียหาย เช่น เชื้อราในสกุล *Aspergillus, Penicillium, Fusarium* และ *Rhizopus* ซึ่งพบในข้าวโพด ซึ่งเชื้อราเหล่านี้สามารถสร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพได้ (Shah และคณะ, 2010; Nakai และคณะ, 2008) นอกจากนี้เชื้อราในสกุล *Alternaria* พบว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลไม้ตระกูลส้ม แอปเปิ้ล หัวหอม กะหล่ำปลี และแครอทเกิดการเน่าเสีย (Montville และ Matthews, 2005; Jay และคณะ, 2005; Znini และคณะ, 2013) และยังพบว่าเชื้อรา *Geotrichum candidum* เป็นสาเหตุที่ทำให้มะเขือเทศ และผลไม้ที่มีรสเปรี้ยวเน่าเสียได้อีกด้วย (Jay และคณะ, 2005) ส่วน *Rhizopus stolonifer* เป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของมันเทศ มะเขือเทศ และแอปเปิ้ล (Jay และคณะ, 2005; Znini และคณะ, 2013) เชื้อราในสกุล *Fusarium* เป็นสาเหตุการเสียของหน่อไม้ฝรั่ง และมันฝรั่ง (Montville และ Matthews, 2005) ส่วนยีสต์ถึงแม้จะเป็นปัญหาไม่มากนัก แต่ยีสต์หลายสกุลสามารถทำให้อาหารเน่าเสียได้เช่น ยีสต์ที่เป็นสาเหตุการเสียของผลไม้แห้งได้แก่ *Zygosaccharomyces rouxii, Hanseniaspora, Candida* และ *Pichia* sp. (Montville และ Matthews, 2005) โดยเฉพาะ *Z. Rouxii* และ *Schizosaccharomyces* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของน้ำผึ้ง น้ำผลไม้ เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบที่ความเข้มข้นสูง (Kurtzman และ James, 2006) ดังนั้นจึงควรหาวิธีป้องกันการเน่าเสียของพืชชนิดต่างๆ เหล่านี้ สำหรับการใช้น้ำมันหอมระเหยในการควบคุมการเจริญของเชื้อราเป็นทางเลือกหนึ่งที่นิยมเนื่องจากเป็นสารธรรมชาติจึงมีความปลอดภัยสูงกว่าการใช้สารเคมีในการต้านเชื้อราและเป็นที่ยอมรับของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผู้บริโภค มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชหลายชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิดที่ทำให้ผลิตผลทางการเกษตรเน่าเสีย (Xing และคณะ, 2012; Soliman และ Badeaa, 2002) อีกทั้งมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรยังมีรายงานว่ามีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้ดีอีกด้วย (Singh และ Lawrence, 2015; Al-Reza และคณะ, 2010) นอกจากนี้การใช้น้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรานั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิดได้ดี มีรายงานว่าการผสมกันของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลูมีให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิดได้ดี (Sukatta และคณะ, 2008; Matan และคณะ, 2006) ส่วนน้ำมันว่านเต่าเกียดมีรายงานว่าต้านเชื้อราและยีสต์ได้ดี (Singh และคณะ, 2000; Policegoudra และคณะ, 2012) แต่ยังมีรายงานการศึกษากิจกรรมต้านเชื้อราในรูปแบบน้ำมันผสมที่น้อย

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะมีการศึกษากิจกรรมต้านเชื้อราของน้ำมันที่ได้จากเครื่องเทศและพืชสมุนไพรหลายชนิดแล้วแต่กิจกรรมต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยบางชนิดยังมีการศึกษาน้อย เช่น น้ำมันว่านน้ำ น้ำมันโกฐเชียง น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา น้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันเปราะหอม ยังมีรายงานวิจัยที่ค่อนข้างน้อย จึงควรมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยว่านน้ำเป็นพืชสมุนไพรซึ่งส่วนของเหง้า ราก และน้ำมันหอมระเหยของว่านน้ำมักเป็นส่วนที่นำมาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่เคยมีรายงานว่ามีกิจกรรมต้านเชื้อราได้ (Lee และคณะ, 2004) และมีรายงานว่า α- และ β-asarones เป็นสารสำคัญของน้ำมันว่านน้ำ (Raina และคณะ, 2003) โกฐเชียงเป็นพืชสมุนไพรซึ่งส่วนที่มักนำมาใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นส่วนของรากและมีปริมาณของน้ำมันหอมระเหยที่ค่อนข้างน้อย ส่วนโกฐจุฬาลัมพาเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถเจริญได้ตามธรรมชาติโดยมีรายงานว่าน้ำมันโกฐจุฬาลัมพามีสารสำคัญคือ camphor และมีกิจกรรมต้านเชื้อราและยีสต์ได้ (Bilia และคณะ, 2014) ว่านเต่าเกียดเป็นพืชสมุนไพรที่เป็นไม้ยืนต้นพบในเขตร้อนโดยส่วนของพืชที่มักนำมาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นส่วนของเหง้าและพบว่าส่วนนี้เป็นแหล่งของน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีสารสำคัญคือ linalool และมีกิจกรรมต้านเชื้อราและยีสต์ได้ดี (Policegoudra และคณะ, 2012) สำหรับเปราะหอมเป็นพืชสมุนไพรที่พบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น หัวของเปราะหอมช่วยในการขับเสมหะ ขับปัสสาวะ ขับลม ลดอาการไอ และหอบหืด ส่วนใบเป็นโลชั่นทาผิวได้ ใช้พอกแก้เจ็บตา เจ็บคอ แก้บวม แก้โรคไขข้อและบรรเทาอาการไข้ได้ และน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากเหง้าเปราะหอมพบว่ามีสารสำคัญคือ ethyl p-methoxycinnamate (Bhuiyan และคณะ, 2008) และยังมีกิจกรรมต้านเชื้อราได้ด้วย (Ghani, 2003)

สภาวะเครียดจากกระบวนการออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในร่างกายมนุษย์ มีผลทำให้เกิดกระบวนการแก่ชรา (aging) และโรคเรื้อรังต่างๆ (chronic disease) เนื่องจากในสภาวะที่มีออกซิเจนมนุษย์ได้เผชิญกับสิ่งแวดล้อมที่เต็มไปด้วยปัจจัยหลายๆ อย่าง เช่น ความเครียด มลภาวะ รังสียูวี ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ภายในร่างกาย ซึ่งผลของ ROS ในทางที่เป็นอันตรายคือ ROS เริ่มต้นวงจรการเกิดออกซิเดชันของไขมันซึ่งบ่อยครั้งที่การเกิดโรคส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการเกิดออกซิเดชันของไขมันในเซลล์เช่น เยื่อหุ้มที่มีไขมัน ดีเอ็นเอ และโปรตีน (Wei และ Shibamoto, 2010) ดังนั้นการรับประทานพืชสมุนไพรรวมทั้งน้ำมันหอมระเหยซึ่งอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นวิธีหนึ่งในการแก้ปัญหา สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ สารใดๆ ที่เมื่อมีอยู่ในระดับความเข้มข้นต่ำจะช่วยชะลอหรือยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสารซับสเตรท สารต้านอนุมูลอิสระสามารถเข้ากระทำในหลายๆ ขั้นตอนของปฏิกิริยาที่เป็นผลจากการออกซิเดชัน (oxidative sequence) เช่น การขจัดออกซิเจนหรือลดปริมาณความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นของออกซิเจนที่ลดลงบริเวณนั้นๆ การขจัดไอออนของโลหะที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การขจัด ROS/RNS (reactive nitrogen species) ชนิดหลักเช่น $O^{\cdot}_2$, H_2O_2, HOCl, O_2, หรือ $ONOO^{-}$ การไปจับอนุมูลอิสระที่เป็นตัวเริ่มต้นปฏิกิริยาเช่นอนุมูล $^{\cdot}OH$, $RO^{\cdot}$, $RO^{\cdot}_2$ และการไปขัดขวางปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เกิดขึ้น (Gutteridge และ Halliwell, 1999) ผลในเชิงรักษา (therapeutic effect) ของน้ำมันหอมระเหยที่มีการรายงานไว้อาจเกี่ยวข้องกับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหย (Wei และ Shibamoto, 2010) ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรเช่น น้ำมันว่านน้ำ น้ำมันโกฐเชียง น้ำมันโกฐจุฬาลัมพา น้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันเปราะหอม เนื่องจากมีรายงานการศึกษากิจกรรมต้านการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันเหล่านี้ค่อนข้างน้อย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์โดยน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย
2) เพื่อศึกษาสมบัติทางพฤกษเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย
3) เพื่อศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและกิจกรรมทางพฤกษเคมีอื่นๆ ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดเพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยไปใช้ประโยชน์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงชนิดน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยที่มีสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหาร พืชผัก ผักผลไม้เน่าเสีย และสมบัติทางด้านพฤกษเคมี เช่น สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหยของพืชสมุนไพรไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พืชสมุนไพร

สมุนไพรของประเทศไทยมีคุณสมบัติในการที่จะนำมาผลิตเป็นยารักษาโรคได้กว่า ชนิด 300 เช่น รากระย่อม(*Rauvolfia* sp.) สามารถสกัดสารมาผลิตเป็นยารักษาโรคความดันโลหิตสูง หัวดองดึงส์ (*Gloriosa superba* Linn.) มีสารที่สามารถบำบัดอาการโรครูมาติซั่ม ใบทองพันชั่งสดๆ หรือตากแห้งต้มกับน้ำหรือชงกับน้ำร้อนดื่มวันละ ครึ่งถ้วยแก้รักษาอาการตกขาวในครั้งๆ ละ 3-2 สุภาพสตรี อาการผมร่วงใช้ใบเพสลาดของทองพันชั่งสดๆ มาต้มกับน้ำบริสุทธิ์แล้วนำกากของทองพันชั่งพอกบนศีรษะบริเวณผมร่วงใช้ผ้าขาวโพกคาดไว้ระวังอย่าให้กากใบทองพันชั่งแห้งถ้าแห้งให้ใช้น้ำเย็นสะอาดหยดใส่กากใบให้ชุ่มเสมอ ปฏิบัติติดต่อกัน วัน สามารถทำให้ผมงอกขึ้นมาใหม่ 30-15 ได้หรือการแพทย์แผนโบราณของไทยใช้น้ำมะพร้าวชโลมรักษาแผลไฟไหม้จากตัวอย่างดังกล่าวในอดีตแทนที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ของไทยจะเป็นผู้พัฒนายาจากพืชสมุนไพรจำหน่ายแก่ประชาชนแต่กลับกลายเป็นโรงงานไบเออร์ของเยอรมันตะวันตกที่นำหัวดองดึงส์ไปผลิตยารักษาโรครูมาติซั่มจำหน่ายทั่วโลก กรณีใบหนุมานประสานกายและใบเปล้าน้อยก็เช่นกัน บริษัทยาของประเทศญี่ปุ่นเป็นผู้ผลิตยาออกจำหน่ายและจดลิขสิทธิ์เป็นของตน ปัจจุบันกองวิจัยและพัฒนาสมุนไพรกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และองค์การเภสัชกรรมศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรมากขึ้น จนกระทั่งมีการพัฒนาสมุนไพรออกจำหน่ายแพร่หลายกว่าเดิม เช่น ยาเม็ดมะแว้งอมแก้เจ็บคอ และสลายเสมหะหรือขมิ้นชันรักษาโรคกระเพาะและบำบัดอาการท้องอืดท้องเฟ้อ นับเป็นนิมิตหมายอันดีสำหรับการพัฒนายาจากพืชสมุนไพรของไทย (วันทนี, 2542)

2.2 ความสำคัญของพืชสมุนไพร

การศึกษาถึงความสำคัญของพืชสมุนไพรมีรากฐานการศึกษามาตั้งแต่สมัยโบราณเริ่มต้นจากการที่มนุษย์ศึกษาค้นคว้าแสวงหาพืชและสัตว์เพื่อนำมาเป็นอาหาร ต่อจากนั้นจึงเกิดความรอบรู้สามารถจำแนกได้ว่าพืชชนิดใดมีพิษชนิดใดไม่มีพิษชนิดใดนำมารับประทานได้ชนิดใดไม่ควรนำมารับประทานเพราะจะทำให้เกิดโทษหรือเป็นอันตราย โดยความรู้เหล่านี้ค่อยๆ พัฒนามาเป็นความรู้เกี่ยวกับสารที่เป็นตัวยารักษาโรคซึ่งได้จากธรรมชาติและพืชสมุนไพร มีการถ่ายทอดความรู้ต่อๆ กันมาสมัยแรกๆ อาศัยการบอกเล่าจนกระทั่งใช้การบันทึกลงบนสิ่งของเช่น บันทึกลงบนกระดาษปาปิรุส แผ่นดินเผา แผ่นหนังสัตว์จนเขียนเป็นเอกสารเกี่ยวกับพืชสมุนไพรต่อมามีการพิมพ์ในที่สุดจึงมีการจดหรือเขียนเป็นเภสัชตำรับขึ้น สำหรับความสำคัญของพืชสมุนไพรในเรื่องหลักๆ ได้แก่ การใช้เป็นอาหาร ใช้เป็นยา ใช้เป็นวัตถุดิบเบื้องต้นในการสกัดสารเคมีหรือน้ำมันหอมระเหยเพื่อใช้สำหรับการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตยา ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม อาหาร และเครื่องสำอาง ตลอดจนใช้ในการปรุงแต่งรส กลิ่น สีของอาหารได้เช่นเดียวกับพืชเครื่องเทศ พืชหลายชนิดเป็นได้ทั้งเครื่องเทศและสมุนไพร เช่น มะกรูด และขมิ้น เป็นต้น (วันทนี, 2542)

2.3 น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารระเหยที่มีความสอดคล้องกันน้ำมันที่สามารถพบได้ทั่วไปในพืชเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้องและมีสีแตกต่างกันตั้งแต่สีเหลืองอ่อนจนถึงสีเขียวมรกตและจากสีฟ้าเป็นสีแดงน้ำตาลเข้มซึ่งถูกสังเคราะห์โดยอวัยวะพืชและเก็บไว้ภายในเซลล์ต่างๆ หรือต่อมไทรโคม (Trichomes) ของพืช การสกัดน้ำมันหอมระเหยสามารถใช้ได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาสกัด รวมถึงการกลั่นด้วยน้ำหรือไอน้ำ การสกัดด้วยตัวทำละลาย การใช้ความดัน การสกัดแบบซุปเปอร์คริทิคอลฟลูอิด (Super critical fluid textraction) การประเมินคุณน้ำมันหอมระเหยมีหลายขั้นตอนที่รู้จักกันดีอย่างเช่น การใช้ประสาทสัมผัส การทดสอบทางเคมีกายภาพ และเทคนิคโครมาโทสเปกทอล ในการวิเคราะห์น้ำมันจะใช้แก๊สโครมาโทกราฟฟีและแมสสเปกโตรมิเตอร์เป็นเทคนิคหลักซึ่งช่วยในการบ่งบอกรายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะคุณภาพและเชิงปริมาณของน้ำมันหอมระเหย แนวทางที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยได้มีการตีพิมพ์โดยหลายสถาบันเช่น มาตรฐานสากลของยุโรป (European pharmacopoeia) องค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (International Organization for Standardization, *ISO*) และองค์การอนามัยโลก)World Health Organization, WHO) ที่ได้มีไว้และต้องปฏิบัติตามเพื่อให้มั่นใจในคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยที่ดีและพืชที่นำมาใช้สกัด น้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนผสมที่ซับซ้อนที่ได้จากการสังเคราะห์สารประกอบระเหยโดยพืช ซึ่งส่วนใหญ่การสังเคราะห์สารประกอบระเหยมีสองกลุ่มหลักคือ สารประกอบกลุ่มเทอร์พีน (Terpenes), เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) และสารประกอบกลุ่มอะโรมาติก (Aromatic) กับอะลิฟาติก (Aliphatic) โดยส่วนใหญ่ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำมันหอมระเหยจะพบในออกซิเจนเทอร์พีนอยด์ (Oxygenated terpenoids) เช่น แอลกอฮอล์ (Alcohols) และฟีนอลิกเทอร์พีน (Phenolic terpenes)ขณะที่สารประกอบไฮโดรคาร์บอนบางตัวยังมีการแสดงผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ (Yousef, 2014)

คำว่า "น้ำมันหอมระเหย" ได้ถูกนำมาใช้เป็นครั้งในศตวรรษที่ โดย 16Paracelsus von Hohenheim เป็นผู้อ้างไว้ว่าเป็นส่วนประกอบที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นยา "Quinta essential" ได้นำน้ำมันหอมระเหยมาทำการทดลองฆ่าเชื้อแบคทีเรียเป็นครั้งแรกดำเนินการโดย De la Croix ในปี ค.ศ. 1881 และตั้งแต่นั้นมาการใช้น้ำมันหอมระเหยในทางเวชกรรมก็ค่อยๆ ลดลง ในวิธีการกลั่นน้ำมันหอมระเหยนั้นมีการสกัดเป็นครั้งแรกในแถบตะวันออกเป็นครั้งแรก (ได้แก่ อียิปต์ อินเดีย และเปอร์เซีย) มามากกว่า 2,ปีมาแล้ว และได้มีการปรับปรุงให้ดีขึ้นในศตวรรษที 000 โดย 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชาวอาหรับโดยศตวรรษที่ 13 น้ำมันหอมระเหยได้มีในร้านขายยาและผลทางเภสัชวิทยาได้อธิบายไว้ รับความนิยมแพร่หลายในยุโรปจนกระทั่งศตวรรษที่ ในตำหรับเภสัชแต่การใช้งานไม่ปรากฏว่าจะได้ 16 ได้มีการซื้อขายในกรุงลอนดอน น้ำมันต้นชามีการนำมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ทางการแพทย์และ ได้รับการรับรองในประเทศออสเตรเลียในช่วงปลายศตวรรษที่ 18 มีการวัดการทดลองแรกของ คุณสมบัติการฆ่าเชื้อแบคทีเรียผ่านไอระเหยของแบคทีเรียได้ดำเนินการโดย De la Croix ในปี ค.ศ. .จากนั้นได้นำเสนอในช่วงต้นปี ค.ศ 1881 1960 และมีการอธิบายอย่างสมบูรณ์โดย López และ คณะ(2005) เป็นเพียงการปรับเปลี่ยนอย่างง่ายของการทดสอบ disc diffusion ใช้สำหรับ สารประกอบที่ไม่มีสารระเหยโดยแผ่นดิสก์จะถูกย้ายออกจากผิวหน้าอาหารวุ้นไปยังฝั่งตรงข้ามบนฝา ของจานเพาะเชื้อ ได้มีการนำน้ำมันหอมระเหยนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ที่หลากหลายเช่น ผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรม ยาฆ่าเชื้อโรคและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (Yousef, 2014)

2.4 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยเป็นกลุ่มของเทอร์พีนอยด์, เซสควิเทอร์ฟีน (Sesquiterpenes) หรือไดเทอร์พีน (Diterpenes) และอีกกลุ่มเป็นพวกอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (Aliphatic hydrocarbons) กรด แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ (Aldehydes) อะไซคลิกเอสเทอร์ (Acyclic esters) หรือ แลคโตน (Lactones) น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดอื่นๆ จากพืชที่มีความสำคัญสำหรับกิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ สารสกัดเหล่านี้สามารถได้จากพืชและเครื่องเทศโดยวิธีการต่างๆ เช่น การใช้ไอน้ำ การใช้ความเย็น การทำแห้ง และการกลั่นสุญญากาศ สารประกอบจากพืชเหล่านี้รวมถึงกลูโคซิเดส (Glucosides) ซาโปนิน (Saponins) แทนนิน (Tannins) อัลคาลอยด์ (Alkaloids) น้ำมันหอมระเหย กรดอินทรีย์และอื่นๆ เป็นสารประกอบที่มีอยู่ในพืชอยู่แล้วซึ่งเป็นระบบช่วยในการป้องกันการติดเชื้อจุลินทรีย์ส่วนสารประกอบที่สำคัญของน้ำมันหอมระเหยนั้นมีถึง ร้อยละ นๆ มักจะมีที่ระดับรองลงมาและส่วนประกอบอี่ 85(Burt, 2004; Grosso และคณะ, 2008)

น้ำมันหอมระเหยมีองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในพืชแตกต่างกันซึ่งเป็นแหล่งของยาต้านจุลินทรีย์รวมทั้งซาโปนิน (Saponin) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ไธโอซัลฟิเนท (Thiosulfinates) และกลูโคซิโนเลท (Glucosinolates) โดยที่ซาโปนินและฟลาโวนอยด์สามารถพบได้ในผัก ผลไม้ ถั่ว เมล็ด ลำต้น ดอก ชา ไวน์ พรอพอลิส และน้ำผึ้ง โดยทั่วไปจะอยู่ในรูปแบบฟองสบู่หลังจากที่นำไปเขย่าในน้ำ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของซาโปนินและฟลาโวนอยด์ในพืช เช่น ข้าวโอ๊ต (*Avena sativa*) และแอนทราควิโนน (Anthraquinones) คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) และอัลคาลอยด์ (Tajkarimi และคณะ, 2010)

ไธโอซัลฟิเนทเตรียมได้จากกระเทียมมีกิจกรรมต้านจุลชีพที่แข็งแกร่งกับแบคทีเรียแกรมลบ (Kim และคณะ, 2008; Naidu, 2000; Yoshida และคณะ, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคซิโนเลทมีอยู่ในบรอกโคลี กะหล่ำดาว กะหล่ำปลี และผงมัสตาร์ด ซึ่งก่อให้เกิดรสชาติฉุนของมัสตาร์ดและฮอสแรดิช ซึ่งมีความหลากหลายของการต้านเชื้อแบคทีเรียและคุณสมบัติในการต้านเชื้อราอาจมีผลโดยตรงหรือมีผลเมื่อได้ทำงานร่วมกันกับสารอื่นๆ (Almajano และคณะ, 2008; Graumann และ Holley, 2008; Gutierrez และคณะ, 2008; Naidu, 2000; Tolonen และคณะ, 2004)

โดยทั่วไปแล้วสารประกอบฟีนอลิกของน้ำมันหอมระเหยเช่นน้ำมันที่สกัดจากส้ม มะนาว น้ำมันมะกอกมีสารโอลีโรเปอิน (Oleuropein(น้ำมันต้นชามีสารเทอร์พีนอยด์ ส้มและมะกรูดมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่กว้างและไม่ได้จัดหมวดหมู่ว่าเป็นเครื่องเทศ ในขณะเดียวกันมีรายงานเพิ่มของสารที่ไม่ใช่ฟีนอลิก (Non-phenolic) ของน้ำมันที่สกัดได้จากออริกาโน กานพลู อบเชย ตะไคร้ กระเทียม ผักชี โรสแมรี่ ผักชีฝรั่ง เมล็ดมัสคาดีน และเซจ เป็นต้น ซึ่งมีผลกับทั้งสองกลุ่มของแคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Tajkarimi และคณะ, 2010)

2.5 ฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหย

ปัจจุบันการบำบัดด้วยสารที่มีกลิ่นหอมหรือบำบัดด้วยน้ำมันหอมระเหยเป็นที่รู้จักกันมากในชื่อสุคนธบำบัด ซึ่งเป็นที่นิยมแพร่หลายในประเทศไทยและต่างประเทศ มีการนำน้ำมันหอมระเหยในรูปแบบที่หลากหลายมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ เช่น นำมาใช้บำบัดผู้ป่วยที่มีสภาวะทางจิตผิดปกติ ผู้ป่วยที่มีความจำเสื่อม ใช้เป็นการแพทย์ทางเลือกในผู้ป่วนโรคมะเร็ง มีการนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางต่างๆ ฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นในเรื่องของฤทธิ์ต่อระบบประสาทกลางและระบบประสาทอัตโนมัติ ได้แก่ กระตุ้นระบบประสาท สงบประสาท ช่วยให้นอนหลับ คลายกังวล คลายเครียด แก้ซึมเศร้า เป็นต้น ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) เช่น ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านไวรัส เป็นต้น ฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหาร ฤทธิ์ต่อระบบทางเดินหายใจ ฤทธิ์ต่อระบบกล้ามเนื้อและข้อต่อ ฤทธิ์ต่อระบบไหลเวียนเลือด หัวใจและหลอดเลือด ฤทธิ์ต่อระบบต่อมไร้ท่อและฮอร์โมน ฤทธิ์ไล่แมลง ฆ่าแมลง ฆ่าปรสิต และฆ่าหนอนพยาธิเป็นต้น (ฐาปนีย์ ,2550)

2.5.1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial effects)

น้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ได้แก่ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านไวรัส

2.5.1.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ก) สารประกอบฟีนอล เช่น carvacrol และ thymol เป็นสารกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข) สารประกอบแอลดีไฮด์ เช่น citral และ citronellal

ค) สารประกอบแอลกอฮอล์ เช่น linalool และ cineol สารกลุ่มนี้จะทำลายโปรตีนของเชื้อแบคทีเรียทำให้เชื้อตาย

ง) สารประกอบเอสเทอร์ เช่น geranyl acetate

จ) สารประกอบคีโตน เช่น menthone และ carvone

2.5.1.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อราและยีสต์

ในบางชนิดของน้ำมันหอมระเหยแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของผลกระทบของสารกำจัดเชื้อราที่เป็นสารธรรมชาติในการต้านเชื้อราของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวโดยเฉพาะในทางชีวภาพจะทำการใช้ไอระเหยสำหรับการจัดเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร (Tripathi และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตามการให้ไอระเหยต้องใช้เวลามากซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับผลทางชีวภาพดังนั้นอาหารจะสามารถดูดซึมไอระเหยได้มากขึ้น (Fisher และ Phillips, 2008) กิจกรรมการต้านเชื้อรามีผลกระทบต่อสรีรวิทยาของเชื้อราดังนั้นเชื้อราแต่ละชนิดจึงให้ผลของกิจกรรมการต้านเชื้อราแตกต่างกัน (Daferera และคณะ, 2000)

มีรายงานว่าสารประกอบที่มีประสิทธิภาพต่อต้านเชื้อราที่ทำให้อาหารเสียรวมทั้ง *Aspergillus niger, A. flavus* และ *A. parasiticus* คือสารสกัดกัวรานา (Majhenič และคณะ, 2007) การเจริญของ *Aspergillus parasiticus* และการผลิต Aflatoxins สามารถยับยั้งได้โดยน้ำมันไทม์ (*Thymus vulgaris*) และน้ำมันมะนาว (*Citrus aurantifolia*) ในขณะที่น้ำมันสะระแหน่ (*Mentha spicata* L.) น้ำมันเทียนข้าวเปลือก (*Foeniculum* miller) น้ำมันสะเดา (*Azadirachta indica* A. Juss) น้ำมันเฮมล็อก (*Conium maculatum*) และน้ำมันทารากอน (*Artemisia dracunculus*) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ในขณะที่น้ำมันเทียนตากบ (*Carum carvi*) สามารถควบคุมการสร้างอะฟลาท็อกซินได้แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Razzaghi-Abyaneh และคณะ, 2009) องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมัน เช่น oleoresin และ cinnamic aldehyde ที่ได้จากน้ำมันอบเชยและ eugenol ที่ได้จากน้ำมันกานพลูพบว่ามีผลในการยับยั้งสารพิษที่สร้างขึ้นโดยเชื้อรา Aspergillus และ Penicillium ที่ความเข้มข้น2.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Davidson และ Naidu, 2000)

2.5.1.3 ฤทธิ์ต้านไวรัส

ปัจจุบันการศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสของน้ำมันหอมระเหยยังไม่มีมาก องค์ประกอบสำคัญของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้าน Herpes simplex ได้แก่ anethole, β-caryophyllene, carvone, cinnamic aldehyde, citronellol, eugenol, limonene, linalyl acetate, α-sabinene และ γ-terpinene น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติต้านไวรัส เช่น น้ำมันอบเชยจีน น้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อบเชยลังกา น้ำมันเปปเปอร์มินท์ น้ำมันมะนาว น้ำมันไธม์ น้ำมันทีทรี น้ำมันขิง และน้ำมันเจอราเนียม เป็นต้น (ฐาปนีย์, 2550)

2.6 กลไกการทำงานการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย

2.6.1 กลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ได้มีรายงานการศึกษาแสดงให้เห็นถึงผลการต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยโดยน้ำมันหอมระเหยทำให้เกิดความเสียหายกับโครงสร้างและการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย มีรายงานแสดงให้เห็นว่าส่วนของ hydrophobicity จะถูกทำลายโดยน้ำมันหอมระเหย (Goñi และคณะ, 2009) โดยเครื่องเทศและสมุนไพรที่ใช้ส่วนใหญ่มีกิจกรรมต้านจุลินทรีย์อยู่ในช่วงระหว่าง 0.05-0.1 เปอร์เซ็นต์ (500–1000 ppm) ในระบบอาหาร บางเครื่องเทศมีกิจกรรมต้านจุลินทรีย์ที่แข็งแกร่งกว่าเครื่องเทศอื่นๆ และมีประสิทธิภาพที่ 1000 ppm อย่างไรก็ตามเครื่องเทศบางชนิดต้องใช้ความเข้มข้นสูง (Ceylan และ Fung, 2004) การประยุกต์ใช้ในยาต้านจุลินทรีย์โดยวิธีที่แตกต่างกัน เช่น การใช้ไอระเหยเมื่อเทียบกับวิธีการสัมผัสโดยตรงของมัสตาร์ดและน้ำมันหอมระเหยได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างเด่นชัด (Goñi และคณะ, 2009) stereochemistry, lipophilicity และปัจจัยอื่นๆ ได้รับผลกระทบจากฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเหล่านี้ซึ่งอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงในทางบวกหรือทางลบ ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางสรีระของจุลินทรีย์เล็กน้อย (Veluri และคณะ, 2004) ได้มีการแสดงให้เห็นว่าสารในพืชส่งผลกระทบต่อเซลล์ของจุลินทรีย์โดยกลไกในการต้านจุลินทรีย์ต่างๆ รวมทั้งเข้าสารเหล่านั้นได้เข้าจับที่ phospholipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์จึงส่งผลต่อระบบการทำงานของเอนไซน์ ทำให้เกิดการสูญเสียสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย และการสร้าง fatty acid hydroperoxidase ที่เกิดจากออกซิเจนของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Arques และคณะ, 2008; Burt และคณะ, 2007; Lanciotti และคณะ, 2004; Proestos และคณะ, 2008; Silva และคณะ, 2007; Skocibusic และคณะ, 2006)

โหมดหลักของการทำงานของน้ำมันหอมระเหย เป็นกระบวนการทำลายเสถียรภาพของอนุภาคคอลลอยด์ในเมมเบรน โดยน้ำมันหอมระเหยเป็น lipophilic ในธรรมชาติและด้วยเหตุนี้จึงสามารถดูดซึมได้ง่ายผ่านผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ปฏิสัมพันธ์ของน้ำมันหอมระเหยและส่วนประกอบพวก polysaccharides, fatty acids และ phospholipids ทำให้ส่วนเมมเบรนแบคทีเรียดูดซึมได้มากขึ้นดังนั้นจึงเกิดการสูญเสียไอออนและเนื้อสารของเซลล์ที่นำไปสู่การตายของเซลล์ (Edris, 2007; Saad และคณะ, 2013) ในทำนองเดียวกันการสอดแทรกของกิจกรรมโปรตอนปั๊มทำให้เกิดการสูญเสียความสมบูรณ์ของเมมเบรน และทำให้เซลล์รั่วไหลส่งผลให้เซลล์สูญเสียความมีชีวิต (Oussalah และคณะ, 2006; Pasqua และคณะ, 2007) การดำเนินการของกลไกที่สำคัญอื่นๆ รวมถึงการสูญเสียสภาพธรรมชาติของ cytoplasmic proteins และทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์ไม่ทำงานจึงนำไปสู่การตายของเซลล์แบคทีเรียที่เกิดจากสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยกลุ่ม terpenoids ไปยับยั้งการทำงานผนังเซลล์ของเชื้อโดยยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอน (electron

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

transport) การเคลื่อนย้ายโปรตีน (protein translocation) ตลอดจนปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆ ทำให้เซลล์ตายเนื่องจากสาร terpenoids เป็นสารละลายได้ดีในไขมันดังนั้นจึงละลายได้ดีในส่วนของผนังเซลล์ของเชื้อ (ฐาปนีย์, 2550)

2.6.2 กลไกการยับยั้งเชื้อราและยีสต์

น้ำมันหอมระเหยยังมีกิจกรรมยับยั้งกับ *Candida albicans* เช่นสารพวก citral, citronellol, geraniol และ geranyl acetate ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของน้ำมันยูคาลิปตัส, น้ำมันทีทรีและน้ำมันเจอเรเนียม) Zore และคณะ,2011) ในทำนองเดียวกัน eugenol, thymol และ carvacrol มีผลกระทบต่อสภาวะสมดุล Ca^{+2} และ H^{+} ที่นำไปสู่การสูญเสียของไอออนและการยับยั้งของ *Saccharomyces cerevisiae* (Rao และคณะ, 2010) ความผิดปกติในการไหลของเมมเบรนส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของไซโทพลาสมิกและทำให้เกิดการเสียความมีชีวิตของเชื้อราตัวอย่างเช่น การซึมผ่านเมมเบรนและกิจกรรมห่วงโซ่หายใจในเซลล์ของ *C. albicans* ถูกขัดขวางจึงทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Carson และคณะ, 2006; Hammer และคณะ, 2004) และการผ่านเมมเบรนของไมโทคอนเดรียได้นำไปสู่การเกิดเนื้อร้ายที่นำไปสู่การตายของเซลล์ (Armstrong, 2006) นอกจากนี้ส่วนประกอบของแต่ละน้ำมันหอมระเหยยังไปรบกวน TOR signalling pathway ของยีสต์จึงส่งผลให้เกิดการสูญเสียความมีชีวิตสามารถสังเกต Modulation ของพลาสมาเมมเบรน ไซโทพลาสซึมและนิวเคลียสได้ด้วยการวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scaning Eletron Microscopy, SEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, *TEM*) ของเชื้อรา *Phytophthora infestans* (Soylu และคณะ, 2006)

2.7 อนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระคืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่เข้าคู่อย่างน้อย 1 อิเล็กตรอนจึงเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร และว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี (ไมตรีและคณะ, 2545) อนุมูลอิสระอาจเกิดจากการสลายตัวของโมเลกุลที่ถูกกระตุ้นโดยรังสีเอ็กซ์ รังสีอิเล็กตรอน รังสีแกรมมาและความร้อน หรืออาจเกิดจากกระบวนการย่อยสลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์เกิดจากการออกซิเดชันของลิปิดในอาหารเนื่องจากความร้อน แสง และโลหะหนัก เช่น เหล็กและแมงกานีส และเกิดจากมลภาวะ เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ควันบุหรี่ ในสภาวะปกติร่างกายจะสร้างอนุมูลอิสระในอัตราที่ปกติ และเป็นไปในแนวทางที่เป็นประโยชน์ แต่ในสภาวะที่มีการสร้างมากเกินไป จะเกิดภาวะความเครียดเนื่องจากออกซิเดชัน จึงเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ พิษของอนุมูลอิสระต่อพืช เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชอยู่ในสภาวะเครียดจะสร้างอนุมูลอิสระของ reactive oxygen species (ROS) ขึ้น (Polle และคณะ, 1993)

การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกันดังนี้

ก. การแตกของพันธะโควาเลนท์แบบไอโมไลซิส (Imolysis)

$$A : B \longrightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$$

ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัวให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A + e^{-} \longrightarrow A^{-\bullet}$$

ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัวจากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A \longrightarrow A^{+\bullet} + e^{-}$$

งต้นที่ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องต่างๆในทางชีววิทยาที่สามารถเป็นตัวตั้งอนุมูลอิสระได้อีกหลายชนิดสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่มเช่นเปอร์ออกซีไนไตรท์ (Peroxynitrite) (โอภา และคณะ, 2550)

2.8 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

การเกิดปฏิริยาออกซิเดชันเป็นการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องของอนุมูลอิสระซึ่งมีกลไกการเกิด 3 ขั้นตอนคือ Initiation, Propagation และ Termination (Shahidi และ Wanasundara, 1992)

2.8.1 Initiation

ในปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นโดยไฮโดรเจนที่จับกับคาร์บอนที่อยู่ถัดจากคาร์บอนอะตอมซึ่งพันธะคู่สลายไปเนื่องจากได้รับความร้อนหรือแสงสว่าง (Angelo, 1996) ออกซิเจนจะเข้าไปรวมกับไฮโดรคาร์บอนตรงพันธะคู่ได้เป็นอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxy radical) อนุมูลเปอร์ออกซีเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งหรือตัวตั้งต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อไปโดยดึงไฮโดรเจนอะตอมจากโมเลกุลอื่นๆ ซึ่งจะทำให้เข้าสู่ปฏิกิริยาในขั้นต่อไป (Frankel, 1984)

$$RH + \text{initiator} \longrightarrow R^{\circ} + H^{\circ}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$ROOH \longrightarrow RO^{\circ} + HO^{\circ}$$

$$2ROOH \longrightarrow RO^{\circ} + ROO^{\circ} + H_2O$$

2.8.2 Propagation

ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องของอนุมูลอิสระโดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้เป็นอนุมูลเปอร์ออกซี (ROO°) ซึ่งสามารถดึงไฮโดรเจนจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวตัวอื่นเกิดเป็นสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (ROOH) ที่สามารถแตกตัวต่อเป็นอนุมูลอิสระได้อีกถ้ามีตัวเร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและอนุมูลเปอร์ออกซิลที่เกิดจากกรดไขมันที่ถูกดึงไฮโดรเจนทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจากนั้นจะทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัวตัวอื่นทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระได้อีกซึ่งจะเกิดเป็นลูกโซ่ปฏิกิริยาต่อเนื่องเรื่อยไป (Gordon, 2001)

$$R^{\circ} + {}^3O_2 \longrightarrow ROO^{\circ}$$

$$ROO^{\circ} + RH \longrightarrow ROOH + R$$

2.8.3 Termination

ปฏิกิริยานี้เป็นระยะสุดท้ายของการเกิดปฏิกิริยาเมื่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวถูกออกซิไดซ์จนหมดอนุมูลอิสระที่เหลือจะเกิดการรวมกันเกิดเป็นสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนครบจึงมีความเสถียรไม่เกิดการเหนี่ยวนำปฏิกิริยาต่อไป (Gordon, 2001)

$$R^{\circ} + R^{\circ} \longrightarrow R\text{-}R$$

$$R^{\circ} + ROO^{\circ} \longrightarrow ROOR$$

$$ROO^{\circ} + ROO^{\circ} \longrightarrow ROOR + O_2$$

2.9 สารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant)

สารต้านออกซิเดชันสามารถช่วยรักษาคุณภาพของอาหารได้โดยการขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (Kinsella และคณะ, 1993; Noguchi และคณะ, 1994) USDA ได้ให้คำนิยามของสารต้านออกซิเดชันว่าเป็นสารที่ใช้สำหรับยืดอายุการเก็บรักษาของอาหารโดยชะลอการเสื่อมเสียการเกิดกลิ่นหืนหรือการเปลี่ยนแปลงสีอันเป็นผลมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Shahidi และWanasundara, 1992)

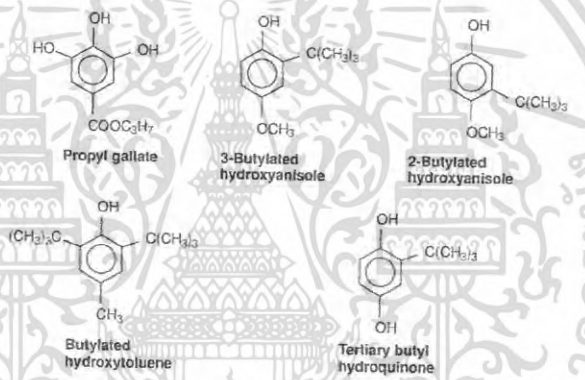
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ได้มาจากพืชผักเครื่องเทศ องุ่น และสมุนไพรได้รับความสนใจและศึกษากันอย่างกว้างขวางเนื่องจากกระแสเรื่องความปลอดภัยของสารสกัดจากธรรมชาติสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิด ได้แก่

2.10.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants)

สารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์ 5 ชนิดได้แก่ propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone ซึ่งสูตรโครงสร้างเคมีเป็นดังรูปที่ 2.11.1 เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่นสีและรสชาติที่เปลี่ยนไปสารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติแต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Pokorný และคณะ, 2001)



รูปที่ 2.11.1 โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

(A) Propyl gallate, (B) 3- Butylated hydroxyanisole, (C) 2-Butylated hydroxyanisole, (D) Butylated hydroxytoluene, (E) Tertiary butyl hydroquinone

ที่มา: (Howell และ Saeed, 1999)

2.10.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants)

สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจากความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้พบได้ทั้งในจุลชีพสัตว์และพืชซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามินเช่นวิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิกโดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่นแซนโทน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไปหมู่ฟังก์ชั่น (functional

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

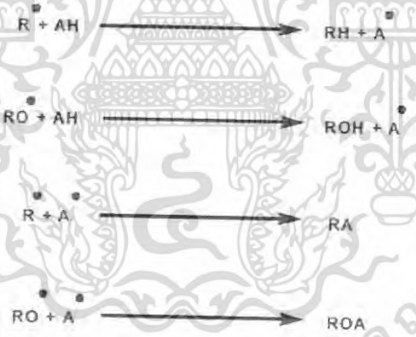
group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้โดยการให้อนุมูล $H^{\cdot}$ แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้นนอกจากนี้สารประกอบโพลีฟีนอลที่มีโครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล $OH^{\cdot}$ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชั่นคือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Sanchez-Moreno และคณะ, 2000) สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งพบในพืชพรรณธรรมชาตินานาชนิดสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการและในสิ่งมีชีวิต

2.11 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

จากรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีหลายกลไกดังนี้

2.11.1 ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging)

การดักจับอนุมูลอิสระเป็นที่ทราบดีว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้โดยการทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้นซึ่งกลไกของปฏิกิริยาเกิดโดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็คตรอนแก่อนุมูลอิสระ (Valacchi และคณะ, 2004) ดังสมการ



2.11.2 ยับยั้งการทำงานของซิงเกล็ทออกซิเจน (Singlet oxygen quenching, $^1O_2^{\cdot}$)

สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) สามารถยับยั้งการทำงานของซิงเกล็ทออกซิเจนโดยการเปลี่ยน ($^1O_2^{\cdot}$) ให้อยู่ในรูปทริปเปร็ท (triplet oxygen ($^3O_2$)) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อนโดยที่แคโรทีนอยด์ (Car) จำนวน 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับซิงเกล็ทออกซิเจนได้ถึง 1,000 โมเลกุล (Sies และคณะ, 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$^1O_2^* + {}^1Car \longrightarrow 3O_2 + {}^3Car^*$$

$$^3Car^* \longrightarrow {}^1Car + \text{thermal energy}$$

2.11.3 จับกับโลหะที่สามารถเร่งสารกลุ่มนี้ ได้แก่ปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (metal chelation)

โลหะที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระคือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ฟอสฟอริกแอซิด (phosphoric acid) และซิตริกแอซิด (citric acid) เป็นต้นสำหรับกลไกการจับโลหะของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Sanchez-Moreno และคณะ, 2000) แสดงดังสมการ

2.11.4 หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking)

วิตามินอี (α-tocopherol, Toc-OH) สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid autooxidation) โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็คตรอน (electron-acceptor antioxidants) จากอนุมูล peroxyl (ROO•) (Burton และ Traber, 1990)

2.11.5 เสริมฤทธิ์ (synergism)

สารชนิดนี้จะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอุนมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น เช่น การทำงานร่วมกันระหว่างวิตามินอี (α-tocopherol) กับวิตามินซี (ascorbic acid) โดยที่วิตามินซีไม่สามารถทำงานในในสภาวะไม่มีขั้ว (hydrophobic condition) ได้เหมือนกับวิตามินอีแต่จะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลแอลฟา-โทโคฟีรอลเปอร์ออกซิล (α-tocopherol peroxyl) ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างแอลฟา-โทโคฟีรอลกับอนุมูลเปอร์ออกซิล (ROO•) เพื่อเปลี่ยนรูปกลับไปเป็นแอลฟา-โทโคฟีรอลที่สามารถทางานได้ (Frankel, 1998)

2.11.6 ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition)

สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดเช่นฟลาโวนอยด์กรดฟีนอลิก (phenolic acid) และแกลเลต (gallates) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิโพออกซีจีเนส (lipoxygenase) โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ส่งผลให้เอ็นไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ (Puerta, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง คือ พืชสมุนไพรทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ ว่านน้ำ (*Acorus calamus*, เหง้าแห้ง) ข่า (*Alpinia galangal*, เหง้าแห้ง) โกฐเชียง (*Angelica sinensis*, ราก) โกฐจุฬาลัมพา (*Artemisia annua*, ทั้งต้น) อบเชย (*Cinnamomum verum*, เปลือกต้น) ว่านนางคำ (*Curcuma aromatica*, เหง้าแห้ง) ว่านเต่าเกียด (*Homalomena aromatica*, เหง้าแห้ง) เปราะหอม (*Kaempferia galangal*, เหง้าแห้ง) และกานพลู (*Syzygium aromaticum*, ดอกตูมแห้ง) โดยสมุนไพรทั้งหมดที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นสมุนไพรแห้งซื้อมาจากร้านขายสมุนไพรในกรุงเทพมหานคร

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Aspergillus terreus* TISTR 3109, *Aspergillus niger* TISTR 3245, *Aspergillus versicolor* TISTR 3460, *Alternaria alternata* TISTR 3282, *Penicillium citrinum* TISTR 3437, *Rhizopus stolonifer* TISTR 3144, ***Trichoderma harzianum*** TISTR 3608, *Geotrichum candidum* TISTR 3442, *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus parasiticus* TISTR3276 , *Aspergillus ochraceus* TISTR และ 3557 *Fusarium moniliforme* TISTR ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และ 3175 เทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155, *Hanseniaspora uvarum* TISTR 5153, *Candida albicans* TISTR 5779, *Schizosaccharomyces pombe* TISTR 5205, *Candida lipolytica* TISTR 5655, *Pichia membranaefaciens* TISTR 5093, *Rhodotorula glutinis* TISTR และ 515 *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA) Yeast Malt Agar (YMA) Yeast Malt Broth (YMB) และสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Anhydrous sodium sulphate) ทวีน 80 (Tween 80) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO, CaelovErba, Italy) ยาปฏิชีวนะแอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B, M&H Manufacturing) เมทานอล (Methanol, Avantor Ferformance Materials, inc., USA) เอ-ทานอล (Ethanol, Avantor Ferformance Materials, inc., USA) DPPH (2, 2–diphenyl–1–picryl–hydrazyl) (Aldrich, Sigma-Aldrich, Switzerland) โซเดียมอะซิเตท ($C_2H_3NaO_2.3H_2O$), กรดอะซิติก ($C_2H_4O_2$) กรดไฮโดรคลอริก (HCl), 2,4,4-tripyridyl-5-triazine (TPTZ) เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) เฟอรัสซัลเฟต (Ferrous sulfate hepptahydrate: $FeSO_4.7H_2O$) 2,2´-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic-acid) diammonium salt (ABTS) (Sigma, Sigma-Aldrich, Switzerland) โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) โซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) อลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_2$) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate: Na_2CO_3) คาเทชิน (Catechin, Aldrich, Sigma-Aldrich, Switzerland) Folin-Cocalteu's phenol reagent กรดแกลลิก (gallic acid) กรดแอสคอร์บิก แอลฟาโทโคฟีรอล BHT และ 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox, Aldrich, Sigma-Aldrich, United States)

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย (Clevenger's apparatus) ตู้อบลมร้อน (Memmert, UFE 600) ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, INP 600) ตู้เย็น (SANYO, SR-F383) ตู้เขี่ยเชื้อ (BossTech, VT 90) หม้อนึ่งความดัน (TOMY, ES-315) เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer, VORTEX GENIE 2, G560E) ไมโครปิเปตขนาด 20-200 ไมโครลิตร (eppendrof, USA) ไมโครปิเปตขนาด 500- 5000 ไมโครลิตร (eppendrof, USA) ไมโครปิเปตขนาด 2-20 ไมโครลิตร (Thermo Scentific, USA) ไมโครปิเปตขนาด 10-100 ไมโครลิตร (BIOHIT, USA) ไมโครปิเปตขนาด 100-1000 ไมโครลิตร (BIOHIT, USA) เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer, Shmadzu, UV-1601, japan) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge, FALCON, 6/300) กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เครื่องบดผสม เครื่องวัดพีเอช กล้องจุลทรรศน์ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ตะเกียงแอลกอฮอล์ ปากคีบ เข็มเขี่ยเชื้อ ลูปเขี่ยเชื้อ แท่งแก้วงอ กรวยแก้วกรองสาร และอุปกรณ์เครื่องแก้วอื่นๆ ที่จำเป็น

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เตรียมโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ โดยใช้เครื่อง Clevenger's apparatus เริ่มจากการนำพืชสมุนไพรแห้งมาปั่นหรือบดให้มีขนาดเล็ก ชั่งพืช

149357

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมุนไพรแห้งปริมาณ 150 กรัม ใส่ลงในขวดกลั่น เติมน้ำกลั่นจนท่วมพืช ให้ความร้อนประมาณ 3-4 ชั่วโมง รอจนกระทั่งปริมาณน้ำมันที่ได้นั้นคงที่จึงหยุดให้ความร้อน และจดบันทึกปริมาณน้ำมันที่ได้ จากนั้นทำการกำจัดน้ำออกโดยเติมสารโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสให้มากเกินพอ และกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บรักษาน้ำมันหอมระเหยนั้นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในขวดแก้วสีชาเพื่อสามารถนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.2.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

3.2.2.1 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง12 ชนิด บนอาหาร PDA slant ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อราเจริญเต็มที่และเกิดการสร้างสปอร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ใส่ลงในหลอดอาหาร PDA slant ที่มีเชื้อราเจริญอยู่แล้วใช้พาสเจอร์ปิเปตที่ปราศจากเชื้อขูดเบาๆ เพื่อให้สปอร์หลุดออกมา จากนั้นกรองเอาเส้นใยออก โดยการกรองผ่านกรวยกรองที่บุสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อได้สปอร์แขวนลอยแล้วให้นำไปนับสปอร์ด้วย haemacytometer ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วย Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

3.2.2.2 การเตรียมสารแขวนลอยของเซลล์ยีสต์

ทำการเพาะยีสต์ทั้ง 8 ชนิด ในอาหาร YMA slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 33000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งไป จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้งในการล้างเซลล์แต่ละครั้งทำได้โดยการเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงไปแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับข้างต้น เทส่วนใสทิ้ง แล้วจึงทำให้ได้สารแขวนลอยเซลล์โดยการเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปรับความขุ่นของเซลล์แขวนลอยให้เท่ากับ Mcfarland Standard เบอร์ 6 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เป็น 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1

3.2.3 การศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย

3.2.3.1 การศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์โดยวิธี Agar disc diffusion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการทดลองตามวิธีของ Collins และคณะ (2001) โดยทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเตรียมสารแขวนลอยเซลล์สำหรับยีสต์และสารแขวนลอยสปอร์สำหรับเชื้อรา นำสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์มาทดสอบโดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารแขวนลอยเซลล์และกดด้านข้างหลอดเพื่อไม่ให้สำลีชุ่มเกินไปจากนั้นทำการ swab ที่ผิวหน้าอาหาร YMA ส่วนเชื้อราทำการปิเปตสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 100ไมโครลิตร ลงที่ผิวหน้าอาหาร PDA และใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร รอให้ผิวหน้าอาหารแห้งแล้ววางกระดาษกรองขนาด 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงตรงกลางผิวหน้าอาหาร หลังจากนั้นปิเปตน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรอง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สำหรับยีสต์ และ 7 วัน สำหรับเชื้อรา วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone ในหน่วยมิลลิเมตร แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยโดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

Negative control ทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่ใช้ DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 แทนน้ำมันหอมระเหย ส่วน Positive control ใช้ยาแอมโฟเทอริซินบีที่ความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 และ 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยใช้วิธี serial two-fold dilutions

3.2.3.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ (MIC) โดยวิธี Agar dilution

ทำการทดลองตามวิธีของ Şahin และคณะ (2004) โดยทำการเตรียม stock solution ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดในสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยีสต์ใช้ YMA สำหรับเชื้อราใช้ PDA ที่มีน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้นสุดท้ายต่างกัน 17 ระดับ (20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.015 และ 0.0078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยทำการเติมน้ำมันหอมระเหยจาก stock ที่ความเข้มข้นที่ได้ทำการเตรียมไว้คือ 500, 50, 5 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตรที่เหมาะสมโดยปริมาตรน้ำกลั่นเมื่อรวมกับปริมาตรน้ำมันหอมระเหยที่เตรียมไว้แล้วต้องรวมกันแล้วได้ 125 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังหลอมเหลวอยู่ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2,375 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันดีแล้วนำมาเอียงเพื่อให้ได้หลอดอาหารที่มีผิวหน้าเอียงรอให้อาหารแข็งตัว จากนั้นจึงทำการเพาะเชื้อ (inoculation) สำหรับเชื้อราให้หยดสปอร์แขวนลอยที่ได้เตรียมไว้แล้วตามข้อ 3.2.2.1 ลงตรงกลางที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อหลอด ส่วนยีสต์ให้นำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้เตรียมไว้แล้วตามข้อ 3.2.2.2 มาทำการ simple streak ที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน สำหรับเชื้อรา และเป็นเวลา 3 วัน สำหรับยีสต์ เมื่อครบกำหนดบ่มแล้วทำการประเมินผลโดยดูที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่ไม่พบการเจริญก็จะให้เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) ซึ่งมาจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Negative control ทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่ใช้ DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 แทนน้ำมันหอมระเหย ส่วน Positive control ใช้ยาแอมโฟเทอริซินบีที่ความเข้มข้นสุดท้าย 6 ระดับ (0.72, 0.36, 0.18, 0.09, 0.045 และ 0.0225 สำหรับเชื้อรา; 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 และ 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับยีสต์) เตรียมโดยใช้วิธี serial two-fold dilutions

3.2.3.3 การศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์

ก. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเตรียมเชื้อราและยีสต์ตามวิธีการข้อ 3.2.2 ให้ได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.0×10^6 CFUต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบ

ข. ทดสอบด้วยวิธี Agar dilution checkerboard

ทำการทดสอบผลของน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด จำนวน 3 คู่ โดยคู่ที่ 1 เป็นน้ำมันอบเชยกับกับน้ำมันกานพลู คู่ที่ 2 เป็นน้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และคู่ที่ 3 เป็นน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียด ในการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์โดยวิธี checkerboard โดยทำการทดลองตามวิธีของ Rosato และคณะ (2007) ขั้นแรกทำการเตรียม stock solution ของน้ำมันอบเชย น้ำมันกานพลู และน้ำมันว่านเต่าเกียด ในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ทำการปิเปต stock solution ของน้ำมันอบเชย และน้ำมันกานพลู ของคู่ที่ 1 อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 : 1) ลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเทอาหาร PDA สำหรับเชื้อรา และอาหาร YMA สำหรับยีสต์ ที่ยังหลอมเหลวอยู่ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงไปในปริมาตร 19 มิลลิลิตร เพื่อให้ในจานเพาะเชื้อมีระดับความเข้มข้นเป็น 1/2, 1/4, 1/8 และ 1/16 เท่าของค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดซึ่งได้จากผลของวิธีการทดลองในข้อ 3.2.3.2 ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวแล้วจึงหยดสารแขวนลอยสปอร์สำหรับเชื้อราและสารแขวนลอยเซลล์สำหรับยีสต์ (1.0×10^6 CFUต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนน้ำมันคู่ที่ 2 และคู่ที่ 3 ก็ทำเช่นเดียวกับน้ำมันคู่ที่ 1 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สำหรับเชื้อราและ 3 วันสำหรับยีสต์ จากนั้นทำการประเมินผลของน้ำมันหอมระเหยโดยคำนวณเป็นค่าของ fractional inhibitory concentration (FIC) การคำนวณค่า FIC index (FICI) มีสูตรดังนี้

$$\text{FIC index} = FIC_A + FIC_B$$

เมื่อ FIC_A = ค่า MIC ของน้ำมันระเหยชนิด A (MIC_A conbination) เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม / ค่า MIC ของน้ำมันระเหย A เพียงอย่างเดียว (MIC_A alone)

FIC_B = ค่า MIC ของน้ำมันระเหยชนิด B (MIC_B conbination) เมื่ออยู่ในรูปแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของน้ำมันผสม / ค่า MIC ของน้ำมันระเหย B เพียงอย่างเดียว (MIC_B alone)

โดยค่า	FIC ≤ 0.5	หมายถึงเสริมฤทธิ์กัน (total synergism)
	0.5 < FIC ≤ 0.75	หมายถึงเสริมฤทธิ์กันบางส่วน (partial synergism)
	0.75 < FIC ≤ 2	หมายถึงไม่มีผล (no effect)
	FIC > 2	หมายถึงเป็นปฏิปักษ์กัน (antagonism)

(Pekmezovic และคณะ, 2015)

3.2.4 สมบัติทางพฤกษเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย

ก) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay)

ทำการทดลองตามวิธีการของ Singh และคณะ (2008) โดยนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้ทั้ง 9 ชนิดมาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ 1, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยสารละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์จากนั้นปิเปตสารละลายน้ำมันหอมระเหยที่เจือจางมา 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลแทนน้ำมันหอมระเหยเป็นชุดควบคุม และใช้แอลฟา-โทโคฟีรอลและบีเอชทีเป็น positive control ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นนำไปคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งของ DPPH radical ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%I = \frac{(Ao - As)}{Ao} x\ 100$$

A_o คือค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_s คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย

จากนั้นนำค่าร้อยละของการยับยั้งโดย DPPH กับค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} เป็นค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถกำจัด DPPH radical ได้ร้อยละ 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข) การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay)

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Lado และคณะ (2004) โดยมีสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ คือ FRAP reagent ซึ่งประกอบด้วย acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และสารละลาย Ferric chloride hexahydrate ($FeCl_3.6H_2O$) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สามารถทำการวิเคราะห์ได้โดยปิเปต FRAP reagent ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยเทียบกับ FRAP reagent ที่ไม่มีตัวอย่างของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งใช้เป็น blank และนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่ได้นั้นมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานของสารละลาย ferrous sulfate heptahydrate ($FeSO_3.7H_2O$) ที่ความเข้มข้น 0.047, 0.094, 0.188, 0.375, 0.750, 1.500 และ 3.000 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น แต่ใช้สารละลาย ferrous sulfate heptahydrate แทนน้ำมันหอมระเหย และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับระดับความเข้มข้นของสารละลาย ferrous sulfate heptahydrate ซึ่งจะได้กราฟแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง และหาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของ ferrous sulfate heptahydrate

ค) การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Re และคณะ (1999) โดยทำการเตรียม Stock solution ที่มีส่วนผสมของสารละลาย ABTS ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และสารละลาย Potassium persulfate ที่ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วทำการผสม Stock solution ของสารละลายทั้งสองด้วยอัตราส่วน 1:1 เก็บสารละลายผสมไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาเจือจางด้วยเอทานอลจนได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (สารละลาย ABTS ที่ใช้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง) จากนั้นนำตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ ทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียม Blank โดยผสมสารตัวอย่างเหมือนการทดลองข้างต้นแต่ใช้เมทานอลแทนน้ำมันหอมระเหย คำนวณกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์จากนั้นรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของโทรล็อกซ์ต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย การทำกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ทำได้ดังนี้

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้น 1,000, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.5625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการทดลองตามวิธีการหาปริมาณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ใช้สารละลายโทรล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ แทนน้ำมันหอมระเหยแล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาพลอตกราฟกับความเข้มข้นของสารละลายโทรล็อกซ์จะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง หาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณปริมาณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่วิเคราะห์

3.2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของDastmalchi และคณะ (2007) โดยทำการเตรียมน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายเมทานอล 1100 เปอร์เซ็นต์ ปิเปตน้ำมันหอมระเหยปริมาตร ไมโครลิตร ใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร 100 เติมน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง(ultra pure water) ปริมาตร มิลลิลิตร 6เติมสาร Folin-Cocalteu's phenol reagent ปริมาตร ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที เติมสารละลาย 500 Na_2CO_3 ที่ความเข้มข้นร้อยละ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วย 20 น้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา นาที จะให้สารละลายเป็นสีน้ำ 30 เงิน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก จากนั้นรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย การทำกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกทำได้ดังนี้

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1,000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการทดลองตามวิธีการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ใช้สารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ แทนน้ำมันหอมระเหยแล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟกับความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิกจะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง หาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่วิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของKathirvel และ Sujatha (2012) โดยปิเปตน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 75 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรลงไป ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 275 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นั้นมาคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของคาเทชิน จากนั้นรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของน้ำมันหอมระเหย การทำกราฟมาตรฐานของคาเทชินทำได้ดังนี้

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานคาเทชินที่ความเข้มข้น 1,000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการทดลองตามวิธีการหาปริมาณสารประกอบ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ใช้สารละลายคาเทชินที่ความเข้มข้นต่างๆ แทนน้ำมันหอมระเหยจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟกับความเข้มข้นของสารละลายคาเทชินจะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง หาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่วิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืชสมุนไพร

เมื่อนำพืชสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดมาทำการกลั่นด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำโดยใช้เครื่อง Clevenger's apparatus (ตารางที่ 4.1) พบว่าพืชสมุนไพรที่มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากกว่าร้อยละ 1.0 ได้แก่ กานพลู ว่านางคำ และอบเชย โดยกานพลูมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด (ร้อยละ 4.0) ส่วนว่านน้ำ ข่า โกฐเชียง โกฐจุฬาลัมพา ว่านเต่าเกียด และเปราะหอมมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยน้อยกว่าร้อยละ 1.0 โดยโกฐเชียงและโกฐจุฬาลัมพามีปริมาณน้ำมันหอมระเหยน้อยที่สุด (ร้อยละ 0.2)

ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืชสมุนไพรแต่ละชนิด

ชนิดสมุนไพรพืชสมุนไพร	ปริมาณน้ำมันหอมระเหย[a] ± SD (มิลลิลิตร/น้ำหนักพืชแห้ง 150 กรัม)
ว่านน้ำ	0.6 ± 0.08
ข่า	0.4 ± 0.04
โกฐเชียง	0.2 ± 0.08
โกฐจุฬาลัมพา	0.2 ± 0.04
อบเชย	1.0 ± 0.08
ว่านนางคำ	2.0 ± 0.16
ว่านเต่าเกียด	0.6 ± 0.19
เปราะหอม	0.7 ± 0.08
กานพลู	4.0 ± 0.56

[a] ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

4.2 สมบัติการต้านเชื้อราและยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย

4.2.1 ผลการศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรด้วยวิธีการแพร่บนอาหารวุ้น (Agar disc diffusion) และวิธีการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution)

จากผลการศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจำนวนทั้งหมด 12 ชนิดของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรทั้งหมด 5 ชนิด (ตารางที่ 4.2.1.1 และ 4.2.1.3) พบว่าน้ำมันเปราะหอมและน้ำมันว่านน้ำ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ค่อนข้างหลากหลายชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรชนิดอื่น (เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งของน้ำมันว่านน้ำอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่าง 8.81 ถึง 16.21 มิลลิเมตร และของน้ำมันเปราะหอมอยู่ระหว่าง 8.40 ถึง 13.34 มิลลิเมตร) แต่ฤทธิ์ในการยับยั้งไม่สูงมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันอบเชย น้ำมันกานพลู และน้ำมันว่านเต่าเกียด ซึ่งมีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งค่อนข้างกว้าง โดยน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทดสอบได้ดีที่สุดคือ น้ำมันอบเชย เนื่องจากค่า MIC ของการยับยั้งการเจริญของเชื้อราส่วนใหญ่มีค่าต่ำกว่าค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืชสมุนไพรชนิดอื่น โดยเชื้อราส่วนใหญ่ถูกยับยั้งได้ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นเชื้อ *A. niger, A. parasiticus, R. stolonifera และ T. harzianum* ซึ่งถูกยับยั้งได้ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันกานพลูเป็นน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีเช่นเดียวกันเนื่องจากเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งการเจริญของเชื้อราส่วนใหญ่ค่อนข้างกว้าง (20.26 ถึง 47.76 มิลลิเมตร) แต่ค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทุกชนิดเท่ากันคือ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนน้ำมันว่านเต่าเกียดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีรองลงมา แต่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทุกชนิดที่ทดสอบไม่กว้างนัก (12.55 ถึง 19.42 มิลลิเมตร และค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเชื้อ *A. versicolor* มีความไวต่อการถูกยับยั้งการเจริญมากที่สุด (ค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนน้ำมันเปราะหอมและน้ำมันว่านน้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ไม่ดีนักเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรชนิดอื่นดังที่กล่าวมาแล้ว น้ำมันเปราะหอมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. parasiticus, P. citrinum และ T. harzianum* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อราชนิดอื่นถูกยับยั้งด้วยน้ำมันเปราะหอมที่ค่า MIC เท่ากับ 4-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในกรณีของน้ำมันว่านน้ำสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus, F. moniliforme* และ *T. harzianum* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อราชนิดอื่นค่อนข้างต้านทานต่อการถูกยับยั้งด้วยน้ำมันว่านน้ำ (มีค่า MIC เท่ากับ 8-18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากผลการศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์จำนวนทั้งหมด 8 ชนิดของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรทั้งหมด 5 ชนิด (ตารางที่ 4.2.1.2 และ 4.2.1.4) พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ทุกชนิดที่ทดสอบได้แก่ น้ำมันอบเชย น้ำมันว่านเต่าเกียด น้ำมันเปราะหอม และน้ำมันกานพลู โดยน้ำมันอบเชยมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ได้ดีมากที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งกว้างมากที่สุด (16.53 ถึง 45.79 มิลลิเมตร) และมีค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ทุกชนิดที่ทดสอบเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ได้ค่อนข้างดีเช่นเดียวกัน เนื่องจากมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งส่วนใหญ่ค่อนข้างกว้าง มีค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่ที่ทดสอบเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นเชื้อ *C. lipolytica* ซึ่งค่อนข้างไวต่อการถูกยับยั้งด้วยน้ำมันกานพลูมากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันว่านเต่าเกียดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ได้ดีรองจากน้ำมันอบเชยและน้ำมันกานพลู โดยมีขนาดเส้นผ่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศูนย์กลางของโซนการยับยั้งอยู่ระหว่าง 8.31 ถึง 22.66 มิลลิเมตร (ค่า MIC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) น้ำมันว่านน้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ที่ทดสอบส่วนใหญ่ได้ดี (ค่า MIC เท่ากับ 0.125 ถึง 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เชื้อยีสต์ส่วนใหญ่ที่ทดสอบถูกยับยั้งได้ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นเชื้อ *C. lipolytica* และ *H. uvarum* ถูกยับยั้งได้ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันเปราะหอมมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่ด้อยกว่าน้ำมันที่ได้จากพืชสมุนไพรชนิดอื่นที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เนื่องจากมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งอยู่ในช่วงที่แคบกว่า (8.69 ถึง 15.68 มิลลิเมตร) โดยพบว่าเชื้อยีสต์เพียงชนิดเดียวคือ *D. hansenii* ที่ค่อนข้างไวต่อการถูกยับยั้งด้วยน้ำมันเปราะหอมมากที่สุดมีค่า MIC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเชื้อ *C. lipolytica* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ *Z. rouxii* มีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันเปราะหอมมากที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อยีสต์ชนิดอื่นมีฤทธิ์ต่อการถูกยับยั้งการเจริญโดยน้ำมันเปราะหอมไม่แตกต่างกัน มีค่า MIC เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับการศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจำนวนทั้งหมด 12 ชนิดและเชื้อยีสต์ทั้งหมด 8 ชนิดของยาแอมโฟเทอริซินบีที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิด ได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยบางชนิด (มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.0225 ถึงมากกว่า 0.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยยับยั้งเชื้อ *A. alternate* ได้ดีที่สุด มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง 15.89 มิลลิเมตร และมีค่า MIC เท่ากับ 0.0225 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยับยั้งเชื้อ *A. niger* ได้ดีรองลงมา (มีค่า MIC เท่ากับ 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งเชื้อ *A. ochraceus, A. terreus, F. moniliforme, R. stolonifera* และ *T. harzianum* มีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งด้วยยาแอมโฟเทอริซินบีมากที่สุด โดยมีค่า MIC มากกว่า 0.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ทุกชนิดได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยทุกชนิดที่ทดสอบ และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ได้ดีโดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.05 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นเชื้อ *C. albicans* และ *D. hansenii* ที่มีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยยาแอมโฟเทอริซินบีมากที่สุด โดยมีค่า MIC มากกว่า 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดลองนี้น้ำมันว่านน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์หลายชนิดได้ดีที่ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.125 ถึงมากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับรายงานการวิจัยของ Devi และ Ganjewala (2009) ซึ่งได้พบว่าสารสกัดจากเหง้าของว่านน้ำ (*Acorus calamus* L.) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้เช่น *Penicillium chrysogenum, Aspergillus niger, Aspergillus Flavus, Microsporum canis, Cryptococcus gastricus* และ *Candida albicans* โดยมีค่า MIC ระหว่าง 3-32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กิจกรรมการต้านเชื้อราและยีสต์อาจเป็นผลมาจากสารประกอบในน้ำมันว่านน้ำ มีรายงานว่าน้ำมันว่านน้ำประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด Senthikumar และ Venkatesalu (2012) ได้วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันจากเหง้าของว่านน้ำ (*Acolus calamus* L.) โดยใช้วิธี Gas Chromatography (GC) และ Gas

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS) พบว่ามีสารประกอบ 20 ชนิด โดยมีสารประกอบหลักได้แก่ β-asarone (ร้อยละ 33.36), *cis*-β-terpineol (ร้อยละ 23.44), limonene (ร้อยละ 13.08), carvone (ร้อยละ 5.64), amyl isovalerate (ร้อยละ 4.92), globulol (ร้อยละ 3.28) และสารประกอบอื่นๆ ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 3 สารสำคัญบางชนิดที่เป็นส่วนประกอบในน้ำมันว่านน้ำเคยมีผู้รายงานไว้ว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อราเช่น มีรายงานว่า β-asarone ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีมากที่สุดในน้ำมันว่านน้ำสามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ได้ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Rajput และ Karuppayil, 2013) และมีการศึกษาผลของ β-asarone ต่อเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) แสดงให้เห็นว่าเส้นใยและสปอร์เกิดการหดตัวและทรุดตัวลงเนื่องจากการรั่วไหลของของเหลวภายในเซลล์ (Phongpaichit และคณะ, 2005)

จากการทดลองนี้น้ำมันอบเชยยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้มากโดยมีค่า MIC ค่อนข้างต่ำผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการรายงานของนักวิจัยท่านอื่น (Simić และคณะ, 2004; Soliman และ Badeaa, 2002) นอกจากนี้น้ำมันอบเชย (*Cinnamomum verum*) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ได้ดีมากสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Unlu และคณะ (2010) ที่ได้รายงานว่าน้ำมันอบเชยมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Candida albicans* ได้ดีโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางโซนการยับยั้งที่มากกว่า 40 มิลลิเมตร และ Simić และคณะ (2004) ได้วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสำคัญในน้ำมันอบเชยด้วยวิธี Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS) พบว่ามีสารประกอบหลักได้แก่ trans-cinnamaldehyde (ร้อยละ 62.79), limonene (ร้อยละ 8.31), eugenol (ร้อยละ 7.09) และ cinnamaldehyde propylene (ร้อยละ 5.55) และสารประกอบอื่นๆ ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 2 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria alternata* ให้ค่า MIC เท่ากับ 1.0 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อรา *A. niger A. ochraceus, A. flavus, A. terreus* และ *A. versicolor* ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ยังแสดงผลของ MFC พบว่า *Alternaria alternate, A. terreus* และ *A. versicolor* ให้ค่า MFC เท่ากับ 0.25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อรา *A. niger A. ochraceus* และ *A. flavus* ให้ค่า MFC เท่ากับ 0.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีรายงานว่า cinnamaldehyde และ eugenol ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในน้ำมันอบเชยมีกิจกรรมการต้านเชื้อราได้ดีมาก (Cheng และคณะ, 2006) รวมถึงยีสต์ *Candida albicans* (Bin Jantan และคณะ, 2008) สำหรับน้ำมันว่านเต่าเกียดจากผลการทดลองพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้หลายชนิด โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นักวิจัยท่านอื่นได้เคยรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันว่านเต่าเกียดไว้บ้างเช่น Singh และคณะ (2000) ได้รายงานว่าน้ำมันว่านเต่าเกียด (จากเหง้าของ *Homalomena aromatica*) มีกิจกรรมต้านเชื้อรา *Curvularia pallescens, Aspergillus niger* และ *Fusarium graminearum* ได้ดี Policegoudra และคณะ (2012) ได้ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสำคัญในน้ำมันว่านเต่าเกียดด้วยวิธี GC-MS พบว่ามีสารประกอบหลักได้แก่ linalool (ร้อยละ 62.5), terpene-4-ol (ร้อยละ 7.08), δ-cadinene (ร้อยละ 5.57), α-cadinol (ร้อยละ 3.71) และ spatulenol (ร้อยละ 1.81) นอกจากนี้ยังมีกิจกรรมต้านเชื้อรากลุ่ม Dermatophyte เช่น *Microsporum fulvum, Microsporum gypseum, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum, Trichosporon beigelii*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และยีสต์ *Candida albicans* ได้ดี Magiatis และคณะ (1999) ได้กล่าวว่าสารประกอบ α-pinene มีกิจกรรมต้านเชื้อราได้ นอกจากนี้สารประกอบ α-terpineol, linalool และ Terpinen-4-ol ได้มีการรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ *Candida albicans* ได้ดี (Carson และ Riley, 1995)

ในการทดลองครั้งนี้น้ำมันเปราะหอมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้ดี เช่นเดียวกับรายงานของ Tewtrakul และคณะ (2005) ที่ได้พบว่า *C. albicans* ถูกยับยั้งโดยน้ำมันจากเหง้าของเปราะหอม (*Kaempferia galanga*) โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนการยับยั้งเท่ากับ 31 มิลลิเมตร นอกจากนี้ Kochuthressia และคณะ (2012) ยังได้รายงานอีกว่าสารสกัดจากเหง้าของเปราะหอมโดยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus, A. niger* และ *C. albicans* ได้โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนการยับยั้งเท่ากับ 15.3, 16.3 และ 12.2 มิลลิเมตร ตามลำดับ Sahoo และคณะ (2014) ได้ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเปราะหอมที่ได้จากเหง้าโดยวิธี GC/MS พบว่ามีสารประกอบหลักได้แก่ ethyl-*p*-methoxy cinnamate (area peak ร้อยละ 82.01), ethyl cinnamate (area peak ร้อยละ 9.69), 3-carene (area peak ร้อยละ 3.41) และ eucalyptol (area peak ร้อยละ 1.60)

การทดลองนี้น้ำมันกานพลูยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้ดีมากเช่นเดียวกับรายงานของ Pinto และคณะ (2009) ซึ่งพบว่า *A. flavus* และ *A. niger* ถูกยับยั้งได้ดีโดยน้ำมันกานพลู (*Syzygium aromaticum*) ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.64 และ 0.32 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ Xing และคณะ (2012) ได้รายงานการศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ *Rhizorus nigricans, A. flavus* และ *P. citrinum* โดยน้ำมันกานพลูพบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 50, 25 และ 25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ Rana และคณะ (2011) ยังรายงานว่าน้ำมันกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิดได้ดีมากเช่น *F. moniliforme, F. oxysporum, Mucor* sp. และ *Aspergillus* sp. และยังตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ถึงการแตกและการเสียรูปร่างของสปอร์เชื้อราทุกชนิดที่ตรวจสอบหลังจากการแช่ไมซีเลียมที่มีสปอร์กับน้ำมันกานพลู 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนฤทธิ์ยับยั้งยีสต์โดยน้ำมันกานพลูได้เคยมีการรายงานเช่นเดียวกันดังการรายงานของ Gayoso และคณะ (2005) ซึ่งได้พบว่าน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* และ *G. candidum* ได้โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์การของโซนการยับยั้งเท่ากับ 14 และ 23 มิลลิเมตร ตามลำดับ กิจกรรมการต้านเชื้อราและยีสต์ของน้ำมันกานพลูพบว่าเป็นผลมาจากสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันกานพลู Razafimamonjison และคณะ (2014) ได้จำแนกชนิดสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบใน clove bud oil ด้วยวิธี Gas chromatography (GC) พบว่ามีสารประกอบหลักคือ eugenol (ร้อยละ 72.08-82.36), eugenyl acetate (ร้อยละ 8.61-21.32) และ β-caryophyllene (ร้อยละ 2.76-8.64) และมีรายงานว่า eugenol ที่เป็นสารประกอบหลักในน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราและยีสต์หลายชนิดได้ดี เช่น *A. flavus, A. niger* และ *C. albicans* (รายงานโดย Pinto และคณะ, 2009) *C. albicans* และ *G. candidum* (รายงานโดย Gayoso และคณะ, 2005) และ *Alternaria alternata, A. niger, A. flavus, A. ochraceus* และ *P. citrinum* (รายงานโดย Abbaszadeh และคณะ, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 สมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นอาหาร (Agar disc diffusion method)

ชนิดของเชื้อรา	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง (มม.)[a] ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน					
	ว่านน้ำ	อบเชย	ว่านเต่าเกียด	เปราะหอม	กานพลู	[c]Amphotericin B
Alternaria alternata	[b]-	-	-	-	-	15.89±6.49
Aspergillus flavus	8.40±0.24	25.47±7.25	13.24±2.80	10.92±1.65	32.25±4.76	9.82±0.53
Aspergillus niger	9.62±0.22	25.74±12.62	15.15±5.72	13.04±2.15	30.54±4.54	11.74±0.40
Aspergillus ochraceus	11.01±1.65	-	13.25±2.34	11.09±2.63	38.38±4.31	7.49±0.40
Aspergillus parasiticus	8.91±0.66	30.14±14.04	12.55±4.45	10.37±2.55	31.26±1.17	8.87±0.70
Aspergillus terreus	8.94±0.69	-	-	8.81±2.73	20.34±8.18	7.12±0.01
Aspergillus versicolor	8.90±0.51	28.36±10.15	15.70±4.16	9.41±0.51	27.05±4.63	10.41±0.82
Fusarium moniliforme	10.97±2.87	-	19.42±2.62	14.69±1.41	47.76±1.30	7.63±0.13
Geotrichum candidum	9.48±1.59	24.94±1.05	12.89±3.04	12.94±0.72	32.47±1.16	12.52±2.12
Penicillium citrinum	10.57±2.22	-	15.90±5.46	11.17±0.67	20.26±0.27	11.62±2.48
Rhizopus stolonifera	13.34±0.92	-	15.44±7.38	16.21±5.12	42.68±3.11	6.66±0.30
Trichoderma harzianum	11.59±2.33	12.79±0.01	-	11.06±0.60	-	10.73±2.28

[a] ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ; [b] ไม่พบการยับยั้ง (ไม่เกิดโซนการยับยั้งการเจริญ); [c] Amphotericin B ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml

ตารางที่ 4.3 สมบัติการยับยั้งการเจริญของยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นอาหาร (Agar disc diffusion method)

ชนิดของยีสต์	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง (มม.)[a] ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน					
	ว่านน้ำ	อบเชย	ว่านเต่าเกียด	เปราะหอม	กานพลู	[c]Amphotericin B
Candida albicans	-	42.80±0.08	12.35±0.14	9.43±0.03	18.78±0.04	-
Candida lipolytica	8.81±0.18	23.26±0.21	22.66±0.19	11.52±0.26	32.56±0.13	9.12±0.04
Debaryomyces hansenii	9.76±0.16	16.53±0.20	10.85±1.00	8.86±0.25	7.85±0.02	-
Hanseniaspora uvarum	7.59±0.03	18.81±0.58	18.05±0.91	15.57±0.07	38.53±0.68	10.49±0.05
Pichia membranaefaciens	-	45.79±0.04	8.31±0.04	11.83±0.00	22.72±0.07	8.17±0.02
Rhodotorula glutinis	7.41±0.31	24.68±0.93	13.51±0.04	13.07±0.01	20.83±0.00	-
Schizosaccharomyces pombe	12.64±0.83	27.02±0.07	18.51±0.06	15.68±0.09	35.29±1.47	17.59±0.04
Zygosaccharomyces rouxii	-	34.36±0.55	11.60±0.14	8.69±0.16	16.74±0.76	-

[a] ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ; [b] ไม่พบการยับยั้ง (ไม่เกิดโซนการยับยั้งการเจริญ); [c] Amphotericin B ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml

ตารางที่ 4.4 สมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยที่ความเข้มข้นต่ำสุดด้วยวิธีการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution)

ชนิดของเชื้อรา	ค่า minimum inhibitory concentration (mg/ml)					
	ว่านน้ำ	อบเชย	ว่านเต่าเกียด	เปราะหอม	กานพลู	Amphotericin B
Alternaria alternata	10	0.125	1	10	0.5	0.0225
Aspergillus flavus	2	0.125	2	10	0.5	0.18
Aspergillus niger	8	0.25	2	10	0.5	0.09
Aspergillus ochraceus	8	0.125	2	8	0.5	>0.72
Aspergillus parasiticus	14	0.25	2	2	0.5	0.36
Aspergillus terreus	16	0.125	2	8	0.5	>0.72
Aspergillus versicolor	18	0.125	0.5	4	0.5	0.18
Fusarium moniliforme	2	0.125	1	2	0.5	>0.72
Geotrichum candidum	14	0.125	1	8	0.5	>0.72
Penicillium citrinum	8	0.125	2	2	0.5	0.18
Rhizopus stolonifer	>20	0.25	1	8	0.5	>0.72
Trichoderma harzianum	2	0.25	2	2	0.5	>0.72

ตารางที่ 4.5 สมบัติการยับยั้งการเจริญของยีสต์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยที่ความเข้มข้นต่ำสุดด้วยวิธีการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution)

ชนิดของยีสต์	ค่า minimum inhibitory concentration (mg/ml)					
	ว่านน้ำ	อบเชย	ว่านเต่าเกียด	เปราะหอม	กานพลู	Amphotericin B
Candida albicans	0.5	0.5	1	4	1	>0.8
Candida lipolytica	0.125	0.5	1	2	0.25	0.05
Debaryomyces hansenii	0.5	0.5	1	1	1	>0.8
Hanseniaspora uvarum	0.125	0.5	1	4	1	0.05
Pichia membranaefaciens	0.5	0.5	1	4	1	0.1
Rhodotorula glutinis	0.5	0.5	1	4	1	0.05
Schizosaccharomyces pombe	0.5	0.5	1	4	1	0.05
Zygosaccharomyces rouxii	0.5	0.5	1	8	1	0.05

4.2.2 การศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์

จากการศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยผสมกัน 2 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบว่าคู่ผสมของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 คู่ คือน้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันกานพลู น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันกานพลูผสมกับน้ำมันว่านเต่าเกียดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 7 ชนิด ที่ทดสอบ ได้แก่ *A. flavus, A. niger, A. ochraceus, A. parasiticus, A. terreus, P. citrinum* และ *T. harzianum* โดยมีค่า MIC ของน้ำมันคู่ผสม (MIC_c) แตกต่างกันดังตารางที่ 4.6 เมื่อคำนวณหาค่า FIC index ของน้ำมันคู่ผสมทั้ง 3 คู่ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 7 ชนิด ดังกล่าวพบว่าให้ค่า FIC index มากกว่า 0.5 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.75 (FIC index เท่ากับ 0.56-0.66) จึงให้ผล partial synergism ซึ่งหมายความว่าการใช้น้ำมันคู่ผสมทั้ง 3 คู่ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าวนั้นน้ำมันแต่ละชนิดให้ผลเสริมฤทธิ์กันบางส่วนมากกว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว

เมื่อทำการทดสอบอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยผสมกัน 2 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์ 4 ชนิด พบว่าคู่ผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ *H. uvarum* ให้ค่า FIC index เท่ากับ 0.75 จึงให้ผล partial synergism ขณะที่ยีสต์ *C. albicans, P. membranaefaciens* และ *R. glutinis* ให้ค่า FIC index มากกว่า 0.75 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 (FIC index เท่ากับ 1) จึงให้ผล no effect ส่วนคู่ผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียดพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ดังกล่าวได้ยกเว้น *P. membranaefaciens* พบว่ามีความไวต่อคู่ผสมของน้ำมันชนิดนี้ซึ่งพิจารณาจากค่า FIC index ให้ค่าน้อยกว่า 0.5 (FIC index เท่ากับ 0.31) จึงให้ผล synergism มีความหมายว่าการใช้น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันว่านเต่าเกียดในการยับยั้งเชื้อ *P. membranaefaciens* ให้ผลที่เสริมฤทธิ์กันมากกว่าการใช้การใช้น้ำมันอบเชยหรือน้ำมันว่านเต่าเกียดเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง ในขณะที่ยีสต์ชนิดอื่นให้ผล partial synergism ต่อคู่ผสมของน้ำมันชนิดนี้เนื่องจากให้ค่า FIC index เท่ากับ 0.56-0.75 และคู่ผสมของน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียดพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ *C. albicans, H. uvarum* และ *P. membranaefaciens* ได้โดยให้ผล partial synergism (FIC index เท่ากับ 0.56-0.75) ในขณะที่เชื้อ *R. glutinis* มีความไวต่อคู่ผสมของน้ำมันชนิดนี้ซึ่งพิจารณาจากค่า FIC index ให้ค่าน้อยกว่า 0.5 (FIC index เท่ากับ 0.31) จึงให้ผล synergism (ตารางที่ 4.7)

จากการศึกษาอิทธิพลน้ำมันอบเชยและน้ำมันกานพลูในรูปแบบน้ำมันผสมต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus, A. niger, A. ochraceus, A. parasiticus, A. terreus, P. citrinum* และ *T. harzianum* ให้ค่า fractional inhibitory concentration index (FICI) อยู่ในช่วง 0.56-0.58 Sukatta และคณะ (2008) ได้แสดงผลของกิจกรรมการทำงานร่วมกันของน้ำมันอบเชยและน้ำมันกานพลูที่อัตราส่วนต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. niger, Alternaria alternata* และ *R. stolonifer* พบว่ามีค่า FICI เท่ากับ 0.78-1.90, 0.70-1.30 และ 0.65-1.40 ตามลำดับ มีรายงานว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของน้ำมันอบเชยร่วมกับน้ำมันกานพลูแสดงเห็นได้ชัดว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยเพิ่มขึ้น (อัตราส่วน 5:1, 7:1 และ 9:1) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ดีนอกจากนี้น้ำมันผสมของน้ำมันอบเชยและน้ำมันกานพลูยังสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Candida lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens* และ *Zygosaccharomyces rouxii* ในบรรจุภัณฑ์ดัดแปลงบรรยากาศของอาหารได้ดี (Matan และคณะ, 2006) และมีรายงานผลของน้ำมันอบเชยร่วมกับน้ำมันกานพลูต่อเชื้อรา *A. niger*, *Penicillium chrysogenum* และ *Penicillium* sp. ในไม้ยางพาราพบว่าการรวมกันของอบเชยและกานพลูน้ำมันในอัตราส่วน 5:1 และ 7: 1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าวได้ดีกว่าการใช้น้ำมันอบเชยและน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว (Matan และ Matan, 2007)

การใช้น้ำมันหอมระเหยร่วมกัน 2 ชนิด เช่น น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันว่านเต่าเกียดให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *P. membranaefaciens* ได้ดีกว่าการใช้น้ำมันอบเชยหรือน้ำมันว่านเต่าเกียดชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียวซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากกิจกรรมร่วมกันของสารสำคัญ 2 ชนิด หรือมากกว่า 2 ชนิด ที่เป็นส่วนประกอบในน้ำมันหอมระเหยผสมคู่นั้น (Goñi และคณะ, 2009) สำหรับกิจกรรมการเสริมฤทธิ์กันของน้ำมันผสม 3 ได้แก่ น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันกานพลู น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันกานพลูผสมกับน้ำมันว่านเต่าเกียด ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ที่ทดสอบนั้นยังไม่มีรายงานการวิจัยปรากฏสนับสนุนการทดลองนี้ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าพบกิจกรรมการเสริมฤทธิ์ของสารประกอบหลักที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหย เช่น cinnamaldehyde และ thymol ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Bassolé และ Juliani, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยเมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_c) ค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และค่า FIC index (FICI) ของน้ำมันผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลู น้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

เชื้อรา	MIC_a		MIC_c		FIC		FICI	การแปลผลค่า FICI
	MIC_{a1}	MIC_{a2}	MIC_{c1}	MIC_{c2}	FIC_1	FIC_2		
น้ำมันอบเชย (1) + น้ำมันกานพลู (2)								
Aspergillus flavus	0.125	0.5	0.008	0.25	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Aspergillus niger	0.25	0.5	0.016	0.25	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Aspergillus ochraceus	0.125	0.5	0.008	0.25	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Aspergillus parasiticus	0.25	0.5	0.02	0.25	0.08	0.5	0.58	partial synergism
Aspergillus terreus	0.125	0.5	0.008	0.25	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Penicillium citrinum	0.125	0.5	0.008	0.25	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Trichoderma harzianum	0.25	0.5	0.02	0.25	0.08	0.5	0.58	partial synergism
น้ำมันอบเชย (1) + น้ำมันว่านเต่าเกียด (2)								
Aspergillus flavus	0.125	2	0.02	1	0.16	0.5	0.66	partial synergism
Aspergillus niger	0.25	2	0.02	1	0.16	0.5	0.66	partial synergism
Aspergillus ochraceus	0.125	2	0.008	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Aspergillus parasiticus	0.25	2	0.02	1	0.16	0.5	0.66	partial synergism
Aspergillus terreus	0.125	2	0.008	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Penicillium citrinum	0.125	2	0.008	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Trichoderma harzianum	0.25	2	0.02	1	0.08	0.5	0.58	partial synergism
น้ำมันกานพลู (1) + น้ำมันว่านเต่าเกียด (2)								
Aspergillus flavus	0.5	2	0.03	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Aspergillus niger	0.5	2	0.03	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Aspergillus ochraceus	0.5	2	0.03	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Aspergillus parasiticus	0.5	2	0.03	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Aspergillus terreus	0.5	2	0.03	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Penicillium citrinum	0.5	2	0.03	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Trichoderma harzianum	0.5	2	0.03	1	0.06	0.5	0.56	partial synergism

MIC_{a1} หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันชนิดที่ 1 เพียงชนิดเดียว และ MIC_{a2} หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันชนิดที่ 2 เพียงชนิดเดียว

MIC_{c1} หมายถึงค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม และ MIC_{c2} หมายถึงค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม

FIC_1 คำนวณได้จากค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_{c1}) หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เพียงชนิดเดียว (MIC_{a1})

FIC_2 คำนวณได้จากค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_{c2}) หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เพียงชนิดเดียว (MIC_{a2})

FICI หมายถึงผลรวมของ FIC_1 (FIC ของน้ำมันชนิดที่ 1) กับ FIC_2 (FIC ของน้ำมันชนิดที่ 2)

FICI น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 หมายถึงเสริมฤทธิ์กัน มากกว่า 0.5 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.75 หมายถึงเสริมฤทธิ์กันบางส่วน มากกว่า 0.75 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 หมายถึงไม่มีผล และมากกว่า 2 หมายถึงเป็นปฏิปักษ์กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยเมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_c) ค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และค่า FIC index (FICI) ของน้ำมันผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลู น้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียด ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์

ยีสต์	MIC_a		MIC_c		FIC		FICI	การแปลผลค่า FICI
	MIC_{a1}	MIC_{a2}	MIC_{c1}	MIC_{c2}	FIC_1	FIC_2		
น้ำมันอบเชย (1) + น้ำมันกานพลู (2)								
Candida albicans	0.5	1	0.25	0.5	0.5	0.5	1	no effect
Hanseniaspora uvarum	0.5	1	0.25	0.25	0.5	0.25	0.75	partial synergism
Pichia membranaefaciens	0.5	1	0.25	0.5	0.5	0.5	1	no effect
Rhodotorula glutinis	0.5	1	0.25	0.5	0.5	0.5	1	no effect
น้ำมันอบเชย (1) + น้ำมันว่านเต่าเกียด (2)								
Candida albicans	0.5	1	0.125	0.5	0.25	0.5	0.75	partial synergism
Hanseniaspora uvarum	0.5	1	0.03	0.5	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Pichia membranaefaciens	0.5	1	0.125	0.06	0.25	0.06	0.31	synergism
Rhodotorula glutinis	0.5	1	0.03	0.5	0.06	0.5	0.56	partial synergism
น้ำมันกานพลู (1) + น้ำมันว่านเต่าเกียด (2)								
Candida albicans	1	1	0.25	0.5	0.25	0.5	0.75	partial synergism
Hanseniaspora uvarum	1	1	0.06	0.5	0.06	0.5	0.56	partial synergism
Pichia membranaefaciens	1	1	0.5	0.25	0.5	0.25	0.75	partial synergism
Rhodotorula glutinis	1	1	0.06	0.25	0.06	0.25	0.31	synergism

MIC_{a1} หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันชนิดที่ 1 เพียงชนิดเดียว และ MIC_{a2} หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันชนิดที่ 2 เพียงชนิดเดียว

MIC_{c1} หมายถึงค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม และ MIC_{c2} หมายถึงค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม

FIC_1 คำนวณได้จากค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_{c1}) หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เพียงชนิดเดียว (MIC_{a1})

FIC_2 คำนวณได้จากค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_{c2}) หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เพียงชนิดเดียว (MIC_{a2})

FICI หมายถึงผลรวมของ FIC_1 (FIC ของน้ำมันชนิดที่ 1) กับ FIC_2 (FIC ของน้ำมันชนิดที่ 2)

FICI น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 หมายถึงเสริมฤทธิ์กัน มากกว่า 0.5 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.75 หมายถึงเสริมฤทธิ์กันบางส่วน มากกว่า 0.75 แต่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 หมายถึงไม่มีผล และมากกว่า 2 หมายถึงเป็นปฏิปักษ์กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

4.3.1 ความสามารถในการกำจัด 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical

จากการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศ โดยทำการศึกษาจากสารสกัดเครื่องเทศ 21 ชนิดด้วยวิธีการหาความสามารถในการกำจัด 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยสารละลาย DPPH เป็นสารละลายสีม่วงที่มีอนุมูลและมีความเสถียรในสารละลายเมทานอล เมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดจากเครื่องเทศที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทำให้ความเข้มของสารละลาย DPPH ลดลงและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานคือแอลฟา-โทโคเฟอรอล ซึ่งจะแสดงค่าในรูปของค่า EC_{50} ซึ่งเป็นค่าของความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัดที่สามารถลดความเข้มข้นของอนุมูลอิสระของสารละลาย DPPH โดยเริ่มต้นที่ร้อยละ 50 นั่นหมายถึงถ้าค่า EC_{50} ยิ่งต่ำแสดงว่ามีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดนั้นยิ่งสูง จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่สามารถกำจัดอนุมูลของ DPPH ได้สูงที่สุด (ตารางที่ 4.8) คือโรสแมรี่ ซึ่งค่า EC_{50} คือ 116.40 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัม DPPH สารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่สามารถกำจัดอนุมูลของ DPPH ได้ค่อนข้างสูงได้แก่ สารสกัดจากใบ-ไทม์และกานพลู มีค่า EC_{50} 760.37 และ 846.19 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัม DPPH ตามลำดับ สารสกัดที่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระปานกลางได้แก่ ขิง มะกรูด ข่าและลูกจันทน์ จะมีค่า EC_{50} คือ 1,721.80, 2,080.73, 3,294.91 และ 5,481.81 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัม DPPH ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่สามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้ค่อนข้างต่ำได้แก่ ดอกกระเจี๊ยบแดง ชะเอม พริกหอม โป๊ยกั๊ก ยี่หร่าและตะไคร้ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 8,490.8, 10,999.97, 13,241.6, 13,861.14, 14,999.55 และ 16,305 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัม DPPH ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่สามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้ต่ำได้แก่ เมล็ดผักชี กระวาน พริกชี้ฟ้า พริกไทยขาว กระเทียม หอมแดง กระชายและพริกไทยดำ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 26,501.20, 26,501.20, 32,482.21, 34,205.2, 50,168.1, 84,173.3, 93,013 และ 95,561.52 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัม DPPH ตามลำดับ

4.3.2 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

จากการศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเครื่องเทศโดยการศึกษาสารสกัดจากเครื่องเทศทั้งหมด 21 ชนิดด้วยวิธี FRAP ซึ่งเป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}-TPTZ) ให้เปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}-TPTZ) ที่มีสีน้ำเงิน ซึ่งเกิดจากอะตอมของเหล็กในสาร Fe^{3+}-TPTZ จะถูกรีดิวซ์ให้ได้เป็น Fe^{2+}-TPTZ เทียบกับสารมาตรฐานคือแอลฟา-โทโคเฟอรอล นั่นหมายถึงถ้าค่าความสามารถในการรีดิวซ์ยิ่งสูง แสดงถึงกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดก็จะยิ่งสูงเช่นกัน จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ได้ดีที่สุดคือ กานพลู มีค่าในความสามารถการรีดิวซ์ 3.63 มิลลิโมลของเหล็กเฟอรัสต่อกรัมของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สารสกัดที่มีความสามารถในการรีดิวซ์รองลงมาคือ โรสแมรี่ ใบไทม์และขิง โดยมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์อยู่ระหว่าง 2.04, 1.95 และ 1.55 มิลลิโมลของเหล็กเฟอรัสต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ สารสกัดที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ปานกลางได้แก่ ดอกกระเจี๊ยบแดง มะกรูด ลูกจันทน์ ยี่หร่า พริกหอม ข่าและพริกชี้ฟ้า ซึ่งมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์เท่ากับ 0.83, 0.75, 0.64, 0.55, 0.48, 0.37 และ 0.35 มิลลิโมลของเหล็กเฟอรัสต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ และสารสกัดที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ต่ำได้แก่ กระชาย กระวาน ตะไคร้ พริกไทยดำ เมล็ดผักชี พริกไทยขาว ชะเอม หอมแดง โป๊ยกั๊กและกระเทียม มีค่าเท่ากับ 0.23, 0.18, 0.25, 0.24, 0.20, 0.15, 0.13, 0.04, 0.02 และ 0.01 มิลลิโมลของเหล็กเฟอรัสต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

4.3.3 ABTS radical cation decolorization assay

จากการศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศโดยทำการศึกษาสารสกัดจากเครื่องเทศทั้งหมด 21 ชนิดด้วยวิธีการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ $ABTS^{+}$ เทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีหรือมีความสามารถในการรีดิวซ์ $ABTS^{+}$ ได้ดีที่สุดคือสารสกัดหยาบจากกานพลู มีค่าความสามารถในการรีดิวซ์เท่ากับ 986.66 มิลลิกรัมของโทรล็อกซ์ต่อกรัมของสารสกัด สารสกัดหยาบที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ $ABTS^{+}$ ได้ดีรองลงมาคือสารสกัดหยาบจากโรสแมรี่และใบไทม์ มีค่าความสามารถในการรีดิวซ์เท่ากับ 510.21 และ 456.91 มิลลิกรัมของโทรล็อกซ์ต่อกรัมของสารสกัด สารสกัดที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ปานกลางได้แก่ ยี่หร่า ลูกจันทน์ ดอกกระเจี๊ยบแดง พริกหอม มะกรูด ขิง ข่าและพริกชี้ฟ้า ซึ่งมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์เท่ากับ 453.93, 450.42, 448.53, 439.06, 430.66, 426.6, 423.37 และ 414.43 มิลลิกรัมของโทรล็อกซ์ต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ และสารสกัดที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ต่ำได้แก่ พริกไทยดำ กระวาน เมล็ดผักชี กระเทียม กระชาย ตะไคร้ ชะเอม โป๊ยกั๊ก พริกไทยขาวและหอมแดง ซึ่งมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์เท่ากับ 348.68, 341.11, 332.98, 318.37, 263.73, 233.69, 229.08, 213.39, 204.46 และ 201.48 มิลลิกรัมของโทรล็อกซ์ต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

จากการวิเคราะห์สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของเครื่องเทศทั้ง 3 วิธีคือ DPPH, FRAP และ ABTS ให้ผลการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกันโดยเฉพาะวิธี FRAP และวิธี ABTS ให้ผลเหมือนกันคือกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกานพลูมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากโรสแมรี่และใบไทม์ ส่วนผลการวิเคราะห์ของสารสกัดจากเครื่องเทศบางชนิดให้ผลสอดคล้องกันบ้างคือค่าที่วิเคราะห์ได้อยู่ที่ลำดับความมากน้อยลำดับเดียวกันของผลการวิเคราะห์อย่างน้อย 2 วิธี (ลำดับที่ 1 ได้ค่ามากที่สุดและลำดับที่ 21 ได้ค่าน้อยที่สุด) ดังนี้ ขิง (ลำดับที่ 4), ลูกจันทน์ (ลำดับที่ 7), ข่า (ลำดับที่ 10), พริกชี้ฟ้า (ลำดับที่ 11), กระวาน (ลำดับที่ 13), พริกไทยขาว (ลำดับที่ 17) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หอมแดง (ลำดับที่ 21) ส่วนสารสกัดจากเครื่องเทศชนิดอื่นๆมีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างแปรผันระหว่างผลจากทั้ง 3 วิธีการวิเคราะห์

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

4.4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศทั้งหมด 21 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดได้แก่ กานพลู ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 496.01 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด สารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่มีฟีนอลิกสูงรองลงมาคือ ใบไทม์ โรสแมรี่และมะกรูด โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 243.41, 184.88 และ 154.84 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ส่วนสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่มีฟีนอลิกปานกลางได้แก่ ขิง พริกหอม ยี่หร่า ดอกกระเจี๊ยบแดงและลูกจันทน์ ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 147.33, 122.93 114.07, 105.81 และ 105.72 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่มีฟีนอลิกค่อนข้างต่ำได้แก่ พริกชี้ฟ้า ข่า กระชาย ชะเอม ตะไคร้ พริกไทยดำ กระวาน เมล็ดผักชี โป๊ยกั๊ก พริกไทยขาว กระเทียมและหอมแดง ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 96.08, 88.78, 86.5, 85.30, 79.69, 75.71, 72.66, 64.88, 63.67, 62.32, 59.37 และ 59.36 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

4.4.2 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศ

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศทั้งหมด 21 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดได้แก่ โรสแมรี่และกานพลู โดยมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 214.94 และ 209.52 มิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ สารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่มีปริมาณสูงรองลงมาคือ ใบไทม์ ขิง และลูกจันทน์ โดยมีปริมาณสารประกอบฟลาโว-นอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 199.03, 126.76 และ 123.39 มิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ สารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดปานกลางได้แก่ ยี่หร่า มะกรูด ดอกกระเจี๊ยบแดง กระชาย พริกหอมและโป๊ยกั๊ก ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟลาโว-นอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 87.65, 72.36, 53.34, 39.03, 34.85, และ 34.14 มิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดค่อนข้างต่ำได้แก่ พริกไทยดำ ข่า ตะไคร้ กระวาน พริกชี้ฟ้าและเมล็ดผักชี มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 16.63, 16.18, 16.01, 15.21, 14.94 และ 13.16 มิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่มีปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดต่ำได้แก่ ชะเอม พริกไทยขาว หอมแดงและกระเทียม มีค่าเท่ากับ 8.80, 4.45, 4.28 และ 3.39 มิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

เมื่อพิจารณากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจะเห็นได้ว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากกานพลู โรสแมรี่และใบไทม์ มีความสัมพันธ์สอดคล้องกับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด คือสารสกัดจากกานพลูมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดอีกด้วย ตามด้วยสารสกัดจากใบไทม์และโรสแมรี่ ส่วนสารสกัดหยาบชนิดอื่นๆมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสัมพันธ์สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันบ้างเช่นกัน โดยเฉพาะสารสกัดหยาบจากขิง (ลำดับที่ 4) และดอกกระเจี๊ยบแดง (ลำดับที่ 8) ส่วนสารสกัดจากเครื่องเทศชนิดอื่นๆ เช่นสารสกัดจากยี่หร่า ลูกจันทน์ และมะกรูด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในปริมาณที่ค่อนข้างสูง (จัดอยู่ใน 10 อันดับแรก) รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากข่า ตะไคร้และพริกชี้ฟ้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในปริมาณปานกลาง ส่วนสารสกัดหยาบจากพริกไทยดำ เมล็ดผักชี กระวานและชะเอม มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดค่อนข้างต่ำ ขณะที่สารสกัดหยาบจากโป๊ยกั๊ก พริกไทยขาว กระเทียมและหอมแดงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่ต่ำที่สุด

จากการศึกษาสมบัติทางพฤษเคมีและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศทั้ง 21 ชนิด ในการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากกานพลู เป็นสารสกัดหยาบที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากใบไทม์และสารสกัดหยาบจากโรสแมรี่ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของนักวิจัยท่านอื่นอีกหลายๆท่านเช่น รายงานผลการวิจัยของ Wojdylo และคณะ (2007) ที่ได้ทำการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลจำนวน 32 ชนิด พบว่าสารสกัดจากกานพลูซึ่งสกัดด้วยเมทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดค่อนข้างสูงโดยมีค่าเท่ากับ 8.96 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมของสารสกัดแห้ง และในสารสกัดจากโรสแมรี่และสารสกัดจากใบไทม์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 1.71 และ 0.58 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมของสารสกัด ซึ่งมีลักษณะเดียวกันกับงานวิจัยของ Shan และ คณะ (2007) ที่ทำการสกัดเครื่องเทศและสมุนไพรด้วยเมทานอล ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากกานพลูมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงเช่นเดียวกัน โดยมีค่าเท่ากับ 14.4 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมของสารสกัดแห้ง ส่วนสารสกัดจากโรสแมรี่และสารสกัดจากใบไทม์ มีค่าเท่ากับ 5.1 และ 4.5 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมของสารสกัดแห้ง นอกจากนี้ยังมีการรายงานการศึกษาสารสกัดจากกานพลูของ Ivanovic และคณะ (2013) พบว่าสารสกัดจากกานพลูซึ่งสกัดด้วยวิธี Supercritical fluid extraction มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 530.56 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด โดยตรวจพบสารประกอบหลักคือ eugnol ปริมาณมากถึงร้อยละ 64 และพบ eugenyl acetate ร้อยละ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดลองครั้งนี้สารสกัดหยาบจากโรสแมรี่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุด สารสกัดหยาบที่มีสารประกอบฟลาโวนอยด์รองลงมาคือ สารสกัดหยาบกานพลูและสารสกัดหยาบใบไทม์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vallverdú-Queralt และคณะ (2014) ที่ใช้สารสกัดจากเครื่องเทศและสมุนไพร 6 ชนิดที่สกัดด้วยเอทานอล พบว่าสารสกัดจากโรสแมรี่มีปริมาณของสารประกอบโพลีฟีนอลสูงกว่าปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลในใบไทม์ ออริกาโน ยี่หร่าและเบย์ (bay) โดยสารสกัดจากโรสแมรี่มีปริมาณของสารประกอบโพลีฟีนอลเท่ากับ 5.02 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง

จากการทดลองสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดกานพลูมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของนักวิจัยท่านอื่นๆเช่น Wojdylo และคณะ (2007) ได้ทำการทดลองหากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลด้วยวิธี ABTS, DPPH และ FRAP พบว่าสารสกัดหยาบจากกานพลูมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยวิธี ABTS มีค่าเท่ากับ 364 ไมโครโมลของโทรล็อกซ์ต่อ 100 กรัมของสารสกัดแห้ง วิธี DPPH มีค่าเท่ากับ 854 ไมโครโมลของโทรล็อกซ์ต่อ 100 กรัมของสารสกัดแห้ง และวิธี FRAP มีค่าเท่ากับ 2133 ไมโครโมลของโทรล็อกซ์ต่อ 100 กรัมของสารสกัดแห้ง ซึ่งสูงกว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโรสแมรี่ ใบไทม์ ลูกจันทน์และชะเอม นอกจากนี้สารสกัดสารจากเครื่องเทศด้วยเอทานอลกับน้ำในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร พบว่าสารสกัดจากกานพลูมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดโดยค่าเท่ากับ 20.71 ไมโครโมลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมของสารสกัดแห้ง โดยวิธี ABTS นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากขิงและพริกไทยมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระได้เล็กน้อย มีค่า ABTS เท่ากับ 37.4 และ 43.1 ไมโครโมลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมของสารสกัดแห้ง

การที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากกานพลู ใบไทม์และโรสแมรี่ อาจเป็นเพราะสารสกัดเหล่านี้มีสารสำคัญหลายชนิดเป็นองค์ประกอบเช่น gallic acid, caffeic acid, syrinagic acid, coumaric acid, rutin, qucetin และ carnosic acid ประกอบอยู่ และจากงานวิจัยของ Vallverdú-Queralt และคณะ (2014) ได้จำแนกชนิดของเครื่องเทศหลายชนิดที่สกัดด้วย hydroalcoholic solvents พบว่าสารประกอบฟีนอลที่พบในโรสแมรี่และใบไทม์ได้แก่ caffeic acid, chlorogenic acid, ferulie acid, *p*-coumaric acid, *p*-hydroxybenzoic acid, protocatechic acid, rosmarinicacid, syrinigic acid และ quercetin ซึ่งสารประกอบที่พบมากในโรสแมรี่ได้แก่ rosmarinic acid โดยพบปริมาณ 156.90 ไมโครกรัมต่อกรัมของสารสกัดแห้ง caffeic acid พบ 12.58 ไมโครกรัมต่อกรัมของสารสกัดแห้ง และ *p*-hydroxybenzoic acid พบ 15.16 ไมโครกรัมต่อกรัมของสารสกัดแห้ง ส่วนในสารสกัดจากใบไทม์สารที่พบปริมาณมากได้แก่ rosmarinic acid พบ 84.04 ไมโครกรัมต่อกรัมของสารสกัดแห้ง caffeic acid พบ 6.56 ไมโครกรัมต่อกรัมของสารสกัดแห้ง และ *p*-hydroxybenzoic acid พบ 4.38 ไมโครกรัมต่อกรัมของสารสกัดแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 สมบัติทางพฤกษเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	Antioxidant activity			Total Phenolic content	Total Flavonoid content
		DPPH IC_{50} (mg/ml) ± SD	FRAP (mmol Fe (II)/g essential oil) ± SD	ABTS (mg Trolox/g essential oil) ± SD	(mg GAE/g essential oil) ± SD	(mg คาเทชิน/g essential oil) ± SD
Acorus calamus Linn.	ว่านน้ำ	[a] 11.80 ± 0.88	1.19 ± 0.03	42.95 ± 2.06	229.27 ± 3092	5.79 ± 0.83
Alpinia galanga (Linn.) Willd.	ข่า	1.25 ± 0.04	0.38 ± 0.02	184.82 ± 3.88	442.14 ± 5.45	11.86 ± 0.73
Angelica sinensis (Oliv.) Diels.	โกฐเชียง	1.65 ± 0.02	0.26 ± 0.03	94.20 ± 1.70	380.92 ± 4.95	5.60 ± 0.39
Artemisia annua Linn.	โกฐจุฬาลัมพา	2.23 ± 0.03	0.01 ± 0.01	90.72 ± 1.85	480.10 ± 0.35	8.05 ± 0.62
Cinnamomum verum J.Pres.	อบเชย	14.72 ± 2.76	0.08 ± 0.02	33.77 ± 0.90	670.70 ± 2.02	9.87 ± 0.83
Curcuma aromatica Salisb.	ว่านนางคำ	1.68 ± 0.04	0.30 ± 0.03	254.91 ± 2.87	240.00 ± 6.88	96.55 ± 3.06
Homalomena aromatica Schott.	ว่านเต่าเกียด	10.56 ± 5.64	0.07 ± 0.01	44.67 ± 1.03	155.51 ± 6.94	4.24 ± 1.90
Kaempferia galanga Linn.	เปราะหอม	8.15 ± 0.28	0.13 ± 0.01	86.51 ± 3.63	777.96 ± 2.89	2.14 ± 0.19
Syzygium aromaticum (L.) Merr.&Perry.	กานพลู	0.58 ± 0.01	3.69 ± 0.06	998.62 ± 2.90	889.17 ± 4.75	141.91 ± 0.79
กรดแอสคอร์บิก		-	[b] -	994.90 ± 2.21	-	-
α-tocopherol		0.41 ± 0.00	0.15 ± 0.02	-	-	-
BHT		0.39 ± 0.01	-	-	-	-

[a] ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ; [b] ไม่ได้ทำการทดลอง

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศจำนวน 21 ชนิดด้วยวิธีการแพร่บนอาหารวุ้น (Disc diffusion) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution) ผลปรากฏว่าสารสกัดหยาบจากดอกกระเจี๊ยบแดงและใบไทม์มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ทุกชนิดที่ทดสอบ สารสกัดหยาบจากกานพลูมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดรองลงมาโดยมีค่า MIC น้อยกว่า 6.4 หรือเท่ากับ 6.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* มีความไวต่อการถูกยับยั้งจากสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศได้ทุกชนิดที่ทดสอบ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบจากโป๊ยกั๊ก ลูกจันทน์และกานพลู (ค่า MIC เท่ากับ 3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และแบคทีเรียที่มีความไวค่อนข้างมากต่อการถูกยับยั้งโดยสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศคือ *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* มีความไวต่อการถูกยับยั้งโดยสารสกัดหยาบจากลูกจันทน์และโรสแมรี่มากที่สุด สำหรับเชื้อ *Bacillus cereus* มีความไวต่อการถูกยับยั้งโดยสารสกัดหยาบจากลูกจันทน์และโรสแมรี่ได้ดีที่สุด (มีค่า MIC เท่ากับ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

การศึกษาด้านพฤกษเคมีได้แก่ สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ผลปรากฏว่าสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีคือ โรสแมรี่ ใบไทม์และกานพลู ซึ่งมีสมบัติในการกำจัดอนุมูลของ DPPH (มีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 116.40 ถึง 846.19 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัม DPPH) และเป็นสารรีดิวซ์ที่ดีในการทดลองด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay (มีค่าอยู่ในช่วง 2.04 ถึง 3.63 มิลลิโมลของเหล็กเฟอรัสต่อกรัมของสารสกัด) นอกจากนี้เครื่องเทศยังมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูง โดยเฉพาะสารสกัดหยาบจากกานพลู ใบไทม์ โรสแมรี่และมะกรูด มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 496.01, 243.41, 184.88 และ 154.84 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศที่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงได้แก่ สารสกัดหยาบจากโรสแมรี่และกานพลู ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 214.94 และ 209.52 มิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของสารสกัด

จากการทดลองนี้ มีข้อเสนอแนะคือเป็นไปได้ที่จะวิจัยต่อโดยนำสารสกัดจากเครื่องเทศที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์สูง เช่นกานพลู โรสแมรี่และใบไทม์ มาช่วยชะลอการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์เนื้อสดต่างๆ เพื่อช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษา เนื่องจากเครื่องเทศเหล่านี้มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ฐาปนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ. (2550). น้ำมันหอมระเหยและการใช้ในสุคนธบำบัด. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์วิฑูรย์การปก

ไมตรี สุทธจิตต์, ปกฤษฎางค์ แก้วสุริยะ, ศิริวรรณ สุทธจิตต์ และอุดมภัณฑ์ ขาลสุวรรณ. (2545). แอนติออกซิแดนท์และสารสำคัญในพืชสมุนไพรไทย. *วารสารเภสัชศาสตร์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ*. 3, 254-260.

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจง จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพฯ: นิวไทยมิตรการพิมพ์จำกัด.

Aazza, S., Lyoussi, B., & Miguel, M. G. (2011). Antioxidant activity of some Morrocan hydrosols. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (30), 6688-6696.

Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Médicale*, 24, e51-e56.

Almajano, M. P., Carbó, R., Jiménez, J. A. L., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108 (1), 55–63.

Angel, G. R., Menon, N., Vimala, B., & Nambisan, B. (2014). Essential oil composition of eight starchy *Curcuma* species. *Industrial Crops and Products*, 60, 233-238.

Angel, G. R., Vimala, B., & Nambisan, B. (2012). Antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from nine starchy *Curcuma* species. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 4 (2), 45-47.

Angelo, A. J. S. (1996). Lipid oxidation in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 175-224.

Armstrong, J. S., (2006). Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays*, 28 (3), 253–260.

Arques, J. L., Rodriguez, E., Nunez, M., & Medina, M. (2008). Inactivation of Gram-negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. *European Food Research and Technology*, 227 (1), 77–82.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.

Barua, C. C., Talukdar, A., Phukan, B., Hazarika, S., Barua, A. G., & Baishya, G. (2014). Phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activity of ethanolic extract of *Homalomena aromatica* (Araceae) root. *Der Pharmacia Lettre*, 6 (1), 128-138.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bassolé, I. H., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17 (4). 3989-4006.

Bhuiyan, MD. N. I, Begum, J., & Anwar, M. N. (2008). Essential oils of leaves and rhizomes of *Kaempferia galangal* Linn. *The Chittagong University Journal of Biosocial Science*, 3 (1-2), 65-76.

Biliaa, A. R., de Malgalhaes, P. M., Bergonzia, M. C., & Vincieri, F. F. (2006). Simultaneous analysis of artemisinin and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and a selected cultivar. *Phytomedicine*, 13, 487–493.

Bilia, A. R., Santomauro, F., Sacco, C., Bergonzi, M. C., & Donato, R. (2014). Essential oil of *Artemisia annua* L.: An extraordinary component with numerous antimicrobial properties. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1-7.

Bin Jantan, I., Moharam, B. A. K., Santhanam, J., & Jamal, J. A. (2008). Correlation between chemical composition and antifungal activity of the essential oils of eight *Cinnamomum* species. *Pharmaceutical Biology*, 46 (6), 406–412.

Burt, S. A., van der Zee, R., Koets, A. P., de Graaff, A. M., van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H. P., & Veldhuizen, E. J. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (14), 4484–4490.

Burton, G. W., & Traber, M. G. (1990). Vitamin E antioxidant activity biokineties and bioavailability. *Annual Review of Nutrition*, 10, 357-382.

Carson, C. F., Hammer, K. A., & Riley, T. V., (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (1), 50–62.

Carson, C. J. F., & Riley, T. N. (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia. Journal of Applied Bacteriolgy*, 78 (3), 264–269.

Ćavar, S., Maksimović, M., Vidic, D., & Parić, A. (2012). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Industrial Crops and Products*, 37, 479–485.

Cerrutti, P., & Alzamora, S. M. (1996). Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purées. *International Journal of Food Microbiology*, 29 (2-3), 379-386.

Ceylan, E., & Fung, D. Y. C. (2004). Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 12 (1), 1–55.

Chang, S. T., Chen, P. F., & Chang, S. C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology: An Interdisciplinary Journal Devoted to Bioscientific Research on Indigenous Drugs*, 77 (1), 123-127.

Cheng, S. S., Liu, J. Y., Hsui, Y. R., & Chang, S. T. (2006). Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresource Technology*, 97, 306–312.

Collins, C. H., Lyne, P. M., & Grange, J. M. (2001). *Collins and Lyne's Microbiological methods.* New York: Oxford University Press Inc.

Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F., & Oliveira, W. P. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (2), 90-96.

Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (6), 2576-2581.

Dastmalchi, K., Dorman, H. L. D., Laakso, I., & Hiltunun, R. (2007). Chemical composition and antioxidant activity of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 1655-1663.

Davidson, P. M., & Naidu, A. S. (2000). Phytophenols. In A. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems* (pp. 265–295). Boca Raton, Florida: CRC Press.

Devi, S. A., & Ganjewala, D. (2009). Antimicrobial activity of *Acorus calamus* (L.) rhizome and leaf extract. *Acta Biologica Szegediensis*, 53 (1), 45-49.

Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (12), 4863-4870.

Edris, A. E., (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research: PTR*, 21 (4), 308–323.

Filtenborg, O., Frisvad, J. C., & Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *Food Microbiology*, 33, 85-102.

Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: Is citrus the answer?. *Trends in Food Science and Technology*, 19 (3), 156-164.

Frankel, E. N., Bosanek,C. A., Meyer, A. S., Silliman, K., & Kirk, L. L. (1998). Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (3), 834-838.

Frankel, E. N. (1984). Lipid oxidation: mechanisms, products and biological

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

significance. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61, 1908-1917.

Gayoso, C.W., Lima, E. O., Oliveira, V. T., Pereira, F. O., Souza, E. L., Lima, I. O., & Navarro, D. F. (2005). Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia cariophyllata* essential oil and eugenol. *Fitoterapia*, 76, 247– 249.

Ghani, A. (2003). *Medicinal Plants of Bangladesh with chemical constituentsand uses*. (2th ed.) Nimtali, Dhaka: Asiatic Society of Bangladesh. (Chapter 4).

Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*116 (4), 982-989.

Gordon, M. H. (2001). The development of oxidative rancidity in foods. In J. Porkorný, N. Yanishlieva, & M. Gordon (Eds.), *Antioxidants in food: practical aoolication* (pp. 7-21). New York: CRC Press.

Gouveia, S. C., & Castilho, P. C. (2013). *Artemisia annua* L.: Essential oil and acetone extract composition and antioxidant capacity. *Industrial Crops and Products*, 45, 170–181.

Graumann, G. H., & Holley, R. A. (2008). Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 in ripening dry fermented sausage by ground yellow mustard. *Journal of Food Protection*, 71 (3), 486-493.

Grosso, C., Ferraro, V., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Coelho, J. A., & Palavra, A. M. (2008). Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds. *Food Chemistry*, 111 (1), 197-203.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology* , 124 (1). 91-97.

Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (1999) . Antioxidant protection and oxygen radical sighaling. In D. L. Gilbert, & C. A. Colton (Eds.), *Reactive oxygen species in biological; An interdisciplinary approach* (pp. 189-220). New York; Kiumer Academic/Plenum.

Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2004). Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans, Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53 (6), 1081–1085.

Hector R., J., & Simon, J. E. (2004). Malagasy aromatic plants: essential oils, antioxidant and antimicrobial activities. *Acta Horticulturae*, 629, 77-81.

Howell, N. K. & Saeed, S. (1999). The effect of antioxidants on the production of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lipid oxidation products and transfer of free radicals in oxidised lipid-protein systems. In T. K. Basu, N. J. Temple, & M. L. Garg (Eds.), *Antioxidants in Human Health and Disease* (pp. 43-54). CAB International, Oxford: UK.

Kathirvel, A., & Sujatha, V. (2012). In vitro assessment of antioxidant and antibacterial properties of *Terminalia chebula* Retz. leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 788-795.

Kim, T. J., Weng, W. L., Stojanovic, J., Lu, Y., Jung, Y. S., & Silva, J. L. (2008). Antimicrobial effect of water-soluble muscadine seed extracts on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 71 (7), 1465-1468.

Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B., & Kanner, J. (1993). Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, 47, 85-89.

Kochuthressia, K. P., Britto, S. J., Jaseentha, M. O., & Raphael, R. (2012). In vitro antimicrobial evaluation of *Kaempferia galangal* L. rhizome extract. *American Journal Bioteohnology and Molecular Sciences*,2 (1), 1-5.

Kurtzman, C. P., & James, S. A. (2006). *Zygosaccharomyces* and related genera. In C. de W. Blackborn (Ed.), *Food spoilage microorganisms* (pp. 290-292). New York: CRC Press.

Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology*. New York, USA: Science+Business Media, Inc. (Chapter 6).

Lado, C.,Then, M., Varga, I., Szőke, É., & Szentmihályi, K. (2004). Antioxidant property of volatile oils determined by the ferric reducing ability. *Zeitschrift fuer Naturforschung. Section C, Biosciences*, 59 (5-6), 354-358.

Lambert, R. J,, Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* , 91 (3), 453-462.

Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E., & Gardin, F. (2004). Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science and Technology*, 15 (3–4), 201–208.

Lao, S. C., Li, S. P., Kan, K. K. W., Li, P., Wan, J. B., Wang, Y. T., Dong, T. T. X., & Tsim, K. W. K. (2004). Identification and quantification of 13 components in *Angelica sinensis* (Danggui) by gas chromatography–mass spectrometry coupled with pressurized liquid extraction. *Analytica Chimica Acta*, 526, 131–137.

Lee, J. Y., Yun, B. S., & Hwang, B. K. (2004). Antifungal activity of beta-asarone from

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

rhizomes of *Acorusgramineus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (4), 776–780.

Li, S. -Y., Yu, Y., & Li, S. -P. (2007). Identification of antioxidants in essential oil of radix *Angelicae sinensis* using HPLC coupled with DAD-MS and ABTS-based assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (9), 3358-3362.

López, P., Sánchez, C., Batlle, R., & Nerín, C. (2005). Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (17), 6939-6946.

Magiatis, P., Melliou, E., Skattsounis, A. L., Chinou, I., & Mitaku, S. (1999). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus*var chia. *Planta Medica*, 65 (8), 749-52.

Mahae, N., & Chaiseri, S. (2009). Antioxidant Activities and antioxidative components in extracts of *Alpinia galangal* (L.) Sw. *Kasetsart Journal: (Natural Science)*, 43, 358-369.

Majhenič, L., Škerget, M., & Knez, Ž. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104 (3), 1258-1268.

Ma, Q., Fan, X. -D., Liu, X. -C., Qiu, T. -Q., & Jiang, J. -G. (2015). Ultrasound-enhanced subcritical water extraction of essential oils from *Kaempferia galangal* L. and their comparative antioxidant activities. *Separation and Purification Technology*, 150, 73-79.

Matan, N., & Matan, N. (2007). Effect of combined cinnamon and clove oil against major moulds identified from rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *Walailak Journal of Science and Technology*, 4 (2), 165-174.

Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A. J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., & Parker, M. (2006). Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 180–185.

Montville, T. J., & Matthews, K. (2005). *Food microbiology an introduction*. Washington, DC, USA: ASM Press, (Chapter 19).

Naidu, A. S. (2000). Overview. In A. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems* (pp. 1-16). Boca Raton, Florida: CRC Press.

Nakai, V. K., Rocha, L. de O., Gonçalez, E., Fonseca, H., Ortega, E. M. M., & Corrêa B. (2008). Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. *Food Chemistry*, 106 (1), 285–290.

Nanasombat, S., & Wimuttigosol, P. (2011). Antimicrobial and antioxidant activity of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

spice essential oils. *Food Science and Biotechnology*, 20 (1), 45-53.

Noguchi, N., Komuro, E., Niki, E., & Wilson, R. L. (1994). Action of curcumin as an antioxidant against lipid peroxidation. *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, 43, 1045-1051.

Oussalah, M., Caillet, S., & Lacroix, M., (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69 (5), 1046–1055.

Pasqua, R. D., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., & Mauriello, G., (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (12), 4863–4870.

Pekmezovic, M., Rajkovic, K., Barac, A., Senerović, L., & Arsic Arsenijevic, V. (2015). Development of kinetic model for testing antifungal effect of *Thymus vulgaris* L. and *Cinnamomum cassia* L. essential oils on *Aspergillus flavus* spores and application for optimization of synergistic effect. *Biochemical Engineering Journal*, 99, 131-137.

Phongpaichit, S., Pujenjob, N., Rukachaisirikul, V., & Ongsakul, M. (2005). Antimicrobial activities of the crude methanol extract of *Acorus calamus* Linn. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27 (Suppl. 2), 517-523.

Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida, Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 1454-1462.

Pokorný, J., (2001). The use of natural antioxidants in food products of plant origin. In J. Pokorný, N. Yanishlieva, & M. Gordon (Eds.), *Antioxidants in food: practical applications* (pp. 355-372). New York: CRC Press.

Politeo, O., Jukić, M, & Miloš, M. (2006). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants. *Croatica Chemica Acta*, 79 (4), 545-552.

Polle, A., & Rennenberg, H. (1993). Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress. In L. Fowden, & T. Mansfield (Eds.), *Plant adaptation to environmental stress* (pp. 263-273). London: Chapman & Hall.

Proestos, C., Boziaris, I., Kapsokefalou, S. M., & Komaitis, M. (2008). Natural antioxidant constituents from selected aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms. *Food Technology and Biotechnology*, 46 (2), 151–156.

Puerta, T. (1999). Inhibition of leukocytes lipoxygenase by phenolics from virgin olive

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

oil. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 57, 445-449.

Raina, A. P., Verma, S. K., & Abraham, Z. (2014). Volatile constituents of essential oils isolated from *Alpinia galanga* Willd. (L.) and *A. officinarum* Hance rhizomes from North East India. *Journal of Essential Oil Research,* 26 (1), 24-28.

Raina, V. K., Srivastava, S. K., & Syamasunder, K. V. (2003). Essential oil composition of *Acorus calamus* L. from the lower region of the Himalayas. *Flavour and Fragrance Journal*, 18 (1), 18-20.

Rajput, S. B., & Karuppayil, S. N. (2013). β-Asarone, an active principle of *Acorus calamus* rhizome, inhibits morphogenesis, biofilm formation and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Phytomedicine*, 20, 139–142.

Rana, I. S., Rana, A. S., & Rajak, R. C. (2011). Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1269-1277.

Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., & Rao, R., (2010). Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (12), 5062–5069.

Razafimamonjison, G., Jahiel, M., Duclos, T., Ramanoelina, P., Fawbush, F., & Danthu, P. (2014). Bud, leaf and stem essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from Madagascar, Indonesia and Zanzibar. *International Journal of Basic and Applied Sciences,* 3 (3), 224-233.

Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Rezaee, M. B., Jaimand, K., Alinezhad, S., Saberi, R., & Yoshinari, T. (2009). Chemical composition and antiaflatoxigenic activity of *Carumcarvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control*, 20 (11), 1018-1024.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., pannala, A., yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.

Rosato, A., Vitali, C., Laurentis, N. D., Armenise, D., & Milillo, M. A. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*, 14, 727-732.

Saad, N. Y., Muller, C. D., & Lobstein, A., (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28 (5), 269-279.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., & Özer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15 (7), 549-557.

Sahoo, S., Parida, R., Singh, S., Padhy, R. N. & Nayak, S. (2014). Evaluation of yield, quality and antioxidant activity of essential oil of *in vitro* propagated *Kaempferia galanga*Linn. *Journal of Acute Disease*, 3 (2), 124-130.

Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escria, A., & Saura-Calixto.J. (2000). Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Research*, 20, 941-953.

Santoro, G. F., Cardoso, M. G., Guimarães, L. G. L., Mendonça, L. Z., & Soares, M. J. (2007). *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Experimental Parasitology*, 116, 283–290.

Senthilkumar, A., & Venkatesalu, V. (2012). Larvicidal potential of *Acorus calamus* L. essential oil against filarial vector mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2 (4), 324-326.

Shah, H. U., Simpson, T. J., Alam, S., Khattak, K .F., & Perveen, S. (2010). Mould incidence and mycotoxin contamination in maize kernels from Swat Valley, North West Frontier Province of Pakistan. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (4), 1111–1116.

Shahidi, F., & Wannasundara, P. K. J. P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67-103.

Shukla, R., Singh, P., Prakash, B., & Dubey, N. K. (2013). Efficacy of *Acorus calamus* L. essential oil as a safe plant-based antioxidant, Aflatoxin B_1 suppressor and broad spectrum antimicrobial against food-infesting fungi. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 128-135.

Sies, H., Stahl, W. & Sundquist, A. (1992). Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of sciences*, 368, 7-19.

Silva, F. G., Oliveira, C. B. A., Pinto, J. E. B. P., Nascimento, V. E., Santos, S. C., Seraphin, J. C., & Ferri, P. H. (2007). Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 18 (5), 990–997.

Simić, A., Soković, M. D., Ristić, M., Grujić-Jovanović, S., Vukojević, J., & Marin, P. D. (2004). The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*, 18, 713–717.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Singh, G., Kapoor, I. P. S., Singh, O. P., Rao, Y. R., Leclerccq, P. A., & Klinkby, N. (2000). Studies on essential oils, Part 28: chemical composition, antifungal and insecticidal activities of rhizome volatile oil of *Homalomena aromatica* Schott. *Flavour and Fragrance Journal*, 15, 278-280.

Singh, G., Kapoor, I. P., Singh, P., De Heluani, C. S., De Lampasona, M. P., & Catalan, C. A. (2008). Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (10), 3295-3302.

Singh, G., Maurya, S., deLampasona, M. P., & Catalan, C. A. N. (2007). A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1650–1661.

Singh, R., & Lawrence, R. (2015). Antioxidant activity of *Syzigium aromaticum, Zingiber officinaleand Cinnamomum zeylanicum* essential oils. *International Journal of Biological and Pharmaceutical Research*, 6 (2), 161-165.

Sivakumar, D., Wijeratnam, R. S. W., Wijesundera, R. L. C., & Abeyesekere, M. (2002). Control of postharvest diseases of rambutan using cinnamaldehyde. *Crop Protection*, 21 (9), 847-852.

Skocibusic, M., Bezic, N., & Dunkic, V. (2006). Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chemistry*, 96 (1), 20–28.

Soliman, K. M., & Badeaa, R. I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1669–1675.

Soylu, E. M., Soylu, S., & Kurt, S., (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*, 161 (2), 119–128.

Sukatta, U., Haruthaithanasan, V., Chantarapanont, W., Dilokkunanant, U., & Suppakul, P. (2008). Antifungal activity of clove and cinnamon oil and their synergistic against postharvest decay fungi of grape *in vitro*. *Kasetsart Journal : Natural Science*, 42, 169 – 174.

Tachakittirungrod, S., & Chowwanapoonpohn, S. (2007). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from *Hyptis suaveolens* and *Alpinia galangal* growing in northern thailand. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, 6 (1), 31-42.

Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199–1218.

Tewtrakul, S., Yuenyongsawad, S., Kummee, S., & Atsawajaruwan, L. (2005). Chemical

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

components and biological activities of volatile oil of *Kaempferia galangal* Linn. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27 (Suppl. 2), 503-507.

Tolonen, M., Rajaniemi, S., Pihlava, J. M., Johansson, T., Saris, P. E. J., & Ryhänen, E. L. (2004). Formation of nisin, plant-derived biomolecules and antimicrobial activity in starter culture fermentations of sauerkraut. *Food Microbiology*, 21 (2), 167-179.

Tripathi, P., Dubey, N. K., & Shukla, A. K. (2008). Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (1), 39-46.

Tsai, S. -Y., Huang, S. -J., Chyau, C. -C., Tsai, C. -H., Weng, C. -C., & Mau, J. -L. (2011). Composition and antioxidant properties of essential oils from *Curcuma* rhizome. *Asian Journal of Arts and Sciences*, 2 (1), 57-66.

Valacchi, G., Pagnin, E., Corbacho, A. M., Olano, E., Davis, P. A., Packer, L., & Cross, C. E. (2004). In vivo ozone exposure induces antioxidant stress-related responses in murine lung and skin. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 673-681.

Valero, D., Valverde, J. M., Martínez-Romero, D.,Guillén, F., Castillo, S., & Serrano, M. (2006). The combination of modified atmosphere packaging with eugenol or thymol to maintain quality, safety and functional properties of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 41 (3), 317-327.

Veluri, R., Weir, T. L., Bais, H. P., Stermitz, F. R., & Vivanco, J. M. (2004). Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (5), 1077–1082.

Vichitphan, S., Vichitphan, K. & Sirikhansaeng, P. (2007). Flavonoid content and antioxidant activity of Krachai-dun (*Kaempferia parviflora*) wine. *KMITL Science and Technology journal*, 7, 97–105.

Wei, A., & Shibamoto, T. (2010). Medicinal activities of essential oil oils: Ade in disease prevention. In R. R. Watson, & V. R. Preedy (Eds.), *Bioactive foods in promoting health; fruits and vegetable* (pp. 59-70). New York; Elsevier Inc.

Wu, Y., Wang, Y., Li, Z. -H., Wang, C. -F., Wei, J. -Y., Li, X. -L., Wang, P. -J., Zhou, Z. -F., Du, S. -S., Huang, D . -Y., & Deng, Z. -W. (2014). Composition of the essential oil from *Alpinia galangal* rhizomes and its bioactivity on *Lasioderma serricorne*. *Bulletin of Insectology*, 62 (2), 247-254.

Xing, Y., Xu, Q., Li, X., Che, Z., & Yun, J. (2012). Antifungal activities of clove oil against

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rhizopus nigricans, Aspergillus flavus and *Penicillium citrinum in vitro* and in wounded fruit test. *Journal of Food Safety,* 32, 84-93.

Yoshida, H., Katsuzaki, H., Ohta, R., Ishikawa, K., Fukuda, H., Fujino, T., & Suzuki, A. (1999). Antimicrobial activity of the thiosulfinates isolated from oil-macerated garlic extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63 (3), 591-594.

Yousef, S. A. A. (2014). Essential oils: their antimicrobial activity and potential application against pathogens by gaseous contact - a review. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences G. Microbiology*, 6 (1), 37-54.

Zaeoung, S., Plubrukarn, A., & Keawpradub, N. (2005). Cytotoxic and free radical scavenging activities of Zingiberaceous rhizomes. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27 (4), 799-812.

Zhang, X. (2003). *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 2.* Geneva: World Health Organization, (Chapter 2).

Znini, M., Cristofari, G., Majidi, L., Paolini, J., Desjobert, J. M., & Costa, J. (2013). Essential oil composition and antifungal activity of *Pulicaria mauritanica* Coss., against postharvest phytopathogenic fungi in apples. LWT-Food Science and Technology, 54 (2), 564-569

Zore, G. B., Thakre, A. D., Jadhav, S., & Karuppayil, S. M., (2011). Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*, 18 (13), 1181–1190.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T149357

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้