ผลของน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *ASPERGILLUS FLAVUS* IMI 242684

INHIBITORY EFFECT OF FIVE ESSENTIAL OILS ON THE GROWTH OF *ASPERGILLUS FLAVUS* IMI 242684

ปวริศา ประสูตร์แสงจันทร์
สุภาพร แป้นเจริญ
อัญชิสา มวยหมั่น

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

ผลของน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *ASPERGILLUS FLAVUS* IMI 242684

INHIBITORY EFFECT OF FIVE ESSENTIAL OILS ON THE GROWTH OF *ASPERGILLUS FLAVUS* IMI 242684

ปวริศา ประสูตร์แสงจันทร์
สุภาพร แป้นเจริญ
อัญชิสา มวยหมั่น

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

INHIBITORY EFFECT OF FIVE ESSENTIAL OILS ON THE GROWTH OF *ASPERGILLUS FLAVUS* IMI 242684

Pawarisa Prasutsaengchan
Supaporn Paencharoan
Anchisa Muayman

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลของน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 Inhibitory Effect of Five Essential Oils on the Growth of *Aspergillus flavus* IMI 242684
ชื่อนักศึกษา	นางสาวปวริศา ประสูตร์แสงจันทร์ นางสาวสุภาพร แป้นเจริญ นางสาวอัญชิสา มวยหมั่น
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.เยาวพา สุวัตถิ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	**ลายมือชื่อ**
ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์ ประธานกรรมการ	
รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	
ดร.เยาวพา สุวัตถิ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ผลของน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684
ชื่อนักศึกษา นางสาวปวริศา ประสูตร์แสงจันทร์
นางสาวสุภาพร แป้นเจริญ
นางสาวอัญชิสา มวยหมั่น
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.เยาวพา สุวัตถิ

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิด ได้แก่ กานพลู กระถิ่นหอม ขิง มะกรูด และลูกจันทน์เทศ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ซึ่งเป็นเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในพืชผลทางการเกษตร ด้วยวิธี Disc diffusion และหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ร้อยละ 50 (MIC_{50}) และค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อรา (MIC) ด้วยวิธี 96-well tissue culture plate พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระถิ่นหอมและกานพลูมีค่า MIC_{50} เท่ากับ 91.19 และ 76.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า MIC เท่ากับ >100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับน้ำมันหอมระเหยขิง ลูกจันทร์เทศ และมะกรูดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ได้

คำสำคัญ : กานพลู กระถิ่นหอม ขิง มะกรูด ลูกจันทน์เทศ *Aspergillus flavus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Inhibitory Effect of Five Essential Oils on the Growth of *Aspergillus flavus* IMI 242684
Students	Miss Pawarisa Prasutsaengchan
	Miss Supaporn Panjarern
	Miss Anchisa Muaymhan
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Dusanee Thanaboripat
Co - Advisor	Dr. Yaowapa Suvathi

ABSTRACT

The inhibitory effect of five essential oils, i.e. cloves, cinnamon, ginger, kaffir lime and nutmeg, on the growth of *Aspergillus flavus* IMI 242684, aflatoxin producing fungus which contaminated in agricultural crops was studied using Disc diffusion Method. The lowest concentration of essential oil inhibiting fungal growth at 50 percent (MIC50) and the lowest concentration that can inhibit the fungus (MIC) were examined by 96-well tissue culture plate. It was found that clove and cinnamon essential oils showed the inhibitory effect on fungal growth of *A. flavus* IMI 242684 by 50% (MIC50) at 91.19 and 76.41 mg/ml, respectively and the minimum concentration that can inhibit the fungus (MIC) was > 100 mg/ml. The essential oils of ginger, kaffir lime and nutmeg did not inhibit the growth of *A. flavus* IMI 242684.

Keywords : Clove, Nutmeg, Ginger, Kaffir lime, Cinnamon, *Aspergillus flavus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 โดยในการจัดทำโครงงานนี้ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ดร.เยาวพา สุวัตถิ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางการทดลอง และช่วยแก้ไขข้อบกพร่องที่เกิดจากการทดลอง ตลอดจนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงผ่านไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชรวัลย์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะแนวทางในการปฏิบัติงาน ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของโครงงาน

ขอขอบพระคุณอาจารย์สุจิตรา สุคนธมัต ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำทางด้านการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความกรุณาถ่ายทอดวิชาความรู้และประสบการณ์ต่าง ๆ เพื่อประยุกต์ใช้ในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่องค์การเภสัชกรรมทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

ขอขอบพระคุณนายศักรินทร์ บุญล้ำ นางสาวณัฐพร มานะประดิษฐ์และนางสาวปรมาภรณ์ ประสูตร์แสงจันทร์ ที่ให้คำปรึกษา แนะแนวทางในการปฏิบัติ และอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำการทดลอง

ท้ายสุดนี้ ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนและส่งเสริมการศึกษาจนสำเร็จลุล่วง ตลอดจนผู้ที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ที่ได้มีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

หากโครงงานพิเศษฉบับนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่อง คณะผู้จัดทำขออ้อมรับไว้ทั้งหมด และหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจ หรือผู้ที่ต้องการจะศึกษาเกี่ยวกับโครงงานพิเศษฉบับนี้

ปวริศา ประสูตร์แสงจันทร์
สุภาพร แป้นเจริญ
อัญชิสา มวยหมั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	1
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 สมุนไพร	3
2.2 น้ำมันหอมระเหย	4
2.3 อะฟลาทอกซิน	4
2.4 วิธีทดสอบการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Agar diffusion	5
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	9
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	9
3.2 น้ำมันหอมระเหย	9
3.3 สารเคมี	9
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ	9
3.5 เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง	9
3.6 วิธีการทดลอง	10
3.6.1 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684	10
3.6.2 การทดสอบอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรเพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ด้วยวิธี Disc diffusion โดยใช้ paper disc	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

3.6.3 การทดสอบอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรเพื่อหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ด้วยวิธี Microdilution proceder โดยใช้ 96-well tissue culture plate	12
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ	13
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	14
4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ด้วยวิธี Disc diffusion โดยใช้ paper disc	14
4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและกระถิ่นหอมที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ด้วยวิธี Microdilution proceder โดยใช้ 96-well tissue culture plate	17
4.3 วิจารณ์ผลการทดลอง	20
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	22
เอกสารอ้างอิง	23
ภาคผนวก	27
ภาคผนวก ก	28
ภาคผนวก ข	34
ภาคผนวก ค ตารางผลการวิจัย	49
ภาคผนวก ง ผลการทดลอง	52
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	55
ภาคผนวก ฉ สมุนไพร	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 4.1 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และสารต้านเชื้อรา ทดสอบด้วยวิธี disc diffusion บ่มนาน 3 วัน และ 7 วัน 15

ตารางที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และสารต้านเชื้อราด้วยวิธี disc diffusion ที่บ่มเป็นระยะเวลา 3 และ 7 วัน 16

ตารางที่ 4.3 ร้อยละการยับยั้งของกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole ที่มีต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* บ่มนาน 3 วัน 18

ตารางที่ 4.4 ค่าความเข้มข้นของกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole ที่ยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus* ได้ร้อยละ 50 (MIC_{50}) 19

ตารางที่ 4.5 ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole โดยวิธี broth microdilution 19

ตารางผนวกที่ ก-1 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด และสารต้านเชื้อราที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบโดยวิธี disc diffusion บ่มนาน 3 วัน 32

ตารางผนวกที่ ก-2 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด และสารต้านเชื้อราที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบโดยวิธี disc diffusion บ่มนาน 7 วัน 33

ตารางผนวกที่ ข-1 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ในการทดสอบค่า MIC ของกานพลู กระถิ่นหอม และ Clotrimazole โดยวิธี broth mcrodilution เมื่อบ่มนาน 3 วัน (ซ้ำที่ 1) 46

ตารางผนวกที่ ข-2 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ในการทดสอบค่า MIC ของกานพลู กระถิ่นหอม และ Clotrimazole โดยวิธี broth mcrodilution เมื่อบ่มนาน 3 วัน (ซ้ำที่ 2) 47

ตารางผนวกที่ ข-3 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ในการทดสอบค่า MIC ของกานพลู กระถิ่นหอม และ Clotrimazole โดยวิธี broth mcrodilution เมื่อบ่มนาน 3 วัน (ซ้ำที่ 3) 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ ค-1 ร้อยละการยับยั้งของกานพลู กระถิ่นหอม และ Clotrimazole ที่มีต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 เมื่อบ่มนาน 3 วัน (ทดสอบวิธี broth microdilution) 49

ตารางผนวกที่ ค-2 ค่าความเข้มข้นของกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole ที่ยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus* IMI 242684 ได้ร้อยละ 50 (MIC_{50}) เมื่อบ่มนาน 3 วัน (ทดสอบวิธี broth microdilution) 50

ตารางผนวกที่ ค-3 ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole โดยวิธี broth microdilution method (Espinel-Ingroff *et al.*, 2002) 50

ตารางผนวกที่ จ-1 ตารางการวิเคราะห์ความแปรปรวน ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* ของน้ำมันหอมระเหย ขิง กานพลู กระถิ่นหอม มะกรูด ลูกจันทน์เทศ บ่มนาน 72 และ 168 ชั่วโมง (disc diffusion) 56

ตารางผนวกที่ จ-2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด และสารต้านเชื้อรา ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มนาน 3 วัน และ 7 วัน ทดสอบด้วยวิธี disc diffusion 58

ตารางผนวกที่ จ-3 ตารางการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน ร้อยละการยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole ที่มีต่อเชื้อรา *Aspergillus* บ่มนาน 3 วัน 59

ตารางผนวกที่ จ-4 การเปรียบทียบร้อยละการยับยั้งของกานพลู กระถิ่นหอม และ Clotrimazole ที่มีต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 เมื่อบ่มนาน 3 วัน 61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
3.1 แผนผังการวางแผ่นดิสก์	11
4.1 ก. การเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในจานเพาะเชื้อ	14
ข. บริเวณยับยั้ง (clear zone) ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684	14
ข-1 แผนภาพจำนวนช่องบนฮีมาไซโตมิเตอร์ ที่ใช้นับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus*	36
ข-2 การเจือจางน้ำมันหอมระเหยกานพลูและกระถิ่นหอม แบบ Two-fold dilution	38
ข-3 การเจือจางสารต้านเชื้อรา Clotrimazole	40
ข-4 แผนผังการทดสอบค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole โดยวิธี Broth microdilution	41
ข-5 ตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร	42
ข-6 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ในการทดสอบค่า MIC ของกานพลู กระถิ่นหอม และ Clotrimazole โดยวิธี broth mcrodilution ซ้ำที่ 1 (รูปบน) และ ซ้ำที่ 2 (รูปล่าง)	44
ข-7 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ในการทดสอบค่า MIC ของกานพลู กระถิ่นหอม และ Clotrimazole โดยวิธี broth mcrodilution ซ้ำที่ 3	45
ง-1 บริเวณยับยั้ง (clear zone) ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 จากสารสกัดน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 3 วัน	52
ง-2 บริเวณยับยั้ง (clear zone) ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 จากสารสกัดน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน	53
ง-3 รูปแสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ที่ระยะเวลา 3 วัน โดยวัดความขุ่น – ใสด้วยตาเปล่าและวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร	54
ฉ-1 กานพลู	62
ฉ-2 กระถิ่นหอม	63
ฉ-3 ขิง	64
ฉ-4 มะกรูด	65
ฉ-5 ลูกจันทน์เทศ	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีความอุดมสมบูรณ์ทั้งแหล่งปลูก ความหลากหลายของพันธุ์พืช และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการเพาะปลูก และหลังการเก็บเกี่ยวที่อาจส่งผลกระทบต่อความสูญเสียของผลผลิตทั้งด้านปริมาณ และคุณภาพ ซึ่งความสูญเสียมีสาเหตุหลักมาจากการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ โดยเชื้อ *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* เป็นกลุ่มเชื้อราที่ศึกษากันอย่างแพร่หลายมากที่สุด อันเป็นผลมาจากความสามารถในการผลิต สารพิษอะฟลาทอกซิน ซึ่งเป็นกลุ่มของสารเคมีที่เป็นพิษและเป็นสารก่อมะเร็ง โดยในการศึกษาพบว่า aflatoxin B1 (AFB1) เป็นสารพิษที่พบมากที่สุดและมีศักยภาพมากที่สุดที่เป็นสาเหตุในการเกิดโรคในพืชทางการเกษตรและส่งผลให้ไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Lahouar *et al.*, 2016)

น้ำมันหอมระเหยมีบทบาทต่อมนุษย์ในหลายรูปแบบ น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากส่วนที่มีกลิ่นหอมของพืช ไม่ว่าจะเป็นดอก ผล ใบ ราก หรือเนื้อไม้ มีการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย เช่นการผลิตน้ำหอม เครื่องสำอาง ทางเภสัชกรรม ทางการเกษตร ในการศึกษาครั้งนี้จึงเล็งเห็นการพัฒนาแนวทางการใช้ประโยชน์จากน้ำมันหอมระเหยใหม่ๆในการควบคุมโรคพืชจัดว่ามีความสำคัญเพิ่มมากขึ้น เช่นน้ำมันหอมจาก *Mentha xpiperita* L. และพืชหลายชนิดในสกุล *Cymbopogon* spp. มีการนำมาทดสอบในการควบคุมและทำลายเชื้อรา *Helminthosporium oryzae* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดทำความเสียหายรุนแรงในพืชทางการเกษตร (พีรศักดิ์และคณะ, 2544) และในปัจจุบันพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดถูกนำมาใช้เป็นทั้งอาหารและยารักษาโรค และบางชนิดนำมาใช้ในการควบคุมศัตรูพืชเพื่อลดการใช้สารเคมี และคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภค นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการนำพืชสมุนไพรพื้นบ้านมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* เพื่อนำไปใช้ในการลดการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตรได้อย่างปลอดภัยอีกด้วย (อาภากร, 2554) ในการทดลองนี้จึงให้ความสนใจน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิดคือ กานพลู กระถิ่นหอม ขิง มะกรูด และลูกจันทน์เทศ ในการศึกษาหาประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ที่เป็นปัญหาสำคัญในทางเกษตรกรรม

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อเปรียบเทียบผลของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร 5 ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684

2. เพื่อศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพร 5 ชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิด ได้แก่ กานพลู กระถิ่นหอม ขิง มะกรูด และลูกจันทร์เทศ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 รวมทั้งหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684

2.ทราบถึงระดับความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684

3. เป็นแนวทางในการนำน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไปใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในพืชผลทางการเกษตรต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สมุนไพร

สมุนไพร หมายถึงยาที่ได้จากส่วนของพืช สัตว์ หรือแร่ที่ยังมิได้มีการผสมปรุงหรือแปรสภาพ เช่น พืชที่ยังเป็นส่วนของราก ต้น ใบ ดอก ผล ซึ่งยังไม่ได้หั่น บด หรือสกัดสารที่สำคัญออกไป การใช้ยาสมุนไพรมีข้อดีหลายประการ เช่น ปลอดภัย ประหยัด เหมาะสำหรับผู้ที่อยู่ห่างไกลแพทย์ ช่วยแก้ปัญหาการขาดแคลนยา สำหรับข้อเสียของการใช้ยาสมุนไพร คือ ใช้ไม่สะดวก ฤทธิ์ไม่แน่นอน เนื่องจากสมุนไพรให้ประโยชน์ทั้งทางตรงและทางอ้อม ดังนั้นประเทศไทยจึงมีการนำสมุนไพรมาใช้ในการพัฒนาประเทศ โดยกระทรวงสาธารณสุขได้ดำเนินโครงการสมุนไพรกับสาธาราณสุขมูลฐานและเน้นการนำสมุนไพรมาใช้ในสถานบริการสาธาราณสุขของรัฐและในชุมชน สมุนไพรที่โครงการแนะนำให้ชาวบ้านปลูกขึ้นใช้ในหมู่บ้านเพื่อรักษาอาการโรคพื้นๆ ได้แก่ การใช้ขมิ้นชันแก้ท้องอืดท้องเฟ้อ การใช้มะนาวแก้เจ็บคอ การใช้ไพลแก้เคล็ดขัดยอก และการใช้พลูแก้แพ้ผื่นคัน (วันดี, 2539)

พืชสมุนไพรแต่ละชนิดมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางยาแตกต่างกัน โดยสารเคมีที่มีอยู่ในเซลล์หรือในเนื้อเยื่อพืชทุกชนิดเป็นผลมาจากการสังเคราะห์แสงของพืชทั้งสิ้น พืชสมุนไพรบางชนิดใช้เป็นเครื่องเทศด้วย เช่น กระเทียม ขมิ้นและกระชาย สารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางยาของพืชสมุนไพรเป็นสารเคมีที่มีผลต่อสรีรวิทยาของร่างกาย (รุ่งรัตน์, 2550) ได้แก่

1. Alkaloid เป็นสารที่มีรสขม มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ มีคุณสมบัติเป็นด่างเมื่อยู่ในรูปของเกลือ ละลายน้ำได้ แต่ถ้าอยู่ในรูปของด่างจะละลายในตัวทำละลาย

2. Glycoside เป็นสารประกอบซึ่งมี 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นน้ำตาล และส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล การมีน้ำตาลมาเกาะทำให้สารนั้นสามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น ส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลเป็นสารพวกอินทรีย์เคมี ซึ่งมีสูตรโครงสร้างและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาแตกต่างกันออกไป

3. น้ำมันหอมระเหย (Essential oil) เป็นสารที่มีอยู่ในพืช โดยทั่วไปมีกลิ่นหอม เป็นส่วนผสมของสารเคมีหลายชนิดประเภท terpene มีฤทธิ์ขับลม ใช้ปรุงแต่งกลิ่นยา ใช้เป็นน้ำหอม น้ำมันหอมระเหยบางชนิดมีคุณสมบัติฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

4. แทนนิน (Tannin) เป็นสารประกอบที่พบในพืชทั่วไป มีรสฝาด มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน สามารถตกตะกอนโปรตีน เมื่อผสมกับเกลือคลอไรด์ของเหล็กจะให้สีเขียว ใช้บรรเทาอาการท้องร่วง และมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วย

5. Gum เป็นของเหนียวที่พบในพืชบางชนิด จะพบเมื่อเวลากรีดพืชหรือทำให้พืชนั้นเป็นแผล ซึ่ง Gum บางชนิดใช้เป็นยาได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การพัฒนาการใช้สมุนไพร (รุ่งรัตน์, 2550)

1. ต้องให้ความรู้อย่างถูกต้อง
2. คัดเลือกสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพ ปลอดภัยและหาง่าย
3. รัฐและเอกชนต้องร่วมมือกันส่งเสริมพัฒนาสมุนไพรกันอย่างจริงจัง

2.2 น้ำมันหอมระเหย

2.2.1 ความหมายของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย (essential oil) เป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นและเก็บสะสมไว้ในผนังเซลล์ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น กลีบดอก ผล เปลือก เมล็ด ใบ เนื้อไม้และเปลือกไม้ ราก ลำต้นใต้ดิน และยาง น้ำมันหอมระเหยนี้มีคุณสมบัติระเหยได้ที่อุณหภูมิปกติ เมื่อโดนความร้อนจะระเหยส่งกลิ่นหอม พืชผลิตน้ำมันหอยระเหยขึ้นมาเพื่อวัตถุประสงค์ในการดึงดูดแมลงให้มาช่วยผสมเกสร หรือไม่ก็ส่งกลิ่นเพื่อไล่แมลงศัตรูพืช รวมทั้งช่วยในการระกาความชุ่มชื้น (คมสัน, 2549)

2.2.2 การสร้างน้ำมันหอมระเหยของพืช

กลิ่นหอมของดอกไม้มีประโยชน์ช่วยดึงดูดแมลงมาผสมเกสร น้ำมันหอมระเหยในส่วนอื่น ๆ ของพืชมีผลในการป้องกันตนเองจากศัตรูภายนอกที่จะมาทำลายพืชนั้นๆ เช่น ป้องกันแมลง ป้องกันเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อโรค เป็นต้น (ดารณี และปฐมสุดา, 2548)

2.2.3 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยมีลักษณะเป็นของเหลว มีสีแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช น้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่มีกลิ่นหอม อาจจะมีกลิ่นหอมมากหรือหอมน้อยแตกต่างกันไป การที่น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติหลายอย่างและแตกต่างกันไป เนื่องมาจากส่วนประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติทั้งทางกายภาพและทางชีวเคมี ส่วนประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหยมีหลายชนิด แต่สารต่างๆ เหล่านี้ประกอบขึ้นจากธาตุเพียง 3 ตัวเท่านั้นคือ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) ตัวอย่างเช่น กลุ่มไดเทอร์ปีน (Diterpene) มีสารที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อราและเชื้อไวรัส กลุ่มอัลดีไฮด์ (Aldehyde) มีสาร Cinnamaldehyde ที่มีคุณสมบัติต้านการติดเชื้อ ต้านการอักเสบ และลดอุณหภูมิ (คมสัน, 2549)

2.3 อะฟลาทอกซิน

เป็นสารพิษที่สร้างขึ้นโดยราในกลุ่ม *Aspergillus* เช่น *Aspergillus flavus, A. parasiticus* และ *A. nominus* นอกจากนี้ยังพบ *Aspergillus novoparasiticus Aspergillus arachidicola* และ *Aspergillus pseudocaelatus* ในเมล็ดข้าวโพด ที่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ ซึ่งสารพิษอะฟลาทอกซินมีหลายชนิดได้แก่ บีหนึ่ง (B1) บีสอง (B2) จีหนึ่ง (G1) จีสอง (G2) เอ็มหนึ่ง (M1) และเอ็มสอง (M2) อะฟลาทอกซินแต่ละชนิดเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอแลตได้แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือ อะฟลาทอกซินชนิดบีแรงแสงให้สีน้ำเงิน ชนิดจีเรืองแสงให้สีเขียว และชนิดเอ็มเรืองแสงให้สีม่วง อะฟลาทอกซินทนต่อความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 260 องศาเซลเซียส อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่มีพิษรุนแรง และเป็สารก่อมะเร็งชนิดร้ายแรงด้วย อะฟลาทอกซินมีพิษรุนแรงต่อตับของสัตว์ทุกชนิด และเป็นสารก่อมะเร็งต่อสัตว์บางชนิด อะฟลาทอกซินชนิดบีหนึ่งมีความเป็นพิษรุนแรงที่สุด การได้รับสารพิษในปริมาณมากอาจทำให้ถึงตาย หากได้รับในปริมาณน้อยจะทำให้เกิดพิษเรื้อรัง แต่หากได้รับปริมาณต่ำๆ ต่อเนื่องกันเป็นเวลานานอาจทำให้เกิดมะเร็งได้โดยเฉพาะมะเร็งตับ (นิธิยา และวิบูลย์, 2553; Thanaboripat, 2011; Viaro *et al.*, 2017)

2.4 วิธีทดสอบการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Agar diffusion

การยับยั้งเชื้อราโดยวิธี Agar diffusion แบ่งออกเป็น 3 วิธีคือ agar well diffusion และ disc diffusion (Kirby-Bauer) เนื่องจากวิธีดังกล่าวทำได้ง่าย สะดวก ใช้เวลาน้อย และสามารถอ่านผลได้จากตาเปล่า ด้วยการวัดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) เนื่องจากวิธีนี้มีข้อดีคือสามารถทราบความไวของเชื้อต่อการทดสอบทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ (จันทนา, 2548)

2.4.1.1 วิธี Agar well diffusion คือวิธีการนำสารสกัดหยาบแต่ละชนิดมาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา โดยการเตรียมเชลลแขวนลอยของเชื้อที่ใชทดสอบ แลวเจือจางเชื้อแขวนลอย จากนั้นนำไป Pour plate ลงในจานอาหารเพาะเชื้อ และเจาะวุนอาหารใหเปนหลุม แลวหยดสารสกัดลงไป นำไปบมตามวันเวลาที่กำหนด จากนั้นวัดขนาดบริเวณยับยั้ง (clear zone) ที่เกิดขึ้น (นัยนาและสุริยา, 2552)

2.4.1.2 วิธี Disc diffusion (Kirby-Bauer) วิธีนี้เปนการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่า เชื้อมีความไวตอการทดสอบหรือไม ไม่อาจทราบคา MIC หรือ MLC ได ไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญชา และเชื้อจุลินทรียที่ไมใชอากาศในการเจริญ หลักการทั่วไปคือ การทำใหสารสกัดสมุนไพรที่อยู่บนแผนกระดาษกรอง (paper disc) ที่เตรียมไวก่อน ซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจาย (spread) เชื้อในจำนวนที่เหมาะสมไว แลวนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญ อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเสนผาศูนยกลางของ clear zone ซึ่งจะ เห็นเปนวงใสไม่มีโคโลนีเชื้อรอบๆ แผน disc ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแปรตามขนาดของ clear zone เปนการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในเบื้องตน (ประสาทพร และคณะ, 2551)

2.4.1.3 วิธี Agar plug diffusion เป็นวิธีการที่มีความคล้ายคลึงกับวิธีการ disk-diffusion โดยนำเชื้อมา streaks ลงบนผิวหน้าอาหาร เซลล์จุลินทรีย์จะแพร่กระจายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังการบ่มจะทำการ agar-plot หรือcylinder คือการตัดด้วย cork borer และนำไปวางบนผิวหน้าอาหารของ plate ที่ได้ทำการ streaks เชื้อไว้ข้างต้น สารจาก plug จะแพร่กระจายไปบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นทำการตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา โดยการวัดขนาดเสนผาศูนยกลางที่เกิดเป็นบริเวณยับยั้งอยู่รอบ agar plug (Balouiri *et al.*, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาของ Rodianawati *et al.* (2015) โดยทดสอบการต้านเชื้อราของลูกจันทน์เทศโดยใช้สารโอลีโอเรซินจากลูกจันทน์เทศเป็นสารต้านเชื้อรา โดยนำความเข้มข้น 10,000 พีพีเอ็ม ผสมลงใน Tween 80 (ร้อยละ 2 ของอาหารทั้งหมด) จนเป็นเนื้อเดียวกัน และทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อรา โดยวัดผลจากอัตราการเจริญของเส้นใยเชื้อราด้วยวิธี Giant Colony โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีทุกวัน ผลจากการสกัดเมล็ดลูกจันทน์เทศที่ใช้การกลั่น 2 ขั้นตอน คือการกลั่นด้วยน้ำตามด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากลูกจันทน์เทศ (ร้อยละ 6.47 ± 0.56) เรซิน (ร้อยละ 7.14 ± 0.72) และเมล็ดลูกจันทน์เทศ (ร้อยละ 16.05 ± 0.26) โอลีโอเรซินทั้งหมดที่ได้เป็นส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหย และโอลีโอเรซินที่นำมาใช้ในการศึกษามีองค์ประกอบที่โดดเด่นที่สุดสำหรับโอลีโอเรซิน คือ sabinene โอลีโอเรซินจากลูกจันทน์เทศสามารถที่จะยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger, Fusarium oxysporum* และ *Pinicillium glabrum* ทุกระดับความเข้มข้นและความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Rhizopus oryzae* และ *Mucor racemosus* ที่ความเข้มข้น 10,000 พีพีเอ็ม

Pekmezovic *et al.* (2015) ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อรา *Aspergillus flavus* ของน้ำมันหอมระเหยจาก *Thymus vulgaris* L. และ *Cinnamomum cassia* L. โดยทำการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ สารประกอบทางเคมีมีมากที่สุดในน้ำมันหอมระเหยจากกระถิ่นหอมมีดังนี้ cinamaladehyde (ร้อยละ 73.6) และในน้ำมันหอมระเหยจากไทม์มีดังนี้ thymol (ร้อยละ 35.6) ขั้นตอนแรกนำน้ำมันหอมระเหยมาละลายให้ได้ความเข้มข้นเป็น 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500 กรัมต่อมิลลิลิตร และทำการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี broth microdilution ของ EUCAST (คณะกรรมการยุโรปทดสอบจุลินทรีย์ภูมิไวรัส) โดยความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมของเพลททดสอบจะเท่ากับ 200 ไมโครลิตร (น้ำมันหอมระเหย 100 ไมโครลิตรและสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* 100 ไมโครลิตร) โดยความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันหอมระเหยคือ 15.625, 31.25, 62.5, 125 และ 250 กรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นสุดท้ายของหัวเชื้อคือ 1-2.5 x 10^5 ต่อสปอร์ของ *A. flavus* การทดสอบมีตัวควบคุมคือหลุมที่ไม่มีการเติมน้ำมันหอมระเหยลงไปและมีตัวควบคุมที่เป็นยา Voriconazole 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายสปอร์ของ *A. flavus* 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำ microtiter plate บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะมีอากาศ โดยผลของประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยแต่ละตัว MIC และ MFC ของน้ำมันหอมระเหยจากไทม์เป็น 31.25 และ 62.5 กรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากกระถิ่นหอมมีค่า MIC (minimum inhibitory concentration) และ MFC (minimum fungicidal concentration) เป็น 62.5 และ 125 กรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

จากการศึกษาของ Passone *et al.* (2012) ได้ทำการเปรียบเทียบศักยภาพการต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิด ได้แก่ ต้นบอลโด สะระแหน่ญวน กานพลู โป๊ยกั๊ก และไทม์ ต่อการต้านเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* ที่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้บนอาหาร peanut-based

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

medium โดยควบคุมสภาวะการทดลองให้มีระดับความชื้น (water activity, a_w) แตกต่างกัน (ร้อยละ 0.98, 0.95, 0.93) แล้วทำการวิเคราะห์ผลของน้ำมันหอมระเหยต่างๆ ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อระยะ lag phase, อัตราการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซิน B1 ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* จากการศึกษาพบว่า น้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิดมีอิทธิพลต่อระยะ lag phase, อัตราการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซิน B1 ถึงแม้ว่าต้นบอลโด สะระแหน่ญวน และกานพลูที่ความเข้มข้นต่ำ (500 พีพีเอ็ม) ไม่มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อระยะ lag phase (ในช่วงที่การเพิ่มที่ร้อยละ 0 – 75) และอัตราการเจริญ (ช่วงที่ลดลงร้อยละ 0 – 65) ซึ่งการประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยความเข้มข้นสูงของต้นบอลโดและสะระแหน่ญวน ที่ 2500 ไมโครลิตรต่อลิตร และกานพลูที่ 1500 ไมโครลิตรต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* ได้อย่างสมบูรณ์

จากการศึกษา Boukaew *et al.* (2017) โดยทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย 4 ชนิดต่อการต้านเชื้อรา *Aspergillus flavus* ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์ยกเว้น *A. flavus* PSRDC-2 ถูกยับยั้งโดยน้ำมันกานพลู (*Syzygium aromaticum* L.) และน้ำมันจันทน์กะพ้อ (*Vatica diospyroides Symington*) น้ำมันดังกล่าวมีสารประกอบ 14 และ 24 ชนิด ตามลำดับ มี eugenol (ร้อยละ 62.4) เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันกานพลูและ benzyl acetate (ร้อยละ 48.8) เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันจันทน์กะพ้อ น้ำมันกานพลู 100 ไมโครลิตรต่อลิตร ยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* PSRDC-2 ได้ร้อยละ 84.7 และยับยั้งการติดเชื้อโรคที่เกิดขึ้นในเมล็ดข้าวโพดอย่างสมบรูณ์ ที่ 10 ไมโครลิตรต่อลิตร น้ำมันจันทน์กะพ้อที่ความเข้มข้น 50 ไมโครลิตรต่อลิตรมีฤทธิ์การต้านเชื้อราอย่างรุนแรงในขณะที่มีการเจริญ การสร้างสปอร์ การงอกของสปอร์ และการติดโรคของ *A. flavus* PSRDC-2 ทั้งในหลอดทดลองและเมล็ดข้าวโพด การรมควันด้วยน้ำมันจันทน์กะพ้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมงสามารถป้องกันการติดโรคของเมล็ดข้าวโพดในการเก็บรักษา โดยน้ำมันกานพลูและน้ำมันจันทน์กะพ้อมีกิจกรรมของสารแอลลีโลพาธี (Allelopathy) ขึ้นอยู่กับการงอกของเมล็ดข้าวโพด ความยาวลำต้น และความยาวของราก โดยน้ำมันจันทน์กะพ้อเป็นพิษมากกว่าน้ำมันกานพลู

Bozik *et al.* (2016) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ กระถิ่นหอม โหระพา ออริกาโน กานพลู ตะไคร้ และขิง ต่อการยับยั้งเชื้อราก่อโรค ได้แก่ *Aspergillus parasiticus, A. flavus* และ *A. clavatus* ที่แยกได้จากข้าวโอ๊ต หลังการเก็บเกี่ยวและเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 3 วัน โดยวิเคราะห์ผลจากร้อยละของเมล็ดที่แสดงการเจริญของเส้นใยและร้อยละของเมล็ดที่แสดงการเจริญของเส้นใยที่มีการสร้างสปอร์ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ กานพลู ออริกาโน และไทม์มีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ดีต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยสามารถต้านเชื้อรา *A. clavatus* ได้ดีที่สุด ตามด้วย *A. parasiticus* และ *A. flavus* ตามลำดับ โดยพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ออริกาโน และไทม์ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อลิตร และตะไคร้ความเข้มข้น 250 ไมโครลิตรต่อลิตรมีประสิทธิภาพสูงที่สุด แต่น้ำมันหอมระเหยจากขิงและกานพลูมีประสิทธิภาพต่ำสุด เมื่อเทียบกับตัวควบคุม และเมื่อพิจารณาผลของน้ำมันหอมระเหยที่มีต่อการสร้างสปอร์ของสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ออริกาโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และไทม์ ให้ผลยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* มากที่สุด และยังคงต้านเชื้อรา *Aspergillus clavatus* ได้มากที่สุดเช่นเดียวกัน ส่วนตะไคร้และออริกาโนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อลิตร สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่สารสกัดจากไทม์และกานพลูสามารถยับยั้งได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครลิตรต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 125 ไมโครลิตรต่อลิตร น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ยังคงทำงานได้ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นไม่สามารถแสดงผลได้เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองโดยไม่พิจารณาชนิดและความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยหรือสายพันธุ์ของเชื้อรา พบว่าตะไคร้เป็นน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด และที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดของกระถิ่นหอม ออริกาโน ขิง และกานพลู มีประสิทธิภาพน้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัด

Thanaboripat *et al.* (1997) ได้ทำการศึกษาผลของประสิทธิภาพในการยับยั้งของสารสกัดหยาบกระเทียม, กานพลู และแครอทที่ความเข้มข้น 20,000, 40,000, 60,000, 80,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus* และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในข้าว จากผลการทดลองพบว่ากระเทียม กานพลู และแครอทสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ โดยกระเทียมและกานพลูที่ความเข้มข้น 100,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถลดระดับการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินลงจาก 5.94 เป็น 0.15 และ 0.06 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ แต่แครอทที่ความเข้มข้น 20,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถลดระดับการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้มากที่สุดจาก 5.94 เป็น 0.03 ไมโครกรัมต่อกรัม ดังนั้นกระเทียม กานพลู และแครอทที่ความเข้มข้น 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ สมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus Flavus* และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ดีที่สุดคือกระเทียม

Thanaboripat *et al.* (2006) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดของใบมะกรูด ผลมะระขี้นก และใบยาสูบที่สกัดโดยเอทานอลต่อการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* บน PDA โดยทำการทดสอบที่ความเข้มข้นร้อยละ 2, 4, 6, 8 และ 10 จากผลการทดลองพบว่าสารกสกัดจากสมุนไพรทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ได้ โดยสารสกัดจากใบมะกรูดทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ได้ ขนาดของโคโลนีเชื้อราเท่ากับ 61.0, 60.6, 53.6, 53.4 และ 41.6 มิลลิเมตรในระยะเวลา 7 วันที่ความเข้มข้นร้อยละ 2, 4, 6, 8 และ 10 ตามลำดับที่ตัวควบคุม (ความเข้มข้นของสารสกัดร้อยละ 0) มีขนาดโคโลนีเท่ากับ 89.6 มิลลิเมตร ความเข้มข้นที่สามารยับยั้งได้ดีที่สุดคือร้อยละ 10 ส่วนสารสกัดจากผลมะระขี้นกทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ได้ ความเข้มข้นที่สามารยับยั้งได้ดีที่สุดคือร้อยละ 6, 8 และ 10 และสารสกัดจากใบยาสูบทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ได้ ความเข้มข้นที่สามารยับยั้งได้ดีที่สุดคือร้อยละ 8 และ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบคือเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ได้รับการอนุเคราะห์จากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย 5 ชนิดซื้อมาจากบริษัท ฮ่งฮวด กรุงเทพมหานคร ได้แก่

1. กานพลู (*Eugenia caryophyllus Bullock & Harrison*)
2. กระถิ่นหอม (*Cinnamomum* sp.)
3. ขิง (*Zingiber officinale Roscoe*)
4. มะกรูด (*Citrus hystrix* DC.)
5. ลูกจันทน์เทศ (*Myristica fergrans Houtt*)

3.3 สารเคมี

1. Tween 80
2. ยาต้านเชื้อรา Clotrimazole
3. Dimethyl Sulfoxide (DMSO)
4. Absolute ethanol
5. Phosphate buffer saline (PBS)

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Agar (PDA) ยี่ห้อ Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd. ประเทศอินเดีย

2. Potato Dextrose Broth (PDB) ยี่ห้อ Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd. ประเทศอินเดีย

3.5 เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

1. หลอดทดลอง (test tube)
2. บีกเกอร์ (beaker)
3. แทงแก้วคน (stirring rod)
4. ขวดเตรียมอาหาร (duran flask)
5. เข็มเขี่ย (loop)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. กรวยกรอง
7. สำลี (cotton)
8. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow)
9. ปากคีบ (forceps)
10. ปิเปตต์ (pipette)
11. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) และ Repeater pipette
12. ช้อนตักสาร
13. กระบอกตวง (cylinder)
14. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) ยี่ห้อ Olympus Opticle Co. Ltd. ประเทศญี่ปุ่น
15. ชุดสไลด์นับเซลล์ (hemacytometer) ยี่ห้อ Bright-line ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (balance) ยี่ห้อ Ohaus Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ยี่ห้อ Hirayama manufacturing corparation ประเทศญี่ปุ่น
18. จานเพาะเลี้ยง (Petri dish)
19. ชุดกรอง
20. ตะเกียงแอลกอฮอล์
21. เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Vernier Caliper)
22. เอทานอล 95 %
23. เอทานอล 70 %
24. กระบอกฉีดยา (syringe)
25. Syringes Filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร
26. ขวดแก้วขนาดเล็ก (Vials)
27. 96-well tissue culture plate ชนิดก้นหลุมแบน
28. เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (Microplate Reader)
29. พาราฟิล์ม (parafilm)
30. แผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 (Nguefack *et al.*, 2004)

3.6.1.1 เขี่ยเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 จากอาหารแข็งเอียง streak ลงบนอาหาร PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

3.6.1.2 ล้างสปอร์ด้วยสารละลายทวีน 80 (tween 80) ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่เตรียมไว้แล้ว โดยการปิเปตต์สารละลายทวีน 80 ลงไปในหลอด แล้วใช้เข็มเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกจากอาหาร นำสารละลายสปอร์ที่ได้ไปกรองด้วยชุดกรองสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.1.3 นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มานับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ปรับสารละลายสปอร์ให้มีความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร (กานพลู กระถิ่นหอม ขิง มะกรูด และลูกจันทร์เทศ) เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ด้วยวิธี Disc diffusion (Bauer *et al.*, 1996)

3.6.2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใส่ในจานเพาะเชื้อ โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1,200 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นรออาหารอุ่นที่อุณหภูมิ 45 - 50 องศาเซลเซียส

3.6.2.2 เมื่ออาหารอุ่นแล้ว เทอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเชื้อเพื่อเป็นอาหารชั้นที่ 1 ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว

3.6.2.3 นำอาหารปริมาตร 20 มิลลิลิตรผสมกับสปอร์แขวนลอย ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร (200 ไมโครลิตร) ลงในฟลาสก์แล้วเขย่าให้เข้ากัน

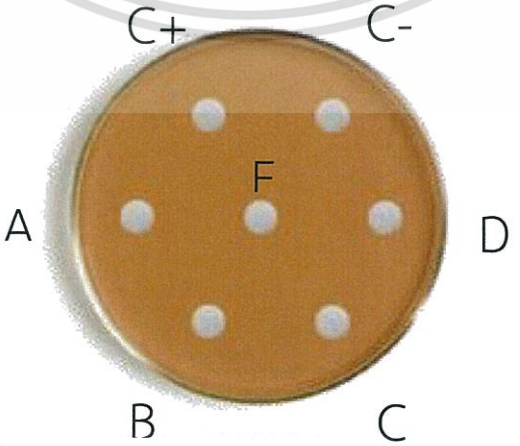
3.6.2.4 เทอาหารที่ผสมกับสปอร์แขวนลอยลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารชั้นที่ 1 เตรียมไว้จนครบทั้งหมด 25 จานเพาะเชื้อ จากนั้นทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว

3.6.2.5 นำน้ำมันหอมระเหยมาทำการเจือจางด้วยตัวทำละลายทวีน 80 (Tween80) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก)

3.6.2.6 นำน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาหยดลงบนแผ่นดิสก์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อ 1 แผ่นดิสก์ จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ของสารสกัดน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิด และทดสอบชนิดละ 5 ซ้ำ

3.6.2.7 ใช้ปากคีบที่ปลอดเชื้อ คีบแผ่นดิสก์วางลงบนอาหารที่เตรียมไว้ข้างต้น

3.5.2.8 สำหรับชุดควบคุมเชิงลบคือแผ่นดิสก์ที่หยดตัวทำลายทวีน 80 (Tween80) ความเข้มข้น 0.05 % ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วชุดควบคุมเชิงบวกคือแผ่นดิสก์ที่หยด Clotrimazole ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร



รูปที่ 3.1 แผนผังการวางแผ่นดิสก์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : C- คือ 0.05% tween80

C+ คือยาปฏิชีวนะ Clotrimazole ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

A คือสารสกัดน้ำมันหอมระเหยขิงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

B คือสารสกัดน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

C คือสารสกัดน้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

D คือสารสกัดน้ำมันหอมระเหยมะกรูดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

E คือสารสกัดน้ำมันหอมระเหยลูกจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

3.6.2.9 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง และทำการตรวจผลการยับยั้งการเจริญ (Clear zone) ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 หลังจากบ่มเป็นเวลา 3 และ 7 วัน วัด clear zone ด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์

3.6.3 การทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.2 เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 (minimum inhibitory concentration, MIC) โดยวิธี broth microdilution method (Espinel-Ingroff *et al.*, 2002) รายละเอียดขั้นตอนการทดสอบในภาคผนวก ข

3.6.3.1 เตรียม 96-well tissue culture plate ที่ปลอดเชื้อและชนิดก้นหลุมแบน (flat bottom) จำนวน 3 เพลท

3.6.3.2 ทำการเจือจางน้ำมันหอมระเหย กานพลู และกระถิ่นหอม แบบ two-fold dilution โดยใช้อาหาร PDB ให้มีความเข้มข้น 6.25 , 12.5 , 25 , 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (ภาคผนวก ข)

3.6.3.3 ใช้ repeater pipette ดูดน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้นต่างๆ ใส่ลงใน 96-well tissue culture plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม

3.6.3.4 ใช้ปิเปตต์ดูดสปอร์แขวนลอย ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมที่ทำการทดสอบ

3.6.3.5 นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน

3.6.3.6 เมื่อบ่มครบ 3 วันแล้ว สังเกตความขุ่น-ใส ในแต่ละความเข้มข้น ด้วยสายตา ทำการบันทึกผลการทดลอง จากนั้นนำ96-well tissue culture plate ที่ทดสอบ วัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (Nanasombat and Teckchuen, 2009) โดยใช้เครื่อง Microplate Reader รุ่น EZ Read 2000

3.6.3.7 บันทึกผลการทดลองและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (% Inhibition) ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละความเข้มข้น (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลองแบบแฟคทอเรียล 3 ปัจจัย (Three-Factor Factorial Design) เป็นแผนการทดลองที่พิจารณา 3 ปัจจัยพร้อมๆกัน โดยกำหนดให้ปัจจัยชนิดของน้ำมันหอมระเหยมี 5 ระดับ ปัจจัย ระยะเวลาในการบ่มมี 2 ระดับ และปัจจัยความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยมี 5 ระดับ และทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยรายคู่โดยวิธี Fisher's least Significant Difference (Fisher LSD) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 หลังจากได้ปัจจัยที่ดีที่สุด จะนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดย สถิติทดสอบวิธี T-Test (Independent Samples T-Test) (บุญเรียง,2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

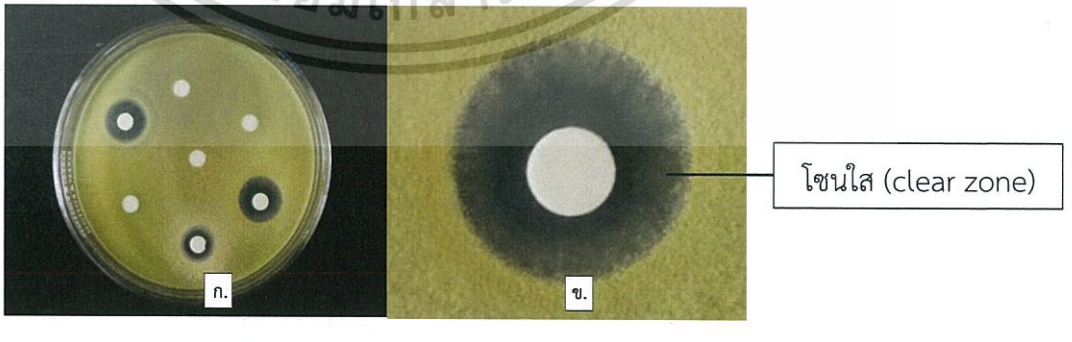
บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ด้วยวิธี disc diffusion

เมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง และทำการวัดผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา หลังจากบ่มนาน 3 และ 7 วัน โดยวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญ จะสังเกตเห็นเป็นบริเวณยับยั้ง (clear zone) รอบแผ่นดิสก์ ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.1

พบว่าประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 3 และ 7 วัน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยวัดค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางได้เท่ากับ 9.29 และ 9.16 มิลลิเมตร ตามลำดับ และประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอมที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 3 และ 7 วัน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยวัดค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางได้เท่ากับ 12.95 และ 11.95 มิลลิเมตร ส่วนน้ำมันหอมระเหยขิง มะกรูด และลูกจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้มต่างๆ ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

และเมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า มีปัจจัยร่วมระหว่างชนิดน้ำมันหอมระเหย ระยะเวลาในการบ่ม และความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย (F = 9.41 ,P-value = 0) จากตารางที่ 4.2 พบว่าปัจจัยที่ยับยั้งได้ดีที่สุดคือ อบเชยที่ระยะเวลา 3 วัน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมปรากฏว่าไม่แตกต่างกับชุดควบคุม (T=2.24, P-value=0.055) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 4.1 ก. การเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในจานเพาะเชื้อ

ข. บริเวณยับยั้ง (clear zone) ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และสารต้านเชื้อรา ทดสอบด้วยวิธี disc diffusion บ่มนาน 3 วัน และ 7 วัน

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (มก.ต่อมล.)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง *A. flavus* IMI242684 (มิลลิเมตร)	
		ระยะเวลาในการบ่ม 3 วัน	ระยะเวลาในการบ่ม 7 วัน
1.กานพลู	10	-	-
	20	9.29	9.16
	30	9.12	9.09
	40	9.09	9.30
	50	9.73	9.44
2.กระถิ่นหอม	10	-	-
	20	12.95	11.95
	30	13.57	12.14
	40	13.30	11.77
	50	16.26	14.17
3.ขิง	10	-	-
	20	-	-
	30	-	-
	40	-	-
	50	-	-
4.มะกรูด	10	-	-
	20	-	-
	30	-	-
	40	-	-
	50	-	-
5.ลูกจันทน์เทศ	10	-	-
	20	-	-
	30	-	-
	40	-	-
	50	-	-
6.clotrimazole	0.5	19.79	18.36
7.tween 80 0.05%		-	-

*ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และสารต้านเชื้อราด้วยวิธี disc diffusion ที่บ่มเป็นระยะเวลา 3 และ 7 วัน

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (มก.ต่อมล.)	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง *A. flavus* IMI242684 (มิลลิเมตร)	
		ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	
		ระยะเวลาในการบ่ม 3 วัน	ระยะเวลาในการบ่ม 7 วัน
1.กานพลู	10	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
	20	9.29 ± 0.33^{e}	9.16 ± 0.36^{e}
	30	9.12 ± 0.17^{e}	9.09 ± 0.19^{e}
	40	9.09 ± 0.11^{e}	9.30 ± 0.30^{e}
	50	9.73 ± 1.20^{e}	9.44 ± 0.97^{e}
2.กระถิ่นหอม	10	0.00±0.00	0.00±0.00
	20	12.95 ± 2.64^{bcd}	11.95 ± 2.24^{d}
	30	13.57 ± 2.42^{b}	12.14 ± 1.45^{cd}
	40	13.30 ± 1.99^{bc}	11.77 ± 1.89^{d}
	50	16.26 ± 3.43^{a}	14.17 ± 3.59^{b}
3.ขิง	10	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
	20	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
	30	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
	40	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
	50	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
4.มะกรูด	10	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
	20	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
	30	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
	40	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
	50	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
5.ลูกจันทน์เทศ	10	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
	20	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
	30	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
	40	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
	50	0.00 ± 0.00^{f}	0.00 ± 0.00^{f}
6.clotrimazole	0.5	19.79	18.36
7.tween 80 0.05%		-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย กานพลูและกระถิ่นหอม เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 (minimum inhibitory concentration, MIC) โดยวิธี broth microdilution

จากผลการทดลองการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA โดยวิธี disc diffusion โดยใช้ paper disc พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 คือกานพลูและกระถิ่นหอม จึงนำมาทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อรา (minimum inhibitory concentration, MIC) โดยวิธี broth microdiluton โดยใช้ 96-well tissue culture plate และความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบ ดังนี้ 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องและทำการวัดผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่บ่มนาน 3 วัน โดยวัดความขุ่น-ใส ด้วยตาเปล่าพบว่า น้ำมันหอมระเหย กานพลู และกระถิ่นหอม ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความขุ่น แสดงว่า เชื้อรามีการเจริญ และเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ได้ค่าร้อยละการยับยั้งของกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole ที่มีต่อเชื้อรา *A. flavus* ผลร้อยละการยับยั้ง ดังตารางที่ 4.2 พบว่ากานพลู และกระถิ่นหอม ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละการยับยั้งเชื้อรา เท่ากับ 69.07±21.53 และ 59.61±15.98 ตามลำดับ ส่วน Clotrimazole ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละการยับยั้งเชื้อรา เท่ากับ 104.04±6.56 ส่วนค่าความเข้มข้นของกานพลูและกระถิ่นหอมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้ร้อยละ 50 (MIC_{50}) ปรากฏผลดังตารางที่ 4.3 โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ร้อยละ 50 (MIC_{50}) เท่ากับ 91.19 และ 76.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนค่า MIC_{50} ของ Clotrimazole เท่ากับ 0.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อรา (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและกระถิ่นหอม มีค่า >100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วน Clotrimazole ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อรา (MIC) เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ร้อยละการยับยั้งของกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole ที่มีต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* บ่มนาน 3 วัน

น้ำมันหอมระเหยและสารต้านเชื้อรา	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการยับยั้ง ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน*
กานพลู	0 (Medium+spores)	0.00 ± 0.00^{hi}
	10% DMSO (Medium+DMSO+spores)	14.61 ± 0.58^{ghi}
	6.25	9.79 ± 10.11^{hi}
	12.5	-50.32 ± 8.31^{j}
	25	-33.76 ± 5.53^{j}
	50	-4.31 ± 8.21^{i}
	100	69.07 ± 21.53^{bc}
กระถิ่นหอม (กระถิ่นหอมเทศ)	0 (Medium+spores)	0.00 ± 0.00^{hi}
	10% DMSO (Medium+DMSO+spores)	39.81 ± 18.34^{def}
	6.25	34.03 ± 9.75^{efg}
	12.5	-29.09 ± 20.11^{j}
	25	-42.74 ± 30.53^{j}
	50	19.95 ± 21.70^{fgh}
	100	59.61 ± 15.98^{cd}
Clotrimazole	0 (Medium+spores)	0.00 ± 0.00^{hi}
	10% Ethanol (Medium+Ethanol+spores)	17.51 ± 6.80^{fghi}
	0.03125	20.64 ± 26.07^{fgh}
	0.0625	37.76 ± 6.43^{def}
	0.125	52.44 ± 4.47^{cde}
	0.25	86.32 ± 5.91^{ab}
	0.5	104.04 ± 6.56^{a}

*ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ค่าความเข้มข้นของกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole ที่ยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus* ได้ร้อยละ 50 (MIC_{50})

ชนิดของสาร	ค่าเฉลี่ย MIC_{50} (mg/ml) (GraphPad Prism 5)
กานพลู	91.19
กระถิ่นหอม	76.41
Clotrimazole	0.11

ตารางที่ 4.5 ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole โดยวิธี broth microdilution

ชนิดของสาร	MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
กานพลู	>100
กระถิ่นหอม	>100
Clotrimazole	0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าน้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอมออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยกานพลู โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอมและกานพลูที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 พบว่ามีค่าเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสายสมร และพงษ์นรินทร์ (2559) ที่พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระถิ่นหอมและกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. K2 27 ได้ในความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดคือ 25,000 พีพีเอ็ม (25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 100,000 พีพีเอ็ม (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ แต่น้ำมันหอมระเหยจากมะกรูดไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* เมื่อพิจารณาถึงสารประกอบที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของของเชื้อราในกระถิ่นหอมพบว่ามี สารสำคัญที่พบมากในน้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอมคือ cinnamaldehyde ซึ่งคาดว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และทำให้จุลินทรีย์ตาย เนื่องจากเป็นสารที่พบเป็นปริมาณมาก สาร cinnamaldehyde เป็นสารประกอบอัลดีไฮด์ซึ่งออกฤทธิ์โดยการ crosslinked ตรงตำแหน่งหมู่อะมิโน ($-NH_2$) ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนในเซลล์จุลินทรีย์ จึงส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมและการแบ่งเซลล์ของจุลินทรีย์ สอดคล้องกับงานวิจัยของปิลันธนา และคณะ (2555) ที่พบว่าน้ำมันจากเปลือกกระถิ่นหอมเทศมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus sp.* เท่ากับ 80 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร โดยน้ำมันจากเปลือกกระถิ่นหอม มีสารสำคัญที่พบมากที่สุดคือ cinnamaldehyde

จากงานวิจัยของ อุดมลักษณ์ (2545) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากขิงไม่สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* กล่าวคือได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* โดยวิธี disc agar diffusion ที่ระดับความเข้มข้น 200,000 พีพีเอ็ม, 100,000 พีพีเอ็ม, 50,000 พีพีเอ็ม, 25,000 พีพีเอ็ม, 12,500 พีพีเอ็ม และ 6,250 พีพีเอ็ม วัดผลโดยดูความกว้างของวงใสผลคือ *A. flavus* จะต้านทานการออกฤทธิ์ของน้ำมันขิง โดยน้ำมันที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อชนิดนี้คือน้ำมันกานพลูและกระถิ่นหอม โดยกระถิ่นหอมจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีกว่ากานพลู และงานวิจัย Bullerman *et al.* (1977) ศึกษาน้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอม กานพูลที่ระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 พีพีเอ็ม และสาร aldehyde และ eugenol ความเข้มข้น 0, 75, 100, 125, 150, 175 และ 200 พีพีเอ็ม โดยสารทั้ง 4 ชนิดยับยั้งการเจริญของสารพิษอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ซึ่งน้ำมันหอมระเหยอบเชยและกานพลูยับยั้งที่ 200-250 พีพีเอ็ม สารcinnamaldehyde ที่ 150 พีพีเอ็ม และ eugenol ที่ 125 พีพีเอ็ม เนื่องจาก cinnamaldehyde และ eugenol เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของน้ำมันหอมระเหยอบเชยและกานพลู จึงสรุปได้ว่าสารเหล่านี้เป็นส่วนประกอบสำคัญในการยับยั้งเชื้อราของน้ำมันทั้งสองชนิดนี้ และระดับน้ำมันหอมระเหยที่ใช้คือ 250 พีพีเอ็ม,cinnamaldehyde และ eugenol 200 พีพีเอ็ม ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและไม่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินในช่วงเวลาของการศึกษานี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thanaboripat *et al.* (2007) ทำการศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากพืช 16 ชนิด ด้วยการวาง cylinder cups ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บ่มเป็นระยะเวลา 3 วัน เพื่อศึกษาผลการยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 พบว่าน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว ให้ผลการยับยั้งการเจริญดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอมและน้ำมันหอมระเหยลาเวนเดอร์ ตามลำดับ จากนั้นเลือกน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิดคือ น้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว น้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอม และน้ำมันหอมระเหยลาเวนเดอร์ มาทำการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50% (v/v) บน PDA พบว่าน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวที่ระดับความเข้มข้น 1.5625% (v/v) และอบเชยและลาเวนเดอร์ที่ระดับ ความเข้มข้น 50% (v/v) คือความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยของเสม็ดขาวที่ระดับความเข้มข้น 25% (v/v) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บน PDA ได้นาน 28 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเป็นระยะเวลา 3 และ 7 วัน พบว่ามีเพียงน้ำมันหอมระเหยกานพลูและกระถิ่นหอม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

จากการศึกษาค่าความเข้มข้นของกานพลูและกระถิ่นหอมที่ยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* IMI 242684 ได้ร้อยละ 50 (MIC_{50}) พบว่าค่าความเข้มข้นของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอมที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ร้อยละ 50 (MIC_{50}) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 76.41และค่าความเข้มข้นของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอมที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ร้อยละ 50 (MIC_{50}) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 91.19

จากการศึกษาการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและกระถิ่นหอมที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ด้วยวิธี Microdilution proceder โดยใช้ 96-well tissue culture plate พบว่าสารสกัดน้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอมและกานพลูที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อราคือที่ระดับความเข้มข้น >100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาร้อยละการยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอม,กานพลูและสารต้านเชื้อรา Clotrimazole ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ด้วยวิธี Microdilution proceder โดยใช้ 96-well tissue culture plate ที่ระดับความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่าน้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอมและกานพลูเมื่อนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับความเข้มข้น น้ำมันหอมระเหยกานพลูและกระถิ่นหอมที่ระดับความเข้มข้น 12.5 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา A. flavus IMI 242684 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และยังพบว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อราคือที่ระดับความเข้มข้น >100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยสมุนไพรแต่ละชนิดว่ามีอิทธพลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา Asper*gillus flavus* IMI 242684 หรือไม่
2. ควรมีการศึกษาวิธีการที่ทำให้น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อราได้ในเวลาที่ยาวนานขึ้น ยกตัวอย่างเช่น วิธีไมโครเอนแคปซูเลชั่น (microencapsulation) (รัชวรรณ และคณะ, 2556) กระบวนการที่ของเหลวหรืออนุภาคถูกห่อหุ้มให้อยู่ในรูปของแคปซูลด้วยพอลิเมอร์ชั้นบางๆเกิดเป็นไมโครแคปซูล จะช่วยเก็บรักษาคุณภาพของสารชีวภาพที่สำคัญ ป้องกันการระเหยสารจากสภาวะแวดล้อมต่างๆ ให้อยู่ในสภาพเดิมได้นานที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

คมสัน หุตะแพทย์. 2549. การสกัดน้ำมันหอมระเหย การใช้ประโยชน์และการทำผลิตภัณฑ์น้ำมันหอมระเหย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. กองบรรณาธิการวารสารเกษตรกรรมธรรมชาติ.

จันทนา เวสพันธ์. 2448. ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด. ภาควิชาชีวเภสัชศาสตร์ มหาลัยศิลปากร. กรุงเทพฯ.

ดารณี ประภาสโนบล และปฐมสุดา อินทุประภา. 2548. น้ำมันหอมระเหยไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. ปทุมธานี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

นัยนา ต่างใจ และสุริยา ฤธาทิพย์. 2552. ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรียบางชนิดของสารสกัดจากหมากนวล. งานวิจัยเทคโนโลยีอุตสาหรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. กรุงเทพฯ.

นิธิยา รัตนาปนนท์ และวิบูลย์ รัตนาปนนท์. 2553. สารพิษในอาหาร.พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โอเดียน สโตร์.

บุญเรียง ขจรศิลป์. 2542. สถิติวิจัย I. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ภาควิชาการศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประสารพร บริสุทธิ์เพ็ชร พิทัย กาญบุตร และสาธร พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในหองปฏิบัติการ. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร กรองกาญน์ มนตรี จารุวรรณ บรรจง เบญจวรรณ สำรวล และ ศรินภา โคตรจันทร์. 2555. ฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันจากเปลือกกระถิ่นหอมเทศ. ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ. 7(1), 39-43.

พีรศักดิ์ วรสุนทโรสถ และคณะ. 2544. โครงการทรัพยาการพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี. สหมิตรพริ้นติ้ง.

รัชวรรณ ฐานัตถวงศ์เจริญ ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ และ อรพิน เกิดชูชื่น. 2556. การเอนแคปซูเลชั่นสารปรุงแต่งกลิ่นรสปูจากโปรตีนไฮโดรไลเซทสาหร่ายไส้ไก่. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 44(2) (ฉบับพิเศษ), 469-472.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ. 2448. พืชเครื่องเทศและสมุนไพร.พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียน สโตร์.

วันดี กฤษณพันธ์. 2539. เกร็ดความรู้สมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : บริษัท เฟื่องฟ้าพริ้นติ้ง จำกัด.

สายสมร ลาลอง และพงษ์นรินทร์ ยอดสิงห์. 2559. การใช้น้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่พบบนแผ่นยางพารา. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 18(1): 30-38.

อาภากร ศิลป์ประเสริฐ. 2554. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการควบคุมเชื้อรา *Aspergillus flavus*. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, วิชัย หฤทัยธนาสันติ์และ อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์. 2545. การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งเชื้อราที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์ขนมอบ. ฝ่ายเทคโนโลยีพืชสมุนไพรเพื่อการอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibnsouda, S.K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71-79.

Bauer, A.W., Kirby, M.M., Sherris, J.C. and Truck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496.

Boukaew, S., Prasertsan, P. and Sattayasamitsathit, S. 2017. Evaluation of antifungal activity of essential oils against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and their allelopathic activity from fumigation toprotect maize seeds during storage. *Industrial Crops and Products*, 97, 558–566.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Bozik, M., Cisarova, M., Tancinova, D., Kourimska, L., Hleba, L. and Kloucek, P. 2017. Selected essential oil vapours inhibit growth of *Aspergillus* spp. in oats with improved consumer acceptability. *Industrial Crops and Products*, 98, 146-152.

Bullerman, L. B., Lieu, F. Y. and Seier, S. S. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Science,* 42(4), 1107-1110.

Espinel-lngroff A., Fothergill, A., Peter, J.,Rinaldi, M.G. and Walsh, T.G. 2002. Testing Conditions for determination of minimum fungicidal concentration of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3204-3208.

Lahouar, A., Marin, S., Crespo-Sempere, A., Saïd, S., Sanchis, V. 2016. Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. *Microbiología*, 48(1), 78-85

Nanasombat, S. and Teckchuen, N. 2009. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(5), 443-449.

Nguefack, J., Leth, v., Zollo, A.P.H. and Mathur, S.B.2004. Evalation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spolilage and mycotoxin producing fungi. Lnt. *Journal of Food Microbiology*, 94, 329-334.

Passone, M.A., Girardi, N.S., Ferrand, C.A. and Etcheverry, M. 2012. Invitro evaluation of five essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored peanuts from *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* contamination. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 70, 82–88.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Pekmezovic, M., Rajkovic, K., Barac, A., Senerovic, L. and 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.

Rodianawati, I., Hastuti, P. and Nur Cahyanto, M. 2015. Nutmeg's (*Myristica fragrans* Houtt) oleoresin: Effect of heating to chemical compositions and antifungal properties. *Procedia Food Science*, 3, 244-254.

Thanaboripat, D. 2011. Control of aflatoxins in agricultural products using plant extracts. *KMITL Science and Technology Journal*,11(1), 35-42.

Thanaboripat, D., Nontabenjawan, K., Leesin, K., Teerapiannont, D., Sukcharoen, O. and Ruangrattanametee, V. 1997. Inhibitory effect of garlic, clove and carrot on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Journal of Forestry Research*, 8, 39-42.

Thanaboripat, D., Chareonsettasilp, S., Pandee, K. and Udomwongsup, K. 2006. Inhibitory effect of kaffir lime, bitter cucumber and tobacco extracts on the growth of *Aspergillus flavus*. *KMITL Science and Technology Journal*, 6(1), 18-24.

Thanaboripat, D., Suvathi, Y., Srilohasin, P., Sripakdee, S., Patthanawanitchai, O. andChareonsettasilp, S. 2007. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. *KMITL Science and Technology Journal*, 6(1), 18-24.

Viaro, H.P., Silva, J.J.D., Ferranti, L.D.S., Bordini, J.G., Massi, F.P. and Fungaro, M.H.P. 2017. The first report of *A. novoparasiticus*, *A. arachidicola* and *A. pseudocaelatus* in Brazilian corn kernels, *International Journal of Food Microbiolog*, 243, 46-51.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา โดยวิธี Disc diffusion

1. การเตรียมสารละลายน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด เพื่อใช้ทดสอบ Disc diffusion

เตรียม stock ความเข้มข้น 100,000 µg/ml (100 mg/ml) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ดูดน้ำมันหอมระเหย ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อ นำไปชั่งน้ำหนัก ดังนี้

น้ำหนักกานพลู = 1.0293 กรัม
น้ำหนักกระถิ่นหอม = 0.5330 กรัม
น้ำหนักขิง = 0.8443 กรัม
น้ำหนักมะกรูด = 0.7918 กรัม
น้ำหนักลูกจันทน์เทศ = 0.7295 กรัม

↓

ทำการละลายด้วย tween 80 โดยเติม tween 80 ลงไป 1 มิลลิลิตร

↓

เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

↓

กรองสารละลายน้ำมันด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

↓

Stock ที่ได้มีความเข้มข้น 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

↓

หุ้มภาชนะด้วยแผ่นฟอยล์ เก็บในที่มืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.การเตรียมละลายสารต้านเชื้อรา Clotrimazole เพื่อใช้ทดสอบ Disc diffusion

เตรียม stock ความเข้มข้น 500 µg/ml (0.5 mg/ml) โดยใช้เมทานอล 99.99% เป็นตัวทำละลาย เตรียมปริมาตร 10 ml

ชั่ง Clotrimazole หนัก 5 มิลลิกรัม

↓

ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย โดยใส่เมทานอล 99.99% ลงไป
จนกระทั่งสารต้านเชื้อราละลายทั้งหมด (1 ml)

↓

เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

↓

กรองสารละลายด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน

↓

ห่อภาชนะด้วยแผ่นฟอยล์ เก็บที่อุณหภูมิ –20°C

↓

Stock ที่ได้มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรประมาณ 10 มิลลิลิตร
(ความเข้มของเมทานอลใน stock เท่ากับ 10%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.การเตรียมสารละลาย tween 80 ความเข้มข้น 0.05 % เพื่อใช้ทดสอบ Disc diffusion

เตรียม stock ความเข้มข้น 0.5 mg/ml หรือ 0.05 % ปริมาตร 500 ml

ดูด tween 80 (100 %) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร (250 ไมโครลิตร)

↓

เติมน้ำกลั่น 499.75 มิลลิลิตร จนครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร

↓

เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

↓

กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน

↓

ห่อภาชนะด้วยแผ่นฟอยล์ เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

↓

Stock ที่ได้มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรประมาณ 500 มิลลิลิตร

หมายเหตุ วิธีคำนวณค่าความเข้มข้นของ Tween 80 เพื่อการทดสอบ Disc diffusion

$C_1V_1 = C_2V_2$

100 % x 0.25 ml = C_2 x 500 ml

C_2 = (100 x 0.25)/500

ความเข้มข้นของ Tween 80 ใน stock = 0.05 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.การเจือจางน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิด เพื่อทดสอบ Disc diffusion

ความเข้มข้นของ stock น้ำมันหอมระเหย 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น ดังนี้ 1000,000 µg/ml (10 mg/ml)

20,000 µg/ml (20 mg/ml)

30,000 µg/ml (30 mg/ml)

40,000 µg/ml (40 mg/ml)

50,000 µg/ml (50 mg/ml)

จากการคำนวณปริมาตรที่ต้องใช้จริง เท่ากับ 0.7 มิลลิลิตร (700 ไมโครลิตร) ต่อ 1 ความเข้มข้น

วิธีคำนวณ การเตรียมน้ำมันหอมระเหย ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร

C1 = ความเข้มข้นของ stock น้ำมันหอมระเหย 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

C2 = ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ต้องการใช้ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

V1 = ปริมาตรของน้ำมันหอมระเหยที่ต้องการใช้

V2 = ปริมาตรของน้ำมันหอมระเหย 0.7 มิลลิลิตร (700 ไมโครลิตร)

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(100)\, V_1 = (10)(0.7)$$

$$V_1 = (10)(0.7) / (100)$$

V_1 = 0.07 มิลลิลิตร หรือ 70 ไมโครลิตร

ดังนั้น ถ้าต้องการเตรียมน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ต้องดูดน้ำมันหอมระเหยจาก stock มา 70 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 630 ไมโครลิตร

เตรียมน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ต้องดูดน้ำมันหอมระเหยจาก stock มา 140 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 530 ไมโครลิตร

เตรียมน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ต้องดูดน้ำมันหอมระเหยจาก stock มา 210 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 490 ไมโครลิตร

เตรียมน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ต้องดูดน้ำมันหอมระเหยจาก stock มา 280 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 420 ไมโครลิตร

เตรียมน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ต้องดูดน้ำมันหอมระเหยจาก stock มา 350 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 350 ไมโครลิตร

↓

เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน

↓

หุ้มภาชนะด้วยแผ่นฟอยล์ เก็บในที่มืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก-1 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด และสารต้านเชื้อราที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบโดยวิธี disc diffusion บ่มนาน 3 วัน

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI242684 (มิลลิเมตร) บ่มนาน 3 วัน					
		I	II	III	V	IV	ค่าเฉลี่ย
1. กานพลู	10	-	-	-	-	-	-
	20	9.84	9.33	9.11	9.17	9.00	9.29
	30	9.00	9.40	9.04	9.00	9.17	9.12
	40	9.14	9.27	9.04	9.00	9.00	9.09
	50	9.78	9.78	9.04	11.94	9.00	9.73
2. ขิง	10	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
3. มะกรูด	10	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
4. ลูกจันทน์เทศ	10	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
5. กระถิ่นหอม	10	-	-	-	-	-	-
	20	16.07	13.34	14.23	12.13	9.00	12.95
	30	17.72	11.45	12.32	13.27	13.08	13.57
	40	14.10	15.68	13.08	10.22	13.44	13.30
	50	14.23	19.18	14.80	19.56	14.08	16.26
6. clotrimazole	0.5	22.88	19.09	19.46	20.12	17.38	19.79
7. tween 80 0.05%		-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก-2 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด และสารต้านเชื้อราที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบโดยวิธี disc diffusion บ่มนาน 7 วัน

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง *A. flavus* IMI242684 (มิลลิเมตร) บ่มนาน 7 วัน					
		I	II	III	IV	V	ค่าเฉลี่ย
1. กานพลู	10	-	-	-	-	-	-
	20	9.80	9.00	9.00	9.00	9.00	9.16
	30	9.43	9.04	9.00	9.00	9.00	9.09
	40	9.33	9.00	9.65	9.52	9.00	9.30
	50	9.01	9.00	9.00	11.18	9.00	9.44
2. ขิง	10	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
3. มะกรูด	10	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
4. ลูกจันทน์เทศ	10	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
5. กระถิ่นหอม	10	-	-	-	-	-	-
	20	14.80	11.11	13.46	11.37	9.00	11.95
	30	14.54	10.80	11.75	11.37	12.26	12.14
	40	13.59	12.38	13.14	10.73	9.00	11.77
	50	13.27	14.86	14.73	18.98	9.00	14.17
6. clotrimazole	0.5	20.55	17.12	18.71	20.03	15.38	18.36
7. tween 80 0.05%		-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีการทดสอบค่า MIC โดยวิธี Broth microdilution

1. การเตรียมสารละลายน้ำมันหอมระเหย กานพลูและกระถิ่นหอมเพื่อหาค่า MIC โดยวิธี broth microdiluton

เตรียม stock ความเข้มข้น 200,000 µg/ml (200 mg/ml)

ดูดน้ำมันหอมระเหยกานพลูและกระถิ่นหอม ชนิดละ 2 มิลลิลิตร
ซึ่งน้ำหนักกานพลูเท่ากับ 2.0108 กรัม และน้ำหนักกระถิ่นหอมเท่ากับ 2.03884 กรัม

↓

ทำการละลายด้วย 100% DMSO โดยค่อยๆ เติมลงไปและเขย่าดูการละลาย จนกระทั่งละลายทั้งหมด

บันทึกปริมาตร DMSO ที่เติมลงไป ซึ่งเมื่อคำนวณแล้ว ใน stock ไม่ควรมี DMSO เกิน 20%

↓

เติม PBS pH 7.4 ลงไปในน้ำมันที่ละลายจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

↓

กรองสารละลายน้ำมันด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

↓

Stock ที่ได้มีความเข้มข้น 200,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 20% DMSO

↓

หุ้มภาชนะด้วยแผ่นฟอยล์ เก็บในที่มืด

หมายเหตุ : เมื่อกรองแล้วเหลือปริมาตรประมาณ 7 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.การเตรียมละลายสารต้านเชื้อรา Clotrimazole เพื่อหาค่า MIC โดยวิธี broth microdiluton

เตรียม stock ความเข้มข้น 1,000 µg/ml โดยใช้ Absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย และควรมีปริมาณ Absolute ethanol ใน stock ไม่เกิน 10% เตรียมปริมาตร 10 ml

ชั่ง Clotrimazole หนัก 10 มิลลิกรัม

↓

ใช้ Absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย โดยค่อยๆ ใส่ลงไปทีละน้อย จนกระทั่งสารต้านเชื้อรา ละลายทั้งหมด

↓

เติม PBS pH 7.4 ลงไปจนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

↓

กรองสารละลายด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

↓

หุ้มภาชนะด้วยแผ่นฟอยล์ เก็บที่อุณหภูมิ –20°C

↓

Stock ที่ได้มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรประมาณ 10 มิลลิลิตร มี Absolute ethanol เท่ากับ 10%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การเตรียม stock สปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. flavus* เพื่อหาค่า MIC โดยวิธี broth microdiluton

นำ tween 80 ใส่ลงหลอดทดลองที่ทำการ streak เชื้อแล้ว

↓

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อให้หลุดออกจากผิวหน้าอาหาร

↓

กรองด้วยชุดกรองสำลี

↓

นำสปอร์แขวนลอยเชื้อราที่ได้ไปนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

↓

เขย่าให้สปอร์กระจายตัวสม่ำเสมอ

↓

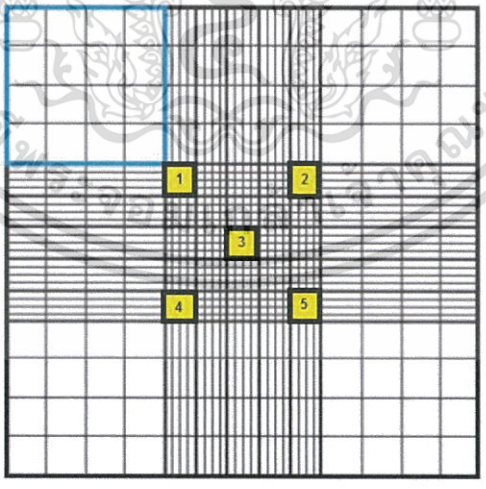
ดูดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา ปริมาตร 1 มิลลิลิตร + tween 80 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (การเจือจาง 10 เท่า) ใส่ลงหลอดทดลอง

↓

ทำการเขย่าให้เข้ากัน

↓

ดูดสปอร์แขวนลอยเชื้อราที่ทำการเจือจาง 10 เท่า หยอดลงในฮีมาไซโตมิเตอร์ นับจำนวนสปอร์ 5 ช่อง ดังภาพ



รูป ข-1 แผนภาพจำนวนช่องบนฮีมาไซโตมิเตอร์ ที่ใช้นับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* (http://www.abcam.com/protocols/counting-cells-using-a-haemocytometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นับทั้งหมด 5 ช่องเล็ก แต่ละช่องเล็กมีขนาด กว้าง 0.2 มิลลิเมตร เท่ากับ $\frac{2}{100}$ เซนติเมตร

ยาว 0.2 มิลลิเมตร เท่ากับ $\frac{2}{100}$ เซนติเมตร

หนา 0.1 มิลลิเมตร เท่ากับ $\frac{1}{100}$ เซนติเมตร

ดังนั้น ปริมาตร เท่ากับ $\frac{2}{100} \times \frac{2}{100} \times \frac{1}{100} = \frac{4}{10^6}$ ลูกบาศก์เซนติเมตร (มิลลิลิตร)

<u>การบันทึกจำนวนสปอร์แขวนลอยเชื้อรา</u>

ช่องที่	จำนวนสปอร์
1	21
2	29
3	31
4	28
5	27
รวม	136
เฉลี่ย	27.2

จากนั้นนำมาคำนวณจำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร

เมื่อทราบปริมาตรของ 1 ช่องเล็กแล้ว สามารถหาค่าจำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร ได้ดังนี้

ปริมาตร $\frac{4}{10^6}$ มิลลิลิตร นับจำนวนสปอร์ได้ 27.2 สปอร์

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นับจำนวนสปอร์ได้ $27.2 \times \frac{10^6}{4}$ สปอร์

เนื่องจากทำการเจือจางสปอร์ 10 เท่า

$\therefore$ จำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร = ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ $\times \frac{10^6}{4} \times$ dilution factor

$$= 27.2 \times \frac{10^6}{4} \times 10$$

$$= 6.8 \times 10^7 \text{ สปอร์ต่อมิลลิลิตร}$$

เมื่อทราบจำนวนสปอร์ใน stock แล้ว จึงทำการเจือจางให้มีจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ปริมาตรขึ้นอยู่กับการทดลอง) ใช้ 96-well tissue culture plate จำนวน 3 เพลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจือจางสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. flavus*

จำนวนสปอร์ใน stock มีจำนวน 6.8×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

↓

เจือจางเป็น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$6.8 \times 10^7 \times V_1 = 10^6 \times 25$$

$$V_1 = \frac{10^6 \times 25}{6.8 \times 10^7} = 0.368 \text{ มิลลิลิตร}$$

∴ ดูดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา 0.368 มิลลิลิตร และเติม PBS 25 – 0.368 = 24.632 มิลลิลิตร

↓

เขย่าให้สปอร์กระจายตัวสม่ำเสมอ

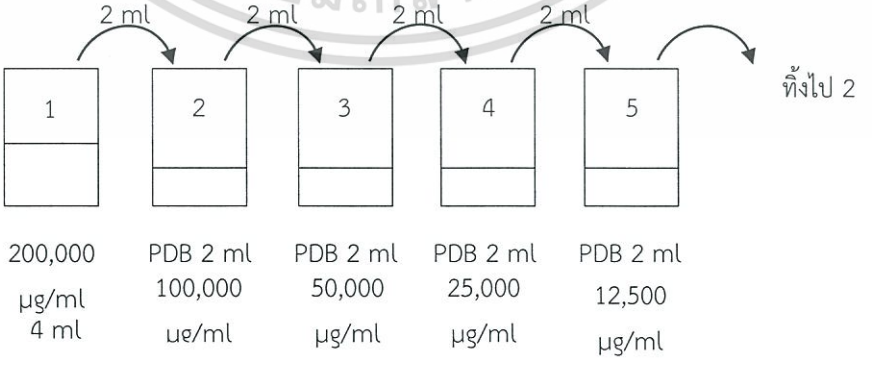
4. การเจือจางน้ำมันหอมระเหยกานพลูและกระถิ่นหอม แบบ Two-fold dilution

ความเข้มข้น 200,000 µg/ml (200 mg/ml)
100,000 µg/ml (100 mg/ml)
50,000 µg/ml (50 mg/ml)
25,000 µg/ml (25 mg/ml)
12,500 µg/ml (12.5 mg/ml)

จากการคำนวณปริมาตรที่ต้องใช้จริง เท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อ 1 ความเข้มข้น
ดังนั้น ต้องเตรียมสารความเข้มข้น 200,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

↓

จากนั้นดูดอาหาร PDB ใส่ลงในหลอดที่ 2-5 หลอดละ 2 มิลลิลิตร



รูป ข-2 การเจือจางน้ำมันหอมระเหยกานพลูและกระถิ่นหอม แบบ Two-fold dilution

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดูดสารความเข้มข้น 200,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
ใส่ลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน

↓

สารในหลอดที่ 2 ความเข้มข้น 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

↓

ดูดสารจากหลอดที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 3 ผสมให้เข้ากัน

↓

สารหลอดที่ 3 ความเข้มข้น 50,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

↓

ทำเช่นนี้จนถึงหลอดที่ 5 ความเข้มข้น 12,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

↓

ดูดสารจากหลอดที่ 5 ทิ้งไป 2 มิลลิลิตร

↓

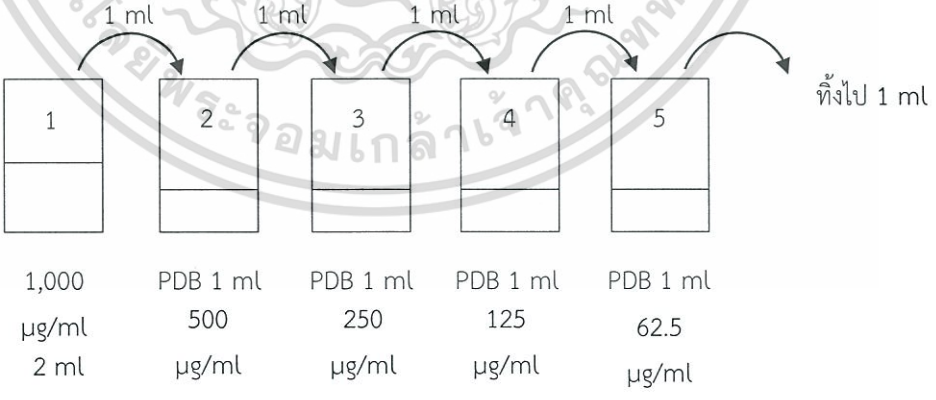
ดังนั้น แต่ละความเข้มข้นจะมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร

5. การเจือจางสารต้านเชื้อรา Clotrimazole แบบ Two-fold dilution

Stock ที่เตรียมไว้ ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

↓

เจือจาง แบบ Two-fold dilution ดังนี้



หมายเหตุ : ปริมาตรขึ้นอยู่กับการทดลอง

รูป ข-3 การเจือจางสารต้านเชื้อรา Clotrimazole

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การทดสอบค่า MIC และ MFC โดยวิธี Broth microdilution

เตรียม 96-well plate ที่ปลอดเชื้อ ชนิดก้นหลุมแบน (flat bottom) จำนวน 3 เพลท

↓

ใช้ repeater pipette ดูดสารละลายน้ำมันหอมระเหยกานพลู ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ใส่ในหลุม A2 – A6, B2 – B6 และ C2 – C6

↓

ดูดสารละลายน้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอมความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ใส่ในหลุม D2 – D6, E2 – E6 และ F2 – F6

↓

ดูดสารต้านเชื้อรา Clotrimazole ความเข้มข้น 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ใส่ในหลุม G2 – G6 และ H2 – H6

ส่วน A7 - G7 ใส่อาหาร PDB 100 ไมโครลิตร A8 - F8 ใส่อาหาร PDB+20% DMSO 100 ไมโครลิตร
G8 - H8 ใส่อาหาร PDB+20% เอทานอล 100 ไมโครลิตร A11 - H11 Blank ใส่อาหาร PDB 200 ไมโครลิตร

↓

ใช้ Autupipette ดูดสปอร์แขวนลอย (ความหนาแน่น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 µl ต่อ 1 หลุม ใส่ลงในหลุม A2 – A8, B2-B8, C2-C8, D2-D8, E2-E8, F2-F8, G2-G8, H2-H8 (A, B, C คือ น้ำมันหอมระเหยกานพลู, D, E, F คือ น้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอม G, H คือ สารต้านเชื้อรา Clotrimazole) ทำการทดสอบ 3 เพลท

↓

นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน

↓

เมื่อบ่มครบ3 วัน สังเกตความขุ่น-ใส ด้วยตาเปล่า ในแต่ละความเข้มข้น
บันทึกผลการทดลอง

↓

จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Microtiter plate reader
บันทึกผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml	12.5 mg/ml	62.5 mg/ml	control	10% DMSO			Blank	
B		100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml	12.5 mg/ml	62.5 mg/ml	control	10% DMSO			Blank	
C		100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml	12.5 mg/ml	62.5 mg/ml	control	10% DMSO			Blank	
D		100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml	12.5 mg/ml	62.5 mg/ml	control	10% DMSO			Blank	
E		100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml	12.5 mg/ml	62.5 mg/ml	control	10% DMSO			Blank	
F		100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml	12.5 mg/ml	62.5 mg/ml	control	10% DMSO			Blank	
G		0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.125 mg/ml	0.0625 mg/ml	0.03125 mg/ml	control	10% Ethanol			Blank	
H		0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.125 mg/ml	0.0625 mg/ml	0.03125 mg/ml	control	10% Ethanol			Blank	

รูปที่ ข-4 แผนผังการทดสอบค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole โดยวิธี Broth microdilution

หมายเหตุ :

- หลุมที่ไม่ใช้ในการทดสอบ
- น้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ใช้ในการทดสอบ ความเข้มข้นละ 3 หลุม
- น้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอมที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ใช้ในการทดสอบ ความเข้มข้นละ 3 หลุม
- สารต้านเชื้อรา Clotrimazole ความเข้มข้น 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ความเข้มข้นละ 2 หลุม
- Control คือ อาหาร PDB 100 ไมโครลิตร + inoculum 100 ไมโครลิตร
- อาหาร PDB+20% DMSO 100 ไมโครลิตร + inoculum 100 ไมโครลิตร
- อาหาร PDB+20% เอทานอล 100 ไมโครลิตร + inoculum 100 ไมโครลิตร
- Blank (อาหาร PDB 200 ไมโครลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณร้อยละการยับยั้งการเจริญ

	1	2 (100 มก.ต่อมล.)	3 (50 มก.ต่อมล.)	4 (25 มก.ต่อมล.)	5 (12.5 มก.ต่อมล.)	6 (6.25 มก.ต่อมล.)	7	8 (Control)	9 (10% DMSO)	10	11 (Blank)	12
A		0.214	0.630	0.720	0.773	0.417		0.563	0.509		0.113	
B		0.190	0.595	0.690	0.818	0.563		0.602	0.477		0.129	
C		0.241	0.534	0.780	0.796	0.586		0.606	0.576		0.119	
D		0.282	0.473	0.894	0.856	0.544		0.723	0.550		0.110	
E		0.503	0.584	0.960	0.827	0.498		0.827	0.467		0.115	
F		0.636	0.590	0.894	0.831	0.485		0.649	0.617		0.108	
G		0.119	0.211	0.356	0.420	0.514		0.719	0.647		0.107	
H		0.113	0.261	0.528	0.622	0.631		0.764	0.713		0.111	

0.5 มก.ต่อมล. | 0.25 มก.ต่อมล. | 0.125 มก.ต่อมล. | 0.0625 มก.ต่อมล. | 0.03125 มก.ต่อมล. | Control | 5% Ethanol | Blank

รูปที่ ข-5 ตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u>

<u>วิธีที่ 1</u>

จากแผนภาพ ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (D2-F2) เท่ากับ 0.282, 0.503 และ 0.636 นำมาลบด้วยค่า Blank (D11-F11) 0.110, 0.115 และ 0.108

0.282 (OD หลุม D2) – 0.110 (OD หลุม D11) = 0.172

0.503 (OD หลุม E3) – 0.115 (OD หลุม E11) = 0.388

0.636 (OD หลุม F2) – 0.108 (OD หลุม F11) = 0.528

จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ย ดังนี้ (0.172 + 0.388 + 0.528) / 3 เท่ากับ 0.362

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากแผนภาพ ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของ Control (D8-F8) เท่ากับ 0.723, 0.827, และ 0.649 และค่า OD ของ Blank (D11-F11) เท่ากับ 0.110, 0.115 และ 0.108

0.723 (OD หลุม D8) – 0.110 (OD หลุม D11) = 0.613

0.827 (OD หลุม E8) – 0.115 (OD หลุม E11= 0.712

0.649 (OD หลุม F8) – 0.108 (OD หลุม F118) = 0.514

จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ย ดังนี้ (0.613 + 0.712 + 0.514) / 3 = 0.613

คำนวณ ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดังนี้

จากสูตร ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา = $\frac{A - B}{A} \times 100$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของ Control

B = ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสิ่งทดลอง

ดังนั้น ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา = $\frac{0.613 - 0.362}{0.613} \times 100$

= 40.94

<u>วิธีที่ 2</u>

จากแผนภาพ ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสารที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (D2-F2) เท่ากับ 0.282, 0.503 และ 0.636 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.474 ส่วนค่า Blank (D11-F11) 0.110, 0.115 และ 0.108 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.111 และ Control (D8-F8) ค่าการดูดกลืนแสง (OD) เท่ากับ 0.723, 0.827, และ 0.649 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.733

ค่าเฉลี่ย OD ของสาร - ค่าเฉลี่ย OD ของ Blank = 0.474 - 0.111 = 0.363

ค่าเฉลี่ย OD ของ Control - ค่าเฉลี่ย OD ของ Blank = 0.733 - 0.111 = 0.622

คำนวณ ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดังนี้

จากสูตร ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา = $\frac{A - B}{A} \times 100$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสง (OD) Control (อาหาร PDB+inoculum)

B = ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของ ของสิ่งทดลอง

ดังนั้น ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา = $\frac{0.622 - 0.363}{0.622} \times 100$

= 41.639

หมายเหตุ : สำหรับโครงงานพิเศษ ใช้วิธีที่ 2 ในการคำนวณ ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ด้วยโปรแกรม Excel

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0.214	0.630	0.720	0.773	0.417		0.563	0.509		0.113	
B		0.190	0.595	0.690	0.818	0.563		0.602	0.477		0.129	
C		0.241	0.534	0.780	0.796	0.586		0.606	0.576		0.119	
D		0.282	0.473	0.894	0.856	0.544		0.723	0.550		0.110	
E		0.503	0.584	0.960	0.827	0.498		0.827	0.467		0.115	
F		0.636	0.590	0.894	0.831	0.485		0.649	0.617		0.108	
G		0.119	0.211	0.356	0.420	0.514		0.719	0.647		0.107	
H		0.113	0.261	0.528	0.622	0.631		0.764	0.713		0.111	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0.224	0.647	0.721	0.824	0.525		0.564	0.563		0.106	
B		0.207	0.537	0.720	0.842	0.651		0.552	0.480		0.138	
C		0.215	0.557	0.828	0.861	0.589		0.625	0.514		0.179	
D		0.266	0.598	0.916	0.862	0.525		0.644	0.431		0.181	
E		0.451	0.597	1.044	0.873	0.534		0.602	0.484		0.180	
F		0.299	0.760	0.976	0.859	0.514		0.643	0.594		0.180	
G		0.110	0.202	0.310	0.466	0.554		0.741	0.636		0.194	
H		0.102	0.293	0.560	0.529	1.007		0.787	0.650		0.153	

รูปที่ ข-6 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ในการทดสอบค่า MIC ของกานพลู กระถิ่นหอม และ Clotrimazole โดยวิธี broth mcrodilution ซ้ำที่ 1 (รูปบน) และ ซ้ำที่ 2 (รูปล่าง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0.377	0.619	0.693	0.760	0.409		0.520	0.618		0.118	
B		0.274	0.669	0.655	0.769	0.515		0.511	0.344		0.125	
C		0.450	0.580	0.754	0.786	0.542		0.655	0.525		0.122	
D		0.296	0.404	0.862	0.813	0.446		0.604	0.338		0.121	
E		0.269	0.624	0.859	0.821	0.489		0.782	0.406		0.140	
F		0.314	0.495	0.777	0.811	0.459		0.746	0.333		0.140	
G		0.103	0.124	0.288	0.429	0.499		0.735	0.637		0.121	
H		0.103	0.219	0.555	0.695	0.493		0.835	0.634		0.109	

รูปที่ ข-7 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ในการทดสอบค่า MIC ของกานพลู กระถินหอม และ Clotrimazole โดยวิธี broth mcrodilution ซ้ำที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข-1 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ในการทดสอบค่า MIC ของกานพลู กระถิ่นหอม และ Clotrimazole โดยวิธี broth mcrodilution เมื่อบ่มนาน 3 วัน (ซ้ำที่ 1)

น้ำมันหอมระเหยและสารต้านเชื้อรา	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	OD_{620}			ค่าเฉลี่ย	ค่า OD หลังจากลบ OD blank	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*
		I	II	III			
กานพลู	0 (control)	0.563	0.602	0.606	0.590	0.470	0.000
	6.25	0.417	0.563	0.586	0.522	0.402	14.539
	12.5	0.773	0.818	0.796	0.796	0.675	-43.688
	25	0.720	0.690	0.780	0.730	0.610	-29.716
	50	0.630	0.595	0.534	0.586	0.466	0.851
	100	0.214	0.190	0.241	0.215	0.095	79.858
	10% DMSO	0.509	0.477	0.576	0.521	0.400	14.823
	blank	0.113	0.129	0.119	0.120	-	-
กระถิ่นหอม (กระถิ่นหอมเทศ)	0 (control)	0.723	0.827	0.649	0.733	0.622	0.000
	6.25	0.544	0.498	0.485	0.509	0.398	36.013
	12.5	0.856	0.827	0.831	0.838	0.727	-16.881
	25	0.894	0.960	0.894	0.916	0.805	-29.421
	50	0.473	0.584	0.590	0.549	0.438	29.582
	100	0.282	0.503	0.636	0.474	0.363	41.693
	10% DMSO	0.550	0.467	0.617	0.545	0.434	30.279
	blank	0.110	0.115	0.108	0.111	-	-
Clotrimazole	0 (control)	0.719	0.764	-	0.742	0.633	0.000
	0.03125	0.514	0.631	-	0.573	0.464	26.719
	0.0625	0.420	0.622	-	0.521	0.412	34.862
	0.125	0.356	0.528	-	0.442	0.333	47.352
	0.25	0.211	0.261	-	0.236	0.127	79.921
	0.5	0.119	0.113	-	0.116	0.007	98.893
	10% Ethanol	0.647	0.713	-	0.680	0.571	9.723
	blank	0.107	0.111	-	0.109	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข-2 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ในการทดสอบค่า MIC ของกานพลู กระถิ่นหอม และ Clotrimazole โดยวิธี broth mcrodilution เมื่อบ่มนาน 3 วัน (ซ้ำที่ 2)

น้ำมันหอมระเหยและสารต้านเชื้อรา	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	OD_{620}			ค่าเฉลี่ย	ค่า OD หลังจากลบ OD blank	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*
		I	II	III			
กานพลู	0 (control)	0.564	0.552	0.625	0.580	0.439	0.000
	6.25	0.525	0.651	0.589	0.588	0.447	-1.821
	12.5	0.824	0.842	0.861	0.842	0.701	-59.636
	25	0.721	0.720	0.828	0.756	0.615	-40.061
	50	0.647	0.537	0.557	0.580	0.439	0.000
	100	0.224	0.207	0.215	0.215	0.074	83.080
	10% DMSO	0.563	0.480	0.514	0.519	0.378	13.961
	blank	0.106	0.138	0.179	0.141	-	-
กระถิ่นหอม (กระถิ่นหอมเทศ)	0 (control)	0.644	0.602	0.643	0.630	0.449	0.000
	6.25	0.525	0.534	0.514	0.524	0.344	23.442
	12.5	0.862	0.873	0.859	0.865	0.684	-52.300
	25	0.916	1.044	0.976	0.979	0.798	-77.671
	50	0.598	0.597	0.760	0.652	0.471	-4.896
	100	0.266	0.451	0.299	0.339	0.158	64.763
	10% DMSO	0.431	0.484	0.594	0.503	0.323	28.190
	blank	0.181	0.180	0.180	0.180	-	-
Clotrimazole	0 (control)	0.741	0.787	-	0.764	0.591	0.000
	0.03125	0.554	1.007	-	0.781	0.607	-2.794
	0.0625	0.466	0.529	-	0.498	0.324	45.131
	0.125	0.310	0.560	-	0.435	0.262	55.712
	0.25	0.202	0.293	-	0.248	0.074	87.468
	0.5	0.110	0.102	-	0.106	-0.068	111.431
	10% Ethanol	0.636	0.650	-	0.643	0.470	20.491
	blank	0.194	0.153	-	0.174	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข-3 ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ในการทดสอบค่า MIC ของกานพลู กระถิ่นหอม และ Clotrimazole โดยวิธี broth mcrodilution เมื่อบ่มนาน 3 วัน (ซ้ำที่ 3)

น้ำมันหอมระเหยและสารต้านเชื้อรา	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	OD_{620}			ค่าเฉลี่ย	ค่า ODหลังจากลบ OD blank	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*
		I	II	III			
กานพลู	0 (control)	0.520	0.511	0.655	0.562	0.440	0.000
	6.25	0.409	0.515	0.542	0.489	0.367	16.654
	12.5	0.760	0.769	0.786	0.772	0.650	-47.615
	25	0.693	0.655	0.754	0.701	0.579	-31.491
	50	0.619	0.669	0.580	0.623	0.501	-13.777
	100	0.377	0.274	0.450	0.367	0.245	44.285
	10% DMSO	0.618	0.344	0.525	0.496	0.374	15.064
	blank	0.118	0.125	0.122	0.122	-	-
กระถิ่นหอม (กระถิ่นหอมเทศ)	0 (control)	0.604	0.782	0.746	0.711	0.577	0.000
	6.25	0.446	0.489	0.459	0.465	0.331	42.634
	12.5	0.813	0.821	0.811	0.815	0.681	-18.082
	25	0.862	0.859	0.777	0.833	0.699	-21.144
	50	0.404	0.624	0.495	0.508	0.374	35.182
	100	0.296	0.269	0.314	0.293	0.159	72.386
	10% DMSO	0.388	0.406	0.333	0.359	0.225	60.947
	blank	0.121	0.140	0.140	0.134	-	-
Clotrimazole	0 (control)	0.735	0.835	-	0.785	0.670	0.000
	0.03125	0.499	0.493	-	0.496	0.381	43.134
	0.0625	0.429	0.695	-	0.562	0.447	33.284
	0.125	0.288	0.555	-	0.422	0.307	54.254
	0.25	0.124	0.219	-	0.172	0.057	91.567
	0.5	0.103	0.103	-	0.103	-0.012	101.791
	10% Ethanol	0.637	0.634	-	0.636	0.521	22.313
	blank	0.121	0.109	-	0.115	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
ตารางผลการวิจัย

ตารางผนวกที่ ค-1 ร้อยละการยับยั้งของกานพลู กระถิ่นหอม และ Clotrimazole ที่มีต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 เมื่อบ่มนาน 3 วัน (ทดสอบวิธี broth microdilution)

น้ำมันหอมระเหยและสารต้านเชื้อรา	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการยับยั้ง			ค่าเฉลี่ย* ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		I	II	III	
กานพลู	0 (Medium+spores)	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00^{hi}
	10% DMSO (Medium+DMSO+spores)	14.82	13.96	15.06	14.61 ± 0.58^{ghi}
	6.25	14.54	-1.82	16.65	9.79 ± 10.11^{hi}
	12.5	-43.69	-59.64	-47.62	-50.32 ± 8.31^{j}
	25	-29.72	-40.06	-31.49	-33.76 ± 5.53^{j}
	50	0.85	0.00	-13.78	-4.31 ± 8.21^{i}
	100	79.86	83.08	44.28	69.07 ± 21.53^{bc}
กระถิ่นหอม (กระถิ่นหอมเทศ)	0 (Medium+spores)	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00^{hi}
	10% DMSO (Medium+DMSO+spores)	30.28	28.19	60.95	39.81 ± 18.34^{def}
	6.25	36.01	23.44	42.63	34.03 ± 9.75^{efg}
	12.5	-16.88	-52.30	-18.08	-29.09 ± 20.11^{j}
	25	-29.42	-77.67	-21.14	-42.74 ± 30.53^{j}
	50	29.58	-4.90	35.18	19.95 ± 21.70^{fgh}
	100	41.69	64.76	72.39	59.61 ± 15.98^{cd}
Clotrimazole	0 (Medium+spores)	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00^{hi}
	10% Ethanol (Medium+Ethanol+spores)	9.72	20.49	22.31	17.51 ± 6.80^{fghi}
	0.03125	26.72	-7.94	43.13	20.64 ± 26.07^{fgh}
	0.0625	34.86	45.13	33.28	37.76 ± 6.43^{def}
	0.125	47.35	55.72	54.25	52.44 ± 4.47^{cde}
	0.25	79.92	87.47	91.57	86.32 ± 5.91^{ab}
	0.5	98.89	111.43	101.79	104.04 ± 6.56^{a}

*ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ค-2 ค่าความเข้มข้นของกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole ที่ยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus* IMI 242684 ได้ร้อยละ 50 (MIC_{50}) เมื่อบ่มนาน 3 วัน (ทดสอบวิธี broth microdilution)

ชนิดของสาร	MIC_{50} (mg/ml)			MIC_{50}* (GraphPad Prism 5)
	I	II	III	
กานพลู	86.58	84.92	>100	91.19
กระถิ่นหอม	>100	83.72	63.99	76.41
Clotrimazole	0.14	0.07	0.12	0.11

*หมายเหตุ: MIC_{50} คำนวณจากค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งของทุกความเข้มข้นของสาร (ตารางผนวก ค-1) และใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5 คำนวณค่า MIC_{50} โดยประมาณ

สรุปค่า MIC_{50} ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู และกระถิ่นหอม มีค่าเท่ากับ 91.19 และ 76.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน Clotrimazole ค่า MIC_{50} เท่ากับ 0.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่าดังกล่าวใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5 ในการคำนวณ แสดงว่าน้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอม (MIC_{50} = 76.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มีฤทธิ์ยับยั้ง *Aspergillus flavus* IMI 242684 ได้ดีกว่ากานพลู (MIC_{50} = 91.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งต้องใช้ความเข้มข้นสูงมากจึงจะยับยั้งเชื้อราได้ร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับสารต้านเชื้อรา Clotrimazole ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Aspergillus flavus* IMI 242684 ได้ดีที่สุด (MIC_{50} = 0.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตารางผนวกที่ ค-3 ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole โดยวิธี broth microdilution method (Espinel-Ingroff *et al.*, 2002)

ชนิดของสาร	MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			MIC เฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
	I	II	III	
กานพลู	>100	>100	>100	>100
กระถิ่นหอม	>100	>100	>100	>100
Clotrimazole	0.5	0.5	0.5	0.5

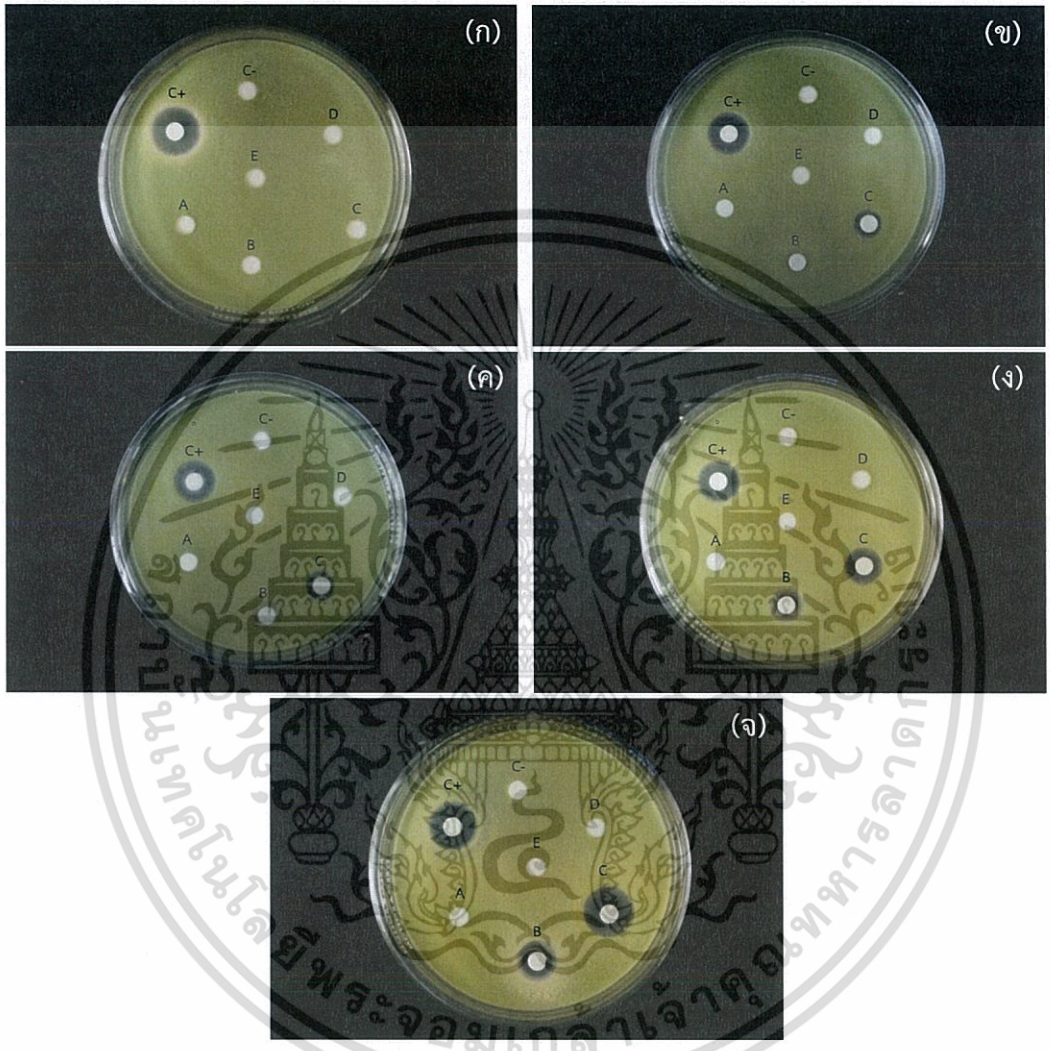
จากการทดสอบค่า MIC โดยวิธี microbroth dilution และทำการตรวจดูความใสและขุ่น ด้วยตาเปล่า พบว่า หลุมที่ใส่สารละลายน้ำมันหอมระเหยกานพลู และกระถิ่นหอม ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความขุ่น ส่วนสารต้านเชื้อรา Clotrimazole หลุมที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความใส และจากการคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* (ตารางผนวกที่ ค-1) ของกานพลูและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระถิ่นหอม พบว่าที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการยับยั้งเฉลี่ย 69.07±21.53 และ 59.61±15.98 ตามลำดับ ส่วนสารต้านเชื้อรา Clotrimazole ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการยับยั้งเฉลี่ย 104.04±6.56 สรุปว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูและกระถิ่นหอม มีค่า MIC > 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารต้านเชื้อรา Clotrimazole มีค่า MIC = 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

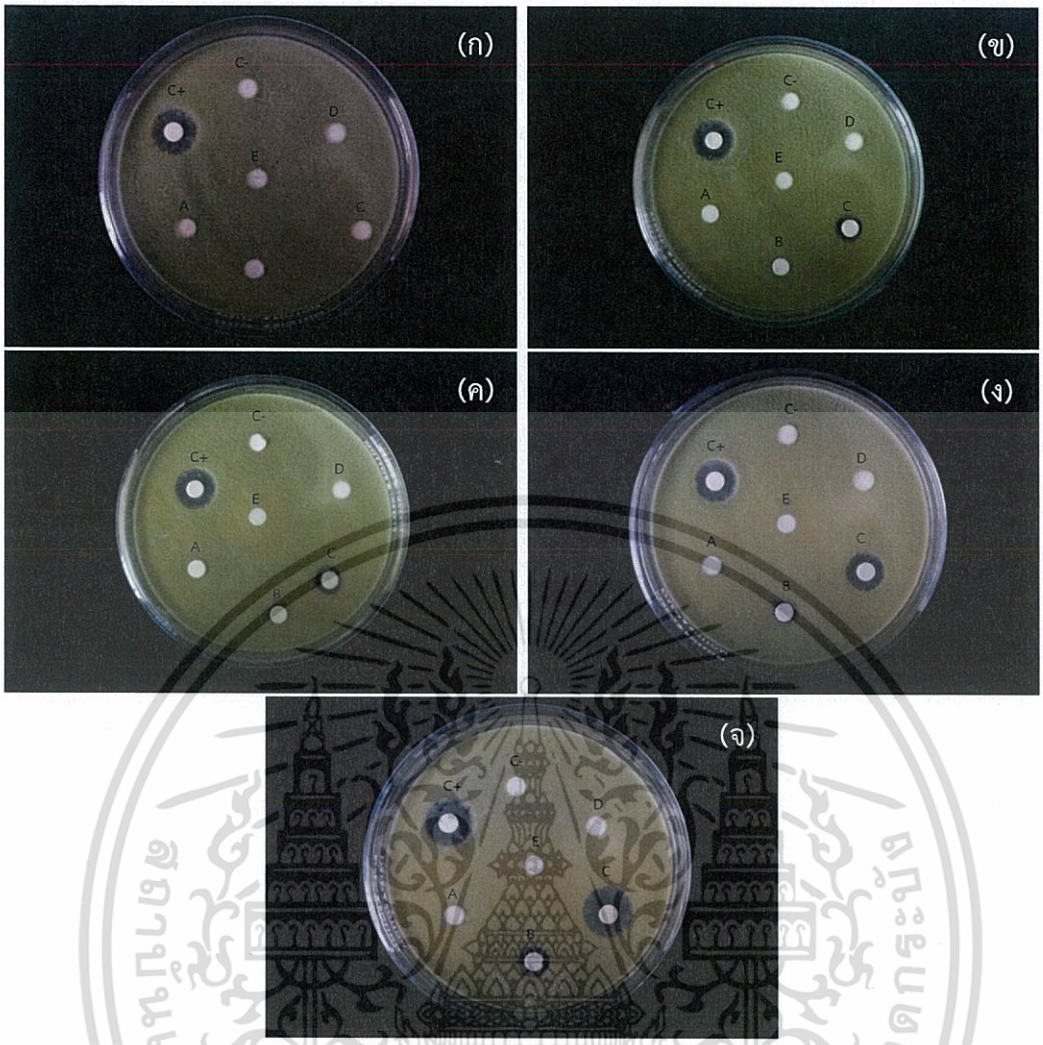
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
ภาพการทดสอบ Agar disc diffusion และ Broth microdilution



รูปที่ ง-1 บริเวณยับยั้ง (clear zone) ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 จากสารสกัดน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 3 วัน

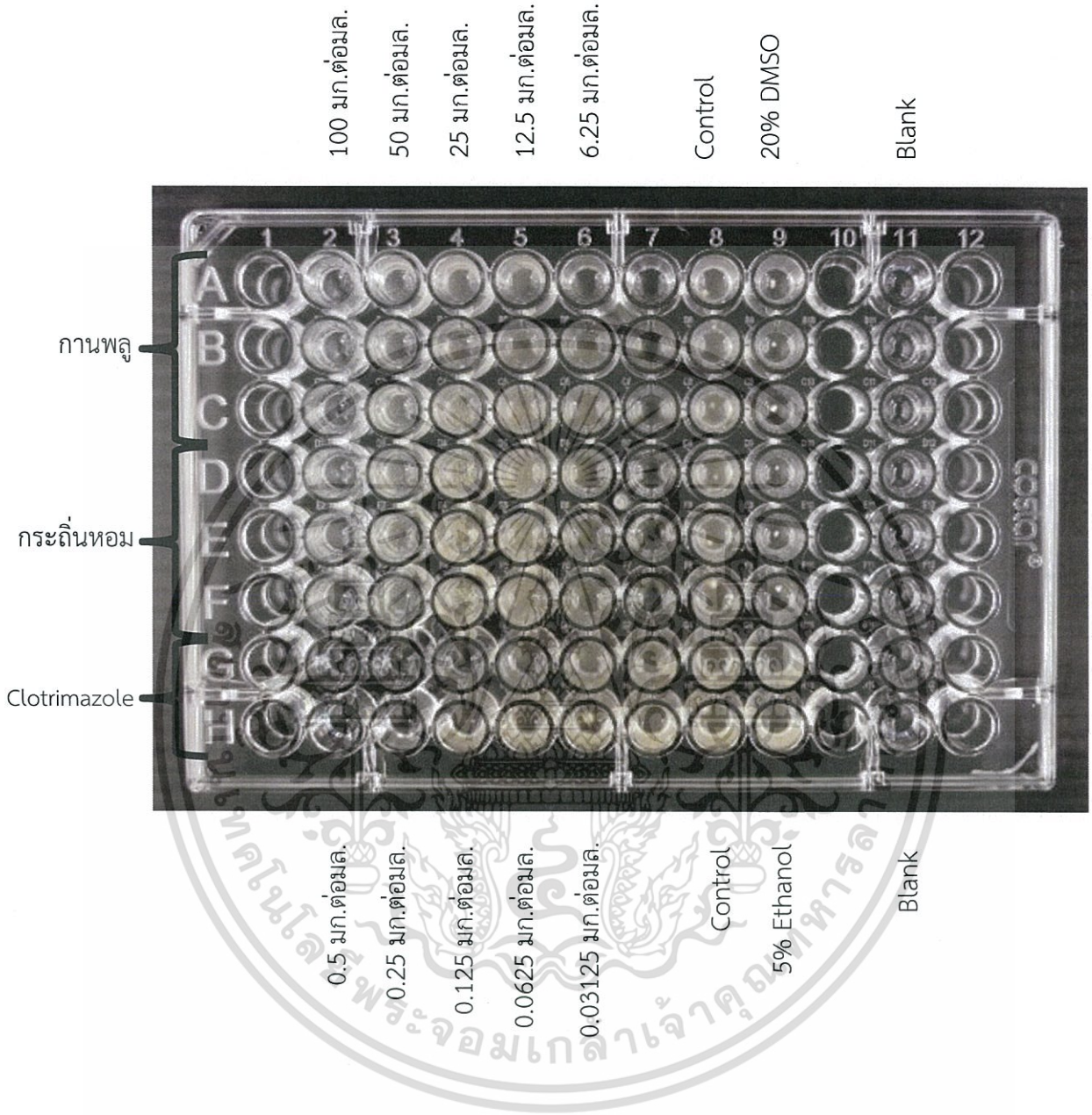
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง-2 บริเวณยับยั้ง (clear zone) ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 จากสารสกัดน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน

หมายเหตุ : ก) คือจานเพาะเลี้ยงที่มีระดับความเข้มข้นของสารสกัดน้ำมันหอมระเหย 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ข) คือจานเพาะเลี้ยงที่มีระดับความเข้มข้นของสารสกัดน้ำมันหอมระเหย 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ค) คือจานเพาะเลี้ยงที่มีระดับความเข้มข้นของสารสกัดน้ำมันหอมระเหย 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ง) คือจานเพาะเลี้ยงที่มีระดับความเข้มข้นของสารสกัดน้ำมันหอมระเหย 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
จ) คือจานเพาะเลี้ยงที่มีระดับความเข้มข้นของสารสกัดน้ำมันหอมระเหย 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
C- คือ 0.05% tween80
C+ คือยาปฏิชีวนะ Clotrimazole ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
A คือสารสกัดน้ำมันหอมระเหยขิงที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ
B คือสารสกัดน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ
C คือสารสกัดน้ำมันหอมระเหยกระถิ่นหอมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ
D คือสารสกัดน้ำมันหอมระเหยมะกรูดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ
E คือสารสกัดน้ำมันหอมระเหยลูกจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง-3 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ที่ระยะเวลา 3 วัน โดยวัดความขุ่น–ใสด้วยตาเปล่าและวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ของน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิด โดยวิธี disc diffusion

จากข้อมูลดิบในตารางผนวกที่ ก-1 (หน้า 31) และตารางผนวกที่ ก-2 (หน้า 32) ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด และสารต้านเชื้อราที่ความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบโดยวิธี disc diffusion บ่มนาน 3 วัน และ 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ สุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง โดยวิธี Fisher's Least Significant Difference โปรแกรมที่ใช้คำนวณคือ Mintab 17.0 (บุญเรียง,2542) กำหนดค่า $\alpha = 0.05$

การตั้งสมมติฐาน

H_0 : ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด ไม่มีปัจจัยร่วมระหว่างชนิดของสาร ความเข้มข้น และระยะเวลาบ่ม

H_1 : ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด มีปัจจัยร่วมระหว่างชนิดของสาร ความเข้มข้น และระยะเวลาบ่ม

C1 = น้ำมันหอมระเหย

โดย 1 = น้ำมันหอมระเหยขิง
2 = น้ำมันหอมระเหยกานพลู
3 = น้ำมันหอมระเหยกระถินหอม
4 = น้ำมันหอมระเหยมะกรูด
5 = น้ำมันหอมระเหยลูกจันทน์เทศ

C2 = วันที่ทำการตรวจสอบผลการทดลอง (วันที่ 3 และวันที่ 7)

C3 = ความเข้มข้น

General Linear Model: C4 versus C1, C2, C3

Factor	Type	Levels	Values
C1	Fixed	5	1, 2, 3, 4, 5
C2	Fixed	2	1, 2
C3	Fixed	5	1, 2, 3, 4, 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ จ-1 ตารางการวิเคราะห์ความแปรปรวน ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* ของน้ำมันหอมระเหย ขิง กานพลู กระถิ่นหอม มะกรูด ลูกจันทน์เทศ บ่มนาน 72 และ 168 ชั่วโมง (disc diffusion)

ANOVA

Source	DF	Adj. SS	Adj. MS	F-Value	P-Value
C1	4	6138.91	1534.73	1397.29	0.000
C2	1	58.33	58.33	53.11	0.000
C3	4	304.74	76.19	69.36	0.000
C1*C2	4	94.56	23.64	21.52	0.000
C1*C3	16	532.24	33.26	30.29	0.000
C2*C3	4	108.64	27.16	24.73	0.000
C1*C2*c3	16	165.33	10.33	9.41	0.000
Error	200	219.32	1.10		
Total	249	7622.44			

Model Summary

S	R-sq	R-sq (adj)	R-sq (pred)
1.04803	97.12%	96.41%	95.50%

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ค่า p = 0.00 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า α = 0.05 ที่กำหนด จึงปฏิเสธ H_0 จึงปฏิเสธ H_0 แสดงว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด ขึ้นอยู่กับปัจจัยร่วมระหว่างชนิดของสาร ความเข้มข้น และระยะเวลาบ่ม ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง โดยวิธี Fisher's Least Significant Difference ดังนี้

Fisher Pairwise Comparisons: Response = C4, Term = C1*C2*C3

Grouping Information Using **Fisher LSD Method** and 95% Confidence

C1	*C2	*C3	N	Mean	Grouping
3	1	5	5	15.760	A
3	2	5	5	14.168	B
3	1	3	5	13.748	B
3	1	4	5	13.304	B C
3	1	2	5	12.954	B C D
3	2	3	5	12.148	C D
3	2	2	5	11.948	D
3	2	4	5	11.768	D
2	1	5	5	9.908	E
2	2	5	5	9.438	E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2	2	4	5	9.300	E	
2	1	2	5	9.290	E	
2	2	2	5	9.160	E	
2	1	3	5	9.122	E	
2	2	3	5	9.094	E	
2	1	4	5	9.090	E	
2	1	1	5	9.000	E	
3	1	1	5	9.000	E	
1	2	5	5	0.000		F
1	1	5	5	0.000		F
1	2	4	5	0.000		F
5	1	1	5	0.000		F
1	1	4	5	0.000		F
1	2	2	5	0.000		F
1	1	2	5	0.000		F
1	2	3	5	0.000		F
5	1	5	5	0.000		F
1	1	3	5	0.000		F
5	1	2	5	0.000		F
5	1	3	5	0.000		F
5	2	1	5	0.000		F
5	1	4	5	0.000		F
5	2	2	5	0.000		F
5	2	4	5	0.000		F
4	1	5	5	0.000		F
5	2	3	5	0.000		F
4	1	2	5	0.000		F
4	1	4	5	0.000		F
4	2	3	5	0.000		F
4	1	3	5	0.000		F
1	1	1	5	0.000		F
5	2	5	5	-0.000		F
4	2	4	5	-0.000		F
4	2	2	5	-0.000		F
1	2	1	5	-0.000		F
4	2	5	5	-0.000		F
4	1	1	5	-0.000		F
4	2	1	5	-0.000		F

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2	2	1	5	-0.000	F
3	2	1	5	-0.000	F

Means that do not share a letter are significantly different.

ตารางผนวกที่ จ-2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด และสารต้านเชื้อรา ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มนาน 3 วัน และ 7 วัน ทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา* *A. flavus* IMI242684 (มิลลิเมตร)	
		บ่มนาน 3 วัน	บ่มนาน 7 วัน
1.กานพลู	10	0^{f}	0^{f}
	20	9.29^{e}	9.16^{e}
	30	9.12^{e}	9.09^{e}
	40	9.09^{e}	9.30^{e}
	50	9.73^{e}	9.44^{e}
2.ขิง	10	0^{f}	0^{f}
	20	0^{f}	0^{f}
	30	0^{f}	0^{f}
	40	0^{f}	0^{f}
	50	0^{f}	0^{f}
3.มะกรูด	10	0^{f}	0^{f}
	20	0^{f}	0^{f}
	30	0^{f}	0^{f}
	40	0^{f}	0^{f}
	50	0^{f}	0^{f}
4. ลูกจันทน์เทศ	10	0^{f}	0^{f}
	20	0^{f}	0^{f}
	30	0^{f}	0^{f}
	40	0^{f}	0^{f}
	50	0^{f}	0^{f}
5.กระถิ่นหอม	10	0^{f}	0^{f}
	20	12.95^{bcd}	11.95^{d}
	30	13.57^{b}	12.14^{cd}
	40	13.30^{bc}	11.77^{d}
	50	16.26^{a}	14.17^{b}

*ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์ร้อยละการยับยั้งของกานพลู กระถิ่นหอม และ Clotrimazole ที่มีต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 เมื่อบ่มนาน 3 วัน โดยวิธี Broth microdilution

จากข้อมูลดิบ ตารางผนวกที่ ค-1 (หน้า 50) นำมาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน ร้อยละการยับยั้งที่มีต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole หลังจากบ่มนาน 3 วัน แผนการทดลองที่ใช้ในการวิจัย คือ แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง โดยวิธี Fisher's least significant difference (Fisher LSD) และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab กำหนดค่า α = 0.05

การตั้งสมมติฐาน

H_0 : ร้อยละการยับยั้งของกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazone ที่มีต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* ไม่มีปัจจัยร่วมระหว่างชนิดของสารกับความเข้มข้น

H_1 : ร้อยละการยับยั้งของกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazone ที่มีต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* มีปัจจัยร่วมระหว่างชนิดของสารกับความเข้มข้น

C1 = น้ำมันหอมระเหย และ Clotrimazole
C2 = ความเข้มข้น

General Linear Model: C3 versus C1, C2

Factor	Type	Levels	Values
C1	Fixed	3	1, 2, 3
C2	Fixed	7	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

ตารางผนวกที่ จ-3 ตารางการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน ร้อยละการยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole ที่มีต่อเชื้อรา *Aspergillus* บ่มนาน 3 วัน

ANOVA

Source	DF	Adj. SS	Adj. MS	F-Value	F-Value
C1	2	22918	11458.9	58.79	0.000
C2	6	52724	8787.9	45.08	0.000
C1*C2	12	24845	2070.5	10.62	0.000
Error	42	8187	194.9		
Total	62	108674			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
13.9613	92.47%	92.47%	83.05%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน ร้อยละการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* ของน้ำมันหอมระเหยกานพลู กระถิ่นหอม และสารต้านเชื้อรา Clotrimazole หลังจากบ่มนาน 3 วัน ค่า p = 0.00 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า α = 0.05 ที่กำหนด จึงปฏิเสธ H_0 แสดงว่า ร้อยละการยับยั้งของกานพลู กระถิ่นหอม และ Clotrimazone ที่มีต่อ เชื้อรา *Aspergillus flavus* มีปัจจัยร่วมระหว่างชนิดของสารกับความเข้มข้น จึงดำเนินการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยวิธีโดยวิธี Fisher's least significant difference (Fisher LSD) ต่อไป ดังนี้

Fisher Pairwise Comparisons: Response = C3, Term = C1*C2

Grouping Information Using Fisher LSD Method and 95% Confidence

C1	*C2	N	Mean	Grouping
3	7	3	104.037	A
3	6	3	86.320	A B
1	7	3	69.073	B C
2	7	3	59.613	C D
3	5	3	52.440	C D E
2	2	3	39.807	D E F
3	4	3	37.757	D E F
2	3	3	34.027	E F G
3	3	3	20.637	F G H
2	6	3	19.953	F G H
3	2	3	17.507	F G H I
1	2	3	14.613	G H I
1	3	3	9.790	H I
3	1	3	-0.000	H I
1	1	3	-0.000	H I
2	1	3	-0.000	H I
1	6	3	-4.310	I
2	4	3	-29.087	J
1	5	3	-33.757	J
2	5	3	-42.743	J
1	4	3	-50.317	J

Means that do not share a letter are significantly different.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ จ-4 การเปรียบทียบร้อยละการยับยั้งของกานพลู กระถิ่นหอม และ Clotrimazole ที่มีต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 เมื่อบ่มนาน 3 วัน

น้ำมันหอมระเหยและสารต้านเชื้อรา	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการยับยั้ง			ค่าเฉลี่ย* ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		I	II	III	
กานพลู	0 (Medium+spores)	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00^{hi}
	10% DMSO (Medium+DMSO+spores)	14.82	13.96	15.06	14.61 ± 0.58^{ghi}
	6.25	14.54	-1.82	16.65	9.79 ± 10.11^{hi}
	12.5	-43.69	-59.64	-47.62	-50.32 ± 8.31^{j}
	25	-29.72	-40.06	-31.49	-33.76 ± 5.53^{j}
	50	0.85	0.00	-13.78	-4.31 ± 8.21^{i}
	100	79.86	83.08	44.28	69.07 ± 21.53^{bc}
กระถิ่นหอม (กระถิ่นหอมเทศ)	0 (Medium+spores)	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00^{hi}
	10% DMSO (Medium+DMSO+spores)	30.28	28.19	60.95	39.81 ± 18.34^{def}
	6.25	36.01	23.44	42.63	34.03 ± 9.75^{efg}
	12.5	-16.88	-52.30	-18.08	-29.09 ± 20.11^{j}
	25	-29.42	-77.67	-21.14	-42.74 ± 30.53^{j}
	50	29.58	-4.90	35.18	19.95 ± 21.70^{fgh}
	100	41.69	64.76	72.39	59.61 ± 15.98^{cd}
Clotrimazole	0 (Medium+spores)	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00^{hi}
	10% Ethanol (Medium+Ethanol+spores)	9.72	20.49	22.31	17.51 ± 6.80^{fghi}
	0.03125	26.72	-7.94	43.13	20.64 ± 26.07^{fgh}
	0.0625	34.86	45.13	33.28	37.76 ± 6.43^{def}
	0.125	47.35	55.72	54.25	52.44 ± 4.47^{cde}
	0.25	79.92	87.47	91.57	86.32 ± 5.91^{ab}
	0.5	98.89	111.43	101.79	104.04 ± 6.56^{a}

*ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ
สมุนไพร

กานพลู

รูปที่ ฉ-1 กานพลู
(ที่มา; http://www.manager.co.th/Marsmag/ViewNews.aspx?NewsID=9560000129296)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Eugenia caryophyllus* Bullock & Harrison
วงศ์ : Myrtaceae
ลักษณะทั่วไป :

พืชยืนต้น ขนาดสูงประมาณ 4-8 เมตร ใบเดี่ยว ผิวใบเรียบเป็นมัน มีกลิ่นหอม ดอกออกเป็นกระจุกสีเขียวอมแดงหรือขาวอมเขียว กลีบดอกร่วงง่าย ผลสีน้ำตาลเข้มผิวเรียบเป็นมัน

แหล่งที่พบ : พืชพื้นเมืองของหมู่เกาะมะละกา และนำไปปลูกทั่วไปในมาเลเซีย สาตรา อัฟริกา

สรรพคุณ : ดอกตูม มีรสเผ็ด ใช้เป็นยาแก้โลหิตเป็นพิษ ปวดท้อง เหน็บขาปวดฟัน ดับกลิ่นปาก หืด ละลายเสมหะ ขับน้ำคาวปลา แก้ท้องขึ้น ขับลมในลำไส้ แก้ปวดท้อง และใช้เป็นเครื่องเทศ (นันทวัน, 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระถิ่นหอม

รูปที่ ฉ-2 กระถิ่นหอม
(ที่มา; https://backwaterbotanics.wordpress.com/2014/05/22/cinnamon-cinnamomum-verum/)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Cinnamomum Cassia*
วงศ์ : Lauraceae
ลักษณะทั่วไป :

ไม้ยืนต้นขนาดสูงประมาณ 5-8 เมตร ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม มีเส้นใบหลัก 3 เส้น เปลือกต้นและใบมีกลิ่นหอม ดอกช่อออกตามซอกใบและปลายกิ่ง ดอกย่อยมีขนาดเล็ก กลีบดอกสีเหลืองนวล ผลสด
แหล่งที่พบ : ถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในทวีปเอเชีย ได้แก่ ศรีลังกา จีน อินโดนีเซีย เวียดนาม
สรรพคุณ : เปลือกต้น ปรุงผสมเป็นยาหอม ยานัตถุ์ ช่วยแก้อาการอ่อนเพลีย จุกเสียด แน่นท้อง ละทำให้สดชื่น ใช้แต่งกลิ่นยาและอาหาร เครื่องดื่ม (นันทวัน, 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขิง

รูปที่ ฉ-3 ขิง

(ที่มา; http://www.thaihealth.or.th/Content/27858-%60ขิง %60%20สมุนไพรไทยแก้คลื่นไส้.html)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Zingiber officinale Roscoe*

วงศ์ : Zingiberaceae

ลักษณะทั่วไป :

พืชล้มลุกมีเหง้าอยู่ใต้ดิน ขนาดสูงประมาณ 60-100 เซนติเมตร ใบเดี่ยวออกสลับกันเป็นสองแถว ก้านใบยาวห่อหุ้มลำต้น ของใบเรียบ ดอกออกเป็นช่อจากลำต้นใต้ดิน กาบหุ้ม ดอกสีเขียวปนแดง กลีบดอกสีเหลืองอมเขียว มีสีม่วงอยู่ตรงโคนกลีบ

แหล่งที่พบ : ถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชีย และนำมาปลูกกันแพร่หลายเป็นผักสวนครัว

สรรพคุณ : เหง้า–มีรสเผ็ดร้อนใช้เป็นเครื่องปรุงอาหารแต่งกลิ่นช่วยขับลม แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ
ต้น-ช่วยขับลมบรรเทาอาการจุกเสียด ท้องร่วงอาเจียน
ใบ-บรรเทาอาการฟกช้ำจากการกระทบกระแทก รักษานิ่ว ปัสสาวะ ฆ่าพยาธิและโรคตา
ดอก-ใช้ฆ่าพยาธิ ช่วยย่อยอาหาร รักษานิ่ว ปัสสาวะขัด
ผล-รักษาอาการไข้ บำรุงน้ำนม เป็นยาอายุวัฒนะ คอแห้งเจ็บคอ ตาฟาง
ราก-ช่วยขับลม เจริญอาหาร รักษาบิด (สมสุข, 2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มะกรูด

รูปที่ ฉ-4 มะกรูด

(ที่มา : http://puechkaset.com/มะกรูด/)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Citrus hystrix* DC.

วงศ์ : Rutaceae

ลักษณะทั่วไป :

ไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ตามลำต้นและกิ่งก้านมีหนามใบสีเขียวแก่ มีรอยคอดตรงกลางคล้ายในสองใบต่อกัน พื้นใบเรียบมีต่อมน้ำมันและมีกลิ่นหอม ดอกสีขาว ผลมีผิวขรุขระสีเขียว เมื่อสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

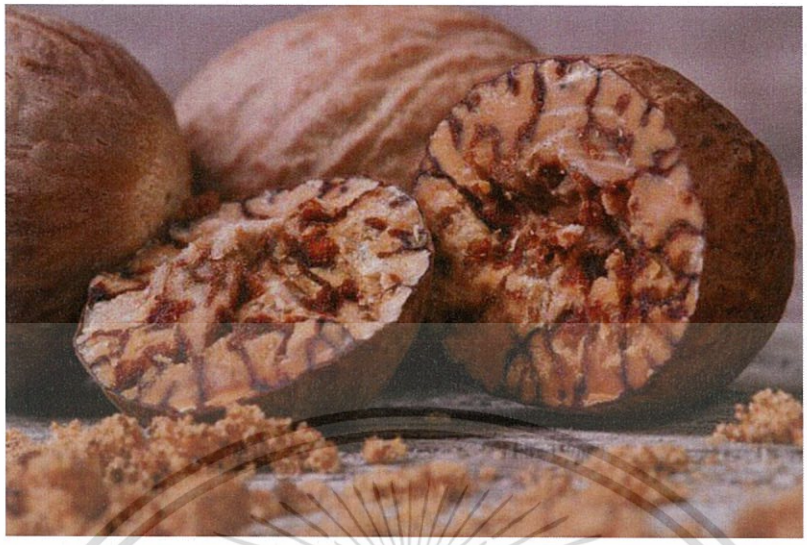
แหล่งที่พบ : นิยมปลูกแซมตามสวน หรือบริเวณหลังบ้าน เพื่อเก็บใบและผลนำไปปรุงอาหาร

สรรพคุณ : ใบสด-ปรุงอาหารดับกลิ่นคาว

ผล-ดองเป็นยาฟอกเลือดในสตรี ช่วยขับระดู ขับลมในลำไส้ แก้จุกเสียด ลักปิดลักเปิด น้ำมันจากผิวมะกรูดช่วยป้องกันรังแคและทำให้เส้นผมดกดำเป็นเงางาม (นันทวัน, 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกจันทน์เทศ



รูปที่ ฉ-5 ลูกจันทน์เทศ
(ที่มา; http://www.livestrong.com/article/112183-benefits-nutmeg-oil/)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Myristica fergrans Houtt*
วงศ์ : Myristicaceae
ลักษณะทั่วไป :

ไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ แตกกิ่งก้านสาขามากและมีใบดกหนาทึบ ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียแยกกันอยู่ต่างต้น ผลชนิดฉ่ำน้ำ ขนาดประมาณลูกหมาก ผลแก่จัดแตกครึ่ง เมล็ดเดี่ยวสีน้ำตาลมีรกแผ่นบางมีหลายแฉกสีแดงหุ้มเมล็ด เรียกกันทั่วไปว่าดอกจันทร์เทศ เปลือกเมล็ดแข็ง เนื้อเมล็ดมีกลิ่นหอม ที่เรียกว่าลูกจันทร์เทศ

สรรพคุณ : ราก –แก้จุกเสียดแน่นเฟ้อ ขับลมในลำไส้ให้ผายและเรอ บำรุงธาตุ
ผล-แก้ลม แก้โรคลม แก้ปวดมดลูก บำรุงโลหิต แก้แน่นจุกเสียด ขับลมในลำไส้
เมล็ด-บำรุงกำลัง แก้ปวดรัดมดลูก แก้จุกเสียดแน่นเฟ้อ บำรุงโลหิต เจริญอาหาร
เปลือกเมล็ด-แก้ท้องขึ้น แก้ปวดท้องในเด็ก สมานแผลภายใน
รกหุ้มเมล็ด-บำรุงโลหิต บำรุงผิวหนังให้เจริญ แก้ท้องร่วง (นันทวัน, 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้