ผลการต้านเชื้อราและการเสริมฤทธิ์กันของน้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิดต่อเชื้อราที่ทำให้ผลิตผลทางการเกษตรเน่าเสีย

Antifungal and Synergistic Effects of some Plant Essential Oils on Agricultural Produce Spoilage Mold

สุรีย์ นานาสมบัติ* ธิดารัตน์ วัฒนสุข เมทนี แสงพิทักษ์ และวราภรณ์ สิงห์คำบาล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

*Email: snanasombat@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากว่านน้ำ (*Acorus calamus*) อบเชย (*Cinnamomum zeylanicum*) ว่านเต่าเกียด (*Homalomena aromatica*) เปราะหอม (*Kaempferia galanga*) และกานพลู (*Syzygium aromaticum*) ต่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทำให้ผลิตผลทางการเกษตรเน่าเสีย ได้แก่ *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Geotrichum candidum* และ *Rhizopus stolonifer* ทำโดยใช้วิธี agar disc diffusion และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งการเจริญ ปรากฏว่า น้ำมันอบเชยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด เชื้อรา *A. alternata*, *F. moniliforme* และ *G. candidum* ไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันอบเชยมากที่สุด (ค่า MIC เท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาเป็น *A. niger* และ *R. stolonifer* ซึ่งถูกยับยั้งได้ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันกานพลูและน้ำมันว่านเต่าเกียดมีประสิทธิภาพสูงในการต้านเชื้อราที่ทดสอบ แต่เชื้อราส่วนใหญ่ค่อนข้างต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันว่านน้ำและน้ำมันเปราะหอม ดังนั้นจึงได้คัดเลือกน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย กานพลูและว่านเต่าเกียดมาศึกษาผลการเสริมฤทธิ์กันของน้ำมันคู่ผสมด้วยวิธี agar dilution checkerboard ผลปรากฏว่าน้ำมันคู่ผสมของ i) น้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียดและ ii) น้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียดให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราส่วนใหญ่ที่ทดสอบโดยมีค่า fractional inhibitory concentration index ระหว่าง 0.56-0.73

คำสำคัญ: การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา น้ำมันหอมระเหย การเสริมฤทธิ์

Abstract

The antifungal effects of mytle grass (*Acorus calamus*), cinnamon *(Cinnamomum zeylanicum),* colla aromatica Roxb. (*Homalomena aromatica*)*,* aromatic ginger (*Kaempferia galanga*), and clove (*Syzygium aromaticum*) essential oils were studied on the agricultural produce spoilage molds *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Geotrichum candidum*, and *Rhizopus stolonifer* using the agar disc diffusion method and minimum inhibitory concentration determination (MIC). Cinnamon oil had the strongest antifungal activity. *A. alternata*, *F. moniliforme* and *G. candidum* were the most susceptible molds to cinnamon oil (0.125 mg/mL MIC), followed by *A. niger* and *R. stolonifer* (0.25 mg/mL MIC). Clove and colla aromatica Roxb. oils exhibited strong antifungal action, but most molds were relatively resistant to mytle grass and aromatic ginger oils. Therefore the oils of cinnamon, clove and colla aromatica Roxb. were selected to test for the synergistic effects of 2-oil combinations by the agar dilution checkerboard method. The results showed that the two oil combinations of cinnamon and colla aromatica

Roxb. oils and clove and colla aromatica Roxb. oils had synergistic effects on most of the mold strains tested with a fractional inhibitory concentration index of 0.56-0.73.

Keywords: Antifungal activity: Essential oil: Synergism

บทนำ

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารเมแทบอไลซ์ทุติยภูมิของพืชซึ่งมีสารที่ระเหยได้เป็นส่วนประกอบถูกสังเคราะห์จากส่วนต่างๆ ของพืชได้แก่ ดอกตูมดอก ใบ ลำต้น กิ่งไม้ เมล็ด ผล ราก หรือเปลือกต้น น้ำมันหอมระเหยหลายชนิดมีกิจกรรมต้านแบคทีเรีย กิจกรรมต้านเชื้อรา และฆ่าแมลงได้ซึ่งเป็นผลมาจากการที่น้ำมันหอมระเหยมีสารประกอบที่ซับซ้อนหลากหลายชนิดซึ่งมีประมาณ 20-60 สารประกอบ แต่ส่วนใหญ่มีสารประกอบหลักที่มีปริมาณมากอยู่เพียง 2-3 ชนิด ซึ่งพบในความเข้มข้นสูง (ประมาณร้อยละ 20-70) [1]

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลายโดยสามารถทำให้ผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิดเน่าเสียซึ่งจะทำให้มีลักษณะปรากฏเปลี่ยนแปลงไปทั้งสี กลิ่นรส และลักษณะเนื้อสัมผัส [2] เชื้อราที่ทำให้ผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิดได้รับความเสียหาย ได้แก่ เชื้อราในสกุล *Aspergillus, Penicillium, Fusarium* และ *Rhizopus* เชื้อราเหล่านี้มีรายงานว่าทำให้ข้าวโพดเน่าเสียและสามารถสร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพได้ [3], [4] ส่วนเชื้อราในสกุล *Alternaria* เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของผลไม้ตระกูลส้ม แอปเปิ้ล หัวหอม กะหล่ำปลี และแครอท [2], [5], [6] และเชื้อราในสกุล *Fusarium* เป็นสาเหตุการเสียของหน่อไม้ฝรั่งและมันฝรั่ง [2] นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่าเชื้อรา *Geotrichum candidum* ทำให้มะเขือเทศ และผลไม้ที่มีรสเปรี้ยวเน่าเสีย [5] ส่วนเชื้อรา *Rhizopus stolonifer* ทำให้มันเทศ มะเขือเทศ และแอปเปิ้ลเน่าเสีย [5], [6] ดังนั้นจึงควรหาวิธีป้องกันการเน่าเสียของพืชชนิดต่างๆ เหล่านี้ การใช้น้ำมันหอมระเหยในการควบคุมการเจริญของเชื้อราเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความปลอดภัยสูงกว่าการใช้สารเคมีต้านเชื้อรา

น้ำมันหอมระเหยจากพืชหลายชนิดประกอบด้วยสารสำคัญที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา [7], [8] เช่น ในน้ำมันจากเหง้าของเปราะหอม มี ethyl-*p*-methoxy cinnamate, ethyl cinnamate, 3-carene, eucalyptol, borneol และ pentadecane เป็นส่วนประกอบหลัก [9] มีรายงานว่าสารสกัดจากเหง้าของเปราะหอมที่สกัดโดยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus, Aspergillus niger* และ *Candida albicans* ได้ [10] ในน้ำมันว่านน้ำมีสารประกอบหลักได้แก่ beta-asarone , *cis*-beta-terpineol และ limonene [11] เคยมีรายงานว่าสารสกัดจากเหง้าของว่านน้ำสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้เช่น *Penicillium chrysogenum, A. niger, A. flavus, Microsporum canis, Cryptococcus gastricus* และ *C. albicans* [12] และในน้ำมันว่านเต่าเกียดมี linalool เป็นส่วนประกอบหลัก [13] แต่อย่างไรก็ตามยังมีรายงานการวิจัยน้อยมากเกี่ยวกับฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรเหล่านี้ในการต้านเชื้อราที่ทำให้ผลิตผลทางการเกษตรเน่าเสีย ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อหากิจกรรมของน้ำมันหอมระเหยเดี่ยวๆ และน้ำมันหอมระเหยผสมจากพืชสมุนไพรเหล่านี้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทำให้ผลิตผลทางการเกษตรเน่าเสียเพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อราในผลิตผลทางการเกษตรต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทย

การศึกษานี้ได้หากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยน้ำมันหอมระเหยจากพืชแห้ง 5 ชนิดที่ซื้อจากร้านขายยาไทย ในกรุงเทพมหานคร

ได้แก่ เหง้าของว่านน้ำ (*Acorus calamus*) เปลือกของลำต้นอบเชย (*Cinnamomum zeylanicum*) เหง้าของว่านเต่าเกียด (*Homalomena aromatica*) เหง้าของเปราะหอม (*Kaempferia galanga*) และดอกของกานพลู (*Syzygium aromaticum*) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

การเตรียมน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เตรียมโดยวิธีการกลั่นไอน้ำโดยใช้ชุดกลั่นที่เรียกว่า Clevenger's apparatus เริ่มจากการนำพืชสมุนไพรแห้งมาหั่นหรือบดให้มีขนาดเล็ก ชั่งพืชสมุนไพรแห้งปริมาณ 150 กรัม ใส่ลงในขวดกลั่น เติมน้ำกลั่นจนท่วมพืช ให้ความร้อนประมาณ 3-4 ชั่วโมง รอจนกระทั่งปริมาณน้ำมันที่ได้คงที่จึงหยุดให้ความร้อนและทำการกำจัดน้ำออกจากน้ำมันที่กลั่นได้โดยการเติมสารโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงไปให้มากเกินพอและกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บรักษาน้ำมันหอมระเหยไว้ในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส [14]

การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา

การเตรียมเชื้อราเริ่มโดยเพาะเลี้ยงเชื้อราจำนวน 5 ชนิดได้แก่ *Aspergillus niger* TISTR 3245, *Alternaria alternata* TISTR 3282, *Rhizopus stolonifer* TISTR 3144, *Geotrichum candidum* TISTR 3442 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 (ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) บนอาหาร Potato Dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อราเจริญเต็มที่และเกิดการสร้างสปอร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ใส่ลงในหลอดอาหาร PDA slant ที่มีเชื้อราเจริญอยู่แล้วใช้พาสเจอร์ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อขูดเบาๆ เพื่อให้สปอร์หลุดออกมา จากนั้นกรองผ่านกรวยกรองที่บุสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อเอาเส้นใยออก เมื่อได้สารแขวนลอยของสปอร์แล้ว ตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วย haemacytometer ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วย Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 [15]

1.1 การศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธี Agar disc diffusion

การศึกษานี้ทำตามวิธีการของ Collin และคณะ [16] เริ่มโดยปิเปตสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร PDA แล้วใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร รอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นวางกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงตรงกลางผิวหน้าอาหาร ปิเปตน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรองนี้ สำหรับ negative control ใช้สารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 ส่วน positive control ใช้ยาแอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B) ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แทนน้ำมันหอมระเหย นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ โซนการยับยั้ง (Inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

1.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธี Agar dilution

การทดสอบนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Collin และคณะ [16] โดยทำการเตรียม stock solution ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 500, 50, 5 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 และเตรียมอาหาร PDA ไว้ล่วงหน้า เมื่อจะทำการทดสอบ เติม stock solution ของน้ำมันหอมระเหยที่แต่ละระดับความเข้มข้นในปริมาตรที่เหมาะสมลงในหลอดทดลองเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วพร้อมทั้งเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปในปริมาตรที่เหมาะสม (คำนวณให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันหอมระเหยในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน 17 ระดับคือ ระหว่าง 0.0078-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปริมาตรน้ำกลั่นเมื่อรวมกับปริมาตรของ stock solution ของน้ำมันหอมระเหยแล้วจะได้ 125 ไมโครลิตร (negative control ใช้ DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 แทนน้ำมันหอมระเหย และ positive control ใช้ยาแอมโฟเทอริซินบีที่ความเข้มข้น 0.0225-0.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นปิเปตอาหาร PDA

ที่ยังหลอมเหลวอยู่ (อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 2,375 ไมโครลิตรลงไปผสมกันเขย่าให้เข้ากันดีแล้วนำหลอดอาหาร PDA ที่ผสมกับน้ำมันหอมระเหยและน้ำกลั่นแล้วมาเอียง ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวจะได้หลอดอาหาร PDA ที่มีผิวหน้าลาดเอียง จากนั้นจึงถ่ายเชื้อราลงบนผิวหน้าอาหาร โดยหยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราแต่ละชนิดที่ได้เตรียมไว้ลงตรงกลางผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด ตรวจดูการเจริญของเชื้อราที่ผิวหน้าอาหาร PDA ที่มีน้ำมันหอมระเหยที่แต่ละระดับความเข้มข้น ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์คือ ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) หรือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยชนิดนั้นที่สามารถที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทดสอบ

2. การศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยผสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี Agar dilution checkerboard

การทดลองนี้ได้ทำการทดสอบผลของน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด จำนวน 3 คู่ (คู่ที่ 1 เป็นน้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด คู่ที่ 2 เป็นน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และคู่ที่ 3 เป็นน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลู) ในการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 5 ชนิดโดยวิธี Agar dilution checkerboard ทำตามวิธีของ Rosato และคณะ [17] ในการเตรียมน้ำมันหอมระเหยผสมแต่ละคู่ ขั้นแรกเตรียม stock solution ของน้ำมันชนิดที่ 1 และน้ำมันชนิดที่ 2 ที่จะผสมกันที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันในสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 แล้วปิเปต stock solution ของน้ำมันทั้ง 2 ชนิดมาอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1: 1) ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเทอาหาร PDA ที่ยังหลอมเหลวอยู่ลงไปปริมาตร 19 มิลลิลิตร เพื่อให้ในจานเพาะเชื้อมีระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดเป็น 1/2, 1/4, 1/8 และ 1/16 เท่าของค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดซึ่งได้จากผลของการทดลองในข้อ 1.2 จากนั้นทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวแล้วจึงหยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราชนิดนั้นๆ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ประเมินผลโดยตรวจดูการเจริญของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ที่มีน้ำมันหอมระเหยผสมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นำมาคำนวณหาค่า Fractional Inhibitory Concentration (FIC) และค่า FIC index (FICI) ตามสูตรดังนี้

$$\text{FIC index} = FIC_1 + FIC_2$$

เมื่อ FIC_1 เท่ากับค่า MIC ของน้ำมันระเหยชนิดที่ 1 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันที่ผสมรวมอยู่กับน้ำมันชนิดที่ 2 (MIC_{C1}) หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 1 เมื่ออยู่ในรูปเดี่ยวๆ ซึ่งไม่ได้ผสมกับน้ำมันชนิดใดๆ (MIC_{a1})

FIC_2 เท่ากับค่า MIC ของน้ำมันระเหยชนิดที่ 2 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันที่ผสมรวมอยู่กับน้ำมันชนิดที่ 1 (MIC_{C2}) หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยที่ 2 เมื่ออยู่ในรูปเดี่ยวๆ (MIC_{a2})

โดยค่า FICI น้อยกว่า 1.0 หมายถึงเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ค่า FICI เท่ากับ 1.0 หมายถึงไม่แตกต่าง (indifferent effect) และค่า FICI มากกว่า 1.0 หมายถึงเป็นปฏิปักษ์กัน (antagonistic effect) [18]

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. สมบัติการต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร

จากการศึกษานี้พบว่าสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 5 ชนิดโดยน้ำมันว่านน้ำและน้ำมันเปราะหอมไม่สูงมากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับ

น้ำมันอบเชย น้ำมันกานพลู และน้ำมันว่านเต่าเกียด ซึ่งมีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งค่อนข้างกว้างในช่วง 15.15 ถึง 47.76 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อราส่วนใหญ่ที่ทดสอบค่อนข้างไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันหอมระเหยจากพืช 3 ชนิดนี้

อย่างไรก็ตามเมื่อหาค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทดสอบพบว่า น้ำมันอบเชยมีประสิทธิภาพสูงที่สุดโดยเชื้อ *A. alternata*, *F. moniliforme* และ *G. candidum* ไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันอบเชยมากที่สุด (ค่า MIC เท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาเป็นเชื้อ *A. niger* และ *R. stolonifer* ซึ่งถูกยับยั้งได้ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันกานพลูเป็นน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพสูงในยับยั้งการเจริญของเชื้อราเช่นเดียวกันเนื่องจากให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งการเจริญที่กว้าง (30.54 - 47.76 มิลลิเมตร) แต่ค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทุกชนิดเท่ากันคือ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2)

ส่วนน้ำมันว่านเต่าเกียดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีรองลงมา แต่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทุกชนิดที่ทดสอบไม่กว้างมากนัก (15.15 - 19.42 มิลลิเมตร และค่า MIC เท่ากับ 1 - 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) น้ำมันเปราะหอมและน้ำมันว่านน้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *F. moniliforme* ได้สูงกว่าเชื้อราชนิดอื่น (ค่า MIC เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ขณะที่เชื้อราชนิดอื่นถูกยับยั้งด้วยน้ำมันทั้งสองชนิดนี้ที่ค่า MIC เท่ากับหรือมากกว่า 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

น้ำมันอบเชยและน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสูงมากซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Simić และคณะ [19] และ Rana และคณะ [20] ซึ่งได้พบว่าน้ำมันอบเชยมีประสิทธิภาพสูงในการต้านการเจริญของ *A. alternata* และ *A. niger* และยังได้จำแนกชนิดของสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันอบเชยด้วยวิธี Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (GC/MS) พบว่า มีสารประกอบหลักได้แก่ trans-cinnamaldehyde (ร้อยละ 62.79) limonene (ร้อยละ 8.31) eugenol (ร้อยละ 7.09) และ cinnamaldehyde propylene (ร้อยละ 5.55) รวมทั้งสารประกอบอื่นๆ ซึ่งมีปริมาณน้อย (ต่ำกว่าร้อยละ 2) สาร cinnamaldehyde และ eugenol เป็นสารที่มีกิจกรรมการต้านเชื้อราได้ดีมาก

Rana และคณะ [20] และ Cheng และคณะ [21] ได้รายงานว่าน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพสูงมากในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme*, *F. oxysporum, Mucor* sp. และ *Aspergillus* sp. และยังได้ตรวจพบการแตกและการเสียรูปร่างของสปอร์เชื้อราทุกชนิดที่ทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากที่ได้แช่ไมซีเลียมที่มีสปอร์ในน้ำมันกานพลู 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กิจกรรมการต้านเชื้อราโดยน้ำมันกานพลูอาจเป็นผลมาจากสารสำคัญที่มีในน้ำมันกานพลู Razafimamonjison และคณะ [22] ได้จำแนกชนิดของสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันกานพลูด้วยวิธี Gas chromatography พบว่า มี eugenol เป็นสารประกอบหลักซึ่งปริมาณมากถึงร้อยละ 72.08-82.36 และยังมี eugenyl acetate ร้อยละ 8.61-21.32 และ ß-caryophyllene ร้อยละ 2.76-8.64 รวมทั้งสารชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ Abbaszadeh และคณะ [23] ได้รายงานว่า eugenol ในน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราและยีสต์หลายชนิดได้ดี เช่น *A. alternata*, *A. niger A. flavus, Aspergillus ochraceus* และ *Penicillium citrinum*

สำหรับน้ำมันว่านเต่าเกียด Singh และคณะ [24] ได้เคยมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านเชื้อราไว้บ้างว่าน้ำมันจากเหง้าของว่านเต่าเกียดสามารถต้านการเจริญของเชื้อรา *Curvularia pallescens, A. niger* และ *Fusarium graminearum* ได้ดี กิจกรรมการต้านเชื้อราของน้ำมันว่านเต่าเกียด อาจเป็นผลมาจากการมีสารสำคัญหลายชนิดเป็นส่วนประกอบ Policegoudra และคณะ [13] ได้วิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำมัน

ว่านเต่าเกียดด้วยวิธี GC/MS พบว่า นอกจากสาร linalool ที่พบในปริมาณมากถึงร้อยละ 62.5 แล้ว ยังมีสารประกอบอื่นอีกหลายชนิดได้แก่ terpene-4-ol (ร้อยละ 7.08) δ-cadinene (ร้อยละ 5.57) α-cadinol (ร้อยละ 3.71) spatulenol (ร้อยละ 1.81) และสารอื่นๆ อีกในปริมาณน้อย Carson และ Riley [25] รายงานว่า α-terpineol, linalool และ terpinen-4-ol สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี

2. อิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยผสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

จากการศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยผสมกัน 2 ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบว่า คู่ผสมของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 คู่ คือ น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันว่านเต่าเกียด น้ำมันกานพลูผสมกับน้ำมันว่านเต่าเกียด และน้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 5 ชนิดที่ทดสอบ โดยมีค่า MIC ของน้ำมันคู่ผสม (MIC_c) แตกต่างกันดังตารางที่ 3 เมื่อคำนวณหาค่า FIC index ของน้ำมันคู่ผสมทั้ง 3 คู่ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 5 ชนิดดังกล่าวพบว่า คู่ผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียดให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 5 ชนิด แต่คู่ผสมของน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียดให้ผลเสริมฤทธิ์กันเฉพาะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger*, *F. moniliforme* และ *R. stolonifer* เท่านั้น แต่ให้ผลไม่แตกต่างในการยับยั้งการเจริญของ *A. alternata* ส่วนคู่ผสมของน้ำมันกานพลูกับน้ำมันอบเชยให้ผลเสริมฤทธิ์กันเฉพาะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* เท่านั้น

Sukatta และคณะ[18] ได้ศึกษาผลของกิจกรรมการทำงานร่วมกันของน้ำมันอบเชยและน้ำมันกานพลูที่อัตราส่วนต่างๆ กันต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. niger, A. alternata และ R. stolonifer* พบว่ามีค่า FIC index เท่ากับ 0.78-1.90, 0.70-1.30 และ 0.65-1.40 ตามลำดับและพบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* โดยน้ำมันคู่ผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลูสูงขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยในน้ำมันคู่ผสมนี้ สำหรับกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยน้ำมันคู่ผสมทั้ง 3 คู่ที่ใช้ในการศึกษานี้ยังไม่พบว่าเคยมีการรายงานไว้ แต่พบเฉพาะการรายงานเกี่ยวกับผลการต้านแบคทีเรียโดยสารประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหย เช่น cinnamaldehyde และ thymol เท่านั้นซึ่งพบว่าให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย [26]

สรุปผลการวิจัย

น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย กานพลู และว่านเต่าเกียด มีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อรา *A. alternata*, *A. niger*, *F. moniliforme*, *G. candidum* และ *R. stolonifer* สูงกว่าน้ำมันหอมระเหยจากว่านน้ำและเปราะหอม น้ำมันคู่ผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียดและน้ำมันคู่ผสมของน้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียดส่วนใหญ่ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าว ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อราที่ทำให้ผลิตผลทางการเกษตรเน่าเสีย

เอกสารอ้างอิง

[1] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. “Biological effects of essential oils – A review”. **Food and Chemical Toxicology.** 46 (2): 446– 475.

[2] Montville, T.J. and Matthews, K. 2005. **Food Microbiology: an Introduction.** Washing ton, DC: ASM Press.

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

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

[5] Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. 2005. **Modern Food Microbiology.** New York: Springer Science+Business Media.

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

[7] Xing, Y., Xu, Q., Li, X., Che, Z. and Yun, J. 2012. "Antifungal activities of clove oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum in vitro* and in wounded fruit test". **Journal of Food Safety.** 32 (1): 84-93.

[8] Soliman, K.M. and Badeaa, R.I. 2002. "Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi". **Food and Chemical Toxicology.** 40 (11): 1669-1675.

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

[10] Kochuthressia, K.P., Britto, S.J., Jaseentha, M.O. and Raphael, R. 2012. "In vitro antimicrobial evaluation of *Kaempferia galanga* L. rhizome extract". **American Journal Biotechnology and Molecular Sciences**. 2 (1): 1-5.

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

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

[13] Policegoudra, R.S., Goswami, S., Aradhya, S.M., Chatterjee, S., Datta, S., Sivaswamy, R., Chattopadhyay, P. and Singh, L. 2012. "Bioactive constituents of *Homalomena aromatica* essential oil and its antifungal activity against dermatophytes and yeasts". **Journal de Mycologie Médicale.** 22 (1): 83-87.

[14] Soylu, E.M., Kurt, Ş. and Soylu, S. 2010. "*In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mold disease agent *Botryis cinerea*". **International Journal of Food Microbiology**. 143 (3): 183–189.

[15] Naeini, A., Ziglari, T., Shokri, H. and Khosravi, A.R. 2010. "Assessment of growing-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates". **Journal de Mycologie Médicale**. 20:174-178.

[16] Collins, C.H., Lyne, P.M. and Grange, J.M. 2001. Collin and Lyne's Microbiological methods. New York, USA: Oxford Unive rsity Press., Inc.

[17] Rosato, A., Vitali, C., de Laurentis, N., Arme nise, D. and Antonietta Milillo, M. 2007. "Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with

norfloxacin". **Phytomedicine**. 14(11): 727-732.

[18] Sukatta, U., Haruthaithanasan, V., Chantarapanont, W., Dilokkunanant, U. and Suppakul, P. 2008. Antifungal activity of clove and cinnamon oil and their synergistic against postharvest decay fungi of grape *in vitro*. **Kasetsart Journal (Natural Science).** 42 (5): 169 – 174.

[19] Simić, A., Soković, M.D., Ristić, M., Grujić-Jovanović, S., Vukojević, J. and Marin, P.D. 2004. "The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities". **Phytotherapy Research.** 18 (9): 713–717.

[20] Rana, I.S., Rana, A.S. and Rajak, R.C. 2011. "Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol". **Brazilian Journal of Microbiology.** 42 (4): 1269-1277.

[21] Cheng, S.S., Liu, J.Y., Hsui, Y.R. and Chang, S.T. 2006. "Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmomphloeum*)". **Bioresource Technology.** 97 (2): 306–312.

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

[23] Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A.R. and Abbaszadeh, A. 2014. "Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi." **Journal de Mycologie Médicale**. 24 (2): e51-e56.

[24] Singh, G., Kapoor, I.P.S., Singh, O.P., Rao, G.P., Prasad, Y.R., Leclercq, P.A. and Klinkby, N. 2000. "Studies on essential oils, part 28: chemical composition, antifungal and insecticidal activities of rhizome volatile oil of *Homalomena aromatica* Schott". **Flavour and Fragrance Journal.** 15 (4): 278-280.

[25] Carson, C.F. and Riley, T.V. 1995. "Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*". **Journal of Applied Bacteriology.** 78 (3): 264–269.

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

ตารางที่ 1 สมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยที่วิเคราะห์โดยวิธี Agar disc diffusion

ชนิดของเชื้อรา	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง (มิลลิเมตร)[a] ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	น้ำมันว่านน้ำ	น้ำมันอบเชย	น้ำมันว่านเต่าเกียด	น้ำมันเปราะหอม	น้ำมันกานพลู	[c]Amphotericin B
Alternaria alternata	[b]-	-	-	-	-	15.89±6.49
Aspergillus niger	9.62±0.22	25.74±12.62	15.15±5.72	13.04±2.15	30.54±4.54	11.74±0.40
Fusarium moniliforme	10.97±2.87	-	19.42±2.62	14.69±1.41	47.76±1.30	7.63±0.13
Geotrichum candidum	9.48±1.59	24.94±1.05	12.89±3.04	12.94±0.72	32.47±1.16	12.52±2.12
Rhizopus stolonifer	13.34±0.92	-	15.44±7.38	16.21±5.12	42.68±3.11	6.66±0.30

[a] ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

[b] ไม่พบการยับยั้ง (ไม่เกิดโซนการยับยั้งการเจริญ)

[c] Amphotericin B ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่วิเคราะห์โดยวิธี Agar dilution

ชนิดของเชื้อรา	ค่า minimum inhibitory concentration (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	น้ำมันว่านน้ำ	น้ำมันอบเชย	น้ำมันว่านเต่าเกียด	น้ำมันเปราะหอม	น้ำมันกานพลู	Amphotericin B
Alternaria alternata	10	0.125	1	10	0.5	0.0225
Aspergillus niger	8	0.25	2	10	0.5	0.09
Fusarium moniliforme	2	0.125	1	2	0.5	>0.72
Geotrichum candidum	14	0.125	1	8	0.5	>0.72
Rhizopus stolonifer	>20	0.25	1	8	0.5	>0.72

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยเมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_c) ค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และค่า FIC index (FICI) ของน้ำมันคู่ผสมของน้ำมันอบเชยกับน้ำมันว่านเต่าเกียด น้ำมันกานพลูกับน้ำมันว่านเต่าเกียดและน้ำมันอบเชยกับน้ำมันกานพลูในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

เชื้อรา	MIC_a		MIC_c		FIC		FICI	การแปลผลค่า FICI
	MIC_{a1}	MIC_{a2}	MIC_{c1}	MIC_{c2}	FIC_1	FIC_2		
น้ำมันอบเชย (1) + น้ำมันว่านเต่าเกียด (2)								
Alternaria alternata	0.125	1	0.008	0.5	0.06	0.5	0.56	เสริมฤทธิ์กัน
Aspergillus niger	0.25	2	0.02	1	0.16	0.5	0.66	เสริมฤทธิ์กัน
Fusarium moniliforme	0.125	1	0.02	0.5	0.16	0.5	0.66	เสริมฤทธิ์กัน
Geotrichum candidum	0.125	1	0.06	0.25	0.48	0.25	0.73	เสริมฤทธิ์กัน
Rhizopus stolonifer	0.25	1	0.02	0.5	0.08	0.5	0.58	เสริมฤทธิ์กัน
น้ำมันกานพลู (1) + น้ำมันว่านเต่าเกียด (2)								
Alternaria alternata	0.5	1	0.25	0.5	0.5	0.5	1	ไม่แตกต่าง
Aspergillus niger	0.5	2	0.03	1	0.06	0.5	0.56	เสริมฤทธิ์กัน
Fusarium moniliforme	0.5	1	0.03	0.5	0.06	0.5	0.56	เสริมฤทธิ์กัน
Geotrichum candidum	0.5	1	>0.25	>0.5	-[a]	-	-	-
Rhizopus stolonifer	0.5	1	0.03	0.5	0.06	0.5	0.56	เสริมฤทธิ์กัน
น้ำมันอบเชย (1) + น้ำมันกานพลู (2)								
Alternaria alternata	0.125	0.5	>0.0625	>0.25	-[a]	-	-	-
Aspergillus niger	0.25	0.5	0.016	0.25	0.06	0.5	0.56	เสริมฤทธิ์กัน
Fusarium moniliforme	0.125	0.5	>0.0625	>0.25	-	-	-	-
Geotrichum candidum	0.125	0.5	>0.0625	>0.25	-	-	-	-
Rhizopus stolonifer	0.25	0.5	>0.125	>0.25	-	-	-	-

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

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

FIC_1 ได้จากค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_{c1}) หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 1 เพียงชนิดเดียว (MIC_{a1}); FIC_2 ได้จากค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม (MIC_{c2}) หารด้วยค่า MIC ของน้ำมันชนิดที่ 2 เพียงชนิดเดียว (MIC_{a2}); FICI คำนวณจากการนำค่า FIC_1 (FIC ของน้ำมันชนิดที่ 1) มาบวกกับ FIC_2 (FIC ของน้ำมันชนิดที่ 2)

FICI น้อยกว่า 1.0 หมายถึงเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) FICI เท่ากับ 1.0 หมายถึงไม่แตกต่าง (indifferent effect or additive effect) และ FICI มากกว่า 1.0 หมายถึงเป็นปฏิปักษ์กัน (antagonistic effect)

[a]ไม่สามารถคำนวณได้เนื่องจากไม่พบการยับยั้งการเจริญที่ทุกคู่ความเข้มข้นของน้ำมันผสมที่ทดสอบ