บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

น้ำมันหอมระเหยในพืชสมุนไพร ประกอบไปด้วยสารประกอบต่างๆมากมายหลายชนิด ซึ่งสารประกอบบางชนิดหรือเกือบทุกชนิดจะมีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ [56] เป็นที่น่าสนใจว่าแม้แต่พืชชนิดเดียวกัน ยังให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยอีกทั้งชนิดและปริมาณของสารประกอบต่างๆในน้ำมันหอมระเหยในระดับที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น สภาพภูมิอากาศ , สภาพภูมิประเทศ , อายุของพืช , ส่วนของพืชที่นำมาสกัด เป็นต้น [57-58] น้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ส่วนใหญ่จะมีลักษณะใสไม่มีสีมักเป็นสารที่ระเหยง่ายและมีความคงตัวต่ำ ดังนั้นจึงต้องทำการเก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ในภาชนะที่ทึบแสงและอุณหภูมิต่ำ เมื่อเก็บไว้นานๆ หรือ เก็บไว้ไม่ถูกต้อง มักเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางประการเช่น สี , กลิ่น , รส เป็นต้น เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยถูกออกซิไดซ์โดยออกซิเจนในอากาศได้ง่ายทำให้สูญเสียความคงตัว นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอีกด้วย เช่น แสงแดด , อุณหภูมิ ดังนั้น เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงน้ำมันหอมระเหยจะมีลักษณะต่างไปจากเดิมอย่างเห็นได้ชัด คือ จะมีสีเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม ลักษณะเหนียวคล้ายเรซิน และกลิ่นเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอีกด้วย จากการที่น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติไม่ละลายหรือละลายได้เล็กน้อยในน้ำแต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ [25] สุนทรี ขันธหิรัญ ได้นำน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร 31 ชนิด มาทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ 6 สายพันธุ์เช่นเดียวกับการทดลองนี้ ปรากฏว่าน้ำมันอบเชย น้ำมันออริกาโน และ น้ำมันซัมเมอร์ไทม์ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดีกว่าน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นๆ โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เท่ากับ 620-10,000 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตรจากรายงานนี้ไม่สามารถจะนำมาเปรียบเทียบกับการทดลองนี้ได้ ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยหลายประการ เช่น ความรุนแรงของเชื้อแหล่งที่มาของเชื้อ มีความแตกต่างกัน [59] และจากการทดลองนี้เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ของน้ำมันหอมระเหย ด้วยวิธี Agar diffusion test นั้น ใช้เมธานอลเป็นตัวทำละลาย ดังนั้นจึงมีแผ่นยาควบคุมที่ใช้เมธานอลแทนน้ำมันหอมระเหย เพื่อทดสอบว่าเมธานอลมีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียหรือไม่ผลที่ได้ก็คือไม่ปรากฏผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ทั้งนี้เนื่องจากจุดหลอมเหลวของเมธานอลต่ำ จึงเกิดการระเหยหมดที่อุณหภูมิห้อง และได้ใช้แผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐานเป็นตัว

ควบคุม 3 ชนิด คือ เพนนิซิลลิน 10 ยูนิต , เททราซัยคลิน 30 ไมโครกรัม และ แวนโคมัยซิน 30 ไมโครกรัม ซึ่งยาปฏิชีวนะเหล่านี้จะต้องใช้ชนิดที่เตรียมไว้ใช้เฉพาะห้องปฏิบัติการเท่านั้น เนื่องจากชนิดที่ใช้สำหรับผู้ป่วยนั้นปริมาณตัวยาในแต่ละเม็ด หรือแคปซูลไม่แน่นอน และยังมีส่วนประกอบอื่นๆ เช่น แป้งปนมาอีกด้วย [34] จากการทดสอบพบว่า ยับยั้งแบคทีเรียเกือบทุกสายพันธุ์ ยกเว้น *Pseudomonas aeruginosa* เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้จะดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากที่สุด ในปัจจุบันนี้ ได้มีการศึกษาค้นคว้าหายาต้านจุลชีพจากแหล่งต่างๆ โดยเฉพาะจากแหล่งธรรมชาติ ทั้งนี้ยาปฏิชีวนะที่ใช้กันส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากการสังเคราะห์หรือกึ่งสังเคราะห์ ซึ่งบางครั้งฤทธิ์ข้างเคียงของยาทำให้เกิดความไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคได้

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกแต่น้ำมันหอมระเหยบางชนิดไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ ทั้งนี้อาจยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้ และได้ทำการคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่ดีสุด มาทำการหาค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยตามลำดับโดยใช้ Tween 80 เป็นอิมัลซิฟายเออร์ (Emulsifier) เพื่อให้น้ำและน้ำมันหอมระเหยรวมเป็นเนื้อเดียวกัน และเพื่อยืนยันว่า Tween 80 จะไม่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย จึงต้องมีหลอดควบคุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ + แบคทีเรีย + Tween 80 จากผลการทดสอบพบว่าหลอดควบคุมมีการเจริญของแบคทีเรียตามปกติ จากการหาค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยได้คัดเลือกน้ำมันหอมระเหยที่ให้ผลการยับยั้งดี และมากสายพันธุ์ที่สุดซึ่งได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากเทพธาโร ซึ่งให้ผลยับยั้งดีที่สุด และน้ำมันหอมระเหยจากกระชายสามารถยับยั้งได้ทุกสายพันธุ์ ดังนั้นได้ทำการคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดนี้ไปทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี จากการวิเคราะห์นั้นพบว่าสารประกอบส่วนใหญ่จะเป็นพวกโมโนเทอร์ปีนอยด์ ซึ่งสารประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจากเทพธาโร และกระชายนั้นเป็น โมโนเทอร์ปีนอยด์เช่นกัน สารประกอบพวกโมโนเทอร์ปีนอยด์นี้มีลักษณะคือ ไม่มีสี ไม่ละลายน้ำ และมีกลิ่นหอม บางชนิดจะเบี่ยงเบนแสงได้ ซึ่งพวกโมโนเทอร์ปีนอยด์มักเกิดอยู่ในธรรมชาติ การแยกออกมาเป็นสารบริสุทธิ์จากสารผสมนั้น ค่อนข้างยุ่งยาก อีกทั้ง มักเกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งโครงสร้างของสารประกอบภายในน้ำมันหอมระเหยได้ (rearrengement) เนื่องจากความไม่คงตัวและปัจจัยภายนอกต่างๆที่มีผลที่มีผลต่อน้ำมันหอมระเหย และได้มีผู้ทำการศึกษารายงานเกี่ยวกับหน้าที่ของโมโนเทอร์ปีนอยด์ในพืชไม่เป็นที่ชัดเจนนัก แต่ก็พอที่จะมีเหตุผลหลายอย่างที่สนับสนุนต่อโมโนเทอร์ปีนอยด์แต่ละตัวเดี่ยวๆ หรือในลักษณะสารผสมชนิดง่ายที่ไม่ซับซ้อนว่ามีหน้าที่ดังนี้ เช่น ล่อแมลงให้ช่วยมาผสมเกสร และ ล่อสัตว์ให้ช่วยกระจายเมล็ดพันธุ์พืช , ขับไล่แมลงที่เป็น

ตัวเบียนและพวกสัตว์ที่กินพืช และ ต่อต้านการบุกรุกของพวกจุลินทรีย์ (21) จากการทดลองนี้ได้นำน้ำมันหอมระเหยจากเทพธาโรและกระชายมาทำการแยกส่วนประกอบโดยวิธี HPLC ซึ่งให้ผลดังรูปที่ 10 และ 11 เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์ปรากฏว่าไม่ยับยั้งเชื้อแต่อย่างใด เมื่อทำการเพิ่มปริมาณน้ำมันหอมระเหย ปรากฏว่าก็ยังไม่ยับยั้งเชื้อแต่อย่างใด ทั้งนี้อธิบายได้ว่า เนื่องจากคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหย สามารถระเหยได้ง่ายในอุณหภูมิปกติ

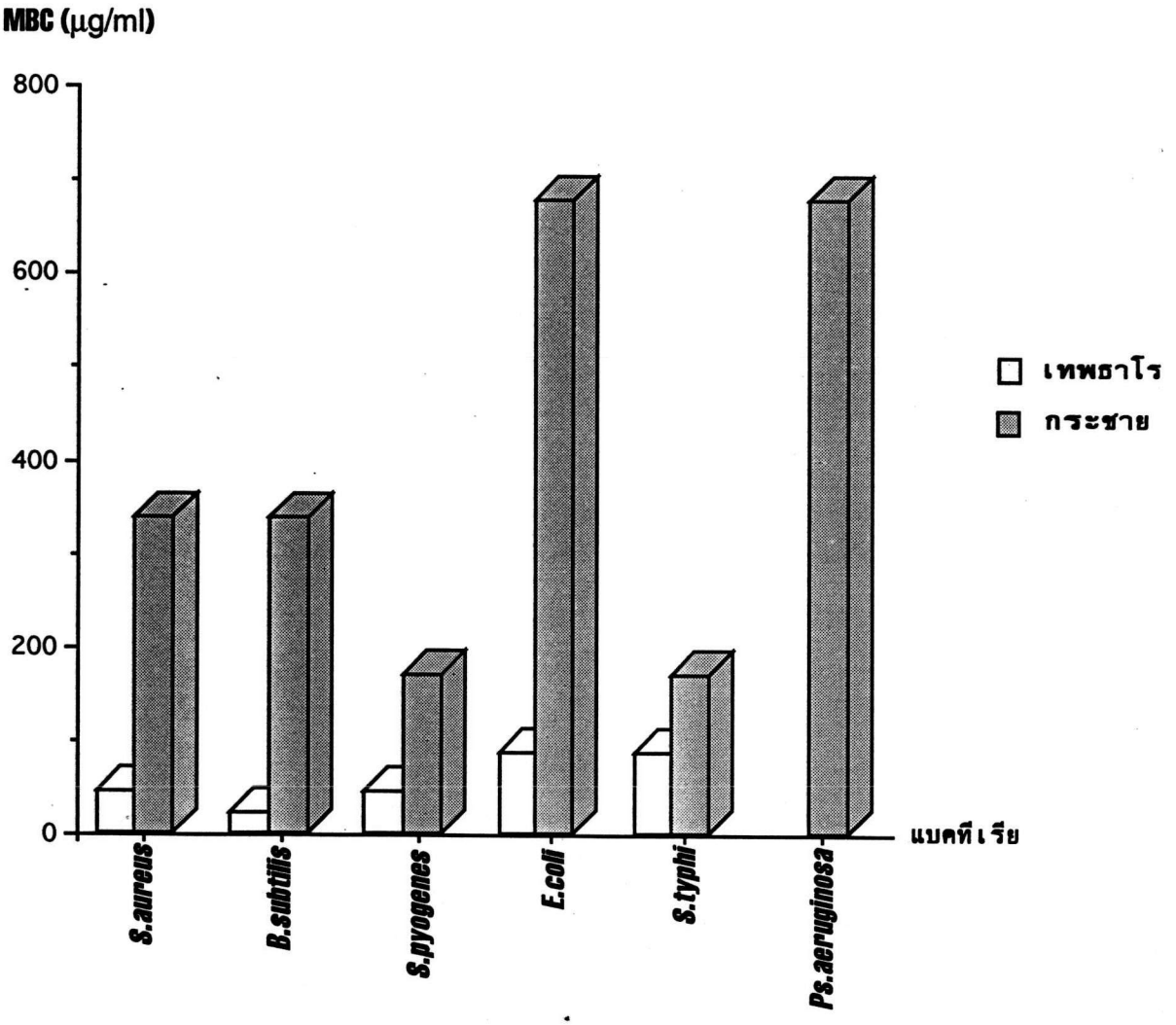
ดังนั้น การทดลองนี้ ได้นำสารประกอบบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากกระชายและเทพธาโร ได้แก่ 3 - แครีน (3 - Carenne) , เจอรานิออล (Geraniol) , ลินาลูล (Linalool) , ลิโมนีน (Limonene) และยูคาลิปตัส (Eucalyptus)มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่าสารประกอบส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียยกเว้น Eucalyptus ส่วนGeraniol เพียงตัวเดียวเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ นอกจากนั้นยับยั้งได้ 5 สายพันธุ์ ยกเว้น *Ps. aeruginosa*

จากรูปที่ 12 แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากเทพธาโรสามารถฆ่าทำลายแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยกเว้น *Ps. aeruginosa* ได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระชาย และจากภาพโดยรวมน้ำมันหอมระเหยจากเทพธาโรและกระชาย สามารถทำลายแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าพืชส่วนใหญ่ก็ให้ผลเช่นเดียวกับเทพธาโรและกระชาย) ทั้งนี้อธิบายได้ว่า เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นของ lipopolysaccharides หนากว่า ดังนั้นสารอาจถูกจับไว้ที่ชั้น lipopolysaccharides ทำให้ปริมาณสารที่ซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้น้อย จึงอาจทีผลทำให้แบคทีเรียแกรมลบทนต่อสารได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยกลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์นั้นยังต้องมีการศึกษาต่อไป

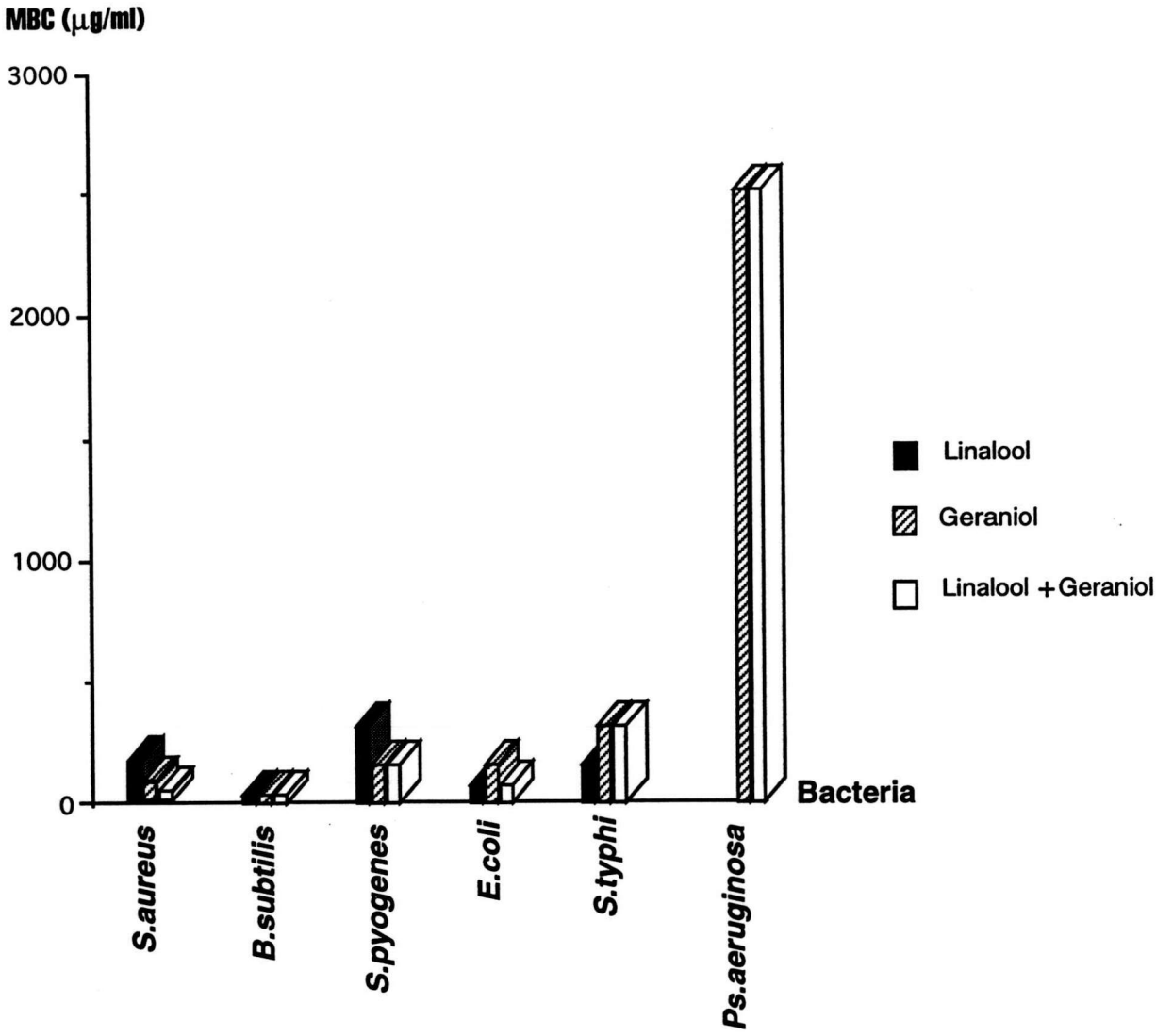
สำหรับเชื้อ *Ps. aeruginosa* นั้น นอกจากจะมีผนังเซลล์ที่หนามากตามคุณสมบัติของแบคทีเรียแกรมลบแล้วยังมีคุณสมบัติการดื้อยาได้ตั้งแต่กำเนิด (inherent resistance) ลักษณะที่คงทนและเป็นที่รู้กันโดยทั่วไปอีกด้วย โดยสามารถปรับตัวให้ดื้อต่อยาได้หลายชนิดจากการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระชายสามารถทำลายเชื้อชนิดนี้ได้ถึงแม้ต้องใช้ความเข้มข้นค่อนข้างสูง แต่ก็เป็นสิ่งที่น่าติดตามศึกษาต่อไป

การที่น้ำมันหอมระเหยให้ผลทำลายเชื้อได้ดีกว่าสารประกอบเดี่ยวๆนั้น อธิบายได้ว่าในน้ำมันหอมระเหยนั้นจะมีองค์ประกอบที่มากกว่า 1 ชนิด ซึ่งองค์ประกอบเหล่านั้นอาจเสริมฤทธิ์กัน (synergism) โดยอาจจะมีกลไกการออกฤทธิ์คนละอย่างจึงให้ผลในลักษณะเสริมฤทธิ์กัน

จากทฤษฎีของการให้ยาต้านจุลชีพร่วมกันพบว่า เมื่อผสมร่วมกัน ฤทธิ์ของยาที่เกิดขึ้นต่อตัวเชื้ออาจอยู่ในลักษณะ ไม่ต่างจากเดิม (indifference) , เสริมฤทธิ์กัน (synergism) หรือต้านฤทธิ์กัน (antagonism) อย่างใดอย่างหนึ่งก็ได้ ตัวอย่างจากตารางที่ 15 และ รูปที่ 13



รูปที่ 12 กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่างน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด ได้แก่ เทพธาโร และกระชาย ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์



รูปที่ 13 กราฟแสดงการเปรียบเทียบระหว่างสารประกอบ 2 ชนิด ได้แก่ Linalool และ Geraniol กับความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและทำการคัดแยกน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยใช้เทคนิคแกสโครมาโทกราฟี / แมสสเปกโทรเมตรี (GC/MS)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย 23 ชนิด โดยทดสอบกับแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* , *Bacillus subtilis* , *Streptococcus pyogenes* , *Salmonella typhi* , *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* เพื่อคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้มากสายพันธุ์ที่สุด และที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโดยดูจากการเกิดบริเวณยับยั้งรอบแผ่นยา (Inhibition zone) และ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง จากการใช้น้ำมันหอมระเหย 20 ไมโครลิตร / แผ่นยา พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระชาย สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากเทพธาโรสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ยกเว้น *Pseudomonas aeruginosa* แต่ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด น้ำมันหอมระเหยจากกระชายสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้ความเข้มข้น 42.3 - 338.3 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร (MIC) ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากเทพธาโรสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยใช้ความเข้มข้น 10.9 - 21.9 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร (MIC) และน้ำมันหอมระเหยจากกระชายสามารถฆ่าทำลายแบคทีเรียโดยใช้ความเข้มข้น 169.1 - 676.7 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร (MBC) ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากเทพธาโรสามารถฆ่าทำลายแบคทีเรียโดยใช้ความเข้มข้น 21.9 - 87.7 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร (MBC) เมื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย โดยใช้เทคนิค GC/MS พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากกระชายมีองค์ประกอบหลัก คือ 3 - Carene (33.82%) และ Geraniol (28.84%) ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากเทพธาโรมีองค์ประกอบหลัก คือ Linalool (96.17%)

อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ยังได้ทดลอง นำสารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ชนิดมาทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า 3 - Carene สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Streptococcus pyogenes* และ *Escherichia coli* โดยใช้ความเข้มข้น 78.1 - 312.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร (MIC) ส่วน Geraniol สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยใช้ความเข้มข้น 19.5 - 1250 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร (MIC) ส่วน Linalool สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 5 สายพันธุ์ ยกเว้นเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้ความเข้มข้น 19.5 - 78.1 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร (MIC)

จากงานวิจัยในครั้งนี้เป็นประโยชน์ในการที่จะศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรที่มาใช้เป็นยาต้านจุลชีพต่อไป ซึ่งจะสามารถช่วยประเทศชาติประหยัดงบประมาณในด้านยาได้เป็นอย่างมาก เนื่องจากประเทศไทยยังมีพืชสมุนไพรอยู่จำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าสามารถหาพืชสมุนไพรที่สามารถทำลายเชื้อ Ps. aeruginosa ซึ่งเป็นเชื้อที่มีปัญหาเรื่องการดื้อยาค่อนข้างสูงได้สำเร็จ จะสามารถประหยัดได้มาก เนื่องจากยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมีราคาแพง

และจากผลการวิจัยในครั้งนี้ จะเห็นว่ากระชายและเทพธาโรซึ่งเป็นพืชที่มีอยู่มากในประเทศไทยสามารถทำลายเชื้อได้อย่างกว้างขวาง (broad spectrum) คือทั้งเชื้อแกรมบวกและเชื้อแกรมลบ จากประโยชน์ตรงนี้สามารถนำมาพัฒนาเป็นรูปแบบยาเตรียมที่มีความสะดวกในการใช้และมีความปลอดภัยต่อมนุษย์ เช่น ยาครีม (creams) , ยาเม็ดหรือแคปซูล (tablets or capsules) เป็นต้น ซึ่งน่าจะมีการศึกษาต่อไป