

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหย

จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืช โดยการกลั่นด้วยน้ำ (Water distillation) ด้วยเครื่องมือ Clevenger apparatus ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้จากพืชต่าง ๆ

พืช	ส่วนของพืช	ปริมาณ (กรัม)	ปริมาตร น้ำ (ml)	ปริมาณ น้ำมันหอมระเหย (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ของ น้ำมันหอมระเหย
กระชาย	เหง้าสด	589	1,400	1.51	0.26
กระเพรา	ใบสด	1,932	9,300	2.24	0.11
ขมิ้นชัน	เหง้าสด	516	1,300	1.55	0.33
ข่า	เหง้าสด	1,345	2,300	1.69	0.12
ขิง	เหง้าสด	870	1,000	0.73	0.083
ขี้เหล็กเทศ	ใบสด	630	1,200	-	-
คื่นฉ่าย	ใบสด	2,150	4,000	0.50	0.023
จอก	ใบสด	332	2,600	-	-
ชุมเห็ดเทศ	ใบสด	104	1,400	-	-
ตะไคร้	ใบสด	513	2,500	2.86	0.56
ทองพันชั่ง	ใบสด	569	1,800	-	-
น้อยหน่า	ใบสด	640	2,200	-	-
บัวบก	ใบสด	90	1,300	0.04	0.04
ผักชีฝรั่ง	ใบสด	858	4,100	0.07	0.008
ผักเสี้ยน	ใบสด	376	3,000	1.1	0.29
พลู	ใบสด	448	2,600	0.85	0.18
พิกุล	ใบสด	121	1,350	-	-
มะกรูด	ใบสด	304	2,900	3.25	1.07
แมงลัก	ใบสด	157	1,400	0.18	0.11
โหระพา	ใบสด	1,263	6,550	2.62	0.2
อบเชยเทศ	ใบสด	65	1,000	0.60	0.98

หมายเหตุ "-" หมายถึง สกัดน้ำมันหอมระเหยไม่ได้

ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหย ดังแสดงในตารางที่ 1 สามารถแบ่งกลุ่มพืชที่นำมาศึกษาได้ 2 กลุ่ม คือ

1. พืชที่สกัดน้ำมันหอมระเหยไม่ได้ ได้แก่ ขี้เหล็กเทศ จอก ชุมเห็ดเทศ ทองพันชั่ง น้อยหน่า พิกุล
2. พืชที่สกัดน้ำมันหอมระเหยได้ ได้แก่ กระชาย กะเพรา ขมิ้นชัน ชำ ชิง คื่นช่าย ตะไคร้ บัวบก ผักชีฝรั่ง ผักเสี้ยน พลู มะกรูด แมงลัก โหระพา อบเชยเทศ

เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้เรียงตามลำดับได้ดังนี้ มะกรูด 1.07% อบเชยเทศ 0.98% ตะไคร้ 0.56% ขมิ้นชัน 0.33% ผักเสี้ยน 0.29% กระชาย 0.26% โหระพา 0.20% พลู 0.18% ชำ 0.12% กะเพรา 0.11% แมงลัก 0.11% ชิง 0.083% คื่นช่าย 0.023% บัวบก 0.04% ผักชีฝรั่ง 0.008%

จากผลการทดลองพบว่าพืชที่ให้เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันหอมระเหยสูงสุดคือ มะกรูด (สกัดจากส่วนของใบ) ได้น้ำมันหอมระเหย 1.07%

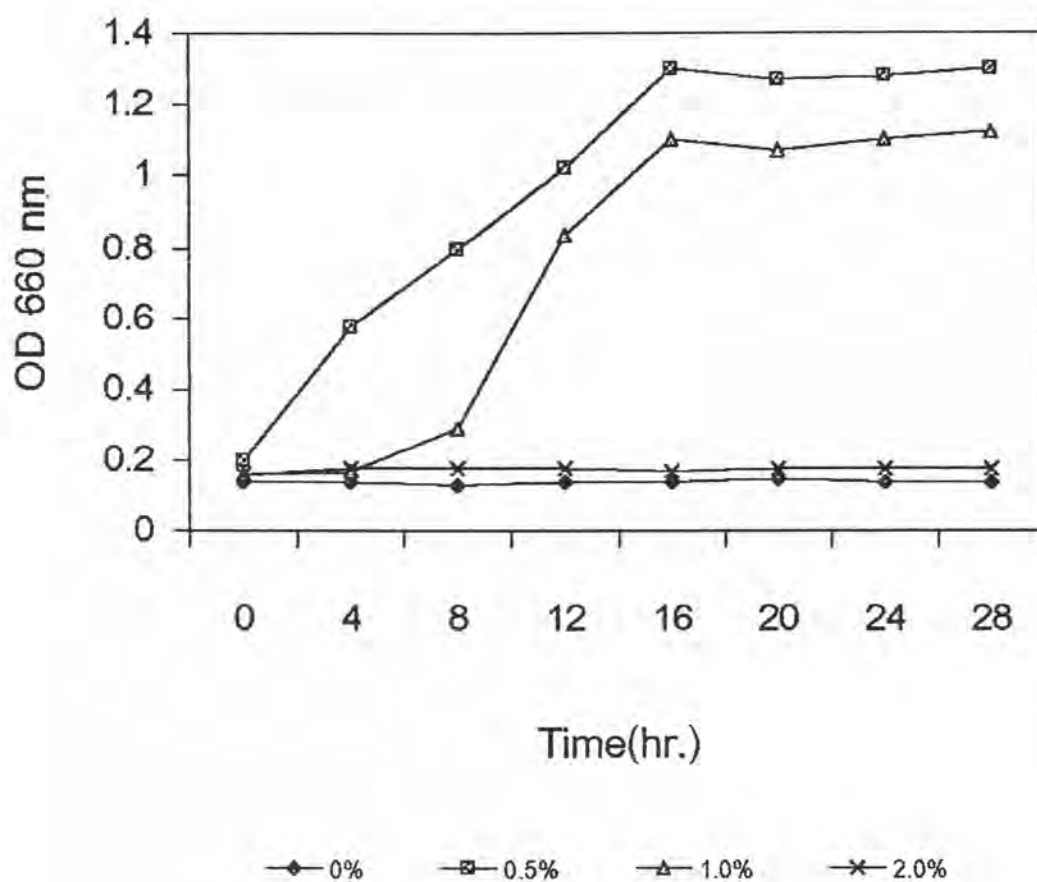
4.2 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อ

ผลการศึกษาหาช่วงเวลาที่ยีสต์ *M. furfur* มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว (Log phase) และความเข้มข้นของน้ำมันมะกอกที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ได้ผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรในช่วงเวลาต่างๆของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. furfur* ที่ความเข้มข้นของน้ำมันมะกอกต่างๆ

Time (hr.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ที่ Olive oil (%)			
	0	0.5	1	2
0	0.14	0.20	0.16	0.16
4	0.14	0.58	0.17	0.18
8	0.13	0.8	0.29	0.18
12	0.14	1.02	0.84	0.18
16	0.14	1.3	1.1	0.17
20	0.15	1.27	1.07	0.18
24	0.14	1.28	1.1	0.18
28	0.14	1.3	1.12	0.18

รูปที่ 1 กราฟแสดงการเจริญของเชื้อ *M. furfur* ที่เปอร์เซ็นต์ Olive oil ต่าง ๆ



จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ในช่วงเวลาต่างๆของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. furfur* ที่ความเข้มข้นของน้ำมันมะกอกต่างๆ (ตารางที่ 3) และกราฟแสดงการเจริญของเชื้อ *M. furfur* ที่เปอร์เซ็นต์ Olive oil ต่างๆ (รูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อโดยไม่เติมน้ำมันมะกอก (0 % olive oil) และที่ความเข้มข้นของน้ำมันมะกอก 2 % พบว่าเชื้อไม่เจริญ โดยดูได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่คงที่ไม่เปลี่ยนแปลง ได้กราฟเป็นเส้นตรง ส่วนที่เติมน้ำมันมะกอก 0.5% และ 1 % พบว่าเชื้อเจริญได้ดี (ภาคผนวก ง) เวลาในการแบ่งตัวเป็นสองเท่า (doubling time ; td) จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของน้ำมันมะกอก 1 % คือ 5.04 ชม. มีค่าสูงกว่า 0.5 % ซึ่งมีค่าเท่ากับ 10.74 ชม. แสดงว่าการเติมน้ำมันมะกอก 1 % ทำให้แบ่งตัวได้รวดเร็วที่สุด (วิธีคำนวณจากภาคผนวก ง) และจากกราฟแสดงให้เห็นว่าช่วง Mid log phase ที่เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง หรือมีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.8 ดังนั้นจะได้เลือกเติมน้ำมันมะกอก 1 % ในการเตรียมเชื้อเพื่อใช้ทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืช

4.3 Disc diffusion test

นำน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้มาเจือจาง แล้วหยดลงบนดิสก์ ให้ได้ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 30, 15, 7.5, 3.75 ไมโครกรัม/ดิสก์ เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ *M. furfur* ทั้ง 4 isolates ของน้ำมันหอมระเหย โดยวัดขนาดของ Clear zone ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับ Ketoconazole ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคเกลื้อน ได้ผลดังตารางที่ 4, 5, 6 และ 7

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของ *M. furfur* (Isolate 1)
ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่างๆ

น้ำมันหอมระเหยจากพืช	Zone of inhibition (mm) ของน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น (ug/disc)			
	30	15	7.5	3.75
กระชาย	-	-	-	-
กะเพรา	-	-	-	-
ขมิ้นชัน	-	-	-	-
ข่า	-	-	-	-
ขิง	-	-	-	-
ขี้เหล็กเทศ	-	-	-	-
คื่นฉ่าย	-	-	-	-
ตะไคร้	-	-	-	-
ผักชีฝรั่ง	-	-	-	-
พลู	-	-	-	-
พริกไทย	-	-	-	-
มะกรูด	-	-	-	-
มะตูม	-	-	-	-
โหระพา	-	-	-	-
อบเชยเทศ	-	-	-	-

หมายเหตุ "-" หมายถึง ไม่เกิด Clear zone คือมีการเจริญของเชื้อ
น้ำมันมะตูม ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. โสภณ เจริญสำราญ

ตารางที่ 4 (ต่อ) แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของ *M. furfur*
(Isolate 1) ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่างๆ

น้ำมันหอมระเหยจากพืช	Zone of inhibition (mm) ของน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น (ug/disc)			
	30	15	7.5	3.75
Control				
Media		-		
Media + Methanol		-		
Media + Inoculum		+		
Media + Inoculum + Methanol		+		
Media + Ketoconazole (15ug/disc)		20.0 ± 0.2		

หมายเหตุ " - " หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อเกล็ดอ่อน

" + " หมายถึง มีการเจริญของเชื้อเกล็ดอ่อน

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของ *M. furfur* (Isolate 2) ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่างๆ

น้ำมันหอมระเหยจากพืช	Zone of inhibition (mm) ของน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น (ug/disc)			
	30	15	7.5	3.75
กระชาย	-	-	-	-
กะเพรา	-	-	-	-
ขมิ้นชัน	-	-	-	-
ชำ	-	-	-	-
ขิง	-	-	-	-
ขี้เหล็กเทศ	-	-	-	-
คินฉ่าย	-	-	-	-
ตะไคร้	-	-	-	-
ผักชีฝรั่ง	-	-	-	-
พลู	-	-	-	-
พริกไทย	-	-	-	-
มะกรูด	-	-	-	-
มะตูม	-	-	-	-
โหระพา	-	-	-	-
อบเชยเทศ	-	-	-	-

หมายเหตุ "-" หมายถึง ไม่เกิด Clear zone คือมีการเจริญของเชื้อ

ตารางที่ 5 (ต่อ) แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของ *M. furfur*
(Isolate 2) ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่างๆ

น้ำมันหอมระเหยจากพืช	Zone of inhibition (mm) ของน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น (ug/disc)			
	30	15	7.5	3.75
Control				
Media		-		
Media + Methanol		-		
Media + Inoculum		+		
Media + Inoculum + Methanol		+		
Media + Ketoconazole (15ug/disc)		20.0 ± 0.2		

หมายเหตุ " - " หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อเกล็ดขน

" + " หมายถึง มีการเจริญของเชื้อเกล็ดขน

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของ *M. furfur* (Isolate 3) ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่าง ๆ

น้ำมันหอมระเหยจากพืช	Zone of inhibition (mm) ของน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น (ug/disc)			
	30	15	7.5	3.75
กระชาย	-	-	-	-
กะเพรา	-	-	-	-
ขมิ้นชัน	-	-	-	-
ข่า	-	-	-	-
ขิง	-	-	-	-
ขี้เหล็กเทศ	-	-	-	-
คินฉ่าย	-	-	-	-
ตะไคร้	-	-	-	-
ผักชีฝรั่ง	-	-	-	-
พลู	-	-	-	-
พริกไทย	-	-	-	-
มะกรูด	-	-	-	-
มะตูม	-	-	-	-
โหระพา	-	-	-	-
อบเชยเทศ	-	-	-	-

หมายเหตุ "-" หมายถึง ไม่เกิด Clear zone คือมีการเจริญของเชื้อ

ตารางที่ 6 (ต่อ) แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของ *M. furfur*
(Isolate 3) ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่างๆ

น้ำมันหอมระเหยจากพืช	Zone of inhibition (mm) ของน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น (ug/disc)			
	30	15	7.5	3.75
Control				
Media		-		
Media + Methanol		-		
Media + Inoculum		+		
Media + Inoculum + Methanol		-		
Media + Ketoconazole (15ug/disc)		20.0 ± 0.2		

หมายเหตุ " - " หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อเกล็ดขน

" + " หมายถึง มีการเจริญของเชื้อเกล็ดขน

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของ *M. furfur* (Isolate 4) ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่างๆ

น้ำมันหอมระเหยจากพืช	Zone of inhibition (mm) ของน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น (ug/disc)			
	30	15	7.5	3.75
กระชาย	-	-	-	-
กะเพรา	-	-	-	-
ขมิ้นชัน	-	-	-	-
ข่า	-	-	-	-
ขิง	-	-	-	-
ซีเหล็กเทศ	-	-	-	-
คินฉ่าย	-	-	-	-
ตะไคร้	-	-	-	-
ผักชีฝรั่ง	-	-	-	-
พลู	-	-	-	-
พริกไทย	-	-	-	-
มะกรูด	-	-	-	-
มะตูม	-	-	-	-
โหระพา	-	-	-	-
อบเชยเทศ	-	-	-	-

หมายเหตุ "-" หมายถึง ไม่เกิด Clear zone คือมีการเจริญของเชื้อ

ตารางที่ 7 (ต่อ) แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของ *M. furfur* (Isolate 4) ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่างๆ

น้ำมันหอมระเหยจากพืช	Zone of inhibition (mm) ของน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น (ug/disc)			
	30	15	7.5	3.75
Control				
Media		-		
Media + Methanol		-		
Media + Inoculum		+		
Media + Inoculum + Methanol		+		
Media + Ketoconazole (15ug/disc)		20.0 ± 0.2		

หมายเหตุ " - " หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อเกล็ดขน

" + " หมายถึง มีการเจริญของเชื้อเกล็ดขน

จากผลการทดสอบน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆโดยวิธี Disc diffusion ดังตารางที่ 4-7 ปรากฏว่าไม่พบ Clear zone จากน้ำมันหอมระเหยของพืชทุกชนิดต่อเชื้อ *M. furfur* ทั้ง 4 isolates เมื่อเทียบกับยา Ketoconazole ซึ่งได้ Clear zone ขนาด 20.0 ± 0.2 มม.ต่อทุก isolate ของ *Malassezia furfur* ไม่แตกต่างกัน

4.4 Agar dilution test

เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibition Concentration , MIC) ของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อเกลื้อน โดยทำเจือจางสารต้านจุลชีพเป็นปริมาณจากมากไปน้อย เพื่อดูปริมาณที่แท้จริงหรือใกล้เคียงที่สุดของสารต้านจุลชีพที่ต้องใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพ โดยใช้วิธี Agar dilution

นำน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชทุกชนิดมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อเกลื้อน โดยทำเจือจางน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 15,288 , 10,192 , 5,096 , 2,048 , 1,024 , 512 , 128 , 64 , 32 , 16 , 8 , 4 , 2 , 1 , 0.5 , 0.25 , 0.125 , 0.0625 , 0.03125 ไมโครกรัม/มล. และสำหรับยา Ketoconazole ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 512 , 128 , 64 , 32 , 16 , 8 , 4 , 2 , 1 , 0.5 , 0.25 , 0.125 , 0.0625 , 0.03125 ไมโครกรัม/มล. ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8

ผลการหาค่า MIC (ตารางที่ 8) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา ที่ความเข้มข้น 10,192 และ 15,288 ไมโครกรัม/มล. ไม่มีการเจริญของเชื้อ แต่ที่ความเข้มข้น 5,096 ไมโครกรัม/มล. มีการเจริญของเชื้อ จึงเตรียมน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา ให้มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 10,192 , 9,618 , 8,918 , 8,599.5 , 8,281 , 7,922.5 , 7,644 , 7,325.5 , 6,370 , 5,096 ไมโครกรัม/มล. เพื่อให้ได้ค่า MIC ที่ถูกต้องยิ่งขึ้น

ตารางที่ 8 แสดงการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหย(MIC) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อเกล็ดสน

Essential oil	MIC (ug/ml) Isolate 1	MIC (ug/ml) Isolate 2	MIC (ug/ml) Isolate 3	MIC (ug/ml) Isolate 4
กระชาย	-	-	-	-
กะเพรา	-	-	-	-
ขมิ้นชัน	-	-	-	-
ชา	-	-	-	-
ขิง	-	-	-	-
ขี้เหล็กเทศ	-	-	-	-
คินฉ่าย	-	-	-	-
ตะไคร้	-	-	-	-
ผักชีฝรั่ง	-	-	-	-
พลู	-	-	-	-
พริกไทย	-	-	-	-
มะกรูด	-	-	-	-
มะตูม	-	-	-	-
โหระพา	7,922.5 - 8,281	7,922.5 - 8,281	7,922.5 - 8,281	7,922.5 - 8,281
อบเชยเทศ	-	-	-	-
Ketoconazole	0.0625 - 0.125	0.0625 - 0.125	0.0625 - 0.125	0.0625 - 0.125

หมายเหตุ " - " หมายถึง มีการเจริญของเชื้อเกล็ดสนที่ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยสูงสุดคือ 15,288 ไมโครกรัม/มล.

ตารางที่ 8 (ต่อ) แสดงการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหย(MIC) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อเกล็ดนอน

Control	
Media	-
Media + Methanol	-
Media + Inoculum	+
Media + Inoculum + Methanol	+

หมายเหตุ "-" หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อเกล็ดนอน

"+" หมายถึง มีการเจริญของเชื้อเกล็ดนอน

จากตารางที่ 8 ผลการทำ MIC โดยวิธี Agar dilution แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจาก กระชาย กะเพรา ขมิ้นชัน ข่า ขิง ขี้เหล็กเทศ คื่นช่าย ตะไคร้ ผักชีฝรั่ง ผักชี พริกไทย มะกรูด มะตูม อบเชยเทศ ที่ความเข้มข้น 0.03125 – 15,288 ไมโครกรัม/มล. ไม่สามารถต้านการเจริญของ *M. furfur* ได้

น้ำมันหอมระเหยจากโหระพาสามารถต้านการเจริญของ *M. furfur* ได้ โดยได้ค่า MIC อยู่ในช่วง 7,922.5 - 8,281 ไมโครกรัม/มล. และ Ketoconazole มีค่า MIC ต่ำต่อเชื้อ *M. furfur* อยู่ในช่วง 0.0625 - 0.125 ไมโครกรัม/มล.

4.5 Disc diffusion ของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา

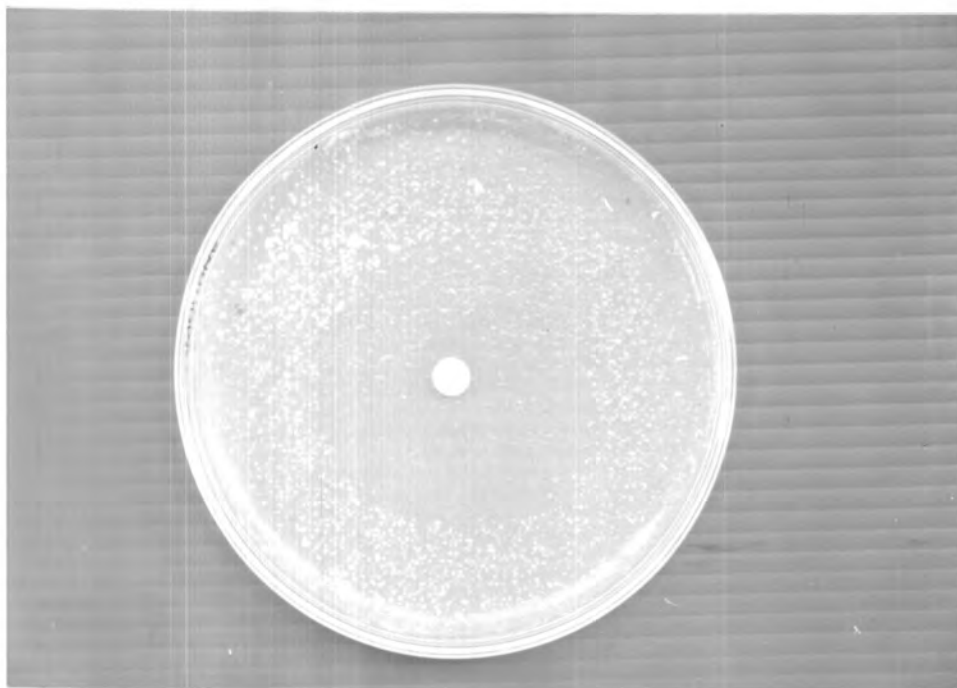
ผลการหาค่า MIC จากตารางที่ 8 น้ำมันหอมระเหยจากโหระพาสามารถต้านการเจริญของ *M. furfur* ได้โดยได้ค่า MIC อยู่ในช่วง 7,922.5 - 8,281 ไมโครกรัม/มล. จึงได้นำน้ำมันหอมระเหยจากโหระพามาทดสอบ Disc diffusion กับ *M. furfur* ทั้ง 4 isolate เพื่อศึกษา Zone of inhibition โดยการวัดขนาดของ Clear zone ซึ่งในการทดลองนี้ทำการเจือจางน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้น 10,000 และ 5,000 ไมโครกรัม/ดิสก์ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 2 - 5

ตารางที่ 9 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของ *M. furfur* ทั้ง 4 isolates ของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา

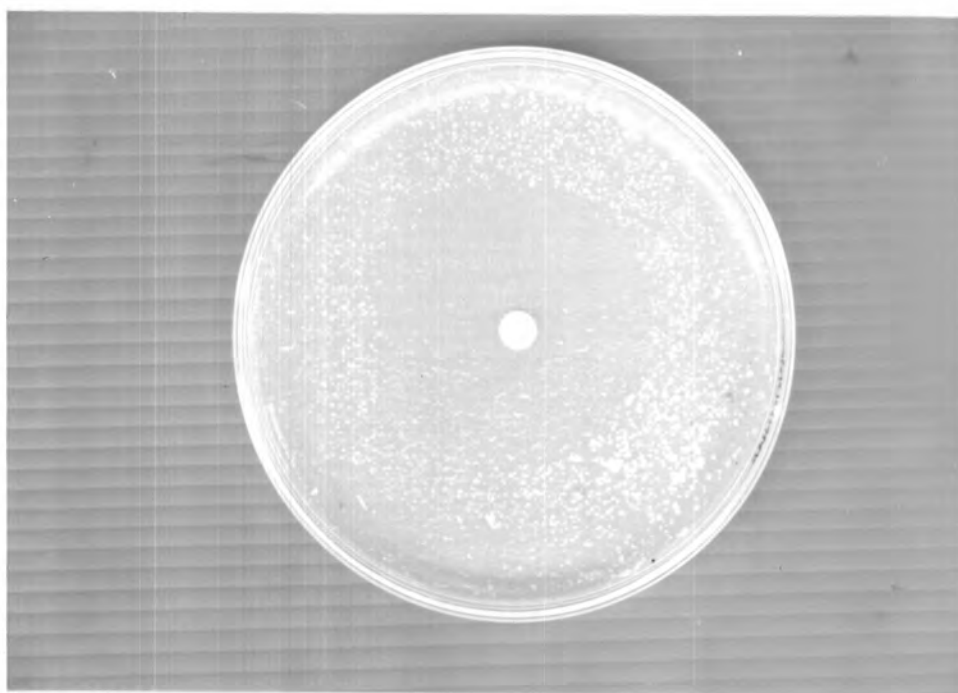
<i>M. furfur</i>	Zone of inhibition (mm)ของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาที่ความเข้มข้น(ug/disc)	
	10,000	5,000
Isolate 1	42.0 ±0.1	40.0±0.1
Isolate 2	42.0±0.3	40.0±0.1
Isolate 3	42.3±0.1	40.0±0.1
Isolate 4	42.4±0.3	40.0±0.1

ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของ *M. furfur* ทั้ง 4 isolates ของ Ketoconazole

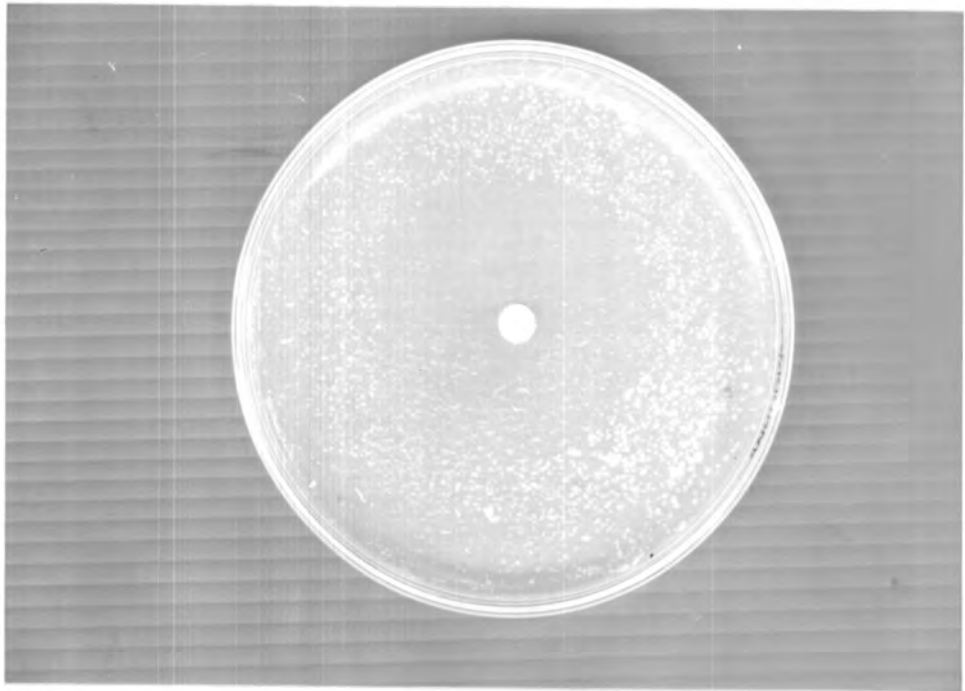
<i>M. furfur</i>	Zone of inhibition (mm)ของ Ketoconazoleที่ความเข้มข้น (ug/disc)	
	30	15
Isolate 1	20.0 ±0.3	20.0 ± 0.2
Isolate 2	20.0 ±0.5	20.0 ± 0.2
Isolate 3	20.0 ±0.3	20.0 ± 0.2
Isolate 4	20.0 ±0.3	20.0 ± 0.2



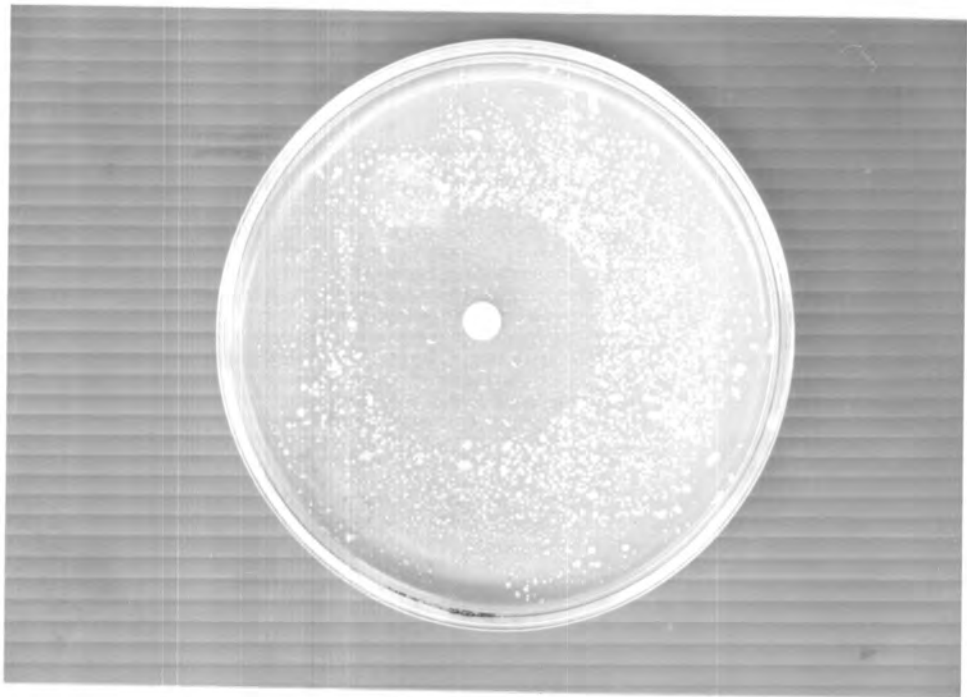
รูปที่ 2 แสดง Clear Zone ของ น้ำมันโพระพา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. furfur*
(Isolate 1)



รูปที่ 3 แสดง Clear Zone ของ น้ำมันโหระพา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. furfur*
(Isolate 2)



รูปที่ 4 แสดง Clear Zone ของ น้ำมันโหระพา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. furfur*
(Isolate 3)



รูปที่ 5 แสดง Clear Zone ของ น้ำมันโหระพา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. furfur*
(Isolate 4)