บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อกลาก จะมีตัวควบคุม (Control) คือเมทธานอล ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายในการทำการเจือจาง ของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งเมทธานอลจะเป็น Negative control จะต้องไม่มีบริเวณที่เกิดการต้านการเจริญของเชื้อรา เพื่อให้ทราบว่า บริเวณที่เกิดการต้านการเจริญของสารในน้ำมันหอมระเหย ไม่ใช่เกิดจากเมทธานอล นอกจากนั้นยังมี Positive control ซึ่งจะใช้เปรียบเทียบว่าสารปฏิชีวนะที่มีขายในท้องตลาด จะมีผลต้านการเจริญของเชื้อกลากได้มากน้อยเท่าใด เมื่อเปรียบเทียบกับสารในน้ำมันหอมระเหยที่ได้นำมาทดสอบ การทดสอบหาค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหย พบว่ามีน้ำมันหอมระเหยที่มีค่า MIC ใกล้เคียง 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่า MIC ของสารปฏิชีวนะมาตราฐานที่ใช้กัน คือ น้ำมันโหระพามีค่า MIC เท่ากับ 34.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นน้ำมันหอมระเหย จากการกลั่นใบโหระพาด้วยไอน้ำ จึงมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อกลากได้ดีพอๆ กับสารปฏิชีวนะที่มีขายตามท้องตลาด น้ำมันหอมระเหยเป็นสารที่สกัดมาจากธรรมชาติ ส่วนสารปฏิชีวนะเป็นสารที่สังเคราะห์ หรือกึ่งสังเคราะห์ขึ้นมา น้ำมันหอมระเหยจึงทำให้เกิดผลข้างเคียงได้น้อยกว่า และมีความปลอดภัยมากกว่าเมื่อนำมาใช้กับมนุษย์ ผู้ป่วยบางคนเกิดอาการแพ้ยา หรือเกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ดังนั้นการนำเอาน้ำมันหอมระเหยมาใช้รักษาโรค จึงมีผลกระทบต่อผู้ป่วยน้อยกว่า

จากการทดลองของ Carson และ Riley (1994) [57] ได้ศึกษาถึงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 12 ชนิด ของ tea tree oil โดยใช้วิธี Disk diffusion ได้ค่าเฉลี่ยขอบเขตยับยั้งของจุลินทรีย์ มีค่าตั้งแต่ 0 - 56.4 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางแผ่น disk เท่ากับ 12.7 มิลลิเมตร ใส่น้ำมันหอมระเหยที่ไม่เจือจาง ปริมาณ 30 μl. โดย tea tree oil จะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Branhamella catarrhalis* ได้มากที่สุด คือ 56.4 มิลลิเมตร เปรียบเทียบกับ ค่าเฉลี่ยขอบเขตยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นจากโหระพา ซึ่งมีความกว้างมากที่สุด ในการยับยั้งเชื้อกลาก 3 สายพันธุ์ คือ *mentagrophytes, T. rubrum* และ *E. floccosum* ซึ่งได้เท่ากับ 44.6, 43.3 และ 47.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยแผ่น disk มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยขอบเขตยับยั้งแล้ว มีค่าใกล้เคียงกัน

จากการทดลองได้ทำสารแขวนลอย ของเชื้อราทดสอบ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 40 % Transmittance จึงจะได้ความเข้มข้นของเชื้อราเท่ากับ 1×10^6 - 1×10^7 colony - forming units/ml. (cfu/ml) แล้วจึงนำไปทำ Disk diffusion test ได้ แต่ในการทดลองของ Chee - Leok และคณะ (1994) [52] ได้ทำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา Dermatophytes ในประเทศสิงคโปร์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 90 % Transmittance ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของเชื้อราเท่ากับ 1×10^6 cfu/ml จึงได้นำไปทดสอบกับ ยา Griseofulvin, Ketoconazole และ Itraconazole แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสารแขวนลอยของเชื้อกลาก *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* และ *E. floccosum* ซึ่งได้ทำการทดลอง โดยใช้สารแขวนลอยที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร เท่ากับ 90 % Transmittance, 80 %Transmittance, 70 % Transmittance, 60 % Transmittance, 50 % Transmittance และ 40 % Transmittance จึงพบว่าที่ 40 % Transmittance จะได้ความเข้มข้นของเชื้อรา ที่เพียงพอจะทำให้เชื้อราเจริญบนอาหาร YNB ได้ ดังนั้นการเจริญของเชื้อราที่ทำเป็นสารแขวนลอย หากใช้ความเข้มข้นน้อยเกินไป เชื้อราไม่เจริญ ไม่ใช่เป็นเพราะสารจาก disk ที่ทำการทดสอบ ไปยับยั้งการเจริญ อาจเป็นเพราะปริมาณเชื้อน้อยเกินไปก็ได้

จากการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร 20 ชนิด นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อกลาก 3 สายพันธุ์ คือ *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* และ *Epidermophyton floccosum* พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อกลากทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้ดี คือ น้ำมันตื่นฉ่าย, น้ำมันเทียนข้าวเปลือก, น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน, น้ำมันพริกไทย, น้ำมันผักชี และน้ำมันโหระพา จึงได้ทำการทดสอบหาความเข้มข้นน้อยที่สุด ของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อกลากได้ (ค่า MIC) พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีค่า MIC ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อกลากทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ น้ำมันพริกไทย และ น้ำมันโหระพา ซึ่งมีค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. mentagrophytes* เท่ากับ 53.54 และ 34.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ, ค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. rubrum* เท่ากับ 109.05 และ 72.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. floccosum* เท่ากับ 69.80 และ 96.66 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Irobi และ Daramola (1993) [33] ได้ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *T. rubrum* และ *M. gypseum* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคกลาก ของสารสกัดจากใบ *Mitracarpus villosus* พบว่าได้ค่าขอบเขตยับยั้งเท่ากับ 17.5 และ 15.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ และได้ค่า MIC เท่ากับ 0.05 และ 0.05 mg/ml. ตามลำดับ โดยทำการสกัดใบ *M. villosus* ด้วย ethanol 95 % เมื่อได้สารสกัดแล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อกลาก โดยวิธี Agar diffusion ซึ่งทำสปอร์แขวนลอย ปิเปตใส่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Potato Dextrose Agar (PDA) อยู่ จากนั้นจึงใส่สารสกัด 0.05 ml. แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. rubrum* ของน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นจากพริกไทยและโหระพา ซึ่งได้ค่าเฉลี่ยขอบเขตยับยั้งเท่ากับ 39.2 และ 43.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ และค่า MIC เท่ากับ 0.109 และ 0.72 mg/ml. ตามลำดับ พบว่าค่าเฉลี่ยขอบเขตยับยั้งของน้ำมันพริกไทย และน้ำมันโหระพา มีค่ามากกว่า สารสกัดจากใบ *M. villosus* ซึ่งแสดงว่ายับยั้ง *T. rubrum* ได้ดีกว่า แต่ค่า MIC ของ น้ำมันพริกไทยและน้ำมันโหระพา มีค่ามากกว่า สารสกัดจากใบ *M. villosus* แสดงว่าต้องใช้ ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากกว่าในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. rubrum* ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นจากพริกไทย และ โหระพา กับ สารสกัดจากใบ *M. villosus* จึงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. rubrum* ได้ดีพอๆกัน

การใช้ Positive control เป็นสารปฏิชีวนะที่มีขายตามท้องตลาด คือ Whitfield® ความเข้มข้น 30 μg/ml. ปริมาณ 2 μl/disk ได้ค่าเฉลี่ยขอบเขตยับยั้งของเชื้อรา *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* และ *E. floccosum* เท่ากับ 20.2, 7.8 และ 12.8 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ Nizoral® ความเข้มข้น 30 μg/ml. ปริมาณ 2 μl/disk ได้ค่าเฉลี่ยขอบเขตยับยั้งของเชื้อรา *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* และ *E. floccosum* เท่ากับ 22.2, 25.5 และ 23.6 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Pankajalakshmi และ Taralakshmi (1994) [51] ได้ศึกษา Disk diffusion test ของสาร Allylamine ซึ่งเป็นสารที่พัฒนาขึ้นใหม่ เพื่อใช้เป็นสารต้านรา และใช้รักษาโรคกลาก โดยสาร Allylamine มีอนุพันธุ์คือ Terbinafine และ Naftifine โดยมีขอบเขตยับยั้งเชื้อ *Microsporum* sp., *Trichophyton* sp. และ *E. floccosum* ที่แยกจากผู้ป่วยในประเทศชาอุดิอาระเบีย มีค่าตั้งแต่ 32 - 40 และ 30 - 50 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบการใช้สารปฏิชีวนะ พบว่า สารปฏิชีวนะ Whitfield ® และ Nizoral ® มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคกลาก ได้ดีเกือบเท่ากับสาร

ปฏิชีวนะ Terbinafine และ Naftifine ดังนั้นสารปฏิชีวนะที่ใช้เป็น Positive Control เหมาะสมที่ใช้ในการเป็นตัวควบคุมในงานวิจัย

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อกลาก ด้วยเทคนิค GC/MS พบว่า น้ำมันพริกไทยประกอบไปด้วย องค์ประกอบหลักคือ Limonene 73.95 % และ Linalool 7.41 % และน้ำมันโหระพาประกอบไปด้วย องค์ประกอบหลักคือ Anethole 94.92 % และ Eucalyptol 23.9 % เช่นเดียวกับรายงานของ Liangfeng, Z. และคณะ ในปี ค.ศ. 1993 [53] ได้ศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันโหระพา โดยเทคนิค GC-MS และ GC-IR พบว่าน้ำมันโหระพาประกอบด้วย Anethole 91.52 %, Linalool 1.02 % และ Limonene 0.10 % และ น้ำมันพริกไทยประกอบด้วย Limonene 17.44 % และ Linalool 0.34 %

การแยกองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อกลาก ด้วยเทคนิค HPLC ของน้ำมันหอมระเหยพริกไทยและโหระพา แล้วเก็บแต่ละ fraction ของพีกไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อกลาก โดยวิธี Disk diffusion test พบว่า ไม่พบสารจากพีกใดๆ ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อกลาก จึงได้เพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย ก่อนที่จะฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อให้ความเข้มข้นของสารแต่ละพีกเพิ่มมากขึ้น เก็บ fraction ต่างๆ ของพีกไปทดสอบกับเชื้อกลากอีกครั้ง ก็ไม่พบว่าสารในพีกใดมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อกลาก อาจเป็นเพราะเมื่อฉีดน้ำมันหอมระเหยเข้าไปในเครื่อง HPLC แล้วแยกองค์ประกอบทางเคมีออกมา สารที่แยกได้อาจระเหยไปเมื่ออยู่ในคอลัมน์ ในระหว่างการแยกองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย หรือลด activity ลงไปถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย ก่อนฉีดเข้าไปในเครื่อง และแม้จะเก็บ fraction ของพีกหลายๆ ครั้ง (20 ครั้ง ครั้งละ 100 ไมโครลิตร) มารวมกัน ก่อนที่จะระเหยตัวทำละลายเฮกเซน ออกไป เมื่อนำไปทดสอบกับเชื้อรา ก็ยังไม่สามารถบอกได้ว่า สารใดในน้ำมันหอมระเหย ที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา

ด้วยเหตุนี้จึงมีการเลือกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำมันพริกไทย และน้ำมันโหระพา และได้เลือกสาร Anethole, Eucalyptus, Limonene และ Linalool มาทำการทดสอบกับเชื้อกลาก พบว่า Eucalyptus ไม่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อกลากเลย ส่วน Anethole, Limonene และ Linalool มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อกลากทั้ง 3 สายพันธุ์ โดย Limonene จะมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อกลากทั้ง 3 สายพันธุ์ มากกว่า Anethole และ Linalool โดยให้ขอบเขตยับยั้งเฉลี่ยของเชื้อ *T. mentagrophytes* เท่ากับ 32.8, 22.7 และ 8.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ

, ขอบเขตยับยั้งเฉลี่ยของเชื้อ *T, rubrum* เท่ากับ 21.0, 20.0 และ 8.2 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ ขอบเขตยับยั้งเฉลี่ยของเชื้อ *E. floccosum* เท่ากับ 41.2, 14.3 และ 13.2 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากรายงานของ Modawi และคณะ (1984) [56] ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นจาก *Ocimum basilicum* var. *thysiflorum* ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือ Linalool, Methyl chavicol, Cineole และ Eugenol และพบว่าน้ำมันหอมระเหยนี้ มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา และจุลินทรีย์บางชนิด และมีการนำน้ำมันหอมระเหย ไปใช้เป็นส่วนประกอบของยาไล่ยุง ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าน้ำมันพริกไทย และน้ำมันโหระพา สามารถนำไปพัฒนา ใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตยารักษาโรคกลากได้ เพราะมีองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อกลาก คือ Limonene, Anethole และ Linalool

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย