

ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยที่ต้านเชื้อยีสต์มาลาสซิเซียพาโคเดอมาดิส ที่คัดแยกจากช่องหูชั้นนอกอักเสบในสุนัข

ธนพร อศวพัฒนากุล¹, วัชรวิ คุณกิตติ², รัตนภรณ์ ลีสิงห์³, จีรรัตน์ เอี่ยมสะอาด^{4*}

บทคัดย่อ

ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยที่ต้านเชื้อยีสต์มาลาสซิเซียพาโคเดอมาดิสที่คัดแยกจากช่องหูชั้นนอกอักเสบในสุนัข

ธนพร อศวพัฒนากุล¹, วัชรวิ คุณกิตติ², รัตนภรณ์ ลีสิงห์³, จีรรัตน์ เอี่ยมสะอาด^{4*}

ว. เกษตรศาสตร์อีสาน 2556; 9(1) : 40-51

Received : 13 December 2012

Accepted : 31 January 2013

บทนำ: เชื้อยีสต์มาลาสซิเซีย พาโคเดอมาดิสเป็นเชื้อที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคช่องหูชั้นนอกอักเสบในสุนัขอย่างมีนัยสำคัญ ปัญหาจากการใช้ยาปัจจุบันรักษาคือ มีโอกาสเกิดปัญหาดื้อยาตามมาและราคาแพง การใช้สารจากธรรมชาติ เช่น น้ำมันหอมระเหยจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยพลู, กานพลูและตะไคร้ในการยับยั้งเชื้อยีสต์ในช่องหูสุนัข และคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันทั้งสามชนิด **วิธีการทดลอง:** วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC/MS), ศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *M. pachydermatis* ด้วยวิธี Broth microdilution และศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยพลู, กานพลูและตะไคร้ ด้วยวิธี DPPH และ ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ด้วยวิธี TBARs **ผลการศึกษา:** น้ำมันหอมระเหยพลูมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อมาลาสซิเซียดีที่สุดโดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) และทำลายเชื้อ (MFC) อยู่ระหว่าง 0.03-0.5 และ 0.03-1 ไมโครลิตร/มิลลิลิตรตามลำดับ และฤทธิ์ของน้ำมันพลูในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร คือ 88.6±5.7 เปอร์เซ็นต์ โดยความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC50) เท่ากับ 0.134±0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่น้ำมันกานพลูและตะไคร้มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.03-1 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร และมีค่า MFC อยู่ระหว่าง 0.06-2 และ 0.125-2 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้น้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 91.0±7.7% โดยมีค่า IC50 เท่ากับ 0.032±0.008 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร **สรุปผล:** น้ำมันหอมระเหยจากพลูเป็นน้ำมันที่มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ สำหรับการรักษาโรคเนื่องจากเชื้อยีสต์มาลาสซิเซีย และควรทำการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ ต่อไป

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาสซิเซีย, น้ำมันหอมระเหย, เชื้อมาลาสซิเซีย พาโคเดอมาดิส

¹ นักศึกษาปริญญาโท สาขาสัตววิทยาการสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² Ph.D., รองศาสตราจารย์, อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

³ Ph.D. อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

⁴ Ph.D. อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น

* **ติดต่อผู้พิมพ์:** จีรรัตน์ เอี่ยมสะอาด อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น e-mail: jaraim@kku.ac.th

Abstract

The efficacy of essential oils against *Malassezia pachydermatis* isolated from canine otitis externa

Tanaporn Asawapattanakul¹, Watcharee Khunkitti², Rattanaporn Leesing³, Jareerat Aiemsard^{4*}

IJPS, 2013; 9(1) : 40-51

Introduction: *Malassezia pachydermatis* fungus is a significant pathogenic organism commonly found in canine otitis externa. The conventional treatment is expensive and may cause drug resistance. The study evaluated the anti-Malassezia and anti-oxidant potential of betel vine, clove and lemongrass essential oils. **Methods:** The chemical components of the oils were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Anti-Malassezia activity of these oils were tested by broth microdilution method. Anti-oxidant activity was tested by free radical scavenger (DPPH) and lipid peroxidation inhibition method (TBARs). **Results:** Betel vine oil possessed the most potent anti-Malassezia activity with the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) 0.03-0.5 and 0.03-1 µl/ml, respectively. Its free radical scavenging activity at a concentration of 2.5 mg/ml was 88.6±5.7 % and its 50% inhibition concentration (IC50) was 0.134±0.002 mg/ml, while the MIC of clove oil and lemongrass oil were 0.03-1 µl/ml and MFC of clove and lemongrass oil were 0.06-2 and 0.125-2 µl/ml, respectively. In addition, clove oil at 0.25 mg/ml possessed the most potent lipid peroxidation inhibitory action of 91.0±7.7% and the IC50 was 0.032±0.008 mg/ml. **Conclusion:** Betel vine oil appears to be a potential agent for development of an anti-Malassezia otitis product. However, it is necessary to further investigate antimicrobial activity against other otitis pathogens.

Keywords: Anti-Malassezia activity, essential oil, *Malassezia pachydermatis*

¹ Master degree in Interdisciplinary Veterinary Science program, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand 40002

² Ph.D., Associate Professor, Lecturer, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

³ Ph.D., Lecturer, Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

⁴ Ph.D., Lecturer, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

* **Corresponding author:** Jareerat Aiemsard, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand, e-mail: jaraim@kku.ac.th

1. บทนำ

เชื้อมาลาเซียเซีย พาโคเดอมาติส (*Malassezia pachydermatis*) เป็นเชื้อที่พบได้ในสุนัขที่มีปัญหาของหูชั้นนอกอักเสบ (Otitis externa) และยังพบในสุนัขที่เป็นโรคผิวหนัง เช่น โรคผิวหนังชนิดอาโทปี (atopy dermatitis) (Yurayart *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามเชื่อนี้เป็นเชื้อที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคของหูอักเสบอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ (Bornand, 1992; Cafarchia *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2002; Mircean *et al.*, 2008) โดยเชื่อดังกล่าวเมื่อก่อโรคจะทำให้สุนัขมีอาการคันหู ปวดหู พบลักษณะการอักเสบเป็นปื้นแดงที่ใบหู มีขี้หูที่หูชั้นนอกและมีกลิ่นเหม็น (Guaguere *et al.*, 2008) ซึ่งถ้าหากรักษาไม่หายขาดโดยเร็ว จะทำให้เกิดเป็นโรคเรื้อรังในสัตว์ได้ ส่งผลให้สัตว์ต้องได้รับความทรมานจากการเป็นโรคเป็นเวลานาน ทำให้เจ้าของสัตว์

ต้องเสียเวลาในการดูแลสัตว์และเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง (Martinez Fernandez *et al.*, 1998) นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อ *M. pachydermatis* ยังเป็นเชื้อที่สามารถติดต่อกันได้ โดยเฉพาะผู้ที่ใกล้ชิดหรือผู้เลี้ยงสุนัขที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องได้ (Ming *et al.*, 2006) ปัจจุบันยาที่นำมาใช้รักษาโรคของหูชั้นนอกอีกเสบในสุนัขเบื้องต้นโดยทั่วไปจะใช้ยาหยอดหูซึ่งตัวยาสาคัญจะประกอบด้วย ยาต้านอักเสบ ยาต้านเชื้อรา ยาต้านแบคทีเรีย และสารลดการอักเสบในช่องหู ซึ่งยาต้านอักเสบที่เป็นส่วนประกอบในยาหยอดหูได้แก่กลุ่มสเตียรอยด์ เช่น เพลดนิโซโลน (prednisolone), เบตาเมทาโซน (betamethasone) และไตรแอมซิโนโลน อะซิไดไนด์ (triamcinolone acetonide) เป็นต้น สำหรับยาต้านเชื้อราและยาต้านแบคทีเรียที่เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ยาหยอดหูในท้องตลาด ได้แก่ ไทอะเบนดาโซล (thiabendazole), นิสเตติน (nystatin), นาตาไมซิน (natamycin), ไมโคนาโซล ไนเตรต (miconazole nitrate), โพลีมิกซิน บี ซัลเฟต (polymyxin B sulfate) และนีโอมัยซิน ซัลเฟต (neomycin sulfate) เป็นต้น (Bishop, 1996; Rochette *et al.*, 2003) ขณะเดียวกันยาด้านเชื้อราบางชนิดมีรายงานการดื้อยา เช่น ไทอะเบนดาโซล (thiabendazole) (Nascente *et al.*, 2009), นิสเตติน (nystatin) (Nakano *et al.*, 2005), นาตาไมซิน (natamycin), ไมโคนาโซล ไนเตรต (miconazole nitrate) (Robson *et al.*, 2010) เป็นต้น ซึ่งปัญหาการดื้อยาคิดว่าเป็นปัญหาหลักเพราะเป็นสาเหตุให้มีอุบัติการณ์การดื้อยาเพิ่มขึ้น เนื่องจากทำให้เชื้อมีโอกาสดื้อต่อยาต้านจุลชีพชนิดอื่นได้มากขึ้น เป็นผลทำให้การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพนั้นทำได้ยาก นอกจากนั้นยาเหล่านี้ยังมีราคาแพง บางผลิตภัณฑ์ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และยังมีข้อห้ามสำหรับสุนัขท้องอีกด้วย

เมื่อคำนึงถึงการเกิดการระบาดของเชื้อสุนัขและปัญหาการดื้อยาของเชื้อแล้ว จึงควรมีการศึกษาหาฤทธิ์การต้านเชื้อ *M. pachydermatis* จากสมุนไพร เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดการระบาดของเชื้อและลดภาวะการเกิดโรคที่รุนแรงขึ้น น้ำมันหอมระเหย (essential oil) เป็นสารที่มีรายงานถึงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลชีพที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้ออย่างกว้างขวางและมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นคุณสมบัติอีกประการหนึ่งในการช่วยลดการอักเสบของโรคได้ น้ำมันหอมระเหยที่พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *M. pachydermatis* ได้แก่ พลุ (*Piper betel*, Linn.) เป็นพืชในตระกูลไพเพอราซีอี (Piperaceae)

นั้นมีรายงานถึงประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *M. pachydermatis* ซึ่งขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้ง (inhibition zone) เท่ากับ 20 มิลลิเมตร (Morgan-Row and Ho, 2009) นอกจากนี้มีรายงานพบว่าน้ำมันหอมระเหยพลูที่ความเข้มข้น 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร ($\mu\text{l/ml}$) สามารถยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 88.9 และที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{l/ml}$ สามารถยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ได้ร้อยละ 65 (Aiemsard *et al.*, 2010) น้ำมันกานพลู (*Syzygium aromaticum* (Linn.) Merr. et Perry) เป็นพืชในตระกูลเมอราซีอี (Myrtaceae) ซึ่ง Rusenova and Parvanov (2009) รายงานว่าน้ำมันกานพลูจากการกลั่นด้วยไอน้ำสามารถต้านเชื้อ *M. pachydermatis* ได้โดยโดยค่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของการยับยั้ง (inhibition zone) เท่ากับ 23.0 มิลลิเมตร น้ำมันกานพลูยังสามารถยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระได้โดยมีค่าความเข้มข้นของลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ที่ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 0.2 $\mu\text{g/ml}$ (Chaieb *et al.*, 2007) และตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Linn.) เป็นพืชในตระกูลกรามินีอี (Gramineae) หรือโพเอซี (Poaceae) มีรายงานว่าสามารถต้านเชื้อ *M. pachydermatis* โดยค่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของการยับยั้ง (inhibition zone) เท่ากับ 32.3 มิลลิเมตร (Rusenova and Parvanov, 2009) และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ *M. pachydermatis* (MIC) เท่ากับ 0.6 $\mu\text{l/ml}$ นอกจากนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{l/ml}$ สามารถยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 46 และที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{l/ml}$ สามารถยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ร้อยละ 32.1 (Aiemsard *et al.*, 2010) น้ำมันดังกล่าวเป็นน้ำมันที่มีประสิทธิภาพอีกทั้งยังสามารถหาได้ง่ายในประเทศไทย แต่ยังมีรายงานถึงการยับยั้งเชื้อในเชื้อที่แยกได้จากสุนัขน้อยมาก ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษานี้ คือ เพื่อศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยพลู, กานพลูและตะไคร้ในการยับยั้งเชื้อ *M. pachydermatis* ที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคของหูชั้นนอกอีกเสบในสุนัข

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Methods)

เชื้อที่ใช้สำหรับทดสอบ

เชื้อยีสต์ *M. pachydermatis* ถูกคัดแยกจากสุนัขที่มีปัญหาของหูชั้นนอกอีกเสบ จำนวน 12 ตัวอย่าง โดยใช้ sterile cotton swab เช็ดเช็ดบริเวณผิวหนังภายในช่องหู และทำการถ่ายเชื้อ ลง agar slant ชนิด Sabouraud's

dextrose (SDA) แล้วจึงนำมาแยกเชื้อ *M. pachydermatis* โดยนำตัวอย่างมาเพาะเชื้อลงบนอาหารแข็ง Sabouraud's dextrose ที่มี 0.05% chloramphenicol และ cycloheximide นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 วัน นำเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองขุ่น ผิวเรียบ ขนาด 2-5 มิลลิเมตร มาย้อมสีด้วย Lactophenol cotton blue จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เชื้อ *M. pachydermatis* จะมีรูปร่างเป็นวงรี ติดสีเข้มบางเซลล์พบการแตกหน่อ (budding) (ดัดแปลงจาก Nascente *et al.*, 2009; Quinn *et al.*, 1999)

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้ น้ำมันหอมระเหย พลู (Betel vine oil), กานพลู (Clove oil) และตะไคร้ (Lemon-grass oil) (บริษัทเครื่องหอมไทยจีน, ประเทศไทย), Vitamin E acetate (บริษัท วันวัตนหน้าเขียน, ประเทศไทย), Potassium chloride (KCl) (เอกตรงเคมีภัณฑ์, ประเทศไทย), Sodium lauryl sulphate (SLS) (เอกตรงเคมีภัณฑ์, ประเทศไทย) สารเคมีอื่นๆ เป็น analytical grade ดังนี้ acetic acid (Scharian, Spain), Butylatedhydroxytoluene (BHT) (Riedel de Haën, Germany), 2,2 azobis (2-aminopropane) dihydrochloride (ABAP) (Aldrich, Germany), Butanol (Lab Scan, Thailand), 2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazil (DPPH) (Fluka, Germany), Ethanol (Merck, Germany), Thiobarbituric acid (TBA) (Sigma Aldrich, Germany), Trolox (Fluka, Germany), Sabouraud's dextrose broth (SDB) (Difco, France), Sabouraud's dextrose agar (SDA)(Difco, France)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยพลู, กานพลู และตะไคร้

ศึกษาสารองค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยพลู กานพลู และตะไคร้ด้วยเทคนิค Gas chromatography (Agilent, China) /Mass spectrophotometry (Agilent, USA) (GS/MS) เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของน้ำมันหอมระเหย ด้วยคอลัมน์ DB-5ms (ขนาด 0.25 ไมครอน x 25 มิลลิเมตร x 30 เมตร) ถูกเคลือบด้วย silica capillary column ใช้ Helium (He) เป็น carrier gas ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิเมตรต่อนาที ปริมาณที่ฉีดคือ 2 ไมโครลิตร โดยมีโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้ อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ 70 องศาเซลเซียส (°C)เป็นเวลา 5 นาที และเพิ่มเป็น 120 °C เป็นเวลา 2 นาที ซึ่งเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตราเร็วคือ 3 °C/

min จากนั้นเพิ่มเป็น 270 °C เป็นเวลา 17 นาที ด้วยอัตราเร็ว 5 °C/min โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ 70.67 นาที จากนั้นเปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัม ของ Wiley 7n. MS Search ของสารมาตรฐาน และนำมาเทียบกับค่า Linear Retention Index (LRI) ที่ได้จากสาร n-alkanes (C10-C23) (Sigma Aldrich, Germany)

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อยีสต์ *Malassezia pachydermatis* ของน้ำมันหอมระเหยพลู, กานพลู และตะไคร้

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (minimum inhibitory concentration ; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อ *M. pachydermatis* (minimum fungicidal concentration; MFC) โดยปิเปตน้ำมันหอมระเหย 3 ชนิด ในตัวทำละลายคือ 5% tween80 และ 5% ethanol 50 µl ลงใน microtiter plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB 50 µl จากนั้นทำ two fold dilution แล้วใส่เชื้อที่ความเข้มข้น 10⁵ cfu/ml ปริมาณ 50 µl ลงไป โดยมีตัวทำละลายน้ำมันหอมระเหยเป็น negative control แล้วนำเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นทำการหาค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อโดยพิจารณาจากความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ (MIC) แล้วทำการหาค่า MFC โดยทำการเชี่ยเชื้อจากหลุม MIC เป็นต้นไปลงใน SDA แล้วนำเข้าตู้บ่มเพาะเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 5 วัน หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้ (MFC) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (ดัดแปลงจาก Nascente *et al.*, 2009) การศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยพลู, กานพลู และตะไคร้

1. การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazil (DPPH)

เติมน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.3 หรือ 3 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร (ซึ่งละลายใน DMSO) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน microtiter จากนั้นเจือจางความเข้มข้นด้วย ethanol ด้วยวิธี 2-fold dilution แล้วจึงเติมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazil) ความเข้มข้น 0.0004 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในทุกหลุม เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที และนำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 25 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลาย

DPPH และค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย (Lertsatitthanakorn *et al.*, 2006) และทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับสารมาตรฐานที่ใช้ทดสอบ คือ BHT, Vitamin E acetate และ Trolox ซึ่งทดสอบด้วยขั้นตอนเดียวกัน โดยผลที่ได้จะถูกนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (%Antioxidation Index; %AI) ดังสมการที่ [1]

$$\% AI = \frac{Abs_{control} - (Abs_{sample} - Abs_{blank}) \times 100}{Abs_{control}} \quad [1]$$

$Abs_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม

Abs_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันหอมระเหย หรือ สารมาตรฐานที่ทดสอบ

Abs_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank

2. การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้ง lipid peroxidation ของน้ำมันหอมระเหย ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substances (TBARs)

เตรียมสารละลายไข่แดงความเข้มข้นร้อยละ 10 ในสารละลาย Potassium chloride (KCl) เข้มข้นร้อยละ 1.15 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำมันหอมระเหยที่ทดสอบ ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 หรือ 3 ไมโครลิตรต่อ มิลลิลิตร (ละลายใน DMSO) ซึ่งปริมาตรที่ใช้แปรผันตามระดับการเจือจางความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย เท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครลิตร โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย (2,2 azobis (2-aminopropane) dihydrochloride) หรือ ABAP เข้มข้น 0.07 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ acetic acid (pH 3.5) เข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วจึงเติมสารละลาย Thiobarbituric acid (TBA) เข้มข้นร้อยละ 0.8 (ละลายใน SLS เข้มข้นร้อยละ 1.1) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำ (Waterbath) ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 60 นาที และตั้งทิ้งไว้ให้เย็น สกัดด้วย butanol ปิเปตส่วนที่สกัดได้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลง Microplate 96 หลุม แล้วจึงไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ไม่เติม

ABAP (blank) และหลอดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย (Miguel *et al.*, 2004) และทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับสารมาตรฐาน BHT, Vitamin E acetate และ Trolox สามารถทดสอบด้วยขั้นตอนเดียวกัน โดยผลที่ได้จะถูกนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%Antioxidation Index; %AI) จากสมการที่ (1)

3. ผลการศึกษาวิจัย (Results)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยพลู, กานพลู และตะไคร้

จากการทดลองพบว่าน้ำมันพลู (betel vine oil) มี eugenol, eugenol acetate และ 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งพบในสัดส่วนที่สูงที่สุด คือ ร้อยละ 38.65, 23.36 และ 19.08 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ส่วนน้ำมันกานพลู (clove oil) พบว่ามี eugenol และ trans-caryophyllene เป็นองค์ประกอบ โดยพบในสัดส่วนร้อยละ 98.87 และ 1.13 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และน้ำมันตะไคร้ (lemongrass oil) มี alpha-citral, beta-citral และ tran-geraniol เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งพบในสัดส่วนร้อยละ 45.32, 35.43 และ 4.12 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อยีสต์ *Malassezia pachydermatis* ของน้ำมันหอมระเหยพลู, กานพลู และตะไคร้

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี broth microdilution พบว่าน้ำมันที่ให้ผลในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *M. pachydermatis* ดีที่สุด คือ น้ำมันพลูโดยมีค่า MIC ระหว่าง 0.03-0.5 µl/ml และมีค่า MFC ระหว่าง 0.03-1 µl/ml รองลงมาคือน้ำมันตะไคร้และกานพลูโดยมีค่า MIC ระหว่าง 0.03-1 และ 0.06-2 µl/ml ตามลำดับ และมีค่า MFC ระหว่าง 0.06-2 µl/ml และ 0.125-2 µl/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยพลู, กานพลู และตะไคร้

จากการศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี DPPH พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 2.5 mg/ml น้ำมันที่ให้ผลดีที่สุดคือน้ำมันพลู รองลงมาคือ น้ำมันกานพลูและน้ำมันตะไคร้ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (%AI) เท่ากับ 88.61, 86.34 และ 55.95% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานพบว่า น้ำมันพลูให้ผลเทียบเท่า Trolox ที่ความเข้มข้น 0.06 mg/ml

และดีกว่า BHT ที่ความเข้มข้น 0.06 mg/ml และ Vitamin E acetate ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ในขณะที่น้ำมันกานพลู ให้ผลดีเทียบเท่า BHT (0.06 mg/ml) และดีกว่า Vitamin E acetate (1 mg/ml) อย่างไรก็ตามน้ำมันตะไคร้ ให้ผลดีกว่า Vitamin E acetate (1 mg/ml) และเมื่อทำการศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC50) ของน้ำมันหอมระเหย (2.5 mg/ml) พบว่าน้ำมันที่ให้ผลดีที่สุดคือ น้ำมันพลู รองลงมาคือน้ำมันกานพลู โดยน้ำมันทั้งสองชนิดมีค่า IC50 ที่ใกล้เคียงกัน คือ 0.134 และ 0.139 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานพบว่าน้ำมันทั้งสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพดีกว่า Vitamin E acetate (1 mg/ml) (ตารางที่ 3)

นอกจากนี้จากผลการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี TBARs พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่

ระดับความเข้มข้น 0.25 mg/ml น้ำมันที่ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation คือ น้ำมันกานพลู รองลงมาคือ น้ำมันพลูและตะไคร้ โดยมีค่า %AI เท่ากับ 90.97, 68.47 และ 67.50% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานพบว่า น้ำมันหอมระเหยทั้งสามชนิดให้ผลดีกว่า Trolox ที่ระดับความเข้มข้น 0.015 mg/ml และ Vitamin E acetate ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 mg/ml และเมื่อศึกษาหาค่า IC50 พบว่า น้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพดีที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำมันพลูและตะไคร้โดยมีค่า IC50 เท่ากับ 0.032 mg/ml ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานพบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่า Vitamine E acetate (0.25 mg/ml) ขณะที่น้ำมันพลูและตะไคร้มีค่า IC50 เท่ากับ 0.059 และ 0.039 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบและปริมาณสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยพลู, กานพลูและตะไคร้

น้ำมัน	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารองค์ประกอบ	LRI	%Area
น้ำมันพลู	<i>Piper betel</i> (Linn.)	Eugenol	1366	38.65
		Eugenol acetate	1518	23.36
		4-allyl-1,2-diacetoxybenzene	1629	19.08
น้ำมันกานพลู	<i>Syzygium aromaticum</i> (Linn.) Merr. et Perry	Eugenol	1350	98.87
		Trans-caryophyllene	1415	1.13
น้ำมันตะไคร้	<i>Cymbopogon citratus</i> (Linn.)	α-citral, geranial, trans-citral, (E)citral	1267	45.32
		α-citral b, Neral, cis-citral, (Z) citral	1237	35.43
		Trans-geraniol	1249	4.12

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (MFC) ของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อ *Malassezia pachydermatis* (n=12)

สารที่ทดสอบ	Range (μl/ml)	
	MIC	MFC
น้ำมันพลู (Betel oil)	0.03 - 0.5	0.03 - 1
น้ำมันกานพลู (Clove oil)	0.03 - 1	0.06 - 2
น้ำมันตะไคร้ (Lemongrass oil)	0.03 - 1	0.125 - 2

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยและสารมาตรฐานด้วยวิธี DPPH

สารที่ทดสอบ	ความเข้มข้น	DPPH	
	(มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	%AI (mean $\pm$ SD)	IC50 $\pm$ SD (mg/ml)
น้ำมันพลู (Betel vine oil)	2.50	88.61 $\pm$ 5.713	0.134 $\pm$ 0.002
น้ำมันกานพลู (Clove oil)	2.50	86.34 $\pm$ 10.375	0.139 $\pm$ 0.006
น้ำมันตะไคร้ (Lemongrass oil)	2.50	55.95 $\pm$ 2.273	1.236 $\pm$ 0.011
BHT	0.06	86.79 $\pm$ 2.443	0.005 $\pm$ 0.029
Vitamin E acetate	1.00	51.05 $\pm$ 2.803	0.163 $\pm$ 0.050
Trolox	0.06	88.77 $\pm$ 0.646	0.014 $\pm$ 0.004

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยและสารมาตรฐานด้วยวิธี TBARs

สารที่ทดสอบ	ความเข้มข้น	TBARs	
	(มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	%AI (mean $\pm$ SD)	IC50 $\pm$ SD (mg/ml)
น้ำมันพลู (Betel vine oil)	0.25	68.47 $\pm$ 6.385	0.059 $\pm$ 0.015
น้ำมันกานพลู (Clove oil)	0.25	90.97 $\pm$ 7.732	0.032 $\pm$ 0.008
น้ำมันตะไคร้ (Lemongrass oil)	0.25	67.50 $\pm$ 3.000	0.039 $\pm$ 0.009
BHT	0.015	94.04 $\pm$ 7.010	0.006 $\pm$ 0.001
Vitamin E acetate	0.25	35.23 $\pm$ 9.838	0.04 $\pm$ 0.004
Trolox	0.015	59.89 $\pm$ 9.859	0.016 $\pm$ 0.009

4. อภิปรายผลและสรุป (Discussion and Conclusion)

ในการศึกษาองค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย พบว่าน้ำมันพลูมี eugenol, eugenol acetate และ 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene ในสัดส่วนที่สูงที่สุดคือ ร้อยละ 38.65, 23.36 และ 19.08 ตามลำดับ ซึ่งมีความสอดคล้องกับ Aiemsard *et al.* (2010), Morgan-Row and Ho (2009) และ Pin *et al.* (2010) พบว่า มี eugenol เป็นองค์ประกอบหลัก ในขณะที่รายงานของ Arambewela *et al.* (2006) รายงานว่า Safrole เป็นสารองค์ประกอบหลักของน้ำมันพลู โดยผลที่ได้มีความแตกต่างกันอาจเนื่องจากแหล่งของน้ำมันที่ต่างกัน สำหรับน้ำมันกานพลูจากการทดลองพบว่า Eugenol และ Trans-caryophyllene เป็นสารองค์ประกอบหลัก พบในสัดส่วน ร้อยละ 98.87 และ 1.13 ตามลำดับซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Satthanakul and

Khunkitti (2011) ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันกานพลูที่ได้มาจากบริษัทเดียวกันแต่คนละล็อต และ Ayoola *et al.* (2008) และ Dorman *et al.* (2000) พบว่ามี eugenol เป็นองค์ประกอบหลักและพบในสัดส่วนที่สูง และในการทดลองพบว่าน้ำมันตะไคร้มี alpha-citral, beta-citral และ tran-geraniol เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งพบในสัดส่วน ร้อยละ 45.32, 35.43 และ 4.12 ตามลำดับ ซึ่งมีความสอดคล้องหลายการทดลอง (Aiemsard *et al.*, 2010; Satthanakul and Khunkitti, 2011; Veerapan and Khunkitti, 2011) อย่างไรก็ตามการทดลองของ Helal *et al.* (2006) พบ E-citral หรือ alpha-citral ร้อยละ 65.4%, a'-Myrcene ร้อยละ 6.7 และ z-citral หรือ beta-citral ร้อยละ 3.0 โดยผลที่ได้มีความแตกต่างกันอาจเนื่องจากแหล่งของน้ำมันที่ต่างกัน

จากการทดสอบด้วยวิธี Broth microdilution method โดยทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อยีสต์ *M.*

pachydermatis ที่เป็นสาเหตุหลักของโรคช่องหูชั้นนอกอักเสบในสุนัข พบว่าน้ำมันพลูมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *M. pachydermatis* โดยมีค่า MIC ระหว่าง 0.03-0.5 µl/ml และ MFC ระหว่าง 0.03-1 µl/ml ซึ่งจากผลการทดลองสอดคล้อง Morgan Row และ Ho (2009) นอกจากนี้ยังมีหลายงานวิจัยที่รายงานว่าใบพลูมีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อรา ยีสต์ (Sukatta *et al.*, 2001; Ali *et al.*, 2010; Khamdang *et al.*, 2010; Suppakul *et al.*, 2006) และแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด (Datta *et al.*, 2011; Ramji *et al.*, 2002; Shitut *et al.*, 1999) เช่น *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris* และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น ซึ่งสารองค์ประกอบหลักของน้ำมันพลูคือ eugenol และมีบางงานวิจัยรายงานว่าฤทธิ์ของ eugenol ในการต้านเชื้อใน genus *Malassezia* (ZHU *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2003) และเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ (Dorman *et al.*, 2000; Filgueiras and Venetti, 2006) แต่ในขณะเดียวกันน้ำมันพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสูงกว่าน้ำมันกานพลู ซึ่งมี eugenol 98.87% ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องจากในน้ำมันพลูที่มี eugenol เพียง 38.65% แต่มีสารประกอบกลุ่มเอสเทอร์คือ eugenol acetate ในปริมาณที่ไม่น้อยคือ 23.36% และสารกลุ่มเอสเทอร์มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราได้ (Zore *et al.*, 2011) โดยกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งของ Eugenol จะรบกวนการผ่านของสารเข้าออกเซลล์ ได้แก่ โปรตอน โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม โดยมีรายงานการใช้ค่าโปแตสเซียมในการประเมินประสิทธิภาพของเซลล์เมมเบรนที่ถูกทำลาย (Filgueiras and Venetti, 2006) และทำให้โครงสร้างของเซลล์เสียหาย (Cox *et al.*, 2000; Tippayatum and Chonhenchob, 2007)

โรคช่องหูชั้นนอกอักเสบเป็นการอักเสบของผิวหนังบริเวณใบหูและช่องหูสุนัข โดยทำให้ผิวหนังบริเวณดังกล่าวบวม เป็นปื้นแดง และร้อน และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดการอักเสบ ความเสื่อม ความแก่ของเซลล์ และทำลายเนื้อเยื่อ ทำให้เป็นสาเหตุของโรคต่างๆ (Kehrer, 1993; Lee *et al.*, 2004) ในขณะเดียวกันมีรายงานว่าสารที่เป็นองค์ประกอบของพืชต่างๆ ที่มีโครงสร้างเป็น polyphenol ภายในโมเลกุลมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ (Chohan *et al.*, 2012; Kiessoun, 2010; Yoon and Baek, 2005) โดยการวัดความสามารถ

ในการยับยั้งการหลั่งสาร interleukin 8 (IL-8) (Chohan *et al.*, 2012) ซึ่งเป็น pro-inflammatory cytokine มีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการเกิดการอักเสบ และในทำนองเดียวกันสารประกอบกลุ่ม Phenolic compound มักมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน (Kim and Kim, 1997) ดังนั้นในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถบ่งชี้ถึงฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้

อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ ทำให้ไม่เสถียร จึงมีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนนี้เป็นกลไกที่สำคัญของปฏิกิริยาออกซิเดชันไขมันในสิ่งมีชีวิต (Lipid peroxidation) (Roberfroid and Calderon, 1995) หรือเป็นกระบวนการที่อนุมูลอิสระเข้าทำลายไขมันในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะส่วนของผนังเซลล์ที่มีโครงสร้างเป็น phospholipid bilayer เป็นต้น ดังนั้น lipid peroxidation สามารถใช้ประเมินอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้ (Yusong *et al.*, 2003) ในการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในการทดลองนี้ได้จำลองโดยใช้ไข่แดงแทนไขมันชนิดไม่อิ่มตัวจากนั้นกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ซึ่งผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยานี้ที่มีความสำคัญคือ มาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde, MDA) ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ โดย MDA จะจับกับ thiobarbituric acid (TBA) เกิดเป็นสารมีสีเรียกว่า TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) ดังนั้นเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบจะทำให้ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ปริมาณ MDA จึงมีน้อย ทำให้สีจางลง (Halliwell and Chirico, 1993; Vajragupta *et al.*, 2006) นอกจากการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ด้วยวิธี TBARS แล้ว การวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (Free radical scavenging) เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยม โดยใช้สารละลายของ DPPH[•] ซึ่งอนุมูล DPPH[•] เป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัว สารที่กำจัดอนุมูลอิสระได้จะสามารถให้อิโธโรเจนแก่อนุมูล DPPH[•] แล้วเปลี่ยนสารละลายของ DPPH[•] ซึ่งมีสีม่วงเป็นสารละลายสีเหลือง (Bondet *et al.*, 1997)

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี TBARS พบว่าน้ำมันกานพลูมีคุณสมบัติเป็นสารต้าน

อนุมูลอิสระได้ดีที่สุดและดีกว่าสารมาตรฐานบางตัวที่ใช้เปรียบเทียบ เช่น Vitamin E acetate ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lee and Shibamoto (2000), Ruberto and Baratta (2000) และ Satthanakul and Khunkitti (2011) แต่ในรายงานของ Satthanakul and Khunkitti (2011) ยังรายงานว่าน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารมาตรฐาน BHT อีกด้วย (Satthanakul and Khunkitti, 2011) ทั้งนี้ผลที่ได้มีความแตกต่างกันอาจเนื่องจากขั้นตอนการทำการทดลอง ระยะเวลาในการให้ความร้อน รอบและความเร็วในการปั่นเหวี่ยง หรือแหล่งที่มาของสารที่ใช้ทดสอบมีความแตกต่างกัน และน้ำมันที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรองลงมาคือ น้ำมันพลู ซึ่งผลของค่า %AI ของน้ำมันพลูโดยวิธี TBARS จากการทดลองยังใกล้เคียงกับรายงานของ Dasgupta and De (2004) อีกด้วย และยังมีอีกหลายรายงานที่กล่าวว่าพลูมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีต่างๆ (Choudhary and Kale, 2002; Maisuthisakul, 2008; Suppakul *et al.*, 2006) เช่นเดียวกันเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่าน้ำมันพลูมีประสิทธิภาพสูงที่สุดและน้ำมันที่มีฤทธิ์รองลงมาคือน้ำมันกานพลู แต่มีค่าต่างกันเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากสารองค์ประกอบหลักของน้ำมันพลูและกานพลู คือ Eugenol ซึ่งเป็น Phenylpropanes โดยภายในโมเลกุลจะมีวงอะโรมาติกริง (Aromatic ring) เป็นองค์ประกอบหลัก และเป็นสารกลุ่มฟีนอลิก (Phenolic compound) โดย Eugenol จะทำหน้าที่ให้ไฮโดรเจนแก่ DPPH[•] แล้วเปลี่ยนเป็น DPPHH (Bondet *et al.*, 1997) ซึ่งสอดคล้องกับบางรายงานที่แสดงว่า eugenol มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระ (Dorman *et al.*, 2000) โดยสรุป จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเซีย เชื้อพาโคเดอมาคิสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ TBARS พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากพลูเป็นน้ำมันที่มีศักยภาพสำหรับนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ เพื่อรักษาโรคเนื่องจากเชื้อยีสต์มาลาเซีย และควรทำการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย และ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือในการศึกษารังนี้

References

- Aiemsard J, Aiumlamai S, Taweechaisupapong S, Aromdee C, Khunkitti W. Chemical composition, antioxidant activity and antibacterial action of eight essential oils against clinical isolates of mastitis pathogens. *IJEOT*. 2010;37-43.
- Ali I, Khan FG, Suri KA, *et al.*, In vitro antifungal activity of hydroxychavicol isolated from *Piper betle* L. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2010;9(7):1-9.
- Arambewela L, Arawwawala M, Rajapaksa D. *Piper betel*: a potential natural antioxidant. *Int J Food Sci Technol*. 2006;41:10-4.
- Ayoola GA, Lawore FM, Adelowotan T, *et al.*, Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* (clove). *AJMR*. 2008;2:162-166.
- Bishop Y. *Veterinary formulary*. 3 ed. Somerset: Butler&Tanner; 1996.
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. *LWT - Food Sci Technol*. 1997;30(6):609-615.
- Bornand V. Bacteriology and mycology of otitis externa in dogs. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 1992;134(7):341-348.
- Cafarchia C, Gallo S, Capelli G, Otranto D. Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. *Mycopathologia*. 2005;160(2):143-149.
- Chaieb K, Zmantar T, Ksouri R, *et al.*, Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. *Mycoses*. 2007;50:403-406.
- Chohan M, Naughton DP, Jones L, Opara EI. An Investigation of the Relationship between the Anti-Inflammatory Activity, Polyphenolic Content, and Antioxidant Activities of Cooked and In

- Vitro Digested Culinary Herbs. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:1-9.
- Choudhary D, Kale RK. Antioxidant and non-toxic properties of Piper betle leaf extract: in vitro and in vivo studies. *Phytother Res*. 2002;16(5):461-466.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, *et al.*, The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). *J Appl Microbiol*. 2000;88:170-175.
- Dasgupta N, De B. Antioxidant activity of Piper betle L. leaf extract in vitro. *Food Chem*. 2004;88(2):219-224.
- Datta A, Ghoshdastidar S, Singh M. Antimicrobial Property of Piper betel Leaf against Clinical Isolates of Bacteria. *IJPSR*. 2011;2(3):104-9
- Dorman HJD, Figueiredo AC, Barroso JG, Deans SG. In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*. 2000;15(1):12-16.
- Filgueiras CT, Vanetti MCD. Effect of Eugenol on Growth and Listeriolysin O Production by *Listeria monocytogenes*. *Braz Arch Biol Techno*. 2006;49(3):405-409.
- Guaguere E, Prelaud P, Craig M. A practical guide to canine dermatology. Italy: Kalanxis; 2008.
- Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993;57:715S-725S.
- Helal GA, Sarhan MM, Abu Shahla ANK, Abou El-Khair EK. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils Against Microorganisms Deteriorating Fruit Juices. *Mycobiology*. 2006;34(4):219-229.
- Kehrer JP. Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. *Crit Rev Toxicol*. 1993;23(1): 21-48.
- Khamdang S, Kanchanapoo J, Meungchan N, *et al.*, Antimicrobial Activity of Piper betle Ethanolic Leaf Extract on Enterococcus faecalis Biofilm. *IJPS*. 2010;6(2):84-91.
- Kiessoun K. Polyphenol Contents, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Six Malvaceae Species Traditionally used to Treat Hepatitis B in Burkina Faso. *Eur J Sci Res*. 2010; 44(4): 570-80.
- Kim JH, Kim BJ. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use(II): anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. *Int J Cosmet Sci*. 1997;19:299-307.
- Kumar A, Singh K, Sharma A. Prevalence of Malassezia pachydermatis and other organisms in healthy and infected dogs ears. *Israel J of vet Med*. 2002;57(4).
- Lee J, Koo N, Min DB. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Com Rev Food Sci Food Safety*. 2004;3:21-33.
- Lee K-G, Shibamoto T. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chem*. 2001;74(4):443-448.
- Lertsatitthanakorn P, Taweechaisupapong S, Aromdee C, Khunkitti W. In vitro bioactivities of essential oils used for acne control. *Int J Aromatherapy*. 2006;16:43-9.
- Maisuthisakul P. Phenolic Antioxidants from Betel Leaf (Piper betel Linn.) Extract Obtained with Different Solvents and Extraction Time. *UTCC*. 2008;28(2):52-64.
- Martinez Fernandez CA, Carnot Uría J, De Castro Arenas R, Muñío Perureral J, Torres Ilibar W. Tratamiento delas micosis profundas. *Estado actual Acta med*. 1998;8:80-85.
- Miguel G, Simoes M, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Carvalho L. Composition and antioxidant activities of the essential oils of Thymus caespitius, Thymus camphoratus and Thymus mastichina. *Food Chem*. 2004;86:183-8.

- Ming FY, Huang WM, Li SF, Wu GF, Lai K, Chen RY. Granulomatous Skin Infection Caused by *Malassezia pachydermatis* in a Dog owner. *Arch Dermatol.* 2006;142:1181-84.
- Mircean V, Mircean M, Gavrea R, Cozma V. Epidemiological aspects of otitis externa in dogs. *LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ.* 2008;XLI:427-436.
- Morgan-Row L-C, Ho J-C. The antimicrobial activity, Mosquito Larvicidal activity, Antioxidant property and tyrosinase inhibition of Piper betle. *J Chin Chem Soc.* 2009;56:653-658.
- Nakano Y, Wada M, Tani H, Sasai K, Baba E. Effect of β -Thujaplicin on Anti-*Malassezia pachydermatis* Remedy for Canine Otitis Externa. *J Vet Med Sci.* 2005;67(12):1243-1247.
- Nascente PS, Meinerz AR, Faria RO, Schuch FD, Meireles CA, Mello RB. CLSI broth microdilution method for testing susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to thiabendazole. *Brazilian J Microbiol.* 2009;40:222-226.
- Pin KY, Chuah AL, Rashih AA, *et al.*, Antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts of betel leaves (*Piper betel*) from solvents with different polarities. *J Trop Forest Sci.* 2010;22(4): 448-455.
- Quinn PF, Carter ME, Markey B, Carter GR, MOSBY. *Clinical Veterinary Microbiology:* Harcourt Publishers Ltd; 1999.
- Ramji N, Ramji N, Iyer R, Chandrasekaran S. Phenolic antibacterials from Piper betle in the prevention of halitosis. *J Ethnopharmacol.* 2002;83(1-2):149-52.
- Roberfroid M, Calderon P. *Free Radicals and Oxidation Phenomena In Biological Systems.* New York: Dekker; 1995.
- Robson D, Moss S, Trott D, Burton G, Bassett R, editors. Evidence for possible clinically relevant antifungal resistance in *Malassezia pachydermatis*: 10 cases. Dermatology chapter of the ACVSc Science Week Proceedings; 2010 July 2-3 Gold Coast.
- Rochette F, Engelen M, Bossche, Vanden H. Antifungal agents of use in animal health-chemical, biochemical, and pharmacological aspect. *J Vet Pharmacol Ther.* 2003;26:5-13.
- Ruberto G, Baratta MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 2000;69(2):167-174.
- Rusenova N, Parvanov P. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trakia J Sci.* 2009; 7(1):37-43.
- Satthanakul P, Khunkitti W. Potential of Clove Oil on *In Vitro* Antioxidant Activity and Factors Affecting Oil Encapsulation Efficiency in Solid Lipid Particles. *KKU Res J.* 2011;16(5):504-516.
- Shitut S, Pandit V, Mehta BK. The antimicrobial efficiency of Piper betle Linn leaf (stalk) against human pathogenic bacteria and phytopathogenic fungi. *Cent Eur J Public Health.* 1999;7(3):137-9.
- Sukatta U, Haruthaithanasan V, Kongkatip N, Dilokkunanant U. Antifungal activity of betel extracts from ethanol and acid-ethanol solvents. Proceedings of the 39th Kasetsart University Annual Conference: Science, Natural Resources and Environmental Economics. 2001.
- Suppakul P, Sanla-Ead N, Phoopuritham P. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Betel oil. *Kasetsart J (Nat Sci).* 2006;40:91-100.
- Tippayatum P, Chonhenchob V. Antibacterial Activities of Thymol, eugenol and Nisin Against Some Food Spoilage Bacteria. *Kasetsart J (Nat Sci).* 2007;41:319-323.
- Vajragupta O, Boonchoong P, Boonyarat C, Utsintong M. *Radical Scavenging Agents.* BKK P S Print; 2006.

- Veerapan P, Khunkitti W. *In Vitro* Antioxidant Activities of 675 Essential oils. *IJPS*. 2011;7(3):30-38.
- Yoon J-H, Baek SJ. Molecular Targets of Dietary Polyphenols with Anti-inflammatory Properties. *Yonsei Med J*. 2005;46(5):585-96.
- Yurayart C, Suttidate N, Chingchit O, Surahat S, Chindamporn A, Prapasarakul N. Isolation and Identification of *Malassezia* sp. Isolated from Atopic and Normal Dogs. Proceedings of the 33rd Thai Veterinary Medical Association; Thailand, 31st october – 2nd November 2007
- Yusong Y, Rajendra S, Abha S, Sanjay A, Yogesh C. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochimica Polonia*. 2003;50(2):319-336.
- ZHU M, WANG X-s, LI L, WANG J-J, ZHANG Q-q. A study on therapeutic efficacy of 3 Chinese herbal components on cutaneous *Malassezia* infection in guinea pigs. *J Clin Dermatol*. 2008-03.
- ZHU M, ZHANG Q-q, WANG X-s, Wang J-j. Susceptibility testing of genus *Malassezia* in vitro to 23 Chinese herbs and the some of their components. *J Clin Dermatol*. 2003-04.
- Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomed*. 2011; 18: 1181-1190.