การศึกษาการสกัดและฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคผิวหนังของน้ำมันหอมระเหยทีทรี

A Study on Extraction and Antifungal Activity against Dermatophytes Fungi of Tea Tree Oil

เกสรี กลิ่นสุคนธ์[1,2] วิชัย หฤทัยธนาสันติ์[2] อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ[1] ประภัสสร รักถาวร[1] วีระศรี เมฆตรง[3] และลลิตา คชารัตน์[1]

Ketsaree Klinsuknon[1,2] Vichai Haruthaitanasun[2] Udomlak Sukatta[1] Weerasri meaktrong[3] and Lalita Khacharat[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาเกี่ยวกับวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยทีทรีที่ปลูกในประเทศไทย โดยศึกษาวิธีการกลั่น 3 วิธี คือ การกลั่นด้วยไอน้ำ การกลั่นด้วยน้ำ และ การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ พบว่าการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ และการกลั่นด้วยน้ำให้ปริมาณผลผลิตสูงสุด 2.77% และ 2.75% ตามลำดับ เมื่อนำน้ำมันที่สกัดทั้ง 3 วิธีมาวัดคุณสมบัติทางกายภาพ โดยการวัดค่าความหนาแน่นของน้ำมัน ค่าความถ่วงจำเพาะ และค่าดัชนีการหักเหของแสงอยู่ในช่วง 0.887-0.893, 0.889-0.897 และ1.474-1.478 ตามลำดับ จากนั้นนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส/สเปกโทรเมตรีมวล (Gas chromatography/mass spectrometry) GC/MS พบสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันทีทรีคือ terpinene-4-ol มีปริมาณ 38.81-41.37% และ1,8-cineoleมีปริมาณ 5.25-6.56%การทดสอบประสิทธิภาพน้ำมันทีทรีที่สกัดได้จากทั้ง 3 วิธีในการต้านเชื้อราที่ก่อโรคที่ผิวหนังได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum* และ *Microsporum gypseum* โดยวิธี Vapor assay พบว่าน้ำมันทีทรีที่ได้มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ดีโดยมีค่า Antifungal Index เท่ากับ 100, 100, และ 95.50-100% ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อรา *T. mentagrophytes, T. rubrum* และ*M. gypseum* คือ 1000, 1000 และ 500 mg/ml ตามลำดับ

ABSTRACT

This research aims to study on extraction of essential oils from tea tree leave which were grown in Thailand by using 3 methods including: steam distillation, water distillation and water and steam distillation. The results showed that water distillation and water and steam distillation method gave the highest percentage of oil yield at 2.77% and 2.75%, respectively. The physical properties of tea tree oil from three methods showed density values, specific gravity and refractive index at 0.887-0.893, 0.889-0.897 and 1.474-1.478 respectively. The chemical components analysed by (Gas chromatography/mass spectrometry) GC/MS indicated that main constituents of tea tree oil were terpinene-4-ol (38.81-41.37%) and 1,8-cineole (5.25-6.56%). The efficacy of tea tree oil from three method of distillation on antifungal activity against dermatophytes fungi:*Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum* and *Microsporum gypseum* by using vapor assay showed that tea tree oils exhibited high efficacy to control all of fungal with antifungal index 100, 100, 95.50-100%, respectively. The minimum inhibition concentration (MIC) of tea tree oil to inhibit these fungi were 1000, 1000 and 500 mg/ml, respectively.

Key words: Tea Tree oil, Antifungal activity, Distillation

e-mail address: ket_moon@hotmail.com

[1]สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement Institute, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900

[2]ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Department of Product Development, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900

[3]สถาบันค้นคว้าและพัฒนาระบบนิเวศเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Agro-Ecological System Research and Development Institute, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok, 10900

คำนำ

ทีทรี หรือ ต้นชาออสซี่ *(Melaleuca alternifolia)* เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศออสเตรเลีย จัดอยู่ในวงศ์ Myrtaceae เป็นพืชสมุนไพรที่มีต่อมน้ำมันหอมระเหย (oil gland) อยู่ในส่วนใบ ซึ่งภายในน้ำมันหอมระเหยนั้นมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญเช่น terpinen-4-ol และ 1, 8-cineol ซึ่งตามมาตรฐานของออสเตรเลีย และมาตรฐานสากลระหว่างประเทศ ISO/FDIS 4730: 2004 (ISO, 2004) ปริมาณสารสำคัญในน้ำมันทีทรีนั้นระบุไว้ว่าควรมีปริมาณ terpinen-4-ol สูงกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ และมี 1, 8-cineol ปริมาณน้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ (Southwell, I. and R. Lowe, 1999) อีกทั้งน้ำมันทีทรีมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อรากลุ่ม Dermatophytes และ กลุ่ม Filamentous fungi เชื้อราที่ก่อโรคที่พบบ่อยที่บริเวณผิวหนังได้แก่ *Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes และ Microsporum gypseum* ซึ่งก่อให้เกิดโรคกลาก เกลื้อน เนื่องจากสารสำคัญ terpinen-4-ol มีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าเชื้อโรคที่ดี (antiseptic) ซึมซาบเข้าสู่ผิวหนังได้ดี และไม่ก่อให้เกิดอาการระคายเคือง (Saller *et al*., 1998; Weseler *et al.,* 2002; Hammer *et al*., 2002) ในปัจจุบันทางสถาบันค้นคว้าและพัฒนาระบบนิเวศเกษตรได้ประสบความสำเร็จในการนำทีทรีเข้ามาปลูกในประเทศไทย เนื่องจากถิ่นกำเนิดของต้นทีทรีที่ปลูกในประเทศออสเตรเลียนั้นมีอุณหภูมิสภาพอากาศที่ไม่หนาวเย็นมาก ซึ่งตั้งอยู่ที่ละติจูดช่วง 20-30 องศาใต้ ซึ่งใกล้เคียงกับสภาพอากาศทางภาคเหนือ ประเทศไทยตั้งอยู่ในละติจูดช่วง 6-20 องศาเหนือ และสามารถลดการนำเข้าน้ำมันทีทรีจากต่างประเทศซึ่งมีราคาลิตรละ 4200 บาท ทำให้สามารถลดต้นทุนการนำเข้าวัตถุดิบจากต่างประเทศได้ การใช้ประโยชน์จากน้ำมันทีทรีเป็นที่แพร่หลายทั้งในอุตสาหกรรมการผลิตยาเวชภัณฑ์ เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดต่างๆ การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาขั้นตอนวิธีการสกัด คุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราก่อโรคผิวหนังของน้ำมันหอมระเหยทีทรีที่ผลิตในประเทศไทย เพื่อนำไปต่อยอดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ระงับกลิ่นเท้าและป้องกันการเกิดเชื้อบริเวณเท้าต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมวัตถุดิบ นำทีทรีสดจากแปลงทดลองบ้านทับเบิก ตำบลวังบาล อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรนูรณ์ ซึ่งเป็นต้นพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกว่ามีปริมาณสาร Terpinen-4-ol สูง (33.00 – 39.00%) มาทำการศึกษาการกลั่น โดยนำมาวัตถุดิบกิ่งทีทรีสด มาตัดใบและกิ่งเล็กๆให้มีขนาดความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ก่อนนำไปทำการกลั่น

2. ศึกษาวิธีและเวลาการสกัดน้ำมันหอมระเหยทีทรี โดยทำการศึกษาปัจจัย 2 ปัจจัย ๆ ละ 3 ระดับ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (3x3 factorial) วิธีละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 วิธีการสกัด 3 วิธี คือการกลั่นด้วยไอน้ำ การกลั่นด้วยน้ำ และการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ

ปัจจัยที่ 2 เวลาที่ใช้สกัด 3 ระดับ คือ 2, 4 และ 6 ชั่วโมง

เพื่อคัดเลือกวิธีและเวลาในการสกัดที่ดีที่สุด โดยพิจารณาจากปริมาณเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้ และนำไปทดสอบคุณภาพทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ

3. ศึกษาคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยทีทรี

วิเคราะห์ค่าการหักเหของแสงในน้ำมันหอมระเหยทีทรี โดยใช้เครื่องRefractometer ยี่ห้อ ATAGO รุ่น RX-5000CX

วิเคราะห์ค่าความหนาแน่นและความถ่วงจำเพาะของน้ำมันหอมระเหยทีทรี โดยใช้เครื่อง Density Meter ยี่ห้อ Toledo รุ่น DA-2L

วิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยทีทรีโดยเครื่อง Gas Chromatography / Mass Spectrometry (GC-MS) Shimazu QP5050A โดยใช้สภาวะการฉีดวิเคราะหสาร ดังนี้ Column : DB-5 (60 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร x 0.25 ไมโครเมตร) Sample size : 1.0 ไมโครลิตร Injector temperature : 250 องศาเซลเซียส, Interface : 250 องศาเซลเซียส Flow rate : 1.2 มิลลิลิตร / นาที, Split ratio : 1: 7 Temperature Program : เริ่มตนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เพิ่มอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสตอนาที จนถึง 120 องศาเซลเซียส เพิ่มอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสตอนาที จนถึง 220 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา แปลผลเทียบกับ library ของ NIST และเทียบกับสารละลายมาตรฐานอัลเคน (C8-C20 alkane)

4. ศึกษาประสิทธิภาพน้ำมันหอมระเหยทีทรีในการต้านเชื้อราที่ก่อโรคที่ผิวหนัง

ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยทีทรีในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคผิวหนังจำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Microsporum gypseum* (DMST 21146), *Trichophyton mentagrophytes* (DMST 19735) และ *Trichophyton rubrum* (DMST 30263) (เชื้อราก่อโรคผิวหนังจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข) ทำการทดสอบโดยวิธี Vapor assay ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ (Alvarez-Castellanos *et al*., 2001) โดยหยดน้ำมันหอมระเหยทีทรีปริมาณ 20 ไมโครลิตรลงบนกระดาษกรองขนาด 10 มิลลิเมตร แล้วนำมาวางตรงกลางฝาจานเลี้ยงเชื้อ ตัดเส้นใยของเชื้อราให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำมาวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการยับยั้งเชื้อโดยรายงานค่า % Inhibition ซึ่งคำนวณจากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = ((D_1 - D_2) / D_1) \times 100$$

D_1 = รัศมีของเชื้อราชุดควบคุม

D_2 = รัศมีของเชื้อราทดสอบ

ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยทีทรีในการต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคผิวหนังทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยเจือจางน้ำมันหอมระเหยทีทรีด้วยสาร Dimethy sulfoxide ให้มีระดับความเข้มข้น 0, 125, 250, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบโดยวิธี Vapor assay รายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันทีทรีในการต้านการเจริญของเชื้อรา (MIC : Minimum Inhibitory Concentration) โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ แสดงข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยเทคนิค ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาการสกัดน้ำมันหอมระเหยทีทรี (tea tree oil)

จากผลการทดลองพบว่า วิธีการกลั่นและเวลาที่ใช้ในการกลั่นน้ำมันหอมระเหยทีทรีมีผลต่อปริมาณผลผลิตน้ำมันหอมระเหยทีทรีทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงใน Table 1 พบว่า วิธีการกลั่นด้วยน้ำ และการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ ให้ปริมาณผลผลิตน้ำมันหอมระเหยทีทรีสูงกว่าวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการกลั่น ปริมาณผลผลิตของน้ำมันทีทรีจะเพิ่มมากขึ้น พบว่าวิธีการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำเป็นเวลา 6 ชั่วโมงจะให้ปริมาณผลผลิตน้ำมันสูงที่สุด คือร้อยละ 2.77 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) จากการใช้วิธีการกลั่นด้วยน้ำ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลจากการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับผลการรายงานของโอฬารและคณะ (2552) ซึ่งรายงานว่าการกลั่นน้ำมันทีทรีด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ และการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ ให้ปริมาณผลผลิตน้ำมันทีทรีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) และ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการกลั่นของ โอฬารและคณะ (2552) ซึ่งทำการกลั่นทีทรีสดด้วยวิธีการกลั่นทั้งสามวิธี เป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่าปริมาณผลผลิตน้ำมันทีทรีที่ได้จากการกลั่น 8 ชั่วโมงใกล้เคียงกับการกลั่นเป็นเวลา เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Table1 Percentage of oil yield from various time and method of distillation.

Distillation	Time (hour)	% Yield oil
Steam	2	0.10^{e}
	4	0.73^{c}
	6	1.70^{d}
Water	2	2.25^{b}
	4	2.43^{ab}
	6	2.75^{a}
Water and steam	2	1.83^{c}
	4	2.38^{ab}
	6	2.77^{a}

$^{a-e}$ Mean values followed by different superscripts within a column were significantly different using Duncan's multiple range test.($p \leq 0.05$)

2. ศึกษาคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยทีทรี

เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยทีทรีที่ได้จากการกลั่นทั้ง 3 วิธีมาวัดค่าคุณภาพทางด้านกายภาพได้แก่ ดัชนีการหักเหแสง (Reflective index, RI) ค่าความหนาแน่น (Density, D)และค่าความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity, S) พบว่า น้ำมันทีทรีที่กลั่นได้จากวิธีการกลั่นทั้ง 3 วิธีมีค่า ดัชนีการหักเหแสงไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยน้ำมันทีทรีที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ การกลั่นด้วยน้ำ และ การกลั่นด้วยไอน้ำ มีค่า RI เท่ากับ 1.478,1.477

และ1.474 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าความหนาแน่นของน้ำมันทีทรี พบว่า ค่าความหนาแน่นของน้ำมันทีทรีที่ได้จากการกลั่นทั้ง 3 วิธี มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยน้ำมันที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำ และ การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ มีค่าความหนาแน่นมากกว่าน้ำมันทีทรีที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการรายงานของ (Carson *et al*., 2006) ซึ่งได้กล่าวถึงการวัดค่าความหนาแน่นของน้ำมันทีทรี ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.885-0.906 ผลจากการวัดค่าความถ่วงจำเพาะ ของน้ำมันที่ได้จากการกลั่นทั้ง 3 วิธี มีค่าความถ่วงจำเพาะ เท่ากับ 0.897, 0.895 และ 0.889 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (Table 2)

Table 2 Physical characteristic of tea tree oils

Distillation	Refective index^{ns} (RI)	Density (D)	Specific gravity (S)
Steam	1.477	0.887^{b}	0.889^{b}
Water	1.474	0.896^{a}	0.897^{a}
water and steam	1.478	0.893^{a}	0.895^{ab}

$^{a-b}$= Mean values followed by different superscripts within a column were significantly different using Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$).

^{ns}= non significant

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยทีทรีโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแก๊ส/สเปกโทรเมตรีมวลพบว่าการกลั่นด้วยน้ำ มีปริมาณสาร terpinene-4-ol สูงสุดคิดเป็น 41.37 % รองลงมาคือการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ และ การกลั่นด้วยไอน้ำคิดเป็น 40.61 และ 38.81% ตามลำดับ ส่วนปริมาณสารสำคัญ 1,8-cineole ของน้ำมันทีทรีที่สกัดได้จากการกลั่นทั้ง 3 วิธี พบว่ามีปริมาณสาร 6.56, 6.16 และ 5.25% ซึ่งปริมาณสารทั้งสองชนิดอยู่ในมาตรฐานของน้ำมันทีทรี ซึ่งระบุไว้ว่าน้ำมันทีทรีที่ได้มาตรฐานต้องมีปริมาณสาร terpinen-4-ol มากกว่า 30-48% และ 1,8-cineole น้อยกว่า 15 % แสดงว่าน้ำมันหอมระเหยทีทรีที่กลั่นได้จาก 3 วิธี เป็นน้ำมันที่มีคุณภาพดีตามเกณฑ์มาตรฐาน (International Standard – ISO/FDIS 4730:2004) และพบว่า น้ำมันทีทรีที่กลั่นได้จากวิธีการกลั่นทั้งสามวิธี มีปริมาณสาร 1, 8-cineole สูงกว่าในน้ำมันทีทรีทางการค้าแสดงผลดัง Table 3

Table 3 Percentage of peak area of terpinene-4-ol and 1, 8-cineole of tea tree oils

active compounds	Steam	Water	water and steam	ISO/FDIS 4730:2004 (min-max%)
terpinene-4-ol	38.81±1.19	41.37±1.07	40.61±0.28	30.00-48.00
1,8-cineole	6.56±0.28	6.16±0.50	5.25±0.52	Trace-15.00

3. ประสิทธิภาพน้ำมันหอมระเหยทีทรีในการต้านเชื้อราที่ก่อโรคที่ผิวหนัง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นทั้ง 3 วิธี คือ การกลั่นด้วยไอน้ำ การกลั่นด้วยน้ำ และ การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ ในการต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคที่ผิวหนัง 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* และ *Microsporum gypseum* โดยวิธีไอระเหย (Vapor assay) แสดงใน Table 4 จากผลการทดลองพบว่าน้ำมันทีทรีที่ได้จากการกลั่นน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 วิธี มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคที่ผิวหนัง *T.mentagrophytes*, *T. rubrum* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า Antifungal Index (%) เท่ากับ 100% แสดงว่าน้ำมันทีทรีมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ 100% เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับน้ำมันทีทรีทางการค้าทั้ง 2 ชนิด คือ น้ำมันทีทรีจากบริษัทที่ 1 และบริษัทที่ 2 พบว่าน้ำมันทีทรีที่มีจำหน่ายทางการค้าจากบริษัทที่ 1 และ 2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีโดยมีค่า Antifungal Index เท่ากับ 100% เช่นเดียวกัน และพบว่าน้ำมันทีทรีกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อรา *M. gypseum* ได้ดีโดยมีค่า Antifungal Index เท่ากับ 100 ส่วนน้ำมันที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ และ การกลั่นด้วยน้ำ มีค่า Antifungal Index ในการยับยั้งเชื้อ *M. gypseum*เ ท่ากับ 95.50 และ 96.85 และน้ำมันทีทรีทางการค้า (บริษัทที่ 1 และ 2) มีค่า Antifungal Indexในการยั้งเชื้อรา *M. gypseum* เท่ากับ 94.23 และ 92.79 ตามลำดับ โดยน้ำมันที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของ *M. gypseum* ได้ดีที่สุด คือน้ำมันที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ

Table 4 Antifungal index of tea tree oil examined by vapor assay

Method	Tea Tree oil	Antifungal Index (%)		
		T. mentagrophytes^{ns}	*T. rubrum*^{ns}	*M. gypseum*^{ns}
Vapor assay	Steam	100	100	95.50
	Water	100	100	96.85
	Water and steam	100	100	100
	Commercial 1	100	100	94.23
	Commercial 2	100	100	92.79

significantly different using Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$) ^{ns}= non significant

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันทีทรีในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคที่ผิวหนังทั้ง 3 ชนิดโดยการประเมินค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี vapor assay พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยทีทรีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. mentagrophytes* และ *T. rubrum* ได้สมบูรณ์ คือระดับความเข้มข้น 1000 mg/ml หรือระดับความเข้มข้นของน้ำมัน 100% และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยทีทรีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. gypseum* ได้สมบูรณ์คือระดับความเข้มข้น 500 mg/ml ดังแสดงใน Table 5

Table 5 Minimum inhibitory concentration of tea tree oils.

Tea tree oil	Minimum inhibitory concentration (mg/ml)		
	T. mentagrophytes	*T. rubrum*	*M. gypseum*
Steam	1000	1000	500
Water	1000	1000	500
Water and steam	1000	1000	500
Commercial 1	1000	1000	500
Commercial 2	1000	1000	500

สรุป

จากการศึกษาวิธีสกัดน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 วิธี คือ การกลั่นด้วยไอน้ำ การกลั่นด้วยน้ำ และการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ พบว่าวิธีการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ ใช้เวลาในการสกัด 6 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำมันสูงที่สุด 2.77% ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการกลั่นด้วยน้ำ 2.75% และการกลั่นด้วยไอน้ำ มีปริมาณน้ำมันน้อยที่สุด 1.70% และเวลาที่ใช้ในการสกัดทั้ง 3 วิธี ซึ่งได้ปริมาณผลผลิตมากที่สุดคือใช้เวลาในการสกัด 6 ชั่วโมงจากผลการศึกษาคุณภาพทางด้านกายภาพ และน้ำมันทีทรีที่ได้จากกลั่นด้วยน้ำ พบปริมาณสารสำคัญ terpinen-4-ol สูงสุดคิดเป็น 41.37% และมีปริมาณ 1,8-cineole 6.16% และจากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยทีทรีที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการกลั่นที่แตกต่างกันในการต้านเชื้อราก่อโรคที่ผิวหนัง *Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum* และ*Microsporum gypseum* ด้วยวิธี Vapor assay พบว่า น้ำมันทีทรีมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ดี และน้ำมันทีทรีที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ และ การกลั่นด้วยน้ำ สามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุดโดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันทีทรีที่ได้จากการกลั่นทั้ง 3 วิธีในการต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes, T. rubrum* และ*M. gypseum* คือ 1000 mg/ml, 1000 mg/ml และ 500 mg/ml ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

คณะนักวิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่สนับสนุนทุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

โอฬาร ตัณฑวิรุฬห์ อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, วรวิทย์ ยี่สวัสดิ์, สุดประสงค์ สุวรรณเลิศ, ประภาส ช่างเหล็ก และวีระศรี เมฆตรง. 2551. **การศึกษาศักยภาพการผลิต** Tea Tree (***Melaleuca alternifolia***) **ในประเทศไทย**. รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัยมก. ปีงบประมาณ 2551 สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

"_____". 2552. **วิธีการสกัดและองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยทีทรี** (***Melaleuca alternifolia***) **ในประเทศไทย**. เรื่องเต็มประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาพืช. 370-377.

Alvarez-Castellanos, P. P., C. D. Bishop and M. J. Pascual-Villalobos. 2001. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. **Phytochem**.57; 99–102.

Carson C. F., K. A. Hammer and T. V. Riley. 2006. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: A Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **Clin Microbiol Rev** 19: 50–62

International Organization for Standardization. 2004. Final draft. International Standard Oil of Meleleuca, terpinen-4-ol type (Tea Tree Oil) ISO/FDIS 4730: 2004

Southwell, I. 1999. Tea Tree Constituens, pp. 29-62. *In* I. Southwell and R. Lowe, **Tea Tree The Genus *Melaleuca*.**Harwood Academic Publishers, Australia.

Saller, R., T. Berger, J. Reichling and M. Harkental. 1998. Pharmaceutical and medicinal aspects of Australian Tea Tree Oil. **Phyto medicine** 5; 489–495.

Weseler,A., H.K. Geiss, R.Saller and J. Reichling. 2002. Antifungal effect of Australian tea tree oil on *Malassezia pachydermatis* isolated from canines suffering from cuta- neous skindisease.**Schweiz.Arch.Tierheilkd**.144; 215–221.