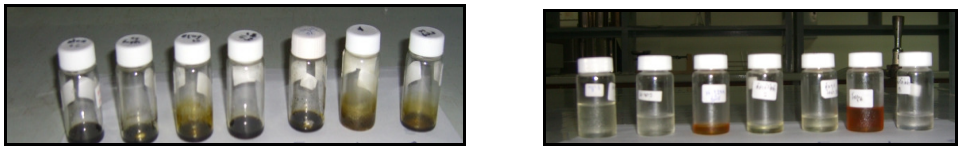
บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกพืชตระกูลส้ม

ในการคัดเลือกพืชตระกูลส้ม 7 ชนิด ได้แก่ มะกรูด มะนาว ส้มโอ ส้มเช้ง ส้มจุก ส้มโชกุน และส้มจี๊ด มาสกัดและทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ ได้คัดเลือกมะนาวที่มีผิวสีเขียวแก่ส่วนมะกรูด ส้มโอ ส้มเช้ง ส้มจุก ส้มโชกุน และส้มจี๊ดมีสีเขียวอมเหลือง เนื่องจากรายงานของ Selvaraj และคณะ (2004) ที่แสดงให้เห็นว่าปริมาณของสารประกอบหลักในมะนาวที่มีผิวสีเหลืองจะลดลง แต่สารประกอบหลักอย่าง limonene, β-pinene และ γ-terpinene จะมีปริมาณใกล้เคียงกันกับผิวสีเขียวแก่ แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของส้มแต่ละชนิดอย่างมะกรูดและส้มจี๊ดตอนผลอ่อนจะมีสีเขียวแก่เมื่อโตเต็มที่จะมีสีเขียวอมเหลือง ส่วนส้มโอ ส้มโชกุน ส้มเช้งและส้มจุก ตอนผลอ่อนจะมีสีเขียวอ่อนเมื่อโตเต็มที่จะมีสีเขียวอมเหลือง เมื่อนำมาทดสอบยาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่มฟอสเฟตและคาร์บาเมทไม่พบการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลง (ภาคผนวก ก) ซึ่งยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้เกษตรกรนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นเวลานานแล้วในทางการเกษตรกรรม การเลือกใช้ผิวส้มสดเนื่องจากมีสารประกอบที่มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์สูงกว่าผิวส้มชนิดแห้ง เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยมีความไวต่อความร้อนทำให้สารประกอบในผิวส้มลดลง (Burt, 2004)

เมื่อนำผิวส้มมาสกัดด้วยเอธิลอะซิเตตและกลั่นด้วยไอน้ำ พบว่าลักษณะทางกายภาพของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวส้มเป็นสารข้น หนืด มีสีเขียวเข้มจัดผสมกับสีเหลือง ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นด้วยไอน้ำเป็นของเหลวสีเหลืองอ่อน ๆ ถึงขาวใสยกเว้นส้มโอ และส้มโชกุนจะมีสีเหลืองเข้มดังแสดงในภาพที่ 6

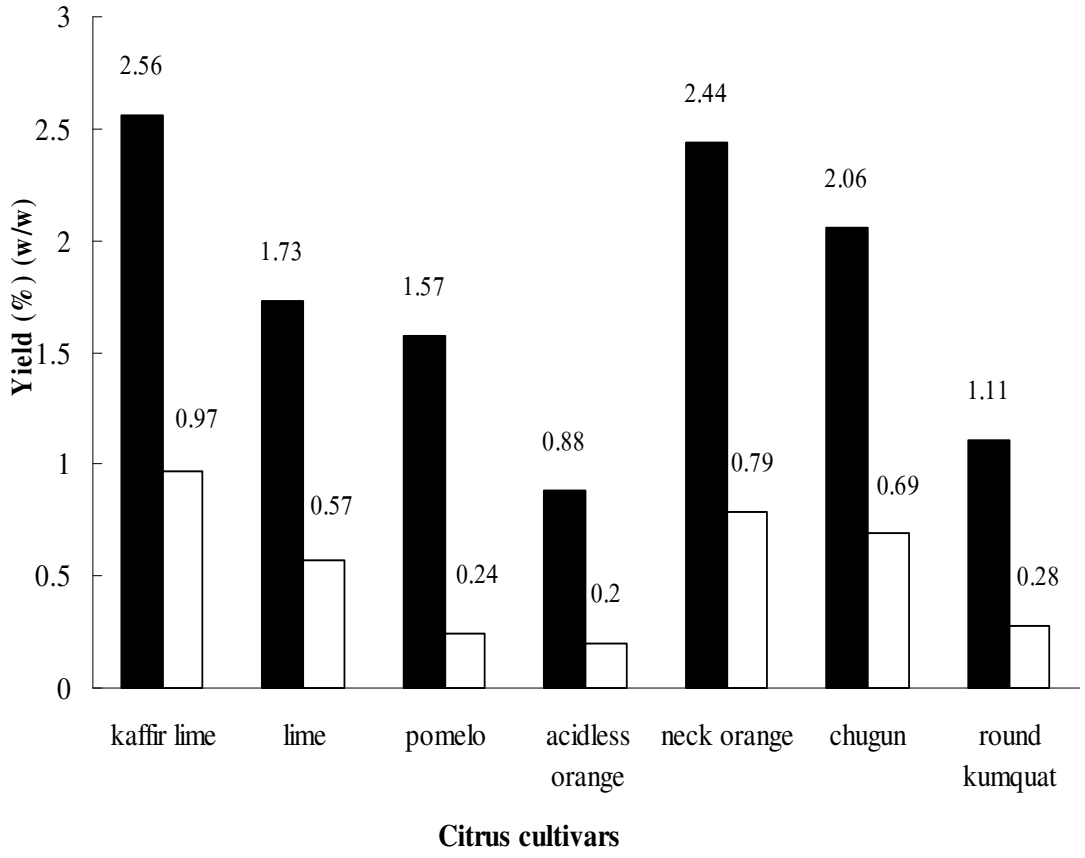


(A) (B)

ภาพที่ 6 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดเอธิลอะซิเตต (A) และน้ำมันหอมระเหย (B) จากผิวส้มชนิดต่างๆ

Figure 6. Physical appereances of ethyl acetate extracts (A) and essential oils (B) from peels of various citrus cultivars.

โดยที่การสกัดด้วยเอธิลอะซิเตตให้ผลได้ของสารสกัดหยาบสูงกว่าผลได้ของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำของผิวส้มทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองคือ ผลได้ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตของมะกรูด มะนาว ส้มโอ ส้มเช้ง ส้มจุก ส้มโชกุนและส้มจี๊ดเท่ากับ 2.56, 1.73, 1.57, 0.88, 2.44, 2.06 และ 1.11 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตามลำดับ ส่วนการกลั่นด้วยไอน้ำให้ผลได้ของน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 0.97, 0.57, 0.24, 0.20, 0.79, 0.69 และ 0.28 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ผลได้ของสารสกัดเอธิลอะซิเตต (■) และน้ำมันหอมระเหย (□) จากผิวส้มชนิดต่างๆ

Figure 7. Production yields of ethyl acetate extracts (■) and essential oils (□) from peels of various citrus cultivars.

โดยผิวมะกรูดให้ผลได้ของสารสกัดสูงสุดจากทั้งสองวิธี ซึ่งผลได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำสอดคล้องกับการทดลองของ Sharma และ Tripathi (2006) ที่พบว่าการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจาก *C. sinensis* (L.) Osbeck ได้ผลผลิต 1.8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และ สิริวิภา (2541) ที่ได้ทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืช 19 ชนิด ด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำและพบว่าผิวมะกรูดและ

ส้มเขียวหวานให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหย 0.90 และ 0.66 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ ส่วน Kamkuan และคณะ (2005) ได้สกัดผิวของมะนาวควาย มะนาว และมะกรูดด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ พบว่าผิวมะกรูดให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุดคือ 0.96 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับ Yadav และคณะ (2004) พบว่าการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากผิวของมะนาว *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle ผลได้ของสารสกัดเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งปริมาณของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้นี้ นอกจากขึ้นอยู่กับชนิดของส้มแล้วยังขึ้นอยู่กับความสด อายุของพืช ฤดูกาล และเทคนิควิธีการสกัดด้วย (สิริวิภา สัจจพงษ์, 2541)

เมื่อนำสารสกัดเอธิลอะซิเตตและน้ำมันหอมระเหยจากผิวส้มทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* พบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวส้มทั้ง 7 ชนิดมีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่นำมาทดสอบได้สูงกว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวส้มชนิดเดียวกันที่นำมาศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 15 แสดงให้เห็นว่าสารประกอบที่แสดงการยับยั้งในน้ำมันหอมระเหยมีน้อยกว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวส้ม โดยสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดและผิวมะนาวมีกิจกรรมการยับยั้ง *B. cereus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ที่ค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) 0.56, 1.13 และ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC (Minimum Bactericidal Concentration) 0.56, 1.13 และ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chaisawadi และคณะ (2003) ที่ศึกษากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี agar diffusion ของสมุนไพรไทย พบว่าผิวมะกรูดและผิวมะนาวมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* ได้ดี ที่น่าสนใจคือสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวส้มจุกที่สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้ดีที่สุดที่ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.56 และ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ยับยั้ง *B. cereus* ได้น้อยมาก และไม่ยับยั้ง *S. aureus* เลย แสดงว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวส้มจุกมีกิจกรรมการยับยั้งที่มีความจำเพาะต่อ *L. monocytogenes* มาก ส่วนสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวส้มโอและส้มเช้งจะไม่แสดงการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกชนิดใดเลย

เมื่อนำสารสกัดเอธิลอะซิเตตและน้ำมันหอมระเหยจากผิวส้มทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *Salmonella* sp. และ *E. coli* O157:H7 DMST 12743 พบว่าระดับความเข้มข้นที่ใช้คือ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองชนิด ดังแสดงในตารางที่ 16 เพราะแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นของผนังเซลล์ที่แข็งแรงโดยมีส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและผนังเซลล์ แต่แบคทีเรียแกรมบวกมีเพียงชั้นของผนังเซลล์ ทำให้แกรมลบทนต่อสารสกัดได้ดีกว่าแกรมบวก (Burt, 2004)

เมื่อนำสารสกัดเอธิลอะซิเตตและน้ำมันหอมระเหยจากผิวส้มทดสอบกิจกรรมการยับยั้งยีสต์และราคือ *S. cerevisiae* var. *sake*, *C. albicans* และ *A. fumigatus* TISTR 3180 พบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดสามารถยับยั้งยีสต์และราได้สูงกว่าน้ำมันหอมระเหย โดยสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดสามารถยับยั้ง *C. albicans* ที่ค่า MIC และ MFC เท่ากับ 1.13 และ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนของน้ำมันหอมระเหยให้ค่า MIC และ MFC เท่ากัน คือ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดแสดงการยับยั้ง *A. fumigatus* TISTR 3180 ที่ค่า MIC และ MFC เท่ากับ 1.13 และ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนของน้ำมัน-หอมระเหยแสดงการยับยั้งที่ค่า MIC และ MFC เท่ากับ 2.25 และ >2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ยกเว้นน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดที่สามารถยับยั้ง *S. cerevisiae* var. *sake* ได้เท่ากันกับสารสกัดเอธิลอะซิเตตที่ค่า MIC และ MFC เท่ากับ 0.28 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 17 สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะนาวและผิวส้มโอสามารถยับยั้ง *S. cerevisiae* var. *sake* ได้ดีรองลงมาจากผิวมะกรูดคือให้ค่า MIC และ MFC เท่ากันคือ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวส้มโอ ส้มเช้ง และส้มโชกุนมีกิจกรรมการยับยั้ง *A. fumigatus* TISTR 3180 ได้ดีที่ค่า MIC เท่ากับ 0.56, 0.28 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า MFC เท่ากับ 1.13, 0.28 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พืชตระกูลส้มมีสมบัติในการยับยั้งเชื้อราได้ 60 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรีย 30 เปอร์เซ็นต์ (Cowan, 1999) นั่นแสดงว่าสารประกอบที่พบในพืชตระกูลส้มจะมีความจำเพาะและแสดงกิจกรรมการยับยั้งราได้ดีกว่าแบคทีเรีย สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดมีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ในช่วงกว้าง (broad spectrum) คือสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ยีสต์และราได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. cerevisiae* var. *sake*, *C. albicans* และ *A. fumigatus* TISTR 3180 สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะนาวมีกิจกรรมการยับยั้งได้ในช่วงกว้างเช่นเดียวกันกับผิวมะกรูดเพียงแต่สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะนาวสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวต่ำกว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูด ยกเว้นการยับยั้ง *B. cereus* , *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ที่สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากพืชทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งได้เท่ากัน เมื่อพิจารณาถึงสารประกอบในผิวมะนาวและผิวมะกรูดพบว่าสารประกอบหลักคือ limonene และ β-pinene (Yadav *et al*., 2004) แต่จะต่างกันในสารประกอบรองตามชนิดของพืชนั้น ๆ ซึ่ง β-pinene จะยับยั้งกระบวนการหายใจ การขนส่งไอออน และเพิ่มสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเซลล์ยีสต์ (Cox *et al*., 2000)

ตารางที่ 15 ค่า MIC และ MBC/MFC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารสกัดหยาบจากผิวส้มด้วยเอธิลอะซิเตตและน้ำมันหอมระเหยต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก

Table 15. MIC and MBC/MFC (mg/ml) of crude ethyl acetate extracts and essential oils from citrus peels against Gram-positive bacteria.

Microorganisms	Extraction methods	MIC & MBC (mg/ml)	Citrus cultivars						
			kaffir lime	lime	pomelo	acidless orange	Chugun	neck orange	round kumquat
B. cereus	Ethyl acetate	MIC	0.56	0.56	>2.25	>2.25	2.25	2.25	2.25
		MBC	0.56	0.56	>2.25	>2.25	2.25	2.25	2.25
	Hydrodistillation	MIC	1.13	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
		MBC	1.13	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
S. aureus	Ethyl acetate	MIC	1.13	1.13	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
		MBC	1.13	1.13	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
	Hydrodistillation	MIC	2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
		MBC	2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
L. monocytogenes	Ethyl acetate	MIC	1.13	1.13	>2.25	>2.25	>2.25	0.56	>2.25
		MBC	2.25	2.25	>2.25	>2.25	>2.25	1.13	>2.25
	Hydrodistillation	MIC	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
		MBC	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25

ตารางที่ 16 ค่า MIC และ MBC/MFC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารสกัดหยาบจากผิวส้มด้วยเอธิลอะซิเตตและน้ำมันหอมระเหยต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ

Table 16. MIC and MBC/MFC (mg/ml) of crude ethyl acetate extracts and essential oils from citrus peels against Gram-negative bacteria.

Microorganisms	Extraction methods	MIC & MBC (mg/ml)	Citrus cultivars						
			kaffir lime	lime	pomelo	acidless orange	chugun	neck orange	round kumquat
Salmonella sp.	Ethyl acetate	MIC	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
		MBC	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
	Hydrodistillation	MIC	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
		MBC	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
E.coli O157 : H7 DMST 12743	Ethyl acetate	MIC	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
		MBC	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
	Hydrodistillation	MIC	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
		MBC	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25

ตารางที่ 17 ค่า MIC และ MBC/MFC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารสกัดหยาบจากผิวส้มด้วยเอธิลอะซิเตตและน้ำมันหอมระเหยต่อกิจกรรมการยับยั้งยีสต์และรา

Table 17. MIC and MBC/MFC (mg/ml) of crude ethyl acetate extracts and essential oils from citrus peels against yeasts and fungi.

Microorganisms	Extraction methods	MIC & MBC (mg/ml)	Citrus cultivars						
			kaffir lime	lime	pomelo	acidless orange	Chugun	neck orange	round kumquat
S. cerevisiae var. *sake*	Ethyl acetate	MIC	0.28	0.56	0.56	>2.25	1.13	1.13	2.25
		MFC	0.56	0.56	0.56	>2.25	1.13	1.13	2.25
	Hydrodistillation	MIC	0.28	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
		MFC	0.56	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
C. albicans	Ethyl acetate	MIC	1.13	2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
		MFC	2.25	2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
	Hydrodistillation	MIC	2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
		MFC	2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
A. fumigatus TISTR 3180	Ethyl acetate	MIC	1.13	2.25	0.56	0.28	0.56	2.25	>2.25
		MFC	2.25	2.25	1.13	0.28	0.56	>2.25	>2.25
	Hydrodistillation	MIC	2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	2.25	>2.25
		MFC	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25

กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตและน้ำมันหอมระเหยจากผิวส้มจะมีความแตกต่างกัน ซึ่งมีปัจจัยคือพฤษศาสตร์ของพืชนั้นๆ ช่วงการเก็บเกี่ยว ระยะเวลาในการเติบโต และวิธีการสกัด ซึ่งจะมีผลต่อสารประกอบชีวภาพของส้มชนิดนั้น ๆ รวมถึงสายพันธุ์แบคทีเรียและปริมาณที่ใช้ในการทดสอบ (Burt, 2004)

2. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเอธิลอะซิเตตและน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด

จากผลการศึกษากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตและน้ำมันหอม-ระเหยจากผิวส้มพบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตและน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดมีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ในช่วงกว้างและมีกิจกรรมการยับยั้งได้ดี จึงนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบเชิงคุณภาพด้วย GC-MS พบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดมีสารประกอบจำนวน 13 ชนิด โดยสารประกอบหลักคือ limonene (31.64 เปอร์เซ็นต์) สารประกอบรองคือ citronellal (25.99 เปอร์เซ็นต์) และ β-pinene (6.83 เปอร์เซ็นต์) ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดมีสารประกอบจำนวน 8 ชนิด สารประกอบหลักคือ β-pinene (30.48 เปอร์เซ็นต์) สารประกอบรองคือ sabinene (22.75 เปอร์เซ็นต์) และ citronellal (15.66 เปอร์เซ็นต์) ดังแสดงในตารางที่ 18 ปริมาณของสารประกอบสอดคล้องกับรายงานการวิจัยหลายท่านที่กล่าวว่าสารประกอบที่พบในพืชตระกูลส้มส่วนใหญ่เป็นกลุ่มสารประเภทเทอร์ปีน ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดประกอบด้วย β-pinene (30 เปอร์เซ็นต์) และ limonene (29 เปอร์เซ็นต์) (Chaisawadi *et al*., 2005) ส่วน Forest Research Institute Malaysia (2006) พบว่าสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดประกอบด้วย β-pinene, limonene, terpinen-4-ol และ 4-terpineol นอกจากนี้ Manosroi และคณะ (1999) พบว่าสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดประกอบด้วย β-pinene (30.6 เปอร์เซ็นต์) limonene (29.2 เปอร์เซ็นต์) และ citronellal (4.2 เปอร์เซ็นต์) เมื่อพิจารณาถึงสารประกอบกับกิจกรรมการยับยั้งพบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยเนื่องจากการสกัดด้วยไอน้ำมีเพียงสารในกลุ่ม volatile compounds เท่านั้นแต่การสกัดด้วยเอธิลอะซิเตตมีทั้งกลุ่มสาร volatile compounds และ non-volatile compounds

นอกจากนี้ยังมีผู้วิจัยหลายท่านได้ศึกษาส่วนประกอบของพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ ซึ่งสารประกอบที่พบเป็นกลุ่มสาร monoterpene hydrocarbon, oxygenated compounds และ non-volatile compounds พบพวกเทอร์ปีน 50 ถึง > 95 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนใหญ่สารประกอบหลักคือ limonene ซึ่งจะพบได้ในพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ เช่น *C. tangerine*, *C. reticulate* Blanco, *C. paradisi*, *C. limon*, *C. reticulate, C. aurantium amara* L. และ *C. aurantifolia* Swingle. สารประกอบรองที่พบคือ linalool,

myrcene, geranial, β-nerolidol, sabinene, β-pinene, citronellol, terpinen-4-ol, α-terpineol เป็นต้น สารประกอบพวก monoterpene ที่พบในลูกจันทน์และกานพลูเป็นสารที่มีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ (Souza *et al*., 2005) น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสารอินทรีย์หลาย ๆ กลุ่มรวมกันซึ่งคุณภาพและปริมาณของสารประกอบขึ้นกับระยะการเจริญ สภาวะแวดล้อม และวิธีการสกัด (Moreira *et al*., 2005) นอกจากนี้สารประกอบที่พบในพืชตระกูลส้มแต่ละชนิดอาจจะเหมือนหรือแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรม ภูมิประเทศ ภูมิอากาศ และการดูแลรักษาในการปลูกด้วย (Lota *et al*., 2000)

ตารางที่ 18 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเอธิลอะซิเตตและน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด

Table 18. Chemical compositions (%) of ethyl acetate extract and essential oil from kaffir lime peel.

Components	Kaffir lime peel	
	Ethyl acetate extract	Essential oil
Limonene	31.64	8.13
Citronellal	25.96	15.67
beta-pinene	6.83	30.48
Sabinene	5.43	22.75
Citronellol	1.89	3.24
citronellyl acetate	5.41	-
delta-cadinene	3.21	-
alpha-copaene	2.99	-
trans-caryophyllene	2.88	-
l-isopulegol	2.13	-
trans-sabinene hydrate	1.74	-
germacrene-d	1.34	-
Myrcene	1.33	-
4-terpineol	-	6.61
alpha-pinene	-	3.05
m-cymene	-	0.85

เมื่อนำสารประกอบ limonene และ citronellal บริสุทธิ์มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ปรากฏว่าไม่พบการยับยั้ง *B. cereus*, *B. cereus* spore, *S. cerevisiae* var. *sake*, *A. fumigatus* TISTR 3180, *C. albicans*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp. และ *E. coli* O157:H7 DMST 12743 ของสาร limonene คือมีค่า MIC >2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน citronellal สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus*, *S. cerevisiae* var. *sake* และ *C. albicans* ที่ค่า MIC เป็น 1.13, 1.13 และ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ค่า MBC เป็น 1.13, 2.25 และ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ค่า MIC และ MBC/MFC ของสาร limonene, citronellal, limonene + citronellal และสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดต่อจุลินทรีย์

Table 19. MIC and MBC/MFC values of limonene, citronellal, limonene + citronellal and kaffir lime extract against microorganisms.

Microorganisms	MIC and MBC/MFC values (mg/ml)			
	limonene	citronellal	limonene + citronellal (1:1)	kaffir lime extracts
B. cereus	>2.25/>2.25	1.13/1.13	1.13/1.13	0.56/0.56
B. cereus spore	>2.25/>2.25	>2.25/>2.25	>2.25/>2.25	1.13/1.13
S. aureus	>2.25/>2.25	>2.25/>2.25	>2.25/>2.25	1.13/1.13
L. monocytogenes	>2.25/>2.25	>2.25/>2.25	>2.25/>2.25	1.13/2.25
Salmonella sp.	>2.25/>2.25	>2.25/>2.25	>2.25/>2.25	>2.25/>2.25
E.coli O157 : H7 DMST 12743	>2.25/>2.25	>2.25/>2.25	>2.25/>2.25	>2.25/>2.25
S. cerevisiae var. *sake*	>2.25/>2.25	1.13/2.25	>2.25/>2.25	0.28/0.56
C. albicans	>2.25/>2.25	2.25/2.25	>2.25/>2.25	1.13/2.25
A. fumigatus TISTR 3180	>2.25/>2.25	>2.25/>2.25	>2.25/>2.25	1.13/2.25

เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์คือ limonene และ citronellal กับสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดพบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดมีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ที่สูงกว่าสารบริสุทธิ์ต่อการยับยั้ง *B. cereus*, *B. cereus* spore, *S. cerevisiae* var. *sake*, *A. fumigatus* TISTR 3180, *C. albicans*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* โดยสามารถยับยั้ง *S.*

cerevisiae var. *sake* ได้ดีที่สุดที่ค่า MIC และ MBC เป็น 0.28 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และยับยั้ง *B. cereus* ได้รองลงมาโดยมีค่า MIC และ MBC เป็น 0.56 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการทดสอบการยับยั้งสปอร์ของ *B. cereus* พบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดสามารถทำลายสปอร์ได้ที่ความเข้มข้น 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในขณะที่สารบริสุทธิ์ citronellal และ limoneneไม่พบการยับยั้งสปอร์เลย เมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของสารผสมของ citronellal และ limonene อัตราส่วน (1:1) พบว่าสามารถยับยั้ง *B. cereus* โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากันคือ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ สารบริสุทธิ์ limonene และ citronellal มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ไม่ดีเท่ากับสารสกัดเอธิลอะซิเตตนั่นแสดงว่าสารสองชนิดนี้ไม่ได้มีกิจกรรมการยับยั้งหลักแต่เป็นผลมาจากองค์ประกอบของสารหลาย ๆ ชนิดร่วมกันซึ่งกิจกรรมการยับยั้งของสารสกัดจากพืชเกิดจากการร่วมกันของสารประกอบแต่ละชนิดไม่ว่าจะเป็นกลุ่มสารพวกเทอร์ปีนและสารประกอบออกซิจิเนต (Smith-Palmer *et al*., 2001) เป็นที่น่าสังเกตว่า limonene ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์แต่เป็นตัวส่งเสริม citronellal ให้เกิดกิจกรรมได้ดีขึ้นจากการยับยั้ง *B. cereus* ของ citronellal และสารผสมของ citronellal และ limonene อัตราส่วน (1:1) ที่มีค่า MIC และ MBC เท่ากันคือ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ limonene จะไม่มีการส่งเสริมกิจกรรมการยับยั้ง *S. cerevisiae* var. *sake* และ *C. albicans* เนื่องจากเมื่อนำสารผสมของ citronellal และ limonene อัตราส่วน (1:1) พบว่าจะไม่มีการยับยั้งเชื้อนี้เลยในขณะที่เป็นสารบริสุทธิ์จะมีกิจกรรมการยับยั้งได้อยู่ทั้งนี้ก็ขึ้นกับเชื้อแต่ละชนิดด้วย แต่ก็น่าสนใจที่จะนำ limonene มาเป็นแนวทางการใช้ร่วมกันกับยาปฏิชีวนะเพื่อลดปริมาณในการใช้ การทดลองนี้สอดคล้องกับที่กล่าวว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบโหระพามีประสิทธิภาพการยับยั้งดีกว่าสารบริสุทธิ์ linalool และ methyl chavicol ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่พบ (Holley and Patel, 2005) นอกจากนี้ได้นำสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูด วิเคราะห์ด้วย GC-MS เชิงปริมาณ พบว่ามี citronellal 394.24 กรัมต่อกิโลกรัม หรือ 2.56 เปอร์เซ็นต์จากน้ำหนักผิวมะกรูดจำนวน 500 กรัม ซึ่งเป็นน้ำหนักเริ่มต้นที่ใช้สกัด

3. ผลของพีเอช อุณหภูมิ และองค์ประกอบในอาหารต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูด

3.1 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้ง *B. cereus* ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูด

เมื่อทำการศึกษากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่มีพีเอช 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7 และ 7.5 พบว่าสามารถยับยั้ง *B. cereus* ได้สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 4.5 และ 5 ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ค่า MBC

ที่พีเอช 4.5 ต่ำกว่าที่พีเอช 5 ซึ่งมีค่า MBC เท่ากับ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนพีเอช 5.5-7 แสดงค่า MIC และ MBC ที่เท่ากันคือ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพีเอช 7.5 MIC และ MBC แสดงค่าการยับยั้งที่เท่ากันคือ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 20 ดังนั้นกิจกรรมการยับยั้งของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดต่อ *B. cereus* มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อระดับพีเอชของอาหารลดลงต่ำกว่า 5 เนื่องจากที่ระดับพีเอชต่ำโมเลกุลของสารสกัดมีการยึดเกาะกันได้ดีเพิ่มประสิทธิภาพในการซึมผ่านของสารสกัดส่งเสริมให้เกิดกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี (Juven *et al*., 1994 อ้างโดย Burt, 2004)

ตารางที่ 20 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้ง *B. cereus* ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูด

Table 20. Effect of pH on antimicrobial activity of ethyl acetate extracts from kaffir lime peel against *B. cereus*.

pH	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
4.5	0.28	0.28
5	0.28	0.56
5.5	0.56	0.56
6	0.56	0.56
6.5	0.56	0.56
7	0.56	0.56
7.5	1.13	1.13
no adjusted pH	0.56	0.56

เมื่อทำการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของสารสกัดเอธิลอะซิเตทจากผิวมะกรูดต่อจุลินทรีย์ 7 ชนิดคือ *S. cerevisiae* var sake, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157 : H7 DMST 12743, *Salmonella* sp., *C. albicans* และ *A. fumigatus* TISTR 3180 ในอาหารที่มีพีเอช 4.5 และ 7 พบว่าที่พีเอช 4.5 สารสกัดเอธิลอะซิเตตสามารถยับยั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* ที่ MIC และ MBC ต่ำสุดคือ 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิต และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* O157 : H7 DMST 12743 และ *Salmonella* sp. ที่ MIC 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ MBC >2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่พีเอช 7 สารสกัดสามารถยับยั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* ที่ MIC เท่ากับ 0.56 และ 1.13

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากับ 0.56 และ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ ดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดที่พีเอช 7 และ 4.5

Table 21. Antimicrobial activities of ethyl acetate extract from kaffir lime peel at pH 7 and 4.5.

Microorganisms	pH 7		pH 4.5	
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
S. cerevisiae var. *sake*	0.28	0.56	1.13	2.25
S. aureus	1.13	1.13	0.28	0.28
L. monocytogenes	1.13	1.13	1.13	1.13
B. cereus	0.56	0.56	0.28	0.28
E. coli O157 : H7 DMST 12743	>2.25	>2.25	2.25	>2.25
Salmonella sp.	>2.25	>2.25	2.25	>2.25
C. albicans	2.25	2.25	2.25	>2.25
A. fumigatus TISTR 3180	1.13	2.25	1.13	2.25

จากผลการทดลองนี้แสดงว่าที่พีเอช 4.5 สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดสามารถยับยั้งการเติบโตแบคทีเรียแกรมลบทั้งนี้เพราะสารสกัดที่อยู่ในพีเอชต่ำเกิดไฮโดรเนียมไอออนส่งเสริมให้เกิดการละลายได้ดี เมื่อสารสกัดเอธิลอะซิเตตจับกับชั้นเมมเบรนของผนังเซลล์แบคทีเรียจะทำให้เกิดการสูญเสียสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านแล้วสามารถเข้าสู่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ดี การทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Stonsaovapak และคณะ (2000) ที่กล่าวว่าอิทธิพลของพีเอชจากสารสกัดเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ของใบพลูต่อการยับยั้ง *E. coli* O157 : H7 ATCC 43889 และการยับยั้งต่อ *Y. enterocolitica* ของสารสกัดเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์จากผลทับทิมเกิดได้ดีในสภาวะที่สารสกัดอยู่ในพีเอช 4.5 เมื่อเทียบกับสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันที่มีพีเอชสูงกว่า โดย *E. coli* O157 : H7 และ *Y. enterocolitica* สามารถเจริญได้ที่พีเอชช่วง 4.5-9.5 และยังสอดคล้องกับการทดลองของ Ohno และคณะ (2003) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) แสดงค่า MBC ที่พีเอช 4.5 และ 5 ต่อการยับยั้ง *H. pylori* ATCC 43504 ซึ่งโคโลนีลดลงหลัง 60 นาที ในขณะที่พีเอช 6 และ 7 เชื้อยังเจริญได้อยู่ กรณีของ *S. cerevisiae* var. *sake* ที่สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดมีการยับยั้งที่ค่า MIC เพิ่มขึ้นในอาหารที่มีพีเอช 4.5 จาก

0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากในสภาวะอาหารที่มีพีเอช 4.5 *S. cerevisiae* var. *sake* สามารถเจริญได้ดีซึ่งส่งผลให้กิจกรรมการยับยั้งลดลง

3.2 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้ง *B. cereus* ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูด

เมื่อนำสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72, 100 และ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง พบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตที่ผ่านความร้อนในระดับ 100 และ 121 องศาเซลเซียส มีค่าลดลงแต่ระดับการให้ความร้อนที่ 72 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งของสารสกัดต่อ *B. cereus* คือมีค่า MIC และ MBC เป็น 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเช่นเดียวกับสารสกัดที่ไม่ได้ผ่านความร้อน ในขณะที่สารสกัดเอธิลอะซิเตทจากผิวมะกรูดที่ผ่านความร้อนที่ 100 และ 121 องศาเซลเซียส มีค่า MIC และ MBC เพิ่มขึ้นเป็น 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 22 แสดงว่าความร้อนในระดับ 100 และ 121 องศาเซลเซียส จะทำลายกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดได้ ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ในสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดไม่สามารถทนต่อความร้อนสูงได้ แต่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารที่ผ่านความร้อนที่ระดับอุณหภูมิไม่สูงกว่า 72 องศาเซลเซียส หรือใช้กับอาหารที่ผ่านการให้ความร้อนมาแล้วหรือไม่ผ่านการให้ความร้อนเลย

ตารางที่ 22 ผลของการใช้ความร้อนต่อกิจกรรมการยับยั้ง *B. cereus* ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูด

Table 22. Effect of heat treatments on antimicrobial activities against *B. cereus* of ethyl acetate extract from kaffir lime peel.

Heat treatments	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
No heat treatment	0.56	0.56
72°C 15 min	0.56	0.56
100 °C 15 min	1.13	1.13
121°C 15 min	1.13	1.13

เมื่อนำสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ 7 ชนิดคือ *S. cerevisiae* var. *sake*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157 : H7 DMST 12743, *Salmonella* sp., *C. albicans* และ *A. fumigatus* TISTR 3180 พบว่าการยับยั้งของสารสกัดเอธิลอะซิเตตต่อ *L. monocytogenes*, *C.*

albicans ลดลงเนื่องจากค่า MBC เพิ่มขึ้นจาก 1.13 และ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 2.25 และ >2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีผลต่อการยับยั้ง *A. fumigatus* TISTR 3180 เนื่องจากค่า MIC เพิ่มขึ้นจาก 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่จะไม่มีผลต่อการยับยั้ง *S. aureus*, *B. cereus* และ *S. cerevisiae* var. *sake* ดังแสดงในตารางที่ 23 เนื่องจากความร้อนจะทำลายสารประกอบในสารสกัดเอธิลอะซิเตต ซึ่งสารประกอบที่ถูกทำลายด้วยความร้อนอาจจะมีความจำเพาะกับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบแตกต่างกันจึงส่งผลต่อกิจกรรมการยับยั้ง น้ำมันหอมระเหยของพืชที่ไม่ผ่านความร้อนหรือผ่านที่ระดับอุณหภูมิต่ำ ๆ จะยังคงมีกิจกรรมในการยับยั้งได้อยู่ (Bahk *et al*., 1990 อ้างโดย Mytle *et al*., 2006)

ตารางที่ 23 กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Table 23. Antimicrobial activity of ethyl acetate extract of kaffir lime peel treated at 72 °C for 15 min.

Microorganisms	No heat treatment		72°C 15 min	
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
S. cerevisiae var. *sake*	0.28	0.56	0.28	0.56
S. aureus	1.13	1.13	1.13	1.13
L. monocytogenes	1.13	1.13	1.13	2.25
B. cereus	0.56	0.56	0.56	0.56
E. coli O157: H7 DMST 12743	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
Salmonella sp.	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
C. albicans	2.25	2.25	2.25	>2.25
A. fumigatus TISTR 3180	1.13	2.25	2.25	2.25

3.3 ผลขององค์ประกอบในอาหารต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูด

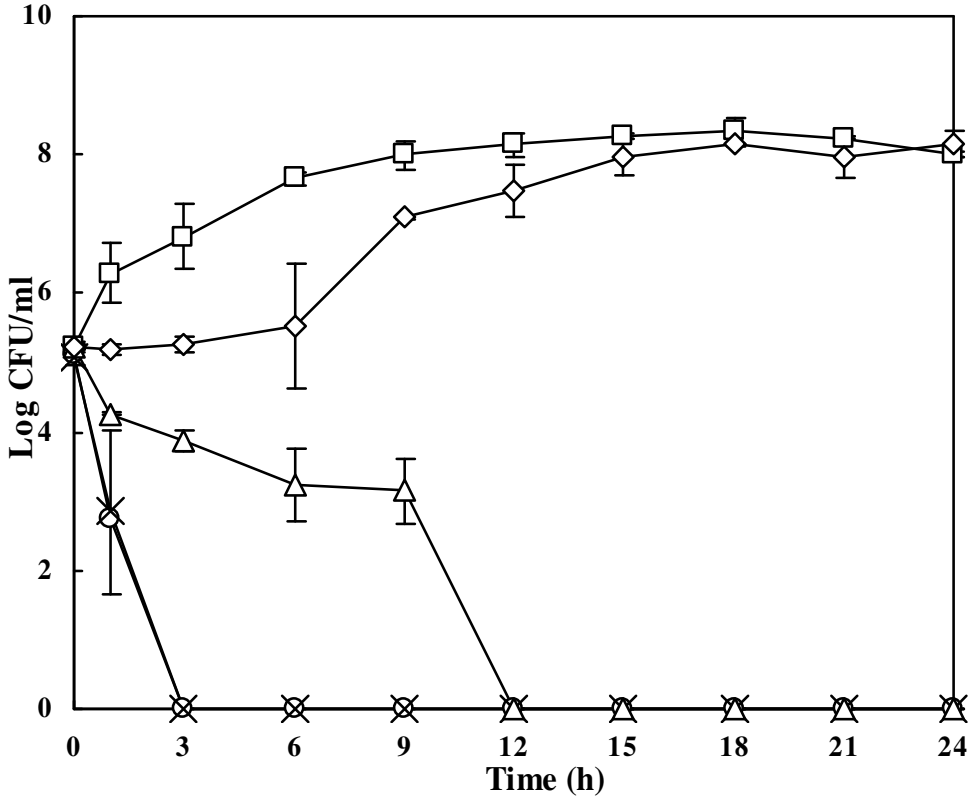
เมื่อนำสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ 8 ชนิดคือ *B. cereus*, *S. cerevisiae* var. *sake*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157 : H7 DMST 12743, *Salmonella* sp., *C. albicans* และ *A. fumigatus* TISTR 3180 ในอาหาร MHB สำหรับแบคทีเรีย หรือ อาหาร YM สำหรับยีสต์ และ PDB สำหรับรา ที่มีแป้งสาลี น้ำมันปาล์มและหางนม 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการมีน้ำมันปาล์มในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบทุกสายพันธุ์ของสารสกัดลดลง สารสกัดเอธิลอะซิเตตที่ผสมอยู่กับหางนมมีกิจกรรมการยับยั้ง *S. cerevisiae*

var. *sake* และ *L.monocytogenes* ลดลง แต่จะไม่มีผลต่อ *S. aureus*, *B. cereus*, *C. albicans* และ *A. fumigatus* TISTR 3180 ส่วนสารสกัดเอธิลอะซิเตตที่ผสมกับแป้งสาลีมีกิจกรรมการยับยั้ง *S. cerevisiae* var. *sake* ลดลงโดยมีค่า MIC เพิ่มจาก 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ชุดควบคุม) เป็น 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่จะไม่มีผลต่อ *B. cereus* และ *A. fumigatus* TISTR 3180 ดังแสดงในตารางที่ 24 ส่วนประกอบในอาหารโดยเฉพาะน้ำมันปาล์มจะมีผลต่อการลดกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดสูง เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยได้ละลายในส่วนที่เป็นชั้นไขมันของอาหาร ทำให้กิจกรรมการยับยั้งในส่วนของชั้นน้ำลดลง นอกจากนี้ไขมันยังเป็นตัวปกป้องแบคทีเรียจากปฏิกิริยาของน้ำมันหอมระเหย (Menon and Garg, 2001) สอดคล้องกับการทดลองของ Smith-Palmer และคณะ (2001) ที่พบว่าเนยแข็งซึ่งมีองค์ประกอบของไขมันสูง 30 กรัมต่อน้ำหนักทั้งหมด 100 กรัม เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งน้ำมันหอมระเหยของใบอบเชยเดือน กานพลู เปลือกอบเชย และ thyme ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเพียงน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูเท่านั้นที่สามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้ น้ำมันหอมระเหยจากพืชมีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ในเนยแข็งที่มีไขมันต่ำดีกว่าในเนยแข็งที่มีไขมันสูงเนื่องจากไขมันในเนยแข็งจะเป็นตัวดูดซับสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Holley and Patel, 2005) ดังนั้นการนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้ในอาหารที่มีองค์ประกอบของไขมันที่สูงจะต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดสูงด้วย ในส่วนของคาร์โบไฮเดรตจะมีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ไม่มากเท่ากับไขมันและโปรตีน (Mejlholm and Dalgaard, 2002 อ้างโดย Burt, 2004) องค์ประกอบในอาหารจะมีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์มากหรือน้อยนั้นก็ขึ้นกับปริมาณขององค์ประกอบในอาหารนั้น ๆ และปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ (Smith-Palmer *et al*., 2001)

4. ผลของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดต่ออัตราการรอดชีวิตของ *B. cereus*

เมื่อนำสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง *B. cereus* ที่ระดับความเข้มข้น 2.25, 1.13, 0.56 และ 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการใช้สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 2.25 และ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลด *B. cereus* จาก 5.12 และ 5.08 Log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 2.74 และ 2.85 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายในเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนการใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดจำนวน *B. cereus* จาก 5.23 Log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 3.14 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ได้ภายในเวลา 9 ชั่วโมง แต่ที่ระดับความเข้มข้น 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถลดจำนวน *B. cereus* ลงได้ ดังแสดงในภาพที่ 8 ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 2.25 และ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะไม่พบการเติบโตของ *B. cereus* หลัง 3 ชั่วโมง ในขณะที่ค่า MIC เท่ากับ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะไม่พบการเติบโตของเชื้อนี้อีกหลัง 12

ชั่วโมง จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดมีศักยภาพในการทำลายแบคทีเรียได้อย่างสมบูรณ์ กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชจะมีความจำเพาะกับเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค (Moreira *et al*., 2005)



ภาพที่ 8 การรอดชีวิตของ *B. cereus* ในอาหาร MHB ที่มี DMSO 0.23 เปอร์เซ็นต์ (□) และสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดที่ความเข้มข้น 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (◊) 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Δ) 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (×) และ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (O)

Figure 8. Survival of *B. cereus* in MHB contained DMSO 0.23 % (□) and ethyl acetate extract of kaffir lime peel at concentration 0.28 mg/ml (◊), 0.56 mg/ml (Δ), 1.13 mg/ml (×) and 2.25 mg/ml (O)

ตารางที่ 24 ผลของแป้งสาลี น้ำมันปาล์ม และหางนมต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB สำหรับแบคทีเรีย YM, สำหรับยีสต์และ PDB สำหรับรา

Table 24. Effect of wheat flour, palm oil and skim milk on antimicrobial activities of ethyl acetate extracts from kaffir lime peel in MHB for bacteria YM for yeasts and PDB for fungi.

Microorganisms	medium broth		medium broth+ wheat flour		medium broth + palm oil		medium broth+skim milk	
	MIC(mg/ml)	MBC(mg/ml)	MIC(mg/ml)	MBC(mg/ml)	MIC(mg/ml)	MBC(mg/ml)	MIC(mg/ml)	MBC(mg/ml)
B. cereus	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	1.13	0.56	0.56
S. cerevisiae var. *sake*	0.28	0.56	1.13	1.13	0.56	1.13	0.56	1.13
S. aureus	1.13	1.13	1.13	2.25	2.25	2.25	1.13	1.13
L. monocytogenes	1.13	1.13	1.13	2.25	2.25	>2.25	1.13	2.25
E. coli O157: H7 DMST 12743	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
Salmonella sp.	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25	>2.25
C. albicans	2.25	2.25	1.13	2.25	>2.25	>2.25	2.25	2.25
A.fumigatus TISTR 3180	1.13	2.25	1.13	2.25	2.25	2.25	1.13	2.25

5. เป้าหมายการทำลายเซลล์ *B. cereus* ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูด และ citronellal โดยใช้ TEM

ผลการศึกษาภาพถ่ายจาก TEM ของ *B. cereus* ก่อนและหลังเติมสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดและ citronellal ดังแสดงในภาพที่ 9 (A) พบว่าก่อนเติมสารสกัดเอธิลอะซิเตตเซลล์ *B. cereus* มีรูปร่างเป็นแท่งปกติ เซลล์แต่ละเซลล์ไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่เซลล์ที่สัมผัสกับสารสกัดเอธิลอะซิเตตที่ระดับความเข้มข้น 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป โดยพื้นผิวผนังเซลล์เกิดลักษณะที่ผิดปกติ ดังแสดงในภาพที่ 9 (B) เช่นเดียวกับเซลล์ที่สัมผัสกับ citronellal ที่ระดับความเข้มข้น 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงบริเวณผนังเซลล์เช่นเดียวกันดังแสดงในภาพที่ 9 (C) โดยผนังเซลล์เกิดรอยแตก ฉีกขาด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Cox และคณะ (2000) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากทีทรีประกอบด้วย monoterpene หลายชนิดรวมกัน เมื่อทำปฏิกิริยากับผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้เกิดการฉีกขาด ซึ่งโพแทสเซียมไอออนไหลออกมาจากเซลล์ของ *S. aureus* และ *E. coli* เกิดการยับยั้งเอนไซม์ นอกจากนี้ปฏิกิริยากลุ่มสาร terpenoids และ sesquiterpenoids สามารถทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเกิดการฉีกขาดส่งผลให้สารพวกโปรตีนและสารประกอบอื่น ๆ ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์แพร่ผ่านออกมาภายนอก แล้วสารที่มีสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก็สามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์ได้มากขึ้นหรือเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการซึมผ่านของสาร (Brehm-Stecher and Johnson, 2003) ถึงแม้ว่ากลไกในการเกิดปฏิกิริยาของน้ำมันหอมระเหยยังไม่แน่ชัด แต่ก็เชื่อว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของผนังเซลล์เกิดการฉีกขาดทำให้เกิดการรั่วไหลของเอนไซม์และสารอาหารต่าง ๆ (Singh *et al*., 2003)

6. การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxic assay) ต่อเซลล์มะเร็ง

เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูด limonene และ citronellal ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (colon cancer, HT-29) เซลล์มะเร็งช่องปาก (oral cavity cancer, KB) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer, Hela) และเซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer, MCF-7) พบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก ปากมดลูก และเต้านมได้ 100, 98.5 และ 99.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่มีผลยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ สารประกอบ limonene ไม่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด ส่วน citronellal สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ 91.44 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ ปากมดลูก และเต้านมได้ ดังแสดงในตารางที่ 25 จะสังเกตได้ว่าสารประกอบ limonene และ citronellal มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ไม่ดีเท่ากับสารสกัดเอธิลอะซิเตตซึ่งยับยั้งได้ถึง 3 ชนิด เนื่องจากสารบริสุทธิ์แต่ละสารมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน การที่สารสกัดเอธิลอะซิเตตแสดงการ

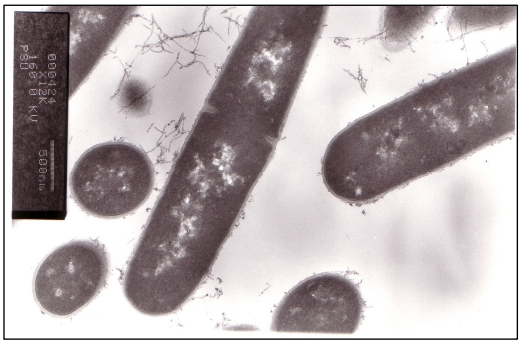
ยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก ปากมดลูก และเต้านม แต่ไม่ยับยั้งเซลล์มะเร็งสำไส้แสดงว่าสารสกัดมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งชนิดนั้น ๆ ซึ่งเหมาะที่จะพัฒนาสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดเป็นยารักษาโรคมะเร็งได้แต่ต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ผิวส้มประกอบด้วยเทอร์ปีนซึ่งเป็นแหล่งของยาแผนโบราณมีสารที่ยับยั้งปัจจัยที่ชักนำให้เกิดการพัฒนาของมะเร็งโดยจะไปยับยั้ง Epstein-Barr virus early antigen (EBV-EA) ที่ถูกชักนำโดย 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) ที่มีสมบัติต่อต้านเนื้องอก (anti-tumor promoters) (Iwase *et al*., 1999) โดยทั่วไปในการรักษาโรคมะเร็งจะใช้เคมีบำบัดซึ่งจะมีอาการข้างเคียงแต่ถ้าเราสามารถที่จะพัฒนาผิวมะกรูดเป็นยาได้ก็จะเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาได้

ตารางที่ 25 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูด limonene และ citronellal ต่อเซลล์มะเร็งสำไส้ ช่องปาก ปากมดลูก และเต้านมที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Table 25. Cytotoxicity against HT-29, KB, Hela and MCF-7 of ethyl acetate extract from kaffir lime peel, limonene and citronellal at concentration of 25 μg/ml.

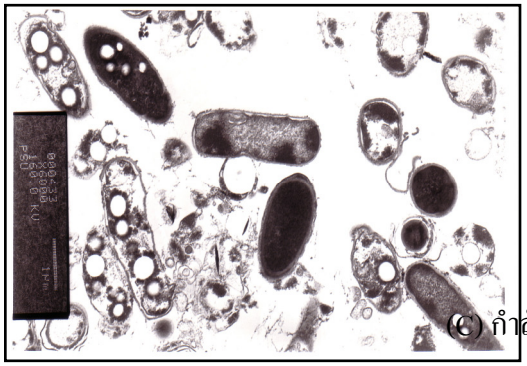
Compounds	Inhibition (%)			
	HT-29	KB	Hela	MCF-7
ethyl acetate extract	56.42	100	98.5	99.06
Limonene	-3.87	5.45	-78.78	15.28
Citronellal	18.08	91.44	78.58	53.59

1 เปอร์เซ็นต์ DMSO เซลล์ตายไม่เกิน 30 เปอร์เซ็นต์



(A) กำลังขยาย 12 k

(B) กำลังขยาย 12 k



(C) กำลังขยาย × 6000

ภาพที่ 9 ภาพถ่ายจาก TEM ของ *B. cereus* เมื่อสัมผัสกับ 0.23 เปอร์เซ็นต์ DMSO (A) สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดความเข้มข้น 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (B) สาร citronellal ความเข้มข้น 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (C) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 9 ชั่วโมง

Figure 9. TEM images of *B. cereus* after exposure to 0.25 % DMSO (A), 0.56 mg/ml of ethyl acetate extract from kaffir lime (B), and 1.13 mg/ml of citronellal (C) at 37 °C for 9 hours.