



ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยพลูต้อเชื้อยีสต์มาลาสซีเซีย พาโคเดมาติส ที่คัดแยกจากรอยโรคผิวหนังอักเสบของสุนัข

จรรีรัตน์ เอี่ยมสะอาด^{1,*} พิทยา ภาภิรมย์¹ เศรษฐ์จี้ ลิขิตฉัตรภักดี¹ และเอกชัย ทองคำ¹

¹คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

บทคัดย่อ: การติดต่อยาต้านเชื้อราของยีสต์ที่ก่อโรคผิวหนังในสุนัขเป็นปัญหาสำคัญอย่างยิ่งในคลินิก ทำให้การศึกษารายการที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์เพื่อใช้ส่งเสริมการรักษาโรคผิวหนังอักเสบเนื่องจากมาลาสซีเซียในสุนัขจึงมีความสำคัญ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยพลูต้อเชื้อยีสต์ *Malassezia pachydermatis* ที่คัดแยกจากรอยโรคผิวหนังอักเสบของสุนัข โดยวิธี broth microdilution ศึกษาฤทธิ์การทำลายเชื้อต่อหน่วยเวลาด้วยวิธี time kill test และวิเคราะห์หาสารองค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี gas chromatography/mass spectrophotometry (GC/MS) ผลการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสารองค์ประกอบหลัก คือ eugenol ในสัดส่วนร้อยละ 32.82 รองลงมาคือ eugenol acetate, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene และ p-chavicol ซึ่งพบในสัดส่วนร้อยละ 26.51, 15.85 และ 7.45 ตามลำดับ โดยน้ำมันหอมระเหยพลูต้อเชื้อยีสต์สูงในการยับยั้งและทำลายเชื้อยีสต์ *M. pachydermatis* ซึ่งมีค่า minimum inhibition concentration (MIC) เท่ากับ 0.66 µg/ml และมีค่า minimum fungicidal concentration (MFC) อยู่ในช่วง 0.66-1.32 µg/ml ฤทธิ์การทำลายเชื้อต่อหน่วยเวลาพบว่าความเข้มข้น 8 เท่าของค่า MIC มีฤทธิ์สูงสุด รองลงมาเป็นความเข้มข้น 4 เท่า ของค่า MIC ซึ่งทำลายเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 99.9 และร้อยละ 90 ที่เวลา 30 นาที ตามลำดับ โดยฤทธิ์ดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากสารที่เป็นองค์ประกอบหลักและขึ้นกับทั้งความเข้มข้นและเวลา ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยพลูต้อเชื้อยีสต์มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นตำรับยาต้านเชื้อ *M. pachydermatis* ได้ โดยต้องมีการศึกษาความเข้มข้นและรูปแบบตำรับยาที่เหมาะสม พร้อมทั้งมีการทดสอบประสิทธิภาพของตำรับยาในสัตว์ทดลองเพิ่มเติม

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาสซีเซีย ผิวหนังอักเสบในสุนัข น้ำมันหอมระเหย พลู

*ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2563. 15(1): 69-80.

E-mail address: jaraaim@kku.ac.th

The Efficacy of *Piper betle* L. (betel vine) Essential Oil against *Malassezia pachydermatis* Isolated from Skin Lesions of Canine Dermatitis

Jareerat Aiemsraad^{1,#}, Pittaya Papirom¹, Setthat Likitchatpakdee¹,
and Eakachai Thongkham¹

¹Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

Abstract: Resistance to antifungal drugs is a very important problem in the treatment of yeast infections in dogs. Therefore, it is important to study new substances to promote the treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of betel vine essential oil against *Malassezia pachydermatis* isolated from skin lesions of canine dermatitis by broth microdilution method and time kill test. The essential oil was analyzed for its chemical properties by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The GC/MS analysis revealed that eugenol was the major component of the tested betel vine essential oil (32.82%) followed by eugenol acetate (26.51%), 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene (15.85%) and p-chavicol (7.45%). The results of antifungal testing demonstrated that betel vine essential oil had high antifungal activity against all tested *M. pachydermatis* isolates, with minimum inhibition concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) values equal to 0.66 and 0.66-1.13 µg/ml, respectively. The time-kill assay showed that a concentration of 8 times the MIC had the highest activity followed by 4 times the MIC, which eradicated tested microorganisms within 30 minutes by more than 99.9% and 90%, respectively. These activities appear to be dependent on dose and time and might be affected by the chemical constituents. These results revealed that betel vine essential oil has the potential to be developed as a drug for use against *M. pachydermatis*. Further studies to determine the suitable concentration and formulation, and for *in vivo* antifungal efficacy are required.

Keywords: Anti-*Malassezia* activity, Canine dermatitis, Essential oils, *Piper betle*

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2020 15(1): 69-80.

E-mail address: jareim@kku.ac.th

บทนำ

เชื้อยีสต์มาลาสซีเซีย พาโคเดอมาติส (*Malassezia pachydermatis*) เป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดปัญหาโรคผิวหนังในสัตว์ เช่น โรคหูชั้นนอกอักเสบในสุนัข (otitis externa) นอกจากนั้นยังทำให้เกิดโรคผิวหนังอักเสบบริเวณต่างๆ ซึ่งบริเวณที่พบได้บ่อย คือ ใต้ราวนอก หน้าท้อง ขาหนีบ ใบหน้า ซอกนิ้ว และบริเวณรอยพับของผิวหนัง โดยเชื่อกันว่าเมื่อก่อโรคจะทำให้สุนัขมีอาการคัน ขนร่วง ผิวหนังเป็นปื้นแดง มีสีเข้มขึ้น มีสะเก็ดคล้ายไลเคน (lichenification) ไขมันเยิ้มและมีกลิ่นเหม็นหืน (musty seborrheic odor) (Crespo et al., 2002; Kumar et al., 2002; Cafarchia et al., 2005 Yurayart et al., 2011) การรักษาส่วนใหญ่นิยมให้ยาต้านเชื้อรา itraconazole รูปแบบรับประทานร่วมกับยาทาภายนอก เช่น ครีม ซิฟิง สเปรย์ และแชมพู โดยแชมพูเป็นรูปแบบการรักษาภายนอกที่นิยมใช้มากที่สุด ซึ่งมีวัตถุประสงค์ในการลดจำนวนเชื้อยีสต์ที่อยู่บนผิวหนังบริเวณรอยโรค โดยส่วนใหญ่มีสารออกฤทธิ์สำคัญ ได้แก่ miconazole, ketoconazole และ chlorhexidine เป็นต้น ซึ่งยาด้านเชื้อราหลายชนิดมักทำให้เกิดผลไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา อาทิ การระคายต่อผิวหนัง เกิดความเป็นพิษเมื่อสัตว์กินเข้าไปโดยไม่ตั้งใจ และอาจมีการแพ้ต่อยา เป็นต้น (Wiebe, 2015)

การดื้อต่อยาต้านเชื้อราของเชื้อราและยีสต์ที่ก่อโรคผิวหนังในสัตว์นั้น เป็นปัญหาสำคัญอย่างยิ่งในคลินิก เนื่องจากส่งผลให้การรักษาประสบความสำเร็จลดลง เกิดการติดเชื้ออย่างเรื้อรังหรือทำให้เกิดการเป็นโรคซ้ำ (recurrent) นอกจากนี้การถ่ายทอดเชื้อดื้อยาดังกล่าวจากสัตว์สู่คน ยังส่งผลให้เกิดปัญหาสำคัญในทางสาธารณสุขอีกด้วย (Nakano et al.,

2005; Fan et al., 2006; Nijima et al., 2011) จากปัญหาดังกล่าวทำให้การศึกษาหายาหรือสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ เพื่อใช้ทดแทนหรือส่งเสริมการรักษาโรคผิวหนังอักเสบเนื่องมาจากมาลาสซีเซียในสุนัขจึงมีความสำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดจากพืชสมุนไพรซึ่งมีหลายรายงานการวิจัยที่พบว่า พืชสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี และยังไม่มีรายงานการดื้อต่อสารสกัดสมุนไพรของเชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้น นอกจากนี้สารบางชนิดจากสมุนไพรยังมีฤทธิ์ในการต้านอักเสบ (Ali et al., 2015; Dagli et al., 2015) และต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Adorjan and Buchbauer, 2010; Nguyen et al., 2018)

พลู (*Piper betle*, Linn.) เป็นพืชในวงศ์พริกไทย (Piperaceae) มีชื่อสามัญในภาษาอังกฤษว่า betel vine เป็นสมุนไพรที่หาได้ง่ายในทุกภูมิภาคของประเทศไทย ส่วนใบมีกลิ่นหอมเฉพาะประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย โดยจากการศึกษาของ Row and Ho (2009) ในการศึกษาขนาดของการยับยั้ง (clear zone) ของน้ำมันหอมระเหยพลูต่อเชื้อ *M. pachydermatis* พบว่าน้ำมันหอมระเหยพลูมีฤทธิ์สูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Asawapattanakul et al. (2013) ที่หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (minimum inhibition concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อ (minimum fungicidal concentration; MFC) ของน้ำมันหอมระเหยพลู กานพลูและตะไคร้แกง ต่อเชื้อ *M. pachydermatis* ที่คัดแยกจากช่องหูที่อักเสบของสุนัข พบว่าน้ำมันหอมระเหยพลูมีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 0.03-0.5 และ 0.03-1 µl/ml ตามลำดับ นอกจากนั้นยังมีรายงานพบว่า

น้ำมันหอมระเหยพลูมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีอีกด้วย (Aiemsard et al., 2010) แต่เนื่องจากข้อมูลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยพลูในการต้านเชื้อและทำลายเชื้อ *M. pachydermatis* ที่แยกจากรอยโรคผิวหนังอักเสบของสุนัขยังมีน้อย ดังนั้นในการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยพลูในการต้านเชื้อยีสต์ *M. pachydermatis* ที่คัดแยกได้จากรอยโรคผิวหนังอักเสบของสุนัข เพื่อเป็นฐานข้อมูลงานวิจัยด้านสมุนไพร และการพัฒนาตำรับยาจากน้ำมันหอมระเหยพลูในการรักษาโรคผิวหนังอักเสบเนื่องมาจากมาลาซีเซียในสัตว์เลี้ยงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

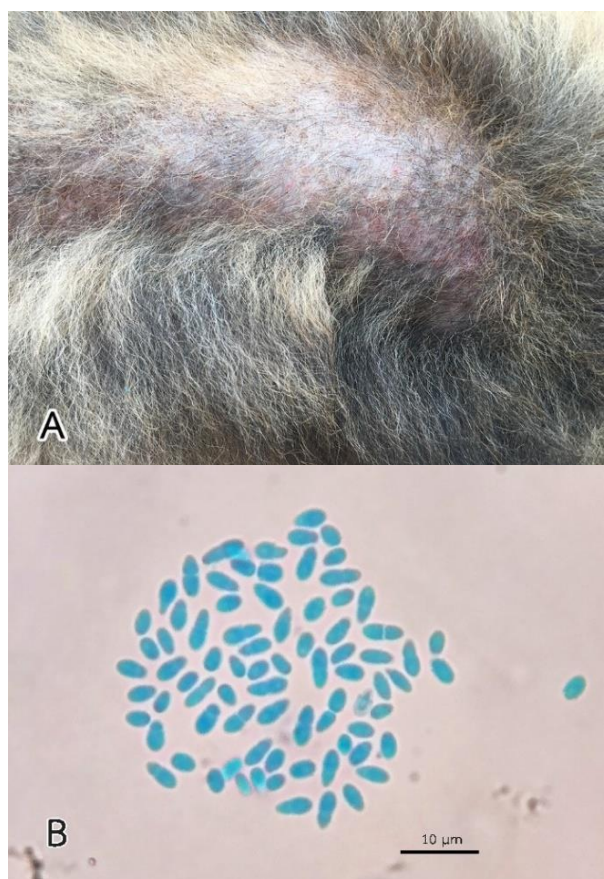
เชื้อที่ใช้สำหรับทดสอบและการเพาะเชื้อ

เชื้อยีสต์ *M. pachydermatis* ถูกคัดแยกจากผิวหนังสุนัขที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคผิวหนังอักเสบเนื่องมาจากมาลาซีเซียจากห้องปฏิบัติการพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น สุนัขที่ใช้เป็นสุนัขไม่ระบุสายพันธุ์ คณะเพศ มีอายุตั้งแต่ 2-10 ปี ซึ่งมีรอยโรคดังแสดงในภาพที่ 1A คัดแยกเชื้อโดยใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ เชื้อยีสต์จะถูกนำมาคัดแยกด้วยการเพาะในอาหาร Sabouraud's dextrose agar (SDA) (Becton Dickinson, France) ที่มียาปฏิชีวนะ chloramphenicol และ cycloheximide (Sigma Aldrich, Germany) ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และจะถูกนำมาย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue จากนั้นนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400-1,000 เท่า เชื้อยีสต์ *M. pachydermatis* จะมีรูปร่างเป็นวงรีหรือรูปไข่ และพบการแตกหน่อของเซลล์โดยทั่วไป (ภาพที่ 1B)

(ดัดแปลงจาก da Silva Nascente et al., 2009; Markey et al., 2013; Usman et al., 2013)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยพลู

น้ำมันหอมระเหยพลูที่ใช้ทดสอบจัดซื้อจาก Thai-China flavours and fragrances industry Co., Ltd., Thailand ซึ่งสกัดด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำจากใบพลูแก่จัดที่เพาะปลูกในประเทศไทย น้ำมันหอมระเหยพลูดังกล่าวจะถูกศึกษาองค์ประกอบทาง



ภาพที่ 1 รอยโรคผิวหนังอักเสบเนื่องมาจากมาลาซีเซียที่ตำแหน่งแนวสันหลังของสุนัข (A) และรูปร่างเซลล์ของเชื้อ *M. pachydermatis* ที่คัดแยกจากรอยโรคดังกล่าว เมื่อย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 1,000 เท่า (B)

เคมีด้วยเทคนิค gas chromatography (Agilent, China) / mass spectrophotometry (Agilent, USA) เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของน้ำมันหอมระเหย ด้วยคอลัมน์ DB-5ms (ขนาด 0.25 μm x 25 mm x 30 m) ซึ่งถูกเคลือบด้วย silica capillary column และใช้ Helium (He) เป็น carrier gas ด้วยอัตราเร็ว 1 mm ต่อนาที ปริมาณที่ฉีดคือ 2 μl โดยมีโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้ อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเพิ่มเป็น 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ซึ่งเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตราเร็วคือ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นเพิ่มเป็น 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 นาที ด้วยอัตราเร็ว 5 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ 44 นาที จากนั้น เปรียบเทียบกับ mass spectrum ของ Wiley 7n. MS Search ของสารมาตรฐาน และนำมาเทียบกับค่า Linear Retention Index (LRI) ที่ได้จากสาร n-alkanes (C10-C23) (Sigma Aldrich, Germany) (ดัดแปลงมาจาก Aiemsraad et al., 2010; Amelia et al., 2017)

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อยีสต์ *Malassezia pachydermatis* ของน้ำมันหอมระเหยพลู

การหาค่า MIC และ MFC ด้วยวิธี broth microdilution method ตามวิธีการที่เคยศึกษาโดย da Silva Nascente et al. (2009) ซึ่งมีการดัดแปลงเล็กน้อย ดังนี้ น้ำมันหอมระเหยพลูจะถูกนำมาละลายในตัวทำละลาย (สารละลายผสมของ 5% tween-80; Ajax Finechem Pty Ltd, Australia และ 5% ethyl alcohol; Merck, Germany) ให้ได้ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย 42.25 $\mu\text{g/ml}$ จากนั้นเติมลงใน microplate ก้นกลมชนิด 96 หลุม (Corning Incorporated, USA) ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ

Sabouraud's dextrose broth (SDB) (Becton Dickinson, France) ปริมาตร 50 μl จากนั้นทำการเจือจางแบบ two-fold dilution แล้วเติมเชื้อยีสต์ *M. pachydermatis* ที่มีความเข้มข้น 10^6 - 10^7 CFU/ml ปริมาตร 50 μl ลงไปในหลุมทดสอบ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยในหลุมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อซึ่งสังเกตได้ด้วยตาเปล่าได้ (อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะใสเนื่องจากเชื้อยีสต์ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตและได้ทำการเปรียบเทียบกับหลุมควบคุมผลลบ) ถือว่าเป็นค่า MIC จากนั้นนำไปหาค่า MFC ด้วยการถ่ายเชื้อจากทุกหลุม ซึ่งเริ่มจากหลุมที่เป็นค่า MIC ไปด้านหลุมที่มีความเข้มข้นมากกว่า ลงใน SDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหาร SDA ถือว่าเป็นค่า MFC หลุมที่เฉพาะเชื้อยีสต์และอาหารเลี้ยงเชื้อถูกใช้เป็นหลุมควบคุมผลลบ ใช้ยา ketoconazole (Sigma-Aldrich, Germany) เป็นยาต้านเชื้อรามาตรฐานในการทดลอง ทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ

การศึกษาฤทธิ์ทำลายเชื้อ *Malassezia pachydermatis* ต่อหน่วยเวลาของน้ำมันหอมระเหยพลู

ศึกษาฤทธิ์ทำลายเชื้อ *M. pachydermatis* ต่อหน่วยเวลาของน้ำมันหอมระเหยพลู ด้วยวิธี time kill test ตามการศึกษาของ Ernst et al. (2002) โดยมีการดัดแปลง ดังนี้ ผสมเชื้อยีสต์ *M. pachydermatis* ความเข้มข้น 10^6 - 10^7 CFU/ml ปริมาตร 100 μl กับน้ำมันหอมระเหยพลูปริมาตร 900 μl โดยให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันหอมระเหย เท่ากับ 1, 2, 4 และ 8 เท่าของค่า MIC (0.66,

1.32, 2.64 และ 5.28 µg/ml ตามลำดับ) พร้อมกับเริ่มจับเวลาทันที ของผสมจะถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาที่กำหนด คือ 30 นาที 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ของผสมจะถูกนำมานับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตด้วยวิธี pour plate technique (Department of medical sciences, 2014) โดยใช้อาหาร SDA

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ความแตกต่างระหว่างฤทธิ์ต้านเชื้อที่ทดสอบของน้ำมันหอมระเหยพลูกับยาต้านเชื้อรามาตรฐาน และความแตกต่างของฤทธิ์ในการทำลายเชื้อที่ทดสอบของน้ำมันหอมระเหยพลูความเข้มข้นต่างๆ ถูกวิเคราะห์โดยใช้สถิติ One-Way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS (SPSS Inc., USA; KKU license) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษา

จากการตรวจน้ำมันหอมระเหยพลูด้วยเทคนิค GC/MS เพื่อหาสารองค์ประกอบหลัก พบว่าสารองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยพลูที่ใช้

ทดสอบ คือ eugenol ซึ่งพบในสัดส่วนร้อยละ 32.82 รองลงมา คือ eugenol acetate, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene และ p-chavicol ซึ่งพบร้อยละ 26.51, 15.85 และ 7.45 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบสารองค์ประกอบอื่น ๆ ในสัดส่วนเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 1

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *M. pachydermatis* ของน้ำมันหอมระเหยพลูแสดงในตารางที่ 2 พบว่า น้ำมันหอมระเหยพลูและ ketoconazole มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบใกล้เคียงกัน โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยค่า MFC ของน้ำมันหอมระเหยพลูมีค่าเป็น 1-2 เท่าของค่า MIC เช่นเดียวกับ ketoconazole เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยพลูมาทดสอบฤทธิ์ทำลายเชื้อยีสต์ต่อหน่วยเวลาพบว่าน้ำมันหอมระเหยพลูมีฤทธิ์สูงในการทำลายเชื้อที่ทดสอบ ซึ่งความเข้มข้น 8 เท่าของค่า MIC (5.28 µg/ml) มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อได้มากที่สุด ($P<0.05$) โดยสามารถทำลายเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 99.9 (3-log reduction) ที่เวลา 30 นาที และทำลายเชื้อได้ร้อยละ 99.99 (4-log reduction)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยพลูที่วิเคราะห์ด้วยวิธี gas chromatography/mass spectrophotometry

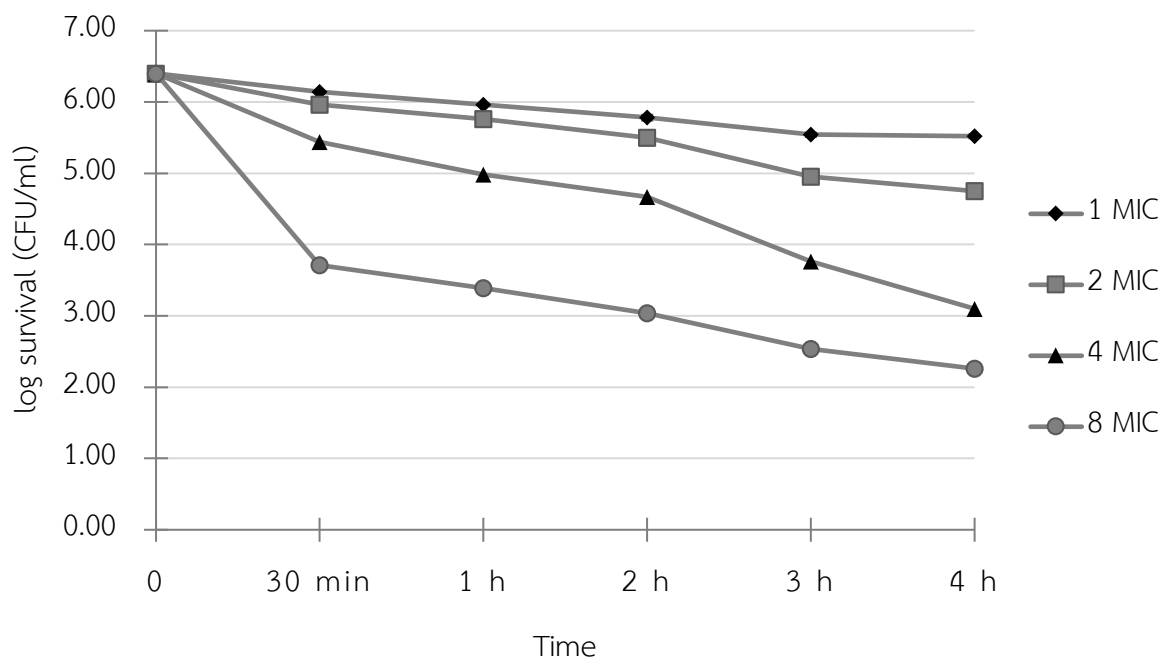
Retention time (นาที)	องค์ประกอบทางเคมี	% Area
9.57	p-chavicol	7.45
10.02	Eugenol	32.82
10.73	Trans-caryophyllene	3.79
11.40	Alpha-amorphene	4.10
11.52	Cubene	1.55
11.69	Delta-amorphene	1.92
11.92	Eugenol acetate	26.51
13.25	4-allyl-1,2-diacetoxybenzene	15.85

ที่เวลา 3 ชั่วโมง ขณะที่ความเข้มข้น 4 เท่า ของค่า MIC (2.64 µg/ml) มีฤทธิ์รบกวนมา โดยทำลายเชื้อ ได้ร้อยละ 90, 99 (2-log reduction) และ 99.99 ที่ เวลา 30 นาที, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนความ เข้มข้น 1 และ 2 เท่าของค่า MIC (0.66 และ 1.32 µg/ml) มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อใกล้เคียงกัน ($P>0.05$) โดยสามารถทำลายเชื้อได้ร้อยละ 90 ที่ เวลา 3 ชั่วโมง (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่า minimum inhibitory concentrations (MICs) และ minimum fungicidal concentrations (MFCs) ของน้ำมันหอมระเหยพลูและ ketoconazole ต่อเชื้อ *Malassezia pachydermatis* ที่คัดแยกจาก สุนัข (n=26)

สารที่ทดสอบ	ความเข้มข้น	
	MICs (µg/ml)	MFCs (µg/ml)
Betel vine oil	0.66 ^a	0.66-1.32 ^a
Ketoconazole	0.25-0.50 ^a	0.50-1.00 ^a

^aสัญลักษณ์ตัวยกที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์แสดงถึงการไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$)



ภาพที่ 2 ผลการทดสอบ time-kill test ของน้ำมันหอมระเหยพลูต่อเชื้อ *M. pachydermatis* โดยค่าที่แสดง ในแผนภาพเป็นค่าเฉลี่ยของการทดสอบ 3 ซ้ำ ของเชื้อจำนวน 12 ตัวอย่าง ซึ่งความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ ได้แก่ 1 MIC = 0.66 µg/ml, 2 MIC = 1.32 µg/ml, 4 MIC = 2.64 µg/ml และ 8 MIC = 5.28 µg/ml

วิจารณ์

จากการศึกษาองค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยพลูด้วยเทคนิค GC/MS พบว่าน้ำมันหอมระเหยพลูที่ทดสอบมีสาร eugenol ในสัดส่วนร้อยละ 32.82 สาร eugenol acetate ร้อยละ 26.51 และสาร 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene ร้อยละ 15.85 ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Aiemsard et al. (2010) และ Asawapattanakul et al. (2013) ที่รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยพลูมีสาร eugenol เป็นสารองค์ประกอบหลัก (ร้อยละ 38.7 และ 38.65 ตามลำดับรายงานการศึกษา) ในขณะที่การศึกษาของ Sugumaran et al. (2011) พบผลที่แตกต่างออกไป โดยพบว่าสาร 5-(2-propenyl)-1,3-benzodioxole เป็นสารองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยพลูมีปริมาณเท่ากับร้อยละ 25.67 รองลงมาเป็น eugenol ร้อยละ 18.27 ส่วนรายงานของ Mohottalage et al. (2007) พบว่าสาร safrole เป็นสารองค์ประกอบหลักของสารสกัดพลูมีปริมาณเท่ากับร้อยละ 52.7 และพบ eugenol ในสัดส่วนร้อยละ 6.4 ซึ่งความแตกต่างของผลการศึกษาที่ได้ของบางรายงานอาจเนื่องมาจากแหล่งที่มาของพลู ซึ่งรวมถึงสภาพภูมิประเทศ และวิธีการเพาะปลูกพลู นอกจากนี้วิธีการเก็บรักษา วิธีการสกัดและวิเคราะห์สารสำคัญ ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่อาจทำให้เกิดความแตกต่างเหล่านี้ได้ (Ravindran and Pillai, 2004)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยพลู ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. pachydermatis* ที่แยกได้จากรอยโรคผิวหนังอักเสบในสุนัข ด้วยวิธี broth microdilution method พบว่าน้ำมันหอมระเหยพลูมีประสิทธิภาพสูงในการต้านเชื้อ *M. pachydermatis* ที่ใช้ทดสอบ โดยมีค่า MIC และ MFCs อยู่ในช่วง 0.66-1.13 µg/ml ซึ่ง

รายงานการศึกษาของ Asawapattanakul et al. (2013) ที่เคยศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยพลูจากแหล่งที่มาเดียวกันกับงานวิจัยนี้ แต่ทดสอบกับเชื้อ *M. pachydermatis* ที่แยกได้จากช่องหูของสุนัข ให้ค่า MICs และ MFCs ที่แตกต่างจากผลการศึกษาปัจจุบัน โดยค่า MICs ของรายงานดังกล่าวอยู่ในช่วง 0.03-0.53 µg/ml ส่วนค่า MFCs อยู่ในช่วง 0.03- 1.07 µg/ml ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากตัวอย่างเชื้อที่เก็บมาจากตำแหน่งบนตัวของสุนัข ช่วงเวลา และสถานที่ที่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าจะเป็นน้ำมันหอมระเหยพลูที่มีแหล่งที่มาเดียวกันก็อาจทำให้ผลการทดลองแตกต่างกันได้ นอกจากนี้รายงานดังกล่าวแล้วยังมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยพลูและน้ำมันหอมระเหยที่มีสาร eugenol เป็นองค์ประกอบหลักในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ อาทิ รายงานการศึกษาของ Kaypetch and Thaweboon (2018) พบว่าน้ำมันหอมระเหยพลูมีค่า MICs ต่อเชื้อ *Candida* spp. ที่เป็นเชื้อมาตรฐานและเชื้อที่คัดแยกจากช่องปากของมนุษย์ อยู่ในช่วง 0.39-0.78 µl/ml ซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษาของงานวิจัยนี้ แต่แตกต่างเล็กน้อยกับรายงานของ Aiemsard and Punareewattana (2017) ที่ทำการศึกษาด้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยกลูต่อเชื้อราผิวหนังที่แยกจากสุนัข ได้แก่ *Trichophyton mentagrophyte*, *Microsporum canis* และ *M. gypseum* พบว่ามีค่า MICs อยู่ในช่วง 0.21-0.43, 0.21-0.43 และ 0.43-0.86 µg/ml ตามลำดับ และมีค่า MFCs เท่ากับ 0.43, 0.43 และ 0.86 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยพลูมาจากสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ eugenol ที่เป็นสารองค์ประกอบหลักที่มีสัดส่วนสูงที่สุด และอาจมาจากสาร

องค์ประกอบอื่นๆ เช่น hydroxychavicol ที่มีรายงานพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งสารทั้งสองอาจให้ผลในการต้านเชื้อร่วมกัน โดยสารดังกล่าวจะโน้มนำให้เกิดการแตกทำลายของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการเสียสมดุลในการควบคุมสารเข้าออกเซลล์ นอกจากนี้ eugenol ยังสามารถยับยั้งการสร้าง ergosterol ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อยีสต์ *Candida* spp. ได้อีกด้วย ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์ตายในที่สุด (Ali et al. 2010; Thosar et al. 2013; Mamilla et al. 2015)

จากการศึกษาฤทธิ์ทำลายเชื้อ *M. pachydermatis* ต่อหน่วยเวลาของน้ำมันหอมระเหยพลูที่ทดสอบ แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ดังกล่าวของน้ำมันหอมระเหยพลูขึ้นกับทั้งความเข้มข้นและเวลา โดยที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เท่าของค่า MIC มีค่า D-value เท่ากับ 3 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่น้ำมันหอมระเหยพลูใช้ในการทำลายเชื้อได้ร้อยละ 90 หรือ 1-log reduction ขณะที่ความเข้มข้น 4 เท่าของค่า MIC มีค่า D-value เท่ากับ 30 นาที ส่วนความเข้มข้น 8 เท่าของค่า MIC มีค่า D-value น้อยกว่า 30 นาที จากการสืบค้นรายงานการวิจัยอื่น ๆ ยังไม่พบรายงานที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาเวลาที่ใช้ในการทำลายเชื้อของน้ำมันหอมระเหยพลูต่อเชื้อ *M. pachydermatis* ที่แยกได้จากสุนัข อย่างไรก็ตามมีบางงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดหรือสารสำคัญของพลูในการทำลายเชื้อยีสต์ที่ก่อโรคชนิดอื่น ๆ ได้แก่ การศึกษาของ Ali et al. (2010) พบว่า hydroxychavicol ที่สกัดจากพลูด้วยการใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย (chloroform extraction) ความเข้มข้น 1,000 µg/ml มีค่า D-value ต่อเชื้อ *C. albicans* ATCC90028 อยู่ในช่วง 4-6 ชั่วโมง และทำลายเชื้อได้ร้อยละ 99.9 และ

99.999 (5-log reduction) ที่เวลา 8 และ 10 ชั่วโมงตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้น 2,000 µg/ml สามารถทำลายเชื้อดังกล่าวได้มากกว่าร้อยละ 99 และ 99.999 ที่เวลา 30 นาที และ 1 ชั่วโมงตามลำดับ นอกจากนี้ รายงานการศึกษาของ Ali et al. (2016) ยังพบว่าสาร hydroxychavicol ที่สกัดจากพลู ความเข้มข้น 500 และ 1,000 µg/ml สามารถทำลายเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 99 ที่เวลา 4 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ ขณะที่สามารถทำลายเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 99.99999 (7-log reduction) ที่เวลา 24 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยนี้ที่ใช้น้ำมันหอมระเหยพลูที่สกัดด้วยการกลั่นไอน้ำ ซึ่งเป็นวิธีการสกัดที่ให้น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณภาพและความแรงสูง ส่งผลที่ดีต่อการทำลายเชื้อ นอกจากนี้สารในกลุ่ม eugenol ของน้ำมันหอมระเหยมีรายงานว่า เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายเชื้อที่ดี (Park et al., 2007; Mamilla et al. 2015) ซึ่งพบเป็นปริมาณสูงในน้ำมันหอมระเหยพลูที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ และปริมาณของสารกลุ่ม chavicol ก็พบในน้ำมันหอมระเหยพลูนี้เช่นกัน ทำให้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อที่ดีกว่า อีกทั้งเชื้อที่ทำการทดสอบก็เป็นเชื้อต่างชนิดกัน จึงทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแตกต่างกันด้วยเช่นกัน

โดยสรุป น้ำมันหอมระเหยพลูที่ใช้ในการทดสอบในการศึกษานี้ ประกอบด้วยสารองค์ประกอบหลัก ได้แก่ eugenol, eugenol acetate, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene และ p-chavicol โดยน้ำมันหอมระเหยพลูมีฤทธิ์สูงในการต้านการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อยีสต์ *M. pachydermatis* ที่คัดแยกจากรอยโรคผิวหนังอักเสบในสุนัข ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวมาจากสารที่เป็นองค์ประกอบหลักและขึ้นกับทั้งความเข้มข้นและเวลาที่สารสัมผัสกับเชื้อที่

ทดสอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยพลูมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นตำรับยาสำหรับต้านเชื้อ *M. pachydermatis* ได้ โดยต้องมีการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยพลูและรูปแบบตำรับยาที่เหมาะสม พร้อมทั้งมีการทดสอบประสิทธิภาพของตำรับยาในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อดังกล่าวในสัตว์ทดลองเพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

- Adorjan, B., and G. Buchbauer. 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour. Fragr. J.* 25(6): 407-426.
- Aiemsraad, J., and K. Punareewattana. 2017. Antifungal activities of essential oils of *Syzygium aromaticum*, *Piper betle*, and *Ocimum sanctum* against clinical isolates of canine dermatophytes. *ScienceAsia.* 43(4): 223-228.
- Aiemsraad, J., S. Aiumlamai, S. Taweechaisupapong, C. Aromdee, and W. Khunkitti. 2010. Chemical composition, antioxidant activity and antibacterial action of eight essential oils against clinical isolates of mastitis pathogens. *Int. J. Essent. Oil. Ther.* 4: 37-43.
- Ali, B., N. A. Al-Wabel, S. Shams, A. Ahamad, S. A. Khan, and F. Anwar. 2015. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 5(8): 601-611.
- Ali, I., F. G. Khan, K. A. Suri, B. D. Gupta, N. K. Satti, P. Dutt, et al. 2010. *In vitro* antifungal activity of hydroxychavicol isolated from *Piper betle* L. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 9: 7.
- Ali, I., N. K. Satti, P. Dutt, and R. Prasad. 2016. Hydroxychavicol: A phytochemical targeting cutaneous fungal infections. *Sci. Rep.* 6: 37867.
- Amelia, B., E. Saepudin, A. H. Cahyana, D. U. Rahayu, A. S. Sulistyoningrum, and J. Haib. 2017. GC-MS analysis of clove (*Syzygium aromaticum*) bud essential oil from Java and Manado. *AIP. Conf. Proc.* 1862: 030082.
- Asawapattanakul, T, W. Khunkitti, R. Leesing, and J. Aiemsraad. 2013. The efficacy of essential oils against *Malassezia pachydermatis* isolated from canine otitis externa. *Isan. J. Pharm. Sci.* 9: 40-51.
- Cafarchia, C., S. Gallo, G. Capelli, and D. Otranto. 2005. Occurrence and population size of *Malassezia spp.* in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. *Mycopathologia.* 160(2): 143-149.
- Crespo, M. J., M. L. Abarca, and F. J. Cabanes. 2002. Occurrence of *Malassezia spp.* in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Med. Mycol.* 40(2): 115-121.

- da Silva Nascente, P., A. R. M. Meinerz, R. O. de Faria, L. F. D. Schuch, M. C. A. Meireles, and J. R. B. de Mello. 2009. CLSI broth microdilution method for testing susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to thiabendazole. Brazilian. J. Microbiol. 40: 222-226.
- Dagli, N., R. Dagli, R. S. Mahmoud, and K. Baroudi. 2015. Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. J. Int. Soc. Prevent. Communit. Dent. 5(5): 335-340.
- Department of medical sciences. 2014. Standard Method for Food Analysis Volume 2; DMSc F 2009 Analytical method of yeasts and molds in food by pour plate and spread plate. National Office of Buddhism publishing. Bangkok. 211 p.
- Ernst, E. J., D. J. Keele, M. E. Klepser, C. R. Petzold, and E. E. Roling. 2002. *In vitro* activity of micafungin (FK-463) against *Candida spp.*: microdilution, time-Kill, and post antifungal-effect studies. Antimicrob. Agents. Chemother. 46(12): 3846-3853.
- Fan, Y. M., W. M. Huang, S. F. Li, G. F. Wu, K. Lai, and R. Y. Chen. 2006. Granulomatous skin infection caused by *Malassezia pachydermatis* in a dog owner. Arch. Dermatol. 142(9): 1181-1184.
- Kaypetch, R., and S. Thaweboon. 2018. Antifungal property of *Piper betle* leaf oil against oral *Candida* species. MATEC. Web. Conf. 242: 01021.
- Kumar, A., K. Singh, and A. Sharma. 2002. Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and other organisms in healthy and infected dogs ears. Isr. Vet. Med. Assoc. 57(4): 145–148.
- Mamilla, R., C. Raja, V. Srinivasan, S. Selvaraj, and S. K. Mahapatra. 2015. Versatile and synergistic potential of eugenol: A review. Pharmaceutica. Analytica. Acta. 6(5): 1000367.
- Markey, B. K., F. C. Leonard, M. Archambault, A. Cullinane, and D. Maguire, editor. 2013. Clinical veterinary microbiology. 2nd ed. Elsevier, Missouri.
- Mohottalage, S., R. Tabacchi, and P. M. Guerin. 2007. Components from Sri Lankan *Piper betle* L. leaf oil and their analogues showing toxicity against the housefly, *Musca domestica*. Flavour Fragr. J. 22(2): 130-138.
- Nakano, Y., M. Wada, H. Tani, K. Sasai, and E. Baba. 2005. Effects of beta-thujaplicin on anti-*Malassezia pachydermatis* remedy for canine otitis externa. J. Vet. Med. Sci. 67(12): 1243-1247.
- Nguyen, T. N. T., T. N. N. Huynh, V. T. Tran, C. H. Dang, T. K. D. Hoang, and T. D. Nguyen. 2018. Physicochemical

- characterization and bioactivity evaluation of essential oils from *Citrus microcarpa* Bunge leaf and flower. J. Essent. Oil. Res. 30(4): 285-292.
- Nijima, M., R. Kano, M. Nagata, A. Hasegawa, and H. Kamata. 2011. An azole-resistant isolate of *Malassezia pachydermatis*. Vet. Microbiol. 149(1-2): 288-290.
- Park, M. J., K. S. Gwak, I. Yang, W. S. Choi, H. J. Jo, J. W. Chang, et al. 2007. Antifungal activities of the essential oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their constituents against various dermatophytes. J. Microbiol. 45: 460-465.
- Ravindran, P. N., and G. S. Pillai. 2004. Under-utilized herbs and spices. In: K.V. Peter, editor, Handbook of Herbs and Spices Volume 2, Woodhead Publishing, Cambridge, pp 52-607. 68-102.
- Row, L. M., and J. Ho. 2009. The antimicrobial activity, mosquito larvicidal activity, antioxidant property and tyrosinase inhibition of *Piper betle*. J. Chin. Chem. Soc. 56(3): 653-658.
- Sugumaran, M., M. Suresh Gandhi, K. Sankarnarayanan, M. Yokesh, M. Poornima, and R. Sreerama. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of vellaikodi variety of *Piper betle* Linn leaf oil against dental pathogens. Int. J. PharmTech. Res. 3(4): 2135-2139.
- Thosar, N., S. Basak, R. N. Bahadure, and M. Rajurkar. 2013. Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An *in vitro* study. Eur. J. Dent. 7(1): S071-S077.
- Usman, M. S., M. E. E. Zowalaty, K. Shameli, N. Zainuddin, M. Salama, and N. A. Ibrahim. 2013. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. Int. J. Nanomed. 8: 4467-4479.
- Wiebe, V. J., editor. 2015. Drug therapy for infectious diseases of the dog and cat. John Wiley & Sons, Iowa.
- Yurayart, C., A. Chindemporn, S. Suradhat, P. Tummaruk, S. Kajiwarra, and N. Prapasarakul. 2011. Comparative analysis of the frequency, distribution and population sizes of yeasts associated with canine seborrheic dermatitis and healthy skin. Vet. Microbiol. 148(2-4): 356-362.

