Agricultural Sci. J. 42 : 1 (Suppl.) : 421-424 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 1 (พิเศษ) : 421-424 (2554)

ผลการยับยั้งของน้ำมันหอมระเหย กานพลู โหระพา และสะระแหน่ ต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* และ *Rhizopus* sp. ในสภาพห้องปฏิบัติการ

Inhibitory Effect of Clove, Basil and Peppermint Essential Oils on Growth of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. *in vitro*

รุ่งอรุณ กันธะปา[1] เกวลิน คุณาศักดากุล[2] สุชาดา เวียรศิลป์[1,3] และ สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์[1, 3]
Rungaroon Kantapa[1], Kaewalin Kunasakdakul[2], Suchada Vearsilp[1,3] and Sa-nguansak Thanapornpoonpong[1,3]

Abstract

The aim of this study was to determine the inhibition effects of clove, basil and peppermint essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. using poisonous agar technique. Radial growths of fungi were measured after 7 days incubation on potato dextrose agar (PDA) supplemented with 500, 1000 and 1500 ppm of those essential oils. All concentrations of clove oil completely inhibited the growth of tested fungi. While basil and peppermint oils showed inhibitory effect on fungal growth with the increasing levels of concentration. The 1500 ppm of peppermint oil could completely inhibited the growth of *A. niger*. Ingeneral the results revealed that those three essential oils could effectively inhibit the growth of storage fungi and clove oil was proven to be the most effective essential oil for inhibiting those fungi.

Keywords: Essential oils, growth inhibition, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp.

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการยับยั้งของน้ำมันหอมระเหย กานพลู, โหระพา และสะระแหน่ ต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* และ *Rhizopus* sp. โดยใช้เทคนิคการทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นพิษ ซึ่งการเจริญของเชื้อราหลังจากบ่มเชื้อไว้ 7 วันบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่เติมน้ำมันหอมระเหยในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 500, 1000 และ 1500 ppm พบว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทดสอบทั้งหมดได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่น้ำมันหอมระเหยโหระพาและสะระแหน่ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทดสอบทั้งหมดได้เพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น โดยน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ ที่ 1500 ppm สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ การทดลองนี้สรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิดสามารถนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ โดยน้ำมันหอมระเหยกานพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหย การยับยั้งการเจริญเติบโต เชื้อรา *Aspergillus flavus Aspergillus niger Rhizopus* sp.

คำนำ

เชื้อรา *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. เป็นกลุ่มเชื้อราที่ทำให้เกิดความเสียหายแก่เมล็ดพืชที่เก็บรักษาในโรงเก็บมากที่สุดทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ ซึ่งสามารถเจริญอยู่บนหรือในเมล็ดพืช ส่วนเชื้อราอื่นเช่น *Rhizopus* sp. เป็นกลุ่มที่พบมากรองลงมา โดยปกติแล้วเชื้อรา *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp.จะไม่พบการเข้าทำลายเมล็ดพืชก่อนการเก็บเกี่ยว ยกเว้นในถั่วลิสงที่พบว่าเชื้อรา *A. flavus* สามารถเข้าทำลายฝักถั่วขณะยังอยู่ในดินได้ และในปัจจุบันยังพบว่าเชื้อรา *A. flavus* สามารถเข้าทำลายฝักแก่ของข้าวโพดขณะอยู่บนต้นได้เช่นเดียวกัน (สมบัติ, 2535) สำหรับการป้องกันกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพืชส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา ซึ่งการใช้สารเคมีส่งผลกระทบต่อคน สัตว์ สิ่งแวดล้อมและทำให้เชื้อราเกิดการดื้อยามากยิ่งขึ้น (Fry, 1982; Koenraadt *et al*.,1992) การนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้เป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งในการทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา สารที่ได้มาจากพืช เช่น alkaloid, glycoside, isothiocynate, volatile oil และ

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[1]Department of Plant Science and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University
[2] ภาควิชาโรคพืชและกีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[2] Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University
[3] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว / ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[3]Postharvest Technology Research Institute/ Postharvest Technology Innovation Center, Chiang Mai University

sulphide สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ และสารที่สำคัญที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีคือน้ำมันหอมระเหย (essential oils หรือ volatile oils) (Deans, 1991) ในปัจจุบันน้ำมันหอมระเหยจากพืชได้เข้ามามีส่วนในชีวิตประจำวันมากขึ้น ทั้งในด้านอาหาร ยา เครื่องสำอาง เป็นต้น ซึ่งน้ำมันหอมระเหยกำลังได้รับความนิยมในการนำมาค้นคว้าทดลองด้านต่าง ๆ เช่น การนำสารสกัดจากพืชช่วยควบคุมเชื้อรา (รณภพและคณะ, 2533) มยุรี (2549) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและอบเชยในทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และ *Bipolaris oryzae* ในข้าวได้ 98-100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยเป็นสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายและออกฤทธิ์กว้าง (Cheng *et al*., 2007) ดังนั้น ในการทดลองครั้งนี้จึงทำการทดสอบผลการยับยั้งของน้ำมันหอมระเหย กานพลู, โหระพา และสะระแหน่ ต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*, *A. niger* และ *Rhizopus* sp. ในสภาพห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้น้ำมันหอมระเหยในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรค

เตรียมเชื้อสาเหตุโรคพืชบริสุทธิ์ 3 ชนิด ได้แก่ *A. flavus*, *A. niger* และ *Rhizopus* sp. โดยวิธีการเพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์บนกระดาษชื้น (Blotter method) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้เข็มเขี่ยเขี่ยเส้นใยของเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่เจริญบนเมล็ดนำมาวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) และบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. การทดสอบผลการยังยั้งของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อราสาเหตุโรค

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) แต่ละกรรมวิธีทวนซ้ำ 5 ครั้งเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมกับน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด คือ กานพลู (clove oil: CO), โหระพา (basil oil: BO) และสะระแหน่ (peppermint oil: PO) ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ดังนี้ คือ 500, 1000 และ 1500 ppm ทำการย้ายเชื้อที่เลี้ยงไว้โดยการใช้เทคนิค hyphal tip culture ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อราหรือขอบของโคโลนีเชื้อราแต่ละชนิด นำมาวางกึ่งกลางของจานอาหาร PDA ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบการเจริญของโคโลนีเชื้อรากับชุดควบคุม คือ อาหาร PDA ที่ไม่ได้ผสมน้ำมันหอมระเหย วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราชุดควบคุมและเชื้อราชุดทดลอง หลังเลี้ยงเชื้อราไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน คำนวณเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากชุดทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ได้จากสูตร (เกษม, 2532)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{\text{(เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม – เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดทดสอบ)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดสอบผลของน้ำมันหอมระเหยกานพลู โหระพา และสะระแหน่ ที่ระดับความเข้มข้น 500, 1000 และ 1500 ppm ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus*, *A. niger* และ *Rhizopus* sp. พบว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ความเข้มข้นทุกระดับสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากกรรมวิธีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ที่ระดับความเข้มข้น 1000 และ 1500 ppm (Figure 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Barrera-Necha *et al*. (2009) ที่ทำการทดสอบเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* กับน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่ระดับความเข้มข้น 100, 150, 200, 250 และ 300 ppm และพบว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ในทุกความเข้มข้น สำหรับน้ำมันหอมระเหยโหระพา พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1500 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดคือ 74 เปอร์เซ็นต์ โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งจากการทดลองของ Soliman and Badeaa (2002) พบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพาความเข้มข้น 3000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceaus* และ *F. moniliforme* จากข้าวสาลีได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองนี้มีระดับที่ต่ำกว่า สำหรับน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ที่ระดับความเข้มข้น 1500 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด โดยเชื้อรา *A. flavus*, *A. niger* และ *Rhizopus* sp. มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง คือ 95, 100 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและสะระแหน่ที่สูงขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 3 ชนิด

เพิ่มขึ้นด้วย (Figure 1) และน้ำมันหอมระเหยกานพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสูงกว่าน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่น (Figure 2) เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยกานพลูมีสารประกอบยูจีนอลในปริมาณที่สูง 78-88 เปอร์เซ็นต์ (Marin *et al*., 2003; Yahyazadeh *et al*., 2008) ซึ่งสารประกอบยูจีนอลเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อราทำให้เชื้อราตาย (Trotel *et al*., 2006) โดยที่น้ำมันหอมระเหยโหระพามีสารประกอบยูจีนอล 9.1 เปอร์เซ็นต์ (Lee *et al*., 2005) น้ำมันหอมระเหยสะระแหน่มีสารประกอบเมนทอลเป็นสารประกอบหลัก 44-58 เปอร์เซ็นต์ ไม่มียูจีนอลเป็นสารประกอบ (Orav and Kann, 2001)

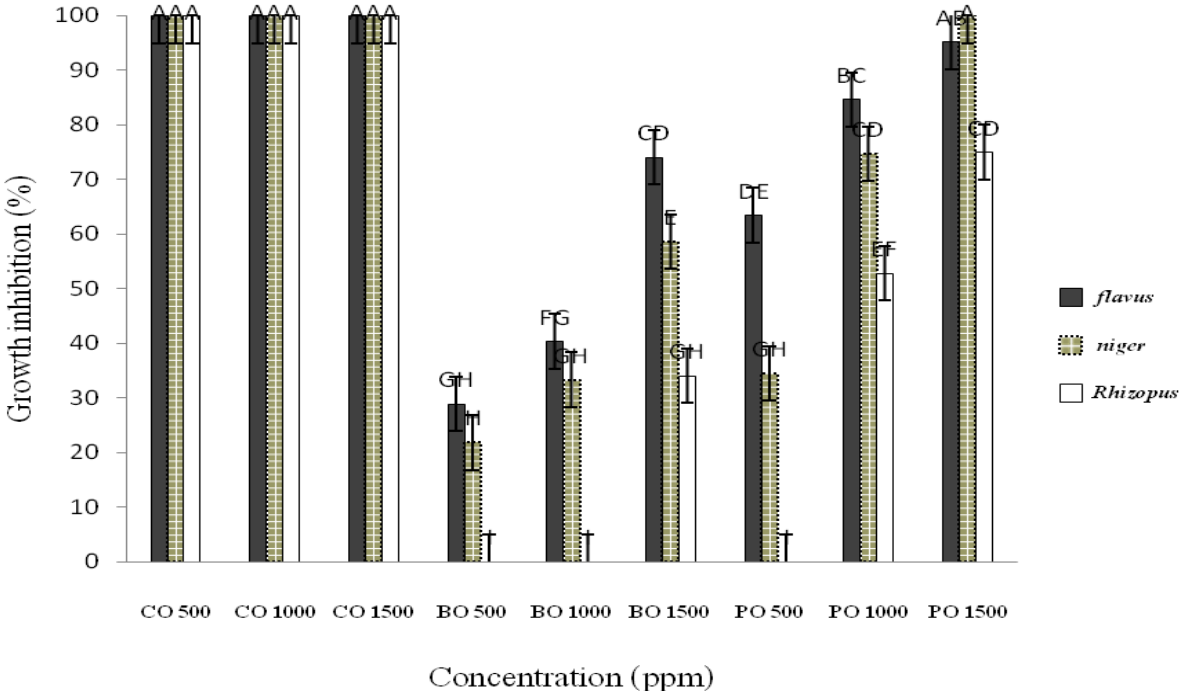

Figure 1 Percentage of growth inhibition of *A. flavus*, *A. niger* and *Rhizopus* sp. after treated with different concentrations of clove, basil and peppermint oil

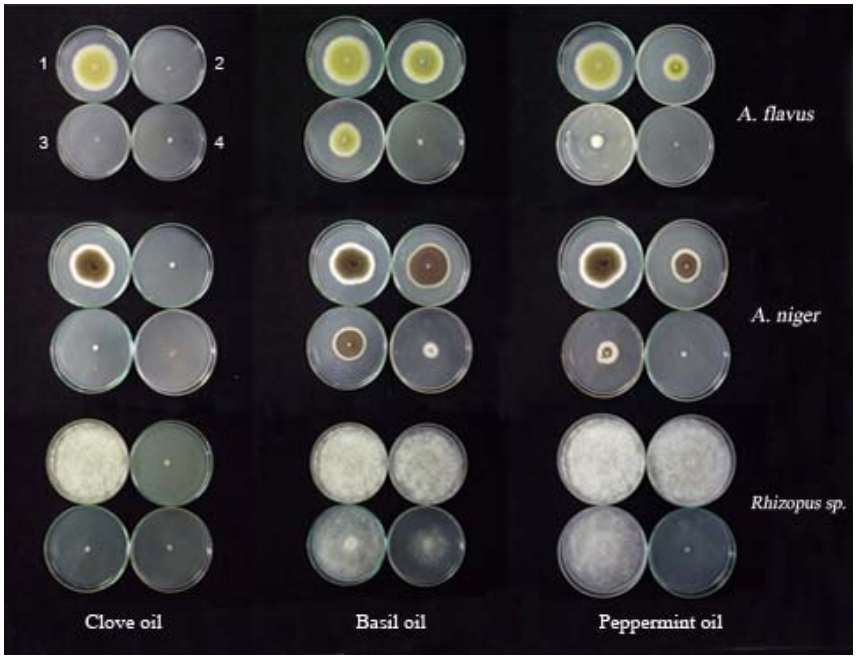

Figure 2 Inhibitory effect of clove, basil and peppermint oil at various concentrations: (1) 0 (2) 500 (3) 1000 and (4)1500 ppm on growth of *A. flavus*, *A. niger* and *Rhizopus* sp. after incubation for 7 days.

สรุปผลการทดลอง

น้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่น้ำมันหอมระเหยโหระพาและสะระแหน่ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้เพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น โดยพบว่าต้องเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยสะระแหน่ ถึง 1500 ppm จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. niger* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณน้ำมันหอมระเหยโหระพาที่ใช้ในการทดลองยังต่ำเกินไปทำให้ยังไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว/ ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนอุปกรณ์ในการทำวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2532. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 326 น.

มยุรี ปละอุด. 2549. ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 163 น.

รณภพ บรรเจิดเชิดชู, จิระเดช แจ่มสว่าง, ปราณี อัมเมอลิ้งค์ และจินตนา ชะนะ. 2533. สารพิษจากเชื้อราและการป้องกันกำจัดในข้าวโพดและธัญพืชอื่น ๆ: การใช้สารสกัดจากพืชควบคุมเชื้อ *Aspergillus flavus* และอะฟลาทอกซินในข้าวโพด. รายงานค้นคว้าวิจัยประจำปี 2553 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ. 247 น.

สมบัติ ศรีชูวงศ์. 2535. โรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 127 น.

Barrera-Necha, L.L., C. Garduno-Pizana and L.J. Garcia-Barrera. 2009. *In vitro* antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. *Plant Pathology* 8(1): 17-21.

Cheng, S.S., J.Y. Liu, E.H. Chang and S.T. Chang. 2007. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology* 99: 5145-5149.

Deans, S.G. 1991. Evaluation of antimicrobial activity of essential (volatile) oils. *In* : H.F. Linskens and J.F. Jackson (Ed.) Essential oils and waxes. 33p.

Fry, W.E. 1982. Principles of plant disease management. Academic Press, New York. 377p.

Koenraadt, H., S.C. Somerville and A.L. Jones. 1992. Characterization of mutation in the beta-tubulin gene of benomyl-resistance field strain of *Venturia inaequalis* and other plant pathology fungi. *Phytopathology* 82: 1348-1354.

Lee S. J., K. Umano, T. Shibamoto and K. G. Lee. 2005 Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. Food Chemistry 91: 131-137.

Marin, S., A. Velluti, A. J. Ramos and V. Sanchis. 2003. Effect of essential oils on zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* in non-sterilized maize grain. *Food Microbiology* 21: 313-318.

Orav, A. and J. Kann. 2001. Determination of peppermint and orange aroma compounds in food and beverages. *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.* 50(4): 217-225.

Soliman, K. M. and R. I. Badeaa. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology* 40: 1669-1675.

Trotel, A. P., M. Couderchet, G. Vernet and A. Aziz. 2006. Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 114: 405-413.

Yahyazadeh, M., R. Omidbaigi, R. Zare and H. Taheri. 2008. Effect of Some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *Microbiotechnology* 24: 1445-1450.