

รายงานวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตต่อ
แบคทีเรียบางชนิด ของสารสกัดจากใบพลู

พิมลวรรณ ทัญญูพิจารณ์* ขวัญฤดี เดชาติวงศ์ ณ ออยุธยา* พิมพ์ พงษ์เพชร**
และ อมรรัตน์ ลีลาภรณ์**

*ภาควิชาเภสัชวิทยา และ **ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF PIPER BETLE LEAF

Pimolwan Tappayuthpijarn*, Quanrudi Dejatiwongse Na Ayudhya*,
Pintip Pongpetch** and Amornrat Leelaporn**

**Department of Pharmacology and **Department of Microbiology,
Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700,
Thailand,*

SUMMARY

Piper betle (L.) leaves were extracted employing the Soxhlet method. The crude extract samples obtained were: volatile oil, petroleum ether extract, ether extract, absolute alcohol and distilled water extracts. Each of these crude extract samples was tested for their inhibitory effects on the growth of 3 species of bacteria isolated from the outpatients who attended Outpatient Department at Siriraj Hospital Medical School from April 1982 to August 1982. The 3 species tested were *Staphylococcus aureus* (122 strains), *Escherichia coli* (31 strains) and *Pseudomonas aeruginosa* (57 strains). The results showed that *S. aureus* was the most sensitive microorganism to all extracts, while *E. coli* and *Ps. aeruginosa* showed similar response but somewhat less sensitive.

Among various extracts obtained from Piper betle leaves, volatile oil exhibited the highest inhibitory effect on the growth of the 3 species of bacteria tested; i.e., its MIC₉₀ against *S. aureus* was 1.7 µg/ml. Ether and petroleum ether extracts showed less potent activity having MIC₉₀ against *S. aureus* of 0.151 and 0.2 mg/ml., respectively. The antibacterial activity was found to be lowest in the water extract fraction.

พลู (Piper betle, Linn) เป็นพืชที่รู้จักกันดี และสามารถปลูกได้ทั่วไป สรรพคุณทางยาแต่เดิมเท่าที่ทราบส่วนใหญ่ ใช้รักษาโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร อาทิเช่น ปวดท้อง ท้องอืด (1,2) เมื่อไม่นานมานี้มีผู้รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบพลูมีฤทธิ์ลดการอักเสบทำลายแบคทีเรีย และใช้รักษาการอักเสบของเยื่อจมูก และ คอ (3) และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Mycobacterium tuberculosis ในหลอดทดลองที่ความเข้มข้นเพียง 1 : 5,000 ได้ (4) พรสวรรค์ ดิษยบุตร และคณะ ได้ศึกษาสารสกัดเบื้องต้นจากพืชหลายชนิดโดยใช้ตัวละลายหลายอย่าง ได้พบว่า สารสกัดจากใบพลูมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน (Standard strain) ได้หลายชนิด (Species) โดยเฉพาะสารที่ได้จากการสกัดด้วยอีเธอร์ (5) แต่ในรายงานของ พรสวรรค์ ดิษยบุตร และคณะ ใช้วิธี Disc diffusion และจำนวนของแบคทีเรียที่ใช้แต่ละชนิด ก็ใช้เพียงชนิดละหนึ่งสายพันธุ์เท่านั้น และใช้เฉพาะสายพันธุ์มาตรฐาน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้เพื่อให้ได้ผลละเอียดยิ่งขึ้น ผู้รายงานจึงได้ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพลูโดยใช้ตัวทำละลายเช่นเดียวกับที่รายงานของพรสวรรค์ ดิษยบุตร และคณะต่อแบคทีเรียก่อโรคที่แยกได้บ่อยจากผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลศิริราช ได้แก่ Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa และ Escherichia coli โดยวิธี Agar dilution ซึ่งได้ผลออกมาเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (MIC)

วัสดุและวิธีการ

แบคทีเรีย

เชื้อที่ใช้ในการศึกษา แยกได้จากตัวอย่างส่งตรวจจากผู้ป่วยที่มารับการักษาที่โรงพยาบาลศิริราชระหว่างเดือน เมษายน 2525-สิงหาคม 2525 รวม 210 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้เป็น Staphylococcus aureus 122 สายพันธุ์ Escherichia coli 31 สายพันธุ์ และ Pseudomonas aeruginosa 57 สายพันธุ์

การเตรียมสารสกัดจากใบพลู

นำใบพลูสด (2 กิโลกรัม) ที่อบแห้งแล้วที่อุณหภูมิ 50° ซ. จำนวน 580 กรัม มาบดละเอียด สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ใน Soxhlet apparatus จากใบพลูที่เหลือสกัดด้วยอีเธอร์ แล้วสกัดต่อโดยหมักด้วย แอลกอฮอล์ และน้ำตามลำดับ การสกัดกระทำที่อุณหภูมิ 50°ซ. เป็นเวลา 24 ช.ม. นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมาทำให้แห้งด้วย เครื่องมือ Rotary vacuum evaporator (Buchi) ที่อุณหภูมิ 50°ซ. ผลสุดท้ายได้สารสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์, อีเธอร์, แอลกอฮอล์ และน้ำ 23.32, 25.13, 20.3 และ 63.8 กรัมตามลำดับ

สกัดน้ำมันหอมระเหยโดยใช้ใบพลูสด (6 กก.) กลั่นด้วยไอน้ำ จากนั้นแยกส่วนที่เป็นน้ำมัน (6 มล.) ออกจากน้ำโดยตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นที่อุณหภูมิ 4°ซ.

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

หาระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบพลูต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อ (MIC) โดยวิธีเจือจางในอาหารวุ้น (Agar-dilution method) ตามวิธีของ Washington และ Sutter (6) เตรียมอาหารวุ้น (Mueller-Hinton Agar, Difco) ในวันทดลอง ผสมสารที่ได้จากการสกัดที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิดลงในอาหารวุ้นที่อุณหภูมิ 55 °ซ. ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 32, 16, ---- 0.03 และ 0.015 มก./มล. ตามลำดับ สำหรับน้ำมันหอมระเหยมีหน่วยความเข้มข้น เป็น ไมโครลิตร/มล.

การเตรียมเชื้อ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่จะทดสอบความไว รวมทั้งเชื้อ Staph. aureus (ATCC 25923) ซึ่งเป็นตัวควบคุมมาตรฐานการทดลองในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) 3 มล. เป็นเวลานาน 18 ช.ม. เจือจางเชื้อด้วย MHB แล้วหยดเชื้อที่เจือจางแล้วลงบนอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ ด้วย Multipoint inoculator ให้มีความเข้มข้นของเชื้อแต่ละจุด 10^{-4} CFU นำ plate ที่ลงเชื้อแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 18 ช.ม.

บันทึกผลความเข้มข้นของสารสกัดจากใบพลูต่ำสุดที่สามารถหยุดยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อได้หมด หรือยังมีเชื้อขึ้นได้ไม่เกิน 1 CFU

ผลการทดลอง

จากการทดลองหาค่า MIC ของสารสกัดจากใบพลูพบว่า สารสกัดใบพลูด้วยอีเทอร์ เลียมอีเธอร์ มีฤทธิ์หยุดยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ S. aureus, E. coli และ Ps. aeruginosa ได้ร้อยละ 90 (MIC_{90}) ที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 0.88 และ 1.54 มก./มล. ตามลำดับ สารสกัดใบพลูด้วยอีเธอร์มีค่า MIC_{90} ต่อเชื้อ S. aureus, E. coli และ Ps. aeruginosa 0.151, 0.423 และ 0.413 มก./มล. สารสกัดใบพลูด้วยแอลกอฮอล์มีค่า MIC_{90} สำหรับ S. aureus, E. coli และ Ps. aeruginosa เท่ากับ 6.31, 17.58 และ 13.54 มก./มล. สารสกัดใบพลูด้วยน้ำมันมีค่า MIC_{90} สำหรับ S. aureus, E. coli และ Ps. aeruginosa เป็น 11.99, 15.38 และ 14.77 มก./มล. ตามลำดับ น้ำมันหอมระเหยมีค่า MIC_{90} สำหรับเชื้อทั้ง 3 เป็น 1.5, 25.85 และ 32 ไมโครลิตร/มล. หรือ 0.0017, 0.029 และ 0.036 มก./มล. เมื่อเปรียบเทียบเป็นน้ำหนัก ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1-4 และ รูปที่ 1 ตัวทำละลายที่ใช้สกัดทุกชนิดไม่มีผลต้านเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นผลที่ได้จึงเป็นผลของสารที่สกัดได้ ปริมาณของสารสกัดแต่ละส่วนที่ MIC_{90} ต่อเชื้อ S. aureus เทียบเป็นปริมาณใบพลูสดแสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 1 จำนวนสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดต่างๆ จากใบพลูในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน

ชนิดสารสกัด	จำนวนสายพันธุ์	ร้อยละของจำนวนเชื้อซึ่งถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นต่างๆ (มก./มล.)
		.015 .03 .06 .125 .25 .5 1 2 4 8 16 32
ปิโตรเลียมอีเธอร์	122	- 0.8 15 67 100
อีเธอร์	122	0.8 19 57 85 100
แอลกอฮอล์	122	- - - - - - - 13 67 99 100
น้ำ	115	- - - - - - - 13 45 79 99 100
น้ำมันหอมระเหย *	52	- - - - 2 13 71 98 100

* ความเข้มข้นมีหน่วยเป็นไมโครลิตร/มล.

ตารางที่ 2 จำนวนสายพันธุ์ของ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดต่างๆ จากใบพลูในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน

ชนิดสารสกัด	จำนวนสายพันธุ์	ร้อยละของจำนวนเชื้อซึ่งถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นต่างๆ (มก./มล.)
		.015 .03 .06 .125 .25 .5 1 2 4 8 16 32
ปิโตรเลียมอีเธอร์	31	- - - - 3 51 96 100
อีเธอร์	31	- - 3 16 38 100
แอลกอฮอล์	31	- - - - - - - 3 61 87 100
น้ำ	31	- - - - - - - 13 96 100
น้ำมันหอมระเหย *	31	- - - - - - - 32 87 96

* ความเข้มข้นมีหน่วยเป็นไมโครลิตร/มล.

ตารางที่ 3 จำนวนสายพันธุ์ของ *Ps. aeruginosa* ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดต่างๆ จากใบพลูในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน

ชนิดสารสกัด	จำนวนสายพันธุ์	ร้อยละของจำนวนเชื้อซึ่งถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นต่างๆ (มก./มล.)
		.125 .25 .5 1 2 4 8 16 32
ปิโตรเลียมอีเธอร์	57	- 14 58 63 100
อีเธอร์	57	31 58 100
แอลกอฮอล์	57	- - - - - 47 100
น้ำ	57	- - - - - 2 100
น้ำมันหอมระเหย *	57	- - - - - 12 40 59 75

* ความเข้มข้นมีหน่วยเป็นไมโครลิตร/มล.

ตารางที่ 4 จำนวนสายพันธุ์ของเชื้อต่างๆ ที่ถูกยับยั้งด้วยน้ำมันหอมระเหยจากใบพลูในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน

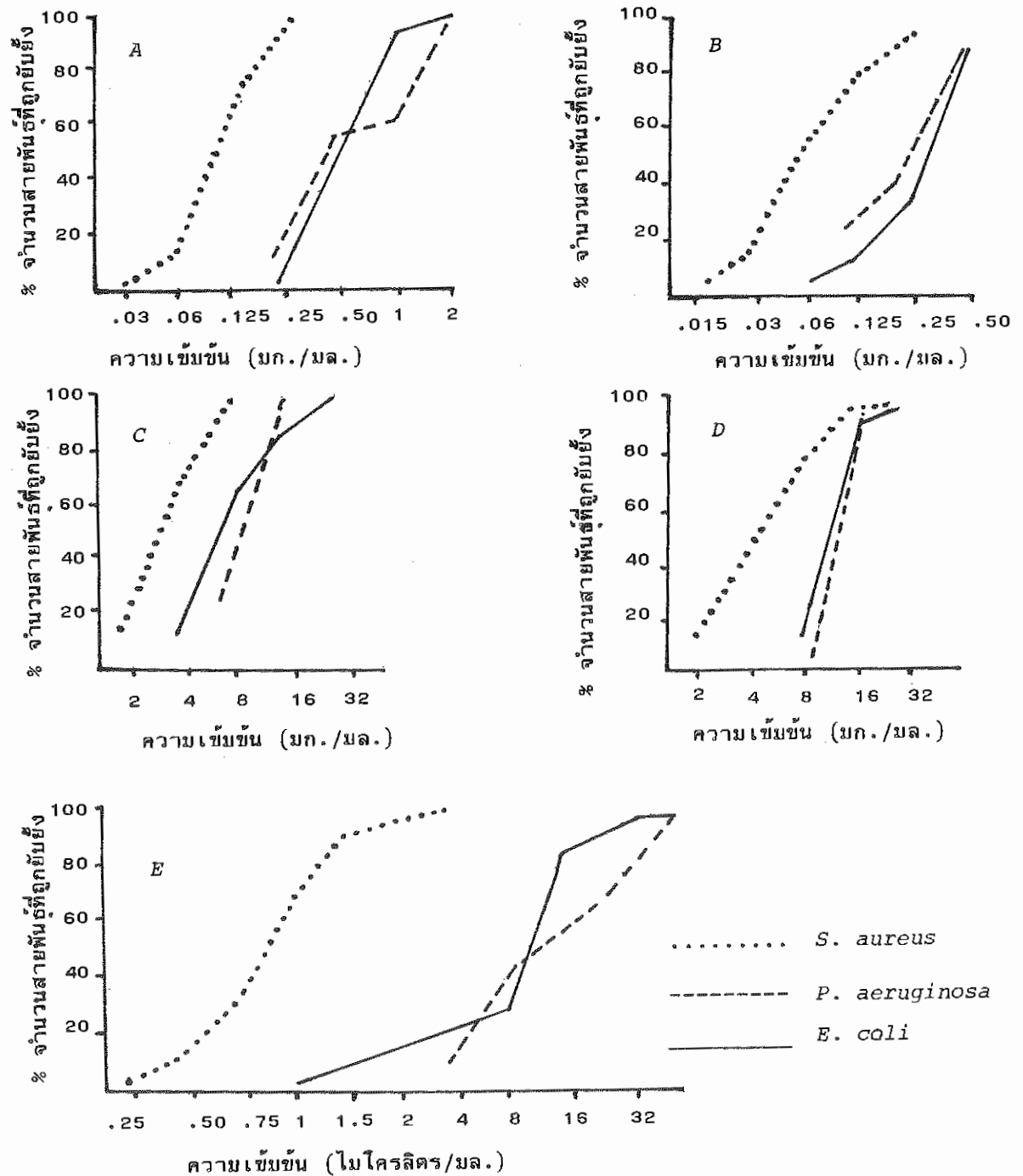
แบคทีเรีย	จำนวนสายพันธุ์	ร้อยละของจำนวนสายพันธุ์	เชื้อซึ่งถูกยับยั้ง	ที่ความเข้มข้นต่างๆ (มก./มล.)					
		.00028	.00057	.00113	.0023	.0045	.009	.018	.036
<i>S. aureus</i>	52	2	13	71	98	100			
<i>E. coli</i>	31	-	-	-	-	-	32	87	96
<i>Ps. aeruginosa</i>	57	-	-	-	-	12	40	59	75

ตารางที่ 5 ปริมาณของสารสกัดแต่ละส่วนที่ MIC₉₀ ต่อเชื้อ *S. aureus* เทียบเป็นปริมาณใบพลูสด

สารสกัดด้วยตัวทำละลาย	MIC ₉₀ (มก./มล.)	เทียบกับปริมาณใบพลูสด (กรัม)
ปิโตรเลียมอีเธอร์	0.2	0.005
อีเธอร์	0.154	0.0036
แอลกอฮอล์	6.31	0.18
น้ำ	11.99	0.109
น้ำมันหอมระเหย	0.0017	1.5

วิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงว่า น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดีโดยเฉพาะต่อ *S. aureus* และ *E. coli* แต่ผลต่อ *Ps. aeruginosa* นั้นมีค่า MIC₉₀ เกินกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง คือมากกว่า 32 ไมโครลิตร/มล. หรือมากกว่า 0.036 มก./มล. โดยน้ำหนัก การศึกษาครั้งต่อไปควรเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้นเพื่อหาค่าฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยต่อ *Ps. aeruginosa* เป็นอย่างไร ได้มีการศึกษาถึงส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหย



รูปที่ 1

เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus*, *Ps. aeruginosa* และ *E. coli* ด้วยสารสกัดจากใบพลูด้วยวิธีแผ่นยัด (A), วิธีหลอด (B), แอลกอฮอล์ (C), น้ำ (D) และ น้ำมันหอมระเหย (E)

จากใบพลูพบว่า มีสารหลายอย่างได้แก่ Chavicol, Allyl pyrocatechol, Chavibetol, Methyl chavicol, Carvacrol, Estragol, Eugenol methyl ether, 1, 8 - Cineol, Eugenol และ Caryophyllene และ Cadinene โดยที่ Chavicol มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (8) ส่วนสารพวก Eugenol มีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ (9)

สำหรับสารสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ และอีเธอร์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ทั้ง 3 ชนิด สารสกัดด้วยอีเธอร์ให้ผลดีกว่าสารสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ ต่อ E. coli และ Ps. aeruginosa แต่ผลต่อ S. aureus ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้สารสกัดเหล่านี้เป็นสารสกัดชั้นต้น ย่อมจะมีสารอื่นซึ่งไม่มีฤทธิ์เจือปนมาด้วยไม่มากนัก โอกาสที่จะปนในสารสกัดจากปิโตรเลียมอีเธอร์ มีมากกว่าเนื่องจากใช้เป็นตัวทำละลายครั้งแรก ดังนั้นในน้ำหนักของสารสกัด (Crude weight) ที่เท่ากัน สารออกฤทธิ์ซึ่งอาจจะเป็นสารตัวเดียวกันในส่วนสกัดทั้งสอง จะมีอยู่ในสารสกัดด้วยอีเธอร์ มากกว่าด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ หรืออาจเป็นได้ว่า อีเธอร์สามารถสกัดเอาสารที่ออกฤทธิ์ซึ่งปิโตรเลียมอีเธอร์สกัดไม่ได้หรือได้น้อยออกมาจึงทำให้สารสกัดด้วยอีเธอร์มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีกว่า การศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในใบพลูซึ่งสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ และอีเธอร์เท่าที่ทราบยังไม่มีรายงาน จึงไม่ทราบว่ามีการออกฤทธิ์ที่ชนิด อย่างไรก็ดีมีรายงานว่าสารชนิดหนึ่งที่แยกได้จากการสกัดผล P. longum และ P. peepoloides ด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ คือ Isobutylamide ($C_{14}H_{25}NO$) มีฤทธิ์ต่อต้าน Tubercle bacilli แต่ฤทธิ์นั้นอ่อนกว่า Streptomycin(a) ถึงแม้ว่าไม่มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิดอื่น สารนี้ก็อาจมีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียที่ใช้ทดลองได้ การศึกษาเกี่ยวกับส่วนประกอบและฤทธิ์ของสารสกัดโดยละเอียดต่อไปจะช่วยให้เข้าใจดีขึ้น

เมื่อนำกากใบพลูที่เหลือมาสกัดด้วยแอลกอฮอล์และน้ำตามลำดับ พบว่า สารสกัดสามารถต่อต้านแบคทีเรียทั้ง 3 ได้ด้วยค่า MIC₉₀ ที่ใกล้เคียงกัน แต่ในความเข้มข้นสูงกว่าสารสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์และอีเธอร์ ทั้งนี้อาจเป็นได้ว่า 1) เป็นฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์เช่นเดียวกับที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ และ อีเธอร์ซึ่งสกัดได้ไม่หมด และสารนี้จะละลายได้ในแอลกอฮอล์และน้ำ แต่เนื่องจากปริมาณเหลือน้อยรวมกับมีสารเจือปนที่ละลายได้ดีในน้ำและแอลกอฮอล์จึงทำให้ได้ผลไม่ดีเท่า 2) อาจเป็นสารออกฤทธิ์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถละลายได้เฉพาะในแอลกอฮอล์ และน้ำ และมีฤทธิ์อ่อนกว่า

จากผลการศึกษาพอสรุปได้ว่า สารสกัดใบพลูโดยเฉพาะน้ำมันหอมระเหย และสารที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ และอีเธอร์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ดีมาก แต่สารสกัดจากแอลกอฮอล์ และน้ำมีฤทธิ์อ่อน น้ำมันหอมระเหยนอกจากจะมีฤทธิ์ที่ดีที่สุด (เมื่อเทียบตามน้ำหนัก) แล้วยังเสียค่าใช้จ่ายในการเตรียมน้อยอีกด้วย อย่างไรก็ตามยังมีปัญหาอีกหลายประการที่ควรจะต้องศึกษาเพิ่มเติมตลอดจนถึงความปลอดภัยในการใช้ และที่สำคัญผู้รายงานหวังว่าการศึกษานี้คงจะเป็นประโยชน์หรือกระตุ้นให้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เกี่ยวกับคุณสมบัติต่อต้านแบคทีเรียของสารที่มีอยู่ในพืชอื่นๆ อีกหลายชนิดในบ้านเรา

เอกสารอ้างอิง

1. เสงี่ยม พงษ์บุรุษรอด . ไม้เทศเมืองไทย หน้า 369, โรงพิมพ์เกษมบรรณกิจ กรุงเทพฯ พ.ศ. 2519
2. พยอม ดันดีวัฒน์ . สมุนไพร หน้า 121, สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ พ.ศ. 2521
3. Perry, L.M. Medicinal Plants of East and Southeast Asia. pp.312-313, The MIT Press, London, 1980.
4. Gupta, K.C. and Viswanathan, R. Antituberculosis substances from plants. Antibiotics and Chemotherapy 6 : 194-195, 1956.
5. พรสวรรค์ ดิศยุบุตร, พยอม ดันดีวัฒน์ และวิเชียร จีรวงส์. การศึกษาคูสมบัติทางฆ่าเชื้อโรคของสมุนไพรไทยบางชนิด การเสนอผลงานค้นคว้าทางวิชาการสมุนไพร ครั้งที่ 1 หน้า 22-44, สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2520.
6. Washington II, J.A. and Sutter, V.L. Dilution susceptibility test : agar and macro-broth dilution procedures. In: Manual of Clinical Microbiology, 3rd edition, American Society for Microbiology, Washington D.C. 1980.
7. Ericsson, H.M. and Sherris, J.C. Antibiotic sensitivity testing : report of an international collaborative study. Acta Pathol. Microbiol. Scand. B. Suppl. 217 : 1-90, 1971.
8. Atal C.K., Dhar, K.L. and Singh, J. The chemistry of Indian Piper species. Lloydia 38 : 256-262, 1975.
9. Boonchiard, Chuenchit. : In Vitro and In Vivo Studies on Antifungal Activity of Eugenol and Vanillin against Candida albicans and Cryptococcus neoformans. In Thesis Submitted for the Degree of Master of Science (Microbiology) Mahidol University, 1981.