

ประสิทธิภาพของสารสกัดใ้บกระท้อมต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli* ในเนื้อไก่

กมลพรรณ เจือกไว้น^{1*} พีรวัจน์ ชูเพ็ง¹ และนัสวัล บุญวงศ์¹

¹สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี รหัสไปรษณีย์ 84100

*Corresponding author: kamonpun.oum@gmail.com

(Received: December 18, 2023; Revised: February 26, 2024; Accepted: April 19, 2024)

บทคัดย่อ

กระท้อมเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีการใช้ทั่วไปในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย ปัจจุบันมีการนำใ้บกระท้อมมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์เนื่องจากมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสารและฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) และ *Escherichia coli* (*E. coli*) ด้วยวิธี Agar well diffusion และต่อคุณภาพเนื้อไก่สด ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากใ้บพืชกระท้อมด้วยเอทานอลสามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. typhimurium* และ *E. coli* ได้ มีประสิทธิภาพมากกว่าการสกัดใ้บพืชกระท้อมด้วยน้ำ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดกระท้อมด้วยเอทานอลในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* และ *E. coli* เท่ากับ 200 mg/mL ผลการใช้สารสกัดใ้บพืชกระท้อมด้วยเอทานอลในเนื้อสัตว์ต่อค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้มและจำนวนเชื้อแบคทีเรียรวมในเนื้อไก่ พบว่า สารสกัดใ้บพืชกระท้อมด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในเนื้อไก่ ชะลอการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในเนื้อไก่ และลดเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้มได้

คำสำคัญ: กระท้อม; ซัลโมเนลล่า; อีโคไล; คุณภาพเนื้อ

Efficacy of Kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.) Leaf on Inhibition of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in Chicken Meat

Kamonpun Chuekwon^{1*}, Peerawat Choopeng¹ and Nusawan Boonwong¹

¹Animal Science Program, Faculty of Science and Technology, Surattthani Rajabhat University Surattthani, 84100, Thailand

*Corresponding author: kamonpun.oum@gmail.com

(Received: December 18, 2023; Revised: February 26, 2024; Accepted: April 19, 2024)

Abstract

Kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.) is an indigenous herbal plant in the South of Thailand. In current, Kratom leaf has been used medical benefits from many pharmacological effects. In this research aimed to determine the extraction method and the efficacy of Kratom leaf extract to against *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) activity by agar well diffusion method and chicken meat quality. The results, Kratom leaf ethanol extract was effective than aqueous extract in inhibiting the growth of *S. typhimurium* and *E. coli*. The minimal inhibitory concentration (MIC) value against *S. typhimurium* and *E. coli*. was 200 mg/mL. For the study of total bacterial number, pH value and percentage of cooking loss were determined in the chicken meat. The kratom leaf ethanol extract had antibacterial activity, slowly changed the pH value, reduced cooking loss.

Keywords: Kratom; *Salmonella*; *E. Coli*; Meat quality

บทนำ

การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในอาหารสามารถเกิดได้ง่ายในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ เนื่องจากเนื้อสัตว์เป็นอาหารที่มีโปรตีนสูงและมีความชื้นเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยเฉพาะเนื้อไก่ที่เกิดการปนเปื้อนจากกระบวนการขนย้ายสัตว์จนถึงกระบวนการตัดแต่งซาก แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ เชื้อแบคทีเรียก่อโรค (Pathogenic bacteria) เช่น *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* และเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของเนื้อสัตว์ (Indicator bacteria) เช่น *E. coli*, *Enterococcus* spp., coliforms แบคทีเรียดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับความปลอดภัยของผู้บริโภค และรวมถึงสัญลักษณ์ที่ดีของกระบวนการผลิตเนื้อ เชื้อ *Salmonella* spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุดและมีความสำคัญต่อสุขภาพของผู้บริโภคเมื่อเกิดการปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ (Klaharn et al., 2022) ผู้บริโภคที่ได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษจนอาจเสียชีวิตได้ และเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ยังคงเป็นเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษอีกชนิดหนึ่ง อาการที่สามารถพบเมื่อเกิดการติดเชื้อ คือ ท้องร่วง ปวดท้อง ปวดศีรษะ อาเจียน และมีไข้เล็กน้อย ดังนั้น เชื้อ *S. typhimurium* และ *E. coli* จึงเป็นแบคทีเรียที่สร้างปัญหาด้านสาธารณสุขสำหรับผู้บริโภคของประเทศไทย เมื่อเกิดการติดเชื้อและเจ็บป่วยจากการบริโภคเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรสดังกล่าว การใช้ยาปฏิชีวนะกับสัตว์ตั้งแต่ระดับฟาร์มจึงจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับเกษตรกรเพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคในขั้นตอนการผลิต เพื่อช่วยลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในเนื้อสัตว์ แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มปศุสัตว์เป็นระยะเวลายาวนานส่งผลก่อให้เกิดเชื้อดื้อยาในสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการเลี้ยงสัตว์ในระยะยาวต่อไป อีกทั้งยังทำให้เกิดการสะสมยาปฏิชีวนะเมื่อถึงผู้บริโภคอีกด้วย แบคทีเรียก่อโรค *S. typhimurium* และ *E. coli* สามารถตรวจพบได้บ่อยและส่งผลกระทบต่อ การส่งออกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์แปรรูป ดังนั้น การวางแผนป้องกันและควบคุมการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ควรมีการควบคุมตั้งแต่ระดับฟาร์ม โรงฆ่าสัตว์ จนถึงจุดจำหน่ายเพื่อสร้างความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค การเลือกใช้สมุนไพรในวงจรการปศุสัตว์จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ได้รับความนิยมด้วยการคัดเลือกสมุนไพรที่มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาตามวัตถุประสงค์ของการนำมาใช้ประโยชน์

กระท่อมเป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย โดยมีการนำพืชกระท่อมมาใช้รักษาอาการท้องร่วง เบาหวาน ขับพยาธิ ลดความอยากกินอาหาร ลดไข้ แก้ปวดกล้ามเนื้อ (สาวตรี และอาภา, 2548) ในปัจจุบันมีการศึกษาองค์ประกอบของกระท่อมโดยเน้นคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาพบว่ากระท่อมมีสารประกอบจำพวกเปปไทด์ กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสายยาว แอลดีไฮด์ อัลคาลอยด์ น้ำมันหอมระเหย ฟีนอล แทนนิน และสารประกอบอื่น ๆ ที่ละลายได้ในน้ำและแอลกอฮอล์ได้ สารเหล่านี้มีสรรพคุณเป็นยาแก้ปวด ยากลับคืน ยาระงับประสาท ยาระงับปวด ยาระงับคลื่นไส้ สารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบและออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* (Parthasarathy et al., 2009; Shaik Mossadeq et al., 2009) จากคุณสมบัติดังกล่าวมาพืชกระท่อมมีแนวโน้มที่จะสามารถใช้ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (กิตติศักดิ์, 2561) ดังนั้น งานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการสกัดสารสกัดหยาบจากกระท่อมและการนำสารสกัดไปใช้ประโยชน์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium*

และ *E. coli* ที่มีโอกาสปนเปื้อนบนเนื้อสัตว์จากกระบวนการเลี้ยงจนถึงกระบวนการแปรรูป เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการใช้ประโยชน์จากพืชกระท่อมในงานปศุสัตว์ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาวิธีการสกัดสารสกัดหยาบจากใบกระท่อมต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ

การเตรียมตัวอย่างพืชกระท่อม

ใบพืชกระท่อมถูกเก็บรวบรวมจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2565 จากนั้นล้างใบกระท่อมด้วยน้ำเปล่าให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำใบกระท่อมแห้งที่ได้บดด้วยเครื่องบดละเอียดสำหรับสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ซึ่งใบพืชกระท่อมบดแห้งและตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด คือ น้ำและเอทานอลความเข้มข้น 95% ในอัตราส่วน 1 : 10 (ใบกระท่อม 60 g : น้ำ/เอทานอล ปริมาตร 540 mL) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองสารละลายด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อกรองเศษใบพืชกระท่อมออกและนำสารสกัดที่ได้มาทำการระเหยน้ำหรือเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 37±2 °C ความดัน 100 ปอนด์ จนสารสกัดไม่มีน้ำหรือเอทานอลผสมอยู่ เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบพืชกระท่อมต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion

การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบพืชกระท่อมต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในห้องปฏิบัติการ ใช้แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ 1) *S. typhimurium* ATCC no.14028 2) *Escherichia coli* ATCC no.25922 นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth บ่มด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaker) ที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็ว 240 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้มีปริมาณเท่ากับ 10⁶ CFU/mL โดยเทียบกับ McFarland standard No 0.5 นำเชื้อ *S. typhimurium* และ *E. coli* มาทำการเกลี่ย (swab) บนอาหาร Nutrient agar ให้ทั่วด้วยไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (cotton swab) จากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ทำการเจือจางสารสกัดใบพืชกระท่อมจากความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 600 mg/mL โดยการเติมสารสกัดใบพืชกระท่อมที่ความเข้มข้น 400 mg/mL ปริมาตรหลุมละ 50 µL ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (Inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ (Vernier caliper) ในหน่วยมิลลิเมตร บันทึกผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยใช้ยาปฏิชีวนะ Amoxicillin ความเข้มข้น 10 µg เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulfoxide, DMSO) เป็นตัวควบคุมเชิงลบ และวิเคราะห์ค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรีย (antibacterial index) ด้วยสูตร

$$\text{ดัชนีการยับยั้งแบคทีเรีย} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง} - \text{เส้นผ่าศูนย์กลางของหลุม}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของหลุม}}$$

การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดพืชกระท่อมที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Minimal inhibitory concentration, MIC)

นำสารสกัดพืชใบกระท่อมความเข้มข้น 400 mg/mL ปริมาตร 0.5 mL มาเจือจางลงครึ่งละ 2 เท่า (Serial dilution) ด้วยไตรเมทิล ซัลโฟนิกแอต ขนาด 0.5 mL มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดของพืชกระท่อมระหว่าง 400 – 12.5 mg/mL จากนั้น นำเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* และ *E. coli* ความเข้มข้น 10^6 CFU/mL ทำการ swab บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ทำการเจาะหลุมด้วยทึปปราศจากเชื้อ เติมสารสกัดพืชกระท่อมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในแต่ละหลุม ปริมาตรหลุมละ 100 μ L ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (Inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ (Vernier caliper) ในหน่วยมิลลิเมตร บันทึกผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยใช้ยาปฏิชีวนะ Amoxicillin ความเข้มข้น 10 μ g เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้ไตรเมทิล ซัลโฟนิกแอตเป็นตัวควบคุมเชิงลบ

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดพืชกระท่อมที่สามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC)

โดยใช้วิธี streak plate ทำการเขี่ยเชื้อจากบริเวณยับยั้งของค่า MIC ที่ความเข้มข้นต่ำสุดอย่างน้อย 2 ความเข้มข้น นำมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient agar ใหม่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลหาค่า MBC หากสารสกัดใบพืชกระท่อมสามารถฆ่าเชื้อได้ จะแสดงผลลบ คือ ไม่มีโคโลนีของเชื้อปรากฏ ดังนั้น ความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดใบกระท่อมที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ คือ ค่า MBC โดยการทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การทดสอบสารสกัดใบกระท่อมด้วยเอทานอลต่อคุณภาพเนื้อและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคนเนื้อไก่ การเตรียมเนื้อไก่

เตรียมเนื้ออกไก่สดที่จำหน่ายทางการค้าจากห้างสรรพสินค้า ตัดแต่งเนื้ออกไก่ให้มีขนาด 5 X 5 cm ทำการแบ่งเนื้อไก่ออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ 1) เนื้ออกไก่สด 2) เนื้อไก่ชุบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* ความเข้มข้น 10^6 CFU/mL 3) เนื้อไก่ชุบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. Coli* ความเข้มข้น 10^6 CFU/mL 4) เนื้อไก่ชุบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* ความเข้มข้น 10^6 CFU/mL และสารสกัดใบกระท่อม 5) เนื้อไก่ชุบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ความเข้มข้น 10^6 CFU/mL และสารสกัดใบพืชกระท่อม เพื่อทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง วัดค่าสีของเนื้อ วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้ม และตรวจสอบหาจำนวนปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในเนื้อไก่ ณ วันที่ 0, 4, 7 และ 14 วัน ขณะทำการทดลอง

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* และ *E. coli* สำหรับซุบเนื้อไก่

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* และ *E. coli* เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth บ่มด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaker) ที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็ว 240 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้มีปริมาณเท่ากับ 10^6 CFU/mL โดยเทียบกับ McFarland standard No 0.5

การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของกล้ามเนื้อ (muscle pH measurement)

วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อไก่ทุกกลุ่มการทดลอง ทำการเตรียมเนื้อไก่ทดลองขนาด 2.5 X 2.5 cm กลุ่มละ 3 ตัวอย่าง สำหรับวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH-meter รุ่น HandyLab 680 สำหรับวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อไก่ จากนั้น ปักอิเล็กโทรดของเครื่องวัดค่าความเป็น กรด-ด่าง ลงในเนื้อไก่ โดยให้อยู่บริเวณชั้นกลางของเนื้อไก่ วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง วันที่ 0, 4, 7 และ 14 ของการทดลอง

การวัดค่าสีของเนื้อไก่

วัดสีของเนื้อไก่ด้วยเครื่องวัดสีรุ่น Konica Minolta นำเนื้อไก่ทุกกลุ่มการทดลองล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดสีจากสารสกัดไบฟิซกระท่อม และทำการบันทึกค่า L^* (ความสว่าง), a^* (แดง-เขียว) และ b^* (เหลือง-น้ำเงิน)

การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้ม (cooking loss)

ตัดเนื้อไก่ขนาด 2 x 2 cm ชั่งน้ำหนัก (W_1) จากนั้น นำไปบรรจุถุงปิดเพื่อไม่ให้น้ำที่ใช้ในการต้มเข้าไปสัมผัสกับเนื้อไก่ นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 °C วัดอุณหภูมิภายในใจกลางจนถึง 72 °C ปลอ่ยให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง (W_2) และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้มจากสูตร

$$\text{cooking loss (\%)} = \left(\frac{W_1 - W_2}{W_1} \right) \times 100$$

การตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

ชั่งเนื้อไก่ขนาด 100 กรัม ซุบเนื้อไก่ลงในแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^6 CFU/mL ปริมาตร 1 mL แล้วปลอ่ยให้แห้ง เลือกความเข้มข้นของสารสกัดไบฟิซกระท่อมที่เป็นค่า MBC โดยใช้ DMSO เป็นตัวละลาย และนำไปซุบสารละลายสารสกัดไบฟิซกระท่อม บรรจุในบรรจุภัณฑ์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0, 4, 7 และ 14 วัน จากนั้น วิเคราะห์หาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยการนำตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ของทุกกลุ่มทดลอง นำตัวอย่างเนื้อ 10 กรัม และเติม sterile peptone water ปริมาณ 90 mL ทำการตีปนด้วยเครื่อง Homogenizer แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้น $10^{-2} - 10^{-8}$ ด้วย peptone water จากนั้น ทำการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการบันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏและรายงานผลเป็นค่า Log CFU/g

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD: Completely Randomized Design) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการศึกษา

ผลของสารสกัดใบกระท่อมต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ด้วยวิธี Agar well diffusion

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* และ *E. Coli* สารสกัดใบกระท่อมด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ พบว่า สารสกัดใบกระท่อมด้วยตัวทำละลายทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ สารสกัดจากใบกระท่อมด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ดีกว่าสกัดด้วยน้ำ ความเข้มข้นของค่า MBC และ MIC ของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลต่อแบคทีเรีย *S. typhimurium* และ *E. Coli* มีความเข้มข้นของค่า MBC และ MIC ต่อแบคทีเรียทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกัน คือ ค่า MBC เท่ากับ 400 mg/mL และค่า MIC เท่ากับ 200 mg/mL แสดงดัง Table 1

Table 1. Antimicrobial activity (Antibacterial index) of *Mitragynaspeciosa* leaf extract

Bacteria	Antibacterial index; AI		MBC (mg/ml) of EtOH extract	MIC (mg/ml) of EtOH extract
	Aqueous extract	Ethanollic (EtOH) extract		
	(400 mg/ml)	(400mg/ml)		
<i>S.typhimurium</i>	0.542±0.059	0.944±0.096	400	200
<i>E. coli</i>	0.750±0.177	0.889±0.096	400	200
SEM	0.08	0.06		

ผลของสารสกัดใบพืชกระท่อมด้วยเอทานอลต่อสีของเนื้อไก่

การใช้สารสกัดใบพืชกระท่อมชุบบนเนื้อไก่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าสีของเนื้อไก่ในแต่ละกลุ่มการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เนื้อไก่ที่ชุบด้วยสารสกัดพืชกระท่อมมีค่าความสว่าง (L^*) และค่าสีแดงของเนื้อสัตว์ (a^*) ต่ำกว่า กลุ่มที่ไม่ได้ชุบด้วยสารสกัดพืชกระท่อมและค่าสีเหลือง (b^*) ของเนื้อไก่ที่มีการชุบด้วยสารสกัดพืชกระท่อมมีค่าสูงกว่าเนื้อไก่ที่ไม่ได้ชุบด้วยสารสกัดพืชกระท่อมในทุกระยะเวลาของการเก็บรักษาที่ 4 °C (Table 2) แสดงให้เห็นว่าการใช้สารสกัดพืชกระท่อมชุบบนเนื้อไก่มีผลชะลอการเกิดสีซีดจางของเนื้อไก่เมื่อเทียบกับเนื้อไก่ที่ไม่ได้ชุบด้วยสารสกัด

Table 2. Effect of Kratom leaves ethanol extract on the color of chicken meat

Sample	Day 4			Day 7			Day 14		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Meat	62.25±1.15 ^a	2.56±0.68 ^a	12.04±0.58 ^b	57.39±0.50 ^b	2.57±0.60 ^a	11.76±0.43 ^b	56.26±1.01 ^c	1.40±0.23 ^a	12.18±1.04 ^b
Meat + <i>S. typhimurium</i>	58.52±1.24 ^{ab}	0.95±0.30 ^b	11.59±0.61 ^b	61.04±0.73 ^a	0.77±0.08 ^b	10.53±0.99 ^b	62.49±1.65 ^a	-0.34±0.09 ^b	1034±0.16 ^{cd}
Meat + <i>E. coli</i>	57.60±4.10 ^{ab}	0.31±0.27 ^b	9.62±0.11 ^c	61.58±2.54 ^a	0.82±0.10 ^b	10.15±1.03 ^b	60.76±1.02 ^{ab}	-0.78±0.15 ^c	10.15±0.63 ^d
Meat + <i>S. typhimurium</i> + Kratom	54.88±5.24 ^b	-1.11±0.29 ^c	17.06±1.43 ^a	56.17±1.58 ^b	-1.50±0.13 ^c	16.35±1.87 ^a	57.27±4.00 ^c	-1.22±0.07 ^c	14.60±1.11 ^a
Meat + <i>E. coli</i> + Kratom	53.93±0.19 ^b	-1.71±0.58 ^c	16.22±1.72 ^a	54.23±2.23 ^b	-1.44±0.15 ^c	15.67±1.30 ^a	56.26±1.15 ^{bc}	-1.19±0.43 ^c	11.60±0.1 ^{bc}
SEM	1.12	0.41	0.80	0.82	0.41	0.75	0.87	0.26	0.46

Data were presented as mean±SEM. The different superscript letters at the same column indicates significant differences ($P < .05$)

ผลของสารสกัดใบพืชกระท่อมสกัดด้วยเอทานอลต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้ม

ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้มของเนื้อไก่สดที่ 0 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 6.20 และ 37.75% ผลการศึกษาในครั้งนี้จาก Table 3. พบว่า สารสกัดใบกระท่อมชุบเนื้อไก่มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้มเนื้อไก่แตกต่างกันทางสถิติจากกลุ่มที่ไม่ได้ชุบสารสกัดใบกระท่อม ($P<0.05$) โดยเนื้อไก่ที่ได้รับการชุบสารสกัดใบพืชกระท่อมสามารถรักษาระดับค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 6.00-6.10 ตลอดอายุการเก็บรักษาเนื้อไก่ทั้ง 14 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C แตกต่างจากเนื้อไก่ที่ไม่ได้ชุบสารสกัดใบกระท่อมจากผลค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อ สามารถสมมติฐานได้ว่าสารสกัดใบกระท่อมมีผลยับยั้งแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดในเนื้อสัตว์ได้ ดังนั้น สารสกัดใบพืชกระท่อมด้วยเอทานอลมีคุณสมบัติในการชะลอการลดลงของค่าความเป็นกรดและลดเปอร์เซ็นต์การสูญเสียจากการต้ม

Table 3. Effect of Kratom leaves ethanol extract on the pH values and % cooking loss of chicken meat

Sample	pH value			% Cooking loss		
	Day 4	Day 7	Day 14	Day 4	Day 7	Day 14
Meat	5.83±0.10 ^c	5.88±0.05 ^b	5.93±0.41 ^c	49.87±5.20 ^b	35.70±0.40 ^{bc}	30.35±1.75 ^b
Meat + <i>S. typhimurium</i>	5.81±0.04 ^c	5.70±0.05 ^b	5.68±0.10 ^b	38.20±2.51 ^{ab}	39.64±1.13 ^c	28.58±9.41 ^b
Meat + <i>E. coli</i>	5.88±0.83 ^c	5.73±0.07 ^b	5.42±0.04 ^a	35.50±6.17 ^{ab}	41.96±5.49 ^c	29.31±2.43 ^b
Meat + <i>S. typhimurium</i> + Kratom	6.00±0.01 ^b	6.09±0.06 ^a	6.08±0.07 ^d	31.73±9.94 ^a	26.09±6.23 ^b	24.83±6.91 ^{ab}
Meat + <i>E. coli</i> + Kratom	6.10±0.03 ^a	6.02±0.15 ^a	6.00±0.01 ^{cd}	30.49±3.86 ^a	22.40±3.39 ^a	22.20±1.60 ^a
SEM	0.03	0.05	0.07	2.72	2.81	2.56

Data were presented as mean±SEM. The different superscript letters at the same column indicates significant differences ($P<0.05$)

ผลของสารสกัดใบพืชกระท่อมสกัดด้วยเอทานอลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนเนื้อไก่

ผลการใช้สารสกัดใบกระท่อมชุบนเนื้อไก่ ดังแสดงใน Table 4. พบว่าสารสกัดใบกระท่อมมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองชนิด เนื่องจากเนื้อไก่กลุ่มที่เคลือบด้วยสารสกัดพืชกระท่อมทั้งสองกลุ่มมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ชุบด้วยสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < .05$) หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ระยะเวลาการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้นมีผลต่อการเพิ่มของจำนวนเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้น สารสกัดใบกระท่อมด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีผลจากการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียจากกระบวนการผลิต กระบวนการฆ่าจนถึงกระบวนการเก็บรักษาได้ และยังพบอีกว่าสารสกัดใบกระท่อมมีผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ดีกว่าเชื้อ *S. typhimurium* อาจเนื่องจากแบคทีเรีย *E. coli* มีความไวต่อยาปฏิชีวนะจึงอาจจะมีผลต่อสารสกัดใบกระท่อมด้วยเช่นกัน (Adeyanju and Ishola, 2014) จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียทั้งในห้องปฏิบัติการและบนเนื้อไก่ สามารถคาดเดาได้ว่าสารไมทราจินีนสารที่จำเพาะต่อกระท่อมเป็นสารตัวหนึ่งในสารสกัดหยาบที่ละลายในเอทานอลมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ดังนั้น ผู้วิจัยจึงวิเคราะห์หาปริมาณสารไมทราจินีนในใบกระท่อมที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ใบกระท่อมมีปริมาณสารไมทราจินีนเท่ากับ 21.46 mg/g ซึ่งอยู่ในช่วงที่มีรายงานของ Prozialeck et al. (2020) ที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างใบกระท่อมในสหรัฐอเมริกาและพบว่าใบกระท่อมมีปริมาณสารไมทราจินีนอยู่ 3.9–62.1 mg/g

Table 4. Effect of Kratom leaves ethanol extract on total bacteria count of chicken meat

Sample	Total bacteria count (log CFU/g)				
	Day 0	Day 4	Day 7	Day 14	SEM
Meat	2.61±0.03 ^A	6.24±0.22 ^{aB}	6.89±0.06 ^{aC}	7.45±0.21 ^{aD}	0.80
Meat + <i>S. typhimurium</i>	2.84±0.01 ^A	6.92±0.06 ^{bB}	7.59±0.09 ^{dC}	8.69±0.01 ^{dD}	0.83
Meat + <i>E. coli</i>	2.69±0.02 ^A	6.81±0.14 ^{bB}	7.52±0.05 ^{dC}	8.37±0.01 ^{cD}	0.82
Meat + <i>S. typhimurium</i> + Kratom	2.76±0.02 ^A	6.71±0.05 ^{bB}	7.35±0.03 ^{cC}	8.11±0.05 ^{bD}	0.78
Meat + <i>E. coli</i> + Kratom	2.66±0.01 ^A	6.78±0.01 ^{bB}	7.19±0.01 ^{bC}	7.84±0.09 ^{bD}	0.77
SEM		0.08	0.08	0.15	

Data were presented as mean±SEM. The different superscript lowercase at the same column indicates significant differences ($P < .05$) and the different superscript capital letter at the same row indicates significant differences ($P < .05$)

วิจารณ์ผล

จากผลการศึกษาในครั้งนี้และการศึกษาของ Parthasarathy et al. (2009) พบว่าตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารสำคัญจากใ้กระทอ้และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้มีประสิทธิภาพคือ เอทานอล ความเข้มข้น 95% โดยความเข้มข้นของสารสกัดพืชใ้กระทอ้ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* มีความเข้มข้นค่อนข้างสูงถึง 400 mg/mL ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Salim et al. (2021) ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* ด้วยสารสกัดพืชใ้กระทอ้ต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 100% ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย สารสำคัญในใ้กระทอ้เป็นสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ฟีนอล สเตียรอยด์ (Bystrom and Garner-wizard, 2017; Juanda et al., 2019) ซึ่งสามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ดังนั้น ผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการและบนเนื้อไก่สามารถสนับสนุนได้ว่าสารสกัดหยาบจากใ้กระทอ้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. typhimurium* และ *E. coli* ได้ จากการรวบรวมเอกสาร พบว่าสารไมทราจินีมีสารที่จำเพาะในใ้กระทอ้ (Karunakaran et al., 2022) จะเป็นสารตัวหนึ่งที่มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรค แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีมีการระบุกลไกการทำงานของสารสำคัญในใ้กระทอ้ต่อกลไกการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ

มีเพียงข้อสันนิษฐานเบื้องต้นถึงกลไกการทำงานของสารต่อการต้านแบคทีเรีย ดังต่อไปนี้ สารไมทราจินีเป็นสารในกลุ่มแอลคาลอยด์จัดเป็นสารประเภท lipophilic ซึ่งมีความสามารถในการต้านแบคทีเรีย รา ไวรัส และโ้โตรชีว จากกลไกการเข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อโรค การยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียและยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีน (Juanda et al., 2019; Yan et al., 2021) สาร quercetin คือ สารในกลุ่ม flavonoid ที่สามารถพบได้ในใ้กระทอ้ เมื่อทำการจำแนกชนิดสารพบว่าในพืชใ้กระทอ้มีสารกลุ่ม flavonoid อยู่ประมาณ 10.65-11.26 mg/mL ของสารสกัด (Hanifah et al., 2021) โดยสาร quercetin สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้มีประสิทธิภาพทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยการเข้าทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการซึมผ่านของสารต่าง ๆ ในเซลล์แบคทีเรีย รวมถึงการยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโนและโปรตีนมีผลลดประสิทธิภาพของโปรตีนที่สามารถก่อความความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรีย ลดการทำงานของไมโทคอนเดรียป้องกันการเข้าเกาะของแบคทีเรียในเซลล์เจ้าบ้าน (Nguyen and Bhattacharya, 2022) กลไกการยับยั้งการสังเคราะห์ ATP Fo subunit1 (ATP1) (Salim et al., 2021) สารแทนนินสามารถพบได้ในพืชใ้กระทอ้ปริมาณ 17.99 mg/g (Hanifah et al., 2021) มีกลไกในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกระบวนการ iron chelation การยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์และกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันของแบคทีเรีย การเข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Farha et al., 2020) จากกลไกที่กล่าวมาต่างมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ดังนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษากลไกหลักของสารสกัดในใ้กระทอ้ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่อไป เพื่อสามารถนำใ้กระทอ้มาใช้เป็นพืชสมุนไพรไทยที่ใช้ในวงการปศุสัตว์ เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะและสร้างความปลอดภัยทางด้านอาหารให้แก่ผู้บริโภคได้

สรุป

สารสกัดใบกระท่อมด้วยตัวทำละลายเอทานอลสามารถนำมาใช้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. typhimurium* และ *E. coli* ในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ และสามารถคงคุณภาพเนื้อสัตว์ได้ที่อุณหภูมิ 4 °C ดังนั้น การใช้สารสกัดพืชกระท่อมจึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในทางปศุสัตว์สามารถนำมาพัฒนาระบบการจัดการฟาร์มปศุสัตว์เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะ และสร้างความมั่นใจถึงความปลอดภัยของอาหารให้กับผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษารั้งนี้ได้รับการสนับสนุนสถานที่จากสาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

เอกสารอ้างอิง

- กิตติศักดิ์ เหมือนดาว. (2561). การเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารไมทราไจนีนเพื่องานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ และฤทธิ์ในการต้าน แบคทีเรียจากกระท่อม [ปริญญานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตไม่ได้ตีพิมพ์]. มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- สาวิตรี อัจฉนงค์กรชัย และอาภา ศิริวงศ์ ณ อยุธยา. (2548). พืชกระท่อมในสังคมไทย. สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด กระทรวงยุติธรรม. กรุงเทพฯ: บางกอก.
- Adeyanju, G. T., & Ishola, O. (2014). *Salmonella* and *Escherichia coli* contamination of poultry meat from a processing plant and retail markets in Ibadan, Oyo state, Nigeria. *SpringerPlus*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-139>
- Bystrom, L., & Garner-wizard, M. (2017). Review of kratom and other *Mitragyna* species reveals complex chemistry, widespread ethnomedicinal uses, and little evidence of harm brown.
- Farha, A. K., Yang, Q. Q., Kim, G., Li, H., Bin, Zhu, F., Liu, H. Y., Gan, R. Y., & Corke, H. (2020). Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience*, 38, 100751. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100751>
- Hanifah, H. N., Hadisoebroto, G., & Dewi, L. (2021). Comparison of phenolic, flavonoid, and tannin contents from ethanol extract of Kratom stem (*Mitragyna speciosa* Korth.) and senggani flower (*Melastoma malabathrium* L.). *Journal of Physics: Conference Series*, 1869(1), 0–7. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1869/1/012002>

- Juanda, E., Andayani, S., & Maftuch, M. (2019). Phytochemical screening and antibacterial activity of kratom leaf (*Mitragyna speciosa* Korth.) against *Aeromonas hydrophilla*. *The Journal of Experimental Life Sciences*, 9(3), 155–158.
<https://doi.org/10.21776/ub.jels.2019.009.03.02>
- Karunakaran, T., Ngew, K. Z., Zailan, A. A. D., Mian Jong, V. Y. & Abu Bakar, M. H. (2022). The chemical and pharmacological properties of mitragynine and its diastereomers: An Insight review. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.805986>
- Kittisak Muandao. (2018). Comparative extraction method of mytragynine for forensic science and their antibacterial property of *Mytragynia Speciosa* Korth. [Master of Science Thesis]. Silpakorn University
- Klaharn, K., Pichpol, D., Meeyam, T., Harintharanon, T., Lohaanukul, P., & Punyapornwithaya, V. (2022). Bacterial contamination of chicken meat in slaughterhouses and the associated risk factors: A nationwide study in Thailand. *PLoS ONE*, 17, 1–14.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269416>
- Nguyen, T. L. A., & Bhattacharya, D. (2022). Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle. *Molecules*, 27(8).
<https://doi.org/10.3390/molecules27082494>
- Parthasarathy, S., Azizi, J. Bin, Ramanathan, S., Ismail, S., Sasidharan, S., Mohd, M. I., & Mansor, S. M. (2009). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of aqueous, methanolic and alkaloid extracts from *Mitragyna speciosa* (rubiceae family) leaves. *Molecules*, 14(10), 3964–3974. <https://doi.org/10.3390/molecules14103964>
- Prozialeck, W. C., Edwards, J. R., Lamar, P. C., Plotkin, B. J., Sigar, I. M., Grundmann, O., & Veltri, C. A. (2020). Evaluation of the mitragynine content, levels of toxic metals and the presence of microbes in kratom products purchased in the Western Suburbs of Chicago. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(15), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijerph17155512>
- Salim, H. M., Puspitarini, M. D., Setiwati, Y., & Shimabukuro, M. (2021). Antibacterial mechanism of Kratom (*Mitragyna speciosa*) methanol extract on *Streptococcus pneumoniae* and *Eschericia coli* bacteria. *Biomolecular and Health Science Journal*, 4(2), 98. <https://doi.org/10.20473/bhsj.v4i2.28933>

- Shaik Mossadeq, W. M., Sulaiman, M. R., Tengku Mohamad, T. A., Chiong, H. S., Zakaria, Z. A., Jabit, M. L., Baharuldin, M. T. H., & Israf, D. A. (2009). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Mitragyna speciosa* Korth methanolic extract. *Medical Principles and Practice*, 18(5), 378–384. <https://doi.org/10.1159/000226292>
- Yan, Y., Li, X., Zhang, C., Lv, L., Gao, B. & Li, M. (2021). Research progress on antibacterial activities and mechanisms of natural alkaloids: A review. *Antibiotics*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030318>