

ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากเปลือกไม้โกงกาง Antimicrobial Activity of Crude Extract from Rhizophora barks

ทิพย์รัตน์ ชาหอมชื่น^{1*} และพรพรรณ สิริมนต์²
Thippayarat Chahomchuen^{1*} and Pornpun Siramon²

บทคัดย่อ

ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากเปลือกไม้โกงกาง ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์ 5 ชนิดคือ *Epidermophyton floccuosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* และ *Trichophyton mentagrophyte* และเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli*, *Micrococcus* spp., *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus pneumonia* ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10.0 มก./มล. สารสกัดหยาบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ในระดับ 50-80 % และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M.gypseum* ได้สูงสุด รองลงมาคือ *M.canis*, *T. mentagrophyte*, *E. floccuosum* และ *T. rubrum* ตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Broth dilution method พบว่าสารสกัดหยาบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี มีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 5.0 ถึง 10.0 มก./มล. แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ที่ระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ ผลการศึกษานี้มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคกลากและแบคทีเรียก่อโรคได้

คำสำคัญ: สารสกัดหยาบ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เปลือกไม้โกงกาง

Abstract

Antimicrobial activity of crude extract from the stem bark of *Rhizophora* spp. was tested against five dermatophytes (*Epidermophyton floccuosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophyte*) and four bacterial stains (*Escherichia coli*, *Micrococcus* spp., *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumonia*). Crude extract at a concentration of 10.0 mg/ml could inhibit the growth of tested dermatophytes in the range of 50-80 % inhibition. It was showed the most effective against *M. gypseum* followed by *M. canis*, *T. mentagrophyte*, *E. floccuosum* and *T. rubrum*, respectively. The antibacterial activities were conducted by broth dilution method. Crude extract showed the good antibacterial activity against gram positive bacteria with the minimum inhibitory concentration (MIC) ranged from 5.0 to 10.0 mg/mL. However, crude extract could not inhibit the growth of *E. coli* at the tested concentration. These results have a potential for future development of antimicrobial product to control and inhibit the growth of dermatophyte and pathogenic bacteria.

Keywords: Crude extract, antimicrobial activity, agricultural waste, rhizophora bark

¹ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

²มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตราชนูรี อ.จอมบึง จ.ราชบุรี 70150

*Corresponding author, Email: cvttyr@ku.ac.th

คำนำ

ปัญหาการดื้อต่อยาต้านจุลชีพในปัจจุบัน โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกในกลุ่ม Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* หรือ MRSA เป็นปัญหาสำคัญที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจและส่งผลต่อการสาธารณสุขทั่วโลก (Woodford *et al.*, 2009; O' Neill, 2016) แบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียเชื้อฉวยโอกาส เช่น *Streptococcus pneumonia* สามารถก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (Hussey *et al.*, 2017) *Escherichia coli* ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร (Croxen *et al.*, 2013) และก่อให้เกิดการอักเสบที่ผิวหนังและผิวหนังอ่อนโดยสามารถติดเชื้อร่วมกับเชื้อ *Micrococcus sp.* (Chuku *et al.*, 2013) นอกจากนี้ โรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คน (Zoonotic diseases) ทั้งที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ก็พบกระจายเพิ่มมากขึ้น สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากสัตว์เลี้ยงเป็นแหล่งรังโรค ผลการศึกษาของ Buma *et al.* (2006) โดยทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากสัตว์เลี้ยงภายในบ้าน และของใช้ของสัตว์เลี้ยง พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มากที่สุด ซึ่งปัญหาโรคติดเชื้อทางผิวหนังที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย โดยความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของเชื้อที่ก่อโรค และการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ หรือการติดเชื้อฉวยโอกาสนี้ก็จะเพิ่มความรุนแรงของโรคได้อีกทางหนึ่ง โรคติดต่อกับเชื้อรา (Zoonotic fungi) สามารถติดต่อกับสัตว์สู่คนได้ ทั้งทางตรงและทางอ้อม (Seyedmousavi *et al.*, 2015) กลายเป็นโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์ (Dermatophyte) เชื้อราในกลุ่มนี้ที่พบบ่อยมี 3 สกุล ได้แก่ *Trichophyton* *Microsporum* และ *Epidermophyton* ในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมาพบว่ามีกระจายของโรคผิวหนังจากเชื้อราเพิ่มขึ้นมากกว่า 25% ของประชากรโลก (Havlickova *et al.*, 2008) โดย Kim *et al.* (2015) รายงานว่าการระบาดของโรคผิวหนังจากเชื้อราในประเทศเกาหลี ระหว่างปี 2006 ถึง 2010 ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์มากกว่าเชื้อราก่อโรคผิวหนังกลุ่มอื่น นอกจากนี้สถิติการดื้อต่อยาต้านเชื้อราที่ใช้อยู่ก็ยังคงสูงขึ้น (Kandeel *et al.*, 2015) ในประเทศไทยผู้ป่วยโรคผิวหนังประมาณ 40% (จากผู้ป่วย 10,000 คน) เกิดจากเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์ (Ungpakorn, 2005) ข้อมูลจากโรงพยาบาลโรคผิวหนังในกรุงเทพมหานครพบว่า ผู้ป่วยโรคผิวหนังจากเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์ในโรงพยาบาลมีจำกัด แต่มีการเข้ารับการรักษาอย่างต่อเนื่อง (Muangkaew *et al.*, 2017) ข้อจำกัดของจำนวนผู้ป่วยเนื่องจากการรักษาโรคผิวหนังจากเชื้อรา ผู้ป่วยจะมาพบแพทย์เมื่ออาการของโรครุนแรง การรักษาต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นปัจจุบันการศึกษาเพื่อหาสารใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพโดยการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรมาใช้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ

แทนนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งพบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช ผักและผลไม้ ทั้งเปลือก เมล็ดและใบ มีการนำแทนนินมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง การบำบัดน้ำเสีย เครื่องสำอาง และยารักษาโรค รวมถึงการใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Panizzi *et al.*, 2002; Sung *et al.*, 2012; Tomiyama *et al.*, 2016; Salih *et al.*, 2017) แทนนินที่สกัดจากธรรมชาติส่วนใหญ่จะสกัดจากส่วนของเปลือกไม้ เช่น ไม้สกุลก่อ ไม้ยูคาลิปตัส แม้ว่าความต้องการแทนนินเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ในประเทศมีเพิ่มมากขึ้น แต่แทนนินที่ใช้นั้นยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นการผลิตแทนนินเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ในประเทศได้เองจะเป็นประโยชน์และเป็นการลดต้นทุนในการผลิต มีรายงานว่าเปลือกไม้โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*) มีแทนนินปริมาณสูงถึง 7-27% และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ได้ดี แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์ได้ (Rajendra *et al.*, 2016; Suraya *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2006) มีเพียงรายงานของ Ismael and Ramadan (2013) และ Giovana *et al.* (2013) รายงานว่าแทนนินจากเปลือกของไม้สกุลก่อ (*Quercus aegilop* และ *Stryphnodendron adstringens*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์ ชนิด *Trichophyton metagrophytes*, *Microsporum canis* และ *Trichophyton rubrum* ได้ดี ชุมชนบ้านยี่สาร อำเภออัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม เป็นชุมชนที่ผลิตถ่านไม้โกงกางมาเป็นเวลานาน มีการถ่ายทอดภูมิปัญญาสืบทอดกันมาจากรุ่นสู่รุ่น และมีการบริหารจัดการเป็นวงจร โดยในแต่ละปีจะทำการปลูกโกงกางทดแทน

ประมาณ 100,000 ต้นปี โดยปลูกสลับแปลงเพื่อให้มีต้นโกก่างมาเผ่าผ่านตลอดทั้งปี ในแต่ละปีมีการเผ่าผ่านจากไม้โกก่างมากกว่า 30 ต้น (ไทย พีบีเอส, 2559) ซึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตถ่านไม้โกก่างนี้ เฉพาะส่วนของลำต้นเท่านั้นที่ใช้ในการเผ่าผ่าน โดยต้องทำการลอกเปลือกไม้ทั้งก่อน พบว่ามีเปลือกไม้เหลือทิ้งจำนวนมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่สกัดจากเปลือกไม้โกก่างที่ปลูกในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นสารควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคผิวหนังในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์และเชื้อแบคทีเรียก่อโรค รวมถึงเชื้อแบคทีเรียเชื้อฉวยโอกาส

วิธีการศึกษา

การรวบรวม และการเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบจากเปลือกไม้โกก่าง

ทำการรวบรวมตัวอย่างเปลือกไม้โกก่างวัสดุชีวมวลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตถ่าน จากตำบลยี่สาร อำเภอบรรพตพิสัย จังหวัดสมุทรสงคราม นำมาผึ่งในที่ร่มให้มีความชื้นประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงทำการบดและร่อนตัวอย่าง ให้มีขนาดอยู่ในช่วง 240-420 μm สำหรับใช้ในการสกัด จากนั้นจึงทำการสกัดตัวอย่างเปลือกไม้โกก่างที่เตรียมได้ตามวิธีการของ Hoong *et al.* (2009) และพรพรรณ สิริมนต์ และทิพย์รัตน์ ขาหอมชื่น (2558) โดยทำการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีการรีฟลักซ์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:100 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และใช้ 50% aq. acetone เป็นตัวทำละลาย (Neimsuwan *et al.*, 2017) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

ทำการเตรียมตัวอย่างสารละลายสารสกัดหยาบสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 80.0 มก./มล. ใช้ DMSO (Dimethyl sulfoxide) สำหรับการเจือจาง และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านตัวกรองเมมเบรนไนลอนที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน (Merck, Germany)

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์ที่ใช้ทดสอบ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Epidermophyton floccuosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* และ *Trichophyton mentagrophyte* เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบจำนวน 4 สายพันธุ์ โดย 3 สายพันธุ์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบคือ *Escherichia coli* TISTR 073 และแบคทีเรียแกรมบวกคือ *Micrococcus* spp. TISTR 1404 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 แบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus pneumonia* จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคกลากในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์ (Dermatophytes) ของสารสกัดหยาบ

ทำการทดสอบโดยนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar (SDA)(HiMedia, India) บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน ให้เชื้อเจริญบนอาหารประมาณ $\frac{3}{4}$ ของพื้นที่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Modified plate method (Castillo *et al.*, 2010) เตรียมจานอาหารสำหรับทดสอบสารสกัดหยาบโดยการผสมสารสกัดหยาบความเข้มข้น 80 มก./มล. ลงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (HiMedia, India) ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ใช้ทดสอบ 3 ระดับคือ 1.0, 5.0 และ 10.0 มก./มล. ทำการเจาะหลุมโดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจาะจานอาหารที่มีสารสกัดหยาบความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ รวมทั้งจานอาหารชุดควบคุม (ไม่มีสารสกัดหยาบผสมอยู่) จากนั้นเจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อราที่เลี้ยงไว้ แล้วทำการย้ายชิ้นรูนที่มีเชื้อราเจริญอยู่มาวางแทนที่บนอาหารสารสกัดหยาบที่เจาะไว้ บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนจานอาหาร PDA ที่มีสารสกัด

หยาบความเข้มข้นต่างๆ ผสมอยู่ ทุกวันเป็นเวลา 8 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดหยาบอยู่ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Percent of inhibition) ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

เมื่อ R1 = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

R2 = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดทดลองที่มีสารสกัดหยาบความเข้มข้นต่างๆ

การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Tryptone Soy Agar (TSA)(Difco, United States) บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเชื้อแบคทีเรียด้วย 0.85% NaCl ให้ได้เชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarlan No.5 (ปริมาณเชื้อเท่ากับ 108 cfu/ml) นำมาเจือจางด้วยอาหาร 1:200 ทำการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Broth dilution method โดยการปิเปตอาหาร Muller-Hinton broth (Merck, Germany) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมทั้ง 96 หลุม จากนั้นปิเปตสารทดสอบความเข้มข้น 80.0 มก./มล. ลงใน 96 well-plate หลุมที่หนึ่ง ผสมสารทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน จากนั้นทำ Two-fold serial dilution ไปจนหลุมสุดท้าย ปิเปตสารผสมหลุมสุดท้ายทิ้งไป 100 ไมโครลิตร ปิเปตสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุม โดยหลุมที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นตัวควบคุมผลบวก (Positive control) และหลุมที่ใส่เชื้อแบคทีเรียและไม่มีสารสกัดหยาบเป็นตัวควบคุมผลลบ (Negative control) นำไปบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยเติมสารละลาย resazurin ความเข้มข้น 0.02% ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) โดยสังเกตหลุมสุดท้ายที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย resazurin หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ทั้งหมด (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ตามวิธีการของ Basri *et al.* (2005) โดยนำสารละลายในหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อไปเพาะเลี้ยงในอาหาร Muller-Hinton agar รายงานค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นค่า MBC ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 หลุม

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธีการ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบจากเปลือกไม้โกงกาง (Figure 1) โดยการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีการรีฟลักซ์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้ 50% aq. acetone เป็นตัวทำละลาย และใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:100 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ได้ผลผลิตสารสกัดหยาบ (Figure 1) เท่ากับ $23.42 \pm 1.31\%$ เทียบกับปริมาณน้ำหนักแห้งของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากเปลือกไม้โกงกาง

1. การยับยั้งการเจริญเชื้อราก่อโรคกลาก โดยทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์ 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 10.0 มก./มล. สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราอยู่ระหว่าง 50-80% (ข้อมูลในวันที่ 8 ของการทดลอง) (Figure 2) โดยสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. gypseum* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *M. canis*, *T. mentagrophyte*, *E. floccuosum* และ *T. rubrum* ตามลำดับ

(Table 1) Min *et al.* (2008) รายงานว่าปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพของสารสกัดคือ สารแทนนินที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหยาบ โดยปริมาณของแทนนินนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนของพืชที่นำมา ทำการสกัด นอกจากนี้สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารก็ยังมีความสำคัญ จากรายงานการวิจัยของ Rajendra *et al.* (2016) สารสกัดแทนนินที่สกัดจากเปลือกไม้โกงกางโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* ได้ดี นอกจากนี้ Lim *et al.* (2006) และ Suraya *et al.* (2011) รายงานว่าสารสกัดแทนนินจาก เปลือกไม้โกงกางที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 70% acetone มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ได้ดี แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์ได้ การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากเปลือกไม้ โกงกางโดยใช้ 50% aq. acetone เป็นตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดได้ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา กลุ่มเดอร์มาโตไฟท์ได้ดี จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาสารสกัดหยาบจากเปลือกไม้โกงกาง จากชุมชนยีสต์ สาร อำเภอมัฒนา จังหวัดสมุทรสงคราม ให้มีศักยภาพเป็นสารต้านเชื้อราต่อไปในอนาคต

2. การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่ครอบคลุม แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคและเชื้อฉวยโอกาส จากผลการทดสอบด้วยวิธี Broth dilution พบว่าสารสกัดหยาบไม่สามารถยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ที่ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ แต่มีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus* spp. ได้ดีที่สุด มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 5.0 และ 10.0 มก./มล. ตามลำดับ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. pneumonia* และ *S. aureus* ที่ค่า MIC เท่ากับ 10.0 มก./มล. และสารสกัดสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย *S. pneumonia* ได้ โดยมีค่า MBC เท่ากับ 10.0 มก./มล. แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (Table 2) ผลการทดสอบสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดแทนนินจากเปลือกไม้โกงกาง (*Rhizophora apiculata*) จากรายงานของ Lim *et al.* (2006) พบว่าสารสกัดแทนนินจากเปลือกไม้โกงกางมี ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus* sp. และ *S. aureus* ได้ดี โดยมีค่า MIC/MBC เท่ากันคือ 6.25/12.5 mg/ml ซึ่งการออกฤทธิ์ของสารสกัดแทนนินสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ สารสกัดสมุนไพรหลายชนิด ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ เนื่องจากคุณสมบัติของผนังเซลล์ แบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเซลล์ชั้นเดียวไม่มีส่วนของ outer membrane สารสกัดจึงออกฤทธิ์ทำลายเซลล์เมมเบรน และส่งผลต่อรูปร่างของเซลล์ทำให้เกิดการเสียสภาพของเซลล์ได้ง่ายกว่า (Marino *et al.*, 2001; Suraya *et al.*, 2011). นอกจากนี้แทนนินยังออกฤทธิ์ยับยั้งกลไกการสังเคราะห์ RNA, DNA และการสร้างโปรตีน ส่งผลให้เกิดการยับยั้ง การเจริญของแบคทีเรีย (Adnan *et al.*, 2017)

Redondo *et al.* (2014) รายงานแนวทางการใช้ประโยชน์ของแทนนินเป็นสารเสริมอาหารในสัตว์ปีกและ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพได้ (antimicrobial as growth promoting factors: AGP) ดังนั้นสารสกัดหยาบ จากเปลือกไม้โกงกางจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะพัฒนา เพื่อใช้ร่วมกับสารต้านจุลชีพอื่นๆ เพื่อควบคุมการติดเชื้อ แบคทีเรียและเชื้อรา ลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ เพื่อความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม



Figure 1 Rhizophora Barks and crude extract from Rhizophora Barks.

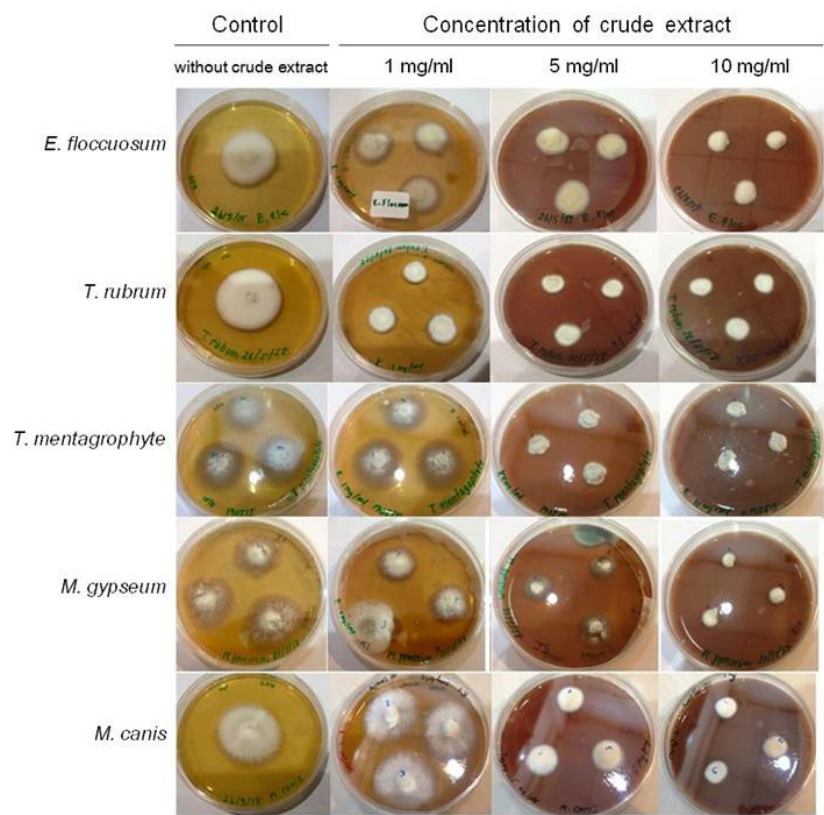


Figure 2 Antifungal activity of crude extract against 5 dermatophytes: *Epidermophyton floccuosum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophyte*, *Microsporum gypseum* and *Microsporum canis* by Modified agar plate method.

Table 1 Percentage inhibition of crude extract against Dermatophytes.

Crude extract (mg/ml)	Percent of inhibition*				
	Dermatophytes				
	<i>E. floccuosum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophyte</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>M. canis</i>
0	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0a
1	27.23.40±3.40a	41.92±23.10a	nd	50.02±3.78b	10.78±2.13a
5	50.67±1.15b	48.10±1.92b	54.90±1.74b	67.34±1.81b	54.03±1.69b
10	58.46±1.33b	50.53±3.88c	64.71±2.80c	78.48±0.83c	69.56±2.54c

* Data from day 8 of experiment. Values are shown as mean ± standard error nd: no detection of antifungal activity.
Mean in column followed by different letters (a-c) are statistically significant (P < 0.05) according to Duncan's multiple range test.

Table 2 Minimal In hibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of crude extract.

Bacteria types	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Micrococcus spp.</i>	5.0	10.0
<i>S. aureus</i>	10.0	na
<i>S. pneumoniae</i>	10.0	10.0
<i>E. coli</i>	na	na

Data from day 8 of experiment na: not active at concentration of 10.0 mg/ml

สรุปผลการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบจากตัวอย่างเปลือกไม้โกงกาง ได้ผลผลิตของสารสกัดหยาบเทียบกับน้ำหนักของเปลือกไม้ เท่ากับ 23.42 % ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์ได้ดี โดยที่ระดับความเข้มข้น 10.0 มก./มล. สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. gypseum* ได้สูงสุด รองลงมาคือ *M. canis*, *T. Mentagrophyte*, *E. floccuosum* และ *T. rubrum* ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดหยาบไม่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ที่ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี สามารถยับยั้งและทำลายเชื้อ *Micrococcus spp.* และ *S. pneumonia* ได้ที่ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 5.0/10.0 และ 10.0/10.0 มก./มล. ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนวิจัย เชื้อราในกลุ่มเดอร์มาโตไฟท์ที่ใช้ทดสอบ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.สพ.ญ.ดร.พรทิพา เล็กเจริญสุข ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ขอขอบคุณ อาจารย์นพดล ประเสริฐสินเจริญ ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ช่วยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

- ไทย พีบีเอส. 2559. รายการสายสืบเจาะตลาด. สำนัวจราคาร้านไม้โกงกาง จังหวัดสมุทรสงคราม. (รายการโทรทัศน์) สถานีโทรทัศน์ไทยพีบีเอส. กรุงเทพฯ. ออกอากาศ 4 ก.ย. 2559. แหล่งที่มา: <https://www.youtube.com/watch?v=K7rADz4YPnE>
- พรพรรณ สิริมนต์ และทิพย์รัตน์ ขาหอมชื่น. 2558. ฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกผลสนุ่นดำ. *วารสาร มทร. อีสาน*. ฉบับพิเศษ: 76-82.
- Adnan, S.N.A., N. Ibrahim, and W.A. Yaacob. 2017. Disruption of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* protein synthesis by tannins. *GERMS* 7(4): 186-192.
- Basri, D.F., R. Sharif, P. Morat, and J. Latip. 2005. Evaluation of antimicrobial activities of the crude extracts from *Garcinia atroviridis* and *Solanum torvum*. *Malaysian Journal of Science* 24: 233-238.
- Buma, R., T. Maeda, M. Kamei, and H. Kourai. 2006. Pathogenic bacteria carried by companion animals and their susceptibility to antibacterial agents. *Biocontrol Science* 11(1): 1-9.

- Castillo, F., D. Hernandez, G. Gallegos, M. Mendez, R. Rodriguez, A. Reyes, and C.N. Aguilar. 2010. In vitro antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Industrial Crops and Products* 32(3): 324-328.
- Chuku, A. and O.O. Nwankiti, 2013. Association of bacteria with fungal infection of skin and soft tissue lesions in plateau state, Nigeria. *British Microbiology Research Journal* 3(4)L 470-477.
- Croxen, M.A., R.J. Law, R. Scholz, K.M. Keeney, M. Wlodarska, and B.B. Finlay. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 26(4): 822-880.
- Giovana, M.L., L.F. Ana, S.C. Valeria, W.B. Bianca, G. Silvana, F.A. Saulo, C.F. Suzelei, and M.S. Ana, 2013. Antimicrobial activity and rates of Tannins in *Stryphnodendron adstringens* Mart. Accessions collected in the Brazilian Cerrado. *American Journal of Plant Sciences* 4: 2193-2198.
- Havlickova, B., V.A. Czaika, and M. Friedrich. 2008. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 51 Suppl 4, 2-15.
- Hoong, Y.B., M.T. Paridah, C.A. Luqman, M.P. Koh, and Y.F. Loh, 2009. Fortification of sulfited tannin from the bark of *Acacia mangium* with phenol-formaldehyde for use as plywood adhesive. *Industrial Crops and Products* 30(3): 416-421.
- Hussey, S.J.K., J. Purves, N. Allcock, V.E. Fernandes, P.S. Monks, J.M. Ketley, P.W. Andrew, and J.A. Morrissey, 2017. Air pollution alters *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumonia* biofilms, antibiotic tolerance and colonization. *Environmental microbiology* 19(5): 1868-1880.
- Ismael, H.M. and N.A. Ramadan. 2013. The anti-dermatophyte activities of some plant extracts against *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum canis*. *Journal of University of Zakho* 1(2): 463-468.
- Kandeel, A., K. Abu-Elmagd, M. Spinner, A. Khanna, K. Hashimoto, M. Fujiki, and A. Abd-Elaal. 2015. A typical Clinical Presentation of a Newer Generation Anti-Fungal Drug-Resistant *Fusarium* Infection After a Modified Multi-Visceral Transplant. *Annals of Transplantation* 20: 512-518.
- Kim, S.H., S.H. Cho, S.K. Youn, J.S. Park, J.T. Choi, Y.S. Bak, Y.B. Yu, and Y.K. Kim, 2015. Epidemiological Characterization of skin fungal infections between the years 2006 and 2010 in Korea. *Osong Public Health Perspect* 6(6): 341-345.
- Lim, S.H., I. Darah, and K. Jain. 2006. Antimicrobial Activities of Tannins Extracted from *Rhizophora Apiculatus* Barks. *Journal of Tropical Forest Science* 18: 59-65.
- Marino, M., C. Bersani, and G. Comi. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *Int J Food Microbiol* 67: 187-195.
- Min, B.R., W.E. Pinchak, R. Merkel, S. Walker, G. Tomita, and R.C. Anderson. 2008. Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens. *Scientific Research and Essay* 3(2): 066-073.
- Muangkaew, W., T. Wongsuk, and N. Luplertlop. 2017. Common dermatophytes and in vitro anti-fungal susceptibility testing in patients attending the Dermatological Clinic at the Hospital for Tropical Medicine, Bangkok. *New Microbiologica* 40(3): 175-179.
- Neimsuwan, T., P. Siramon, P. Hengniran, and V. Punsuvon, 2017. Tannin Extraction of *Rhizophora* Bark from Residual Charcoal Production. *Journal of Tropical Forest Research* 1(1): 36-50.
- O'Neill, J. 2016. Tackling drug-resistant infections globally: The review on antimicrobial resistance. Final report and recommendations. London: HM Government and the Wellcome Trust 84 p.
- Panizzi, L., C. Caponi, S. Catalano, P.L. Cioni, and I. Morelli. 2002. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacology* 79(2): 165-168.
- Rajendra, S., P. Karthick, M.K. Narayana, C. Ramesh, R. Mohanraju, and A. Vijayakumar, 2016. Evaluation of antimicrobial properties from the mangrove *Rhizophora apiculata* and *Bruguiera gymnorhiza* of Burmanallah coast, South Andaman, India. *Journal of Coastal Live Medicine* 4(6): 475-478.
- Redondo, L.M., P.A. Chacana, J.E. Dominguez, and M.E.F. Miyakawa, 2014. Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. *Frontiers in Microbiology* 5: 1-7.

- Salih, E.Y.A., M. Kanninen, M. Sipi, O. Luukkanen, R. Hiltunen, H. Vuorela, R. Julkunen-Tiitto, and P. Fyhrquist, 2017. Tannins, flavonoids and stilbenes in extracts of African savanna woodland trees *Terminalia brownie*, *Terminalia laxiflora* and *Anogeissus leiocarpus* showing promising antibacterial potential. *South African Journal of Botany* 108: 370-386.
- Seyedmousavi, S., J. Guillot, A. Toloee, P.E. Verweij and G.S. Hoog. 2015. Neglected fungal zoonoses: hidden threats to man and animals. *Clinical Microbiology and Infection* 21(5): 416-425.
- Sung, S.H, K.H. Kim, B.T. Jeon, S.H. Cheong, J.H. Park, D.H. Kim, H.J. Kweon and S.H. Moon. 2012. Antibacterial and antioxidant activities of tannins extracted from agricultural by-products. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(15): 3072-3079.
- Suraya, S., I. Darah, K. Jain, and S.H. Lim. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of condensed tannin from *Rhizophora apiculata* barks. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 3: 436-444.
- Tomiyama, K., Y. Mukai, M. Saito, K. Watanabe, H. Kumada, T. Nihei, N. Hamada and Teranaka, T. 2016. Antibacterial Action of a Condensed Tannin Extracted from Astringent Persimmon as a Component of Food Addictive Pancil PS-M on Oral Polymicrobial Biofilms. *Biomed Research International* 2016: 1-7.
- Ungpakorn, R. 2005. Mycoses in Thailand: Current Concerns. *Japanese Journal of Medical Mycology* 46: 81-86.
- Woodford, N. and D. Livermore. 2009. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *Journal of Infection* 59(S1): S4-S16.
-

วันรับบทความ (Received date) : 29 ธ.ค. 60

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 25 เม.ย. 61

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 7 มิ.ย. 61