



Research Article

ปริมาณสารฟีนอลิกรวม การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จากสารสกัดดอกแคหัว
หมู

Phenolic Compounds, antioxidant and anti-bacterial activities from *Markhamia stipulate* Seem. Flowers extracts

ภรณ์ทิพย์ ชัยสว่าง¹, ปาริชาติ อ้นองอาจ^{1*}, กัมปนาท คำสุข¹ และณลิตา ไพบูลย์¹

Pornthip Chaisawang¹, Parichat Onongarj^{1*}, Kumpanat Khamsuk¹ and Nalita Phaiboon¹

¹ สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ วิทยาลัยนครราชสีมา

¹ Department of Medical Science, Faculty of Allied Health Science, Nakhon Ratchasima College

Article Info

Received 16 May 2024

Revised 1 November 2024

Accepted 6 December 2024

Abstract

The edible flower of *Markhamia stipulate* Seem are widely used in Thai traditional medicine to treat a variety of health issues. The aims of this study were to investigate antioxidant activity and antibacterial of crude extracts from *M. stipulate*. In the present study, total phenolic compound, antioxidant activities and antibacterial activities of the 50%ethanolic extract from flower of *M. stipulate* were evaluated. The total phenolic contents was quantified based on the Folin–Ciocalteu method, and the antioxidant activities of the extract were assessed through the DPPH and FRAP assays. The broth dilution method, MIC and MBC were used to evaluate the antibacterial activity of the extract against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. The results revealed that the total phenolic contents of the extracts was 53.71 ± 0.002 mg of gallic acid equivalent/g of extract. Additionally, the antioxidant activities in terms of IC_{50} value of the extracts were 43.56 ± 0.044 mg/mL and 38.43 ± 0.013 mg/mL, according to the DPPH and the FRAP assay. Crude extract of *M. stipulate* flower also demonstrated antibacterial activity against selected bacterial strains, with MIC and MBC values ranging from 1.56 to 200 mg/mL. In summary, the results suggest that flower extract of *M. stipulate* may serve as valuable sources of bioactive compounds with antioxidant and antibacterial properties.

Keywords: *M. stipulate*, Antioxidant activity, Antibacterial activity, phytochemical contains

บทคัดย่อ

ดอกแคหัวหมู (*Markhamia stipulate* Seem.) เป็นดอกไม้ที่นิยมนำมาบริโภคเป็นอาหารและใช้ประโยชน์ในการดูแลสุขภาพผู้ป่วยต่างๆ ในทางการแพทย์แผนไทย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากดอกแคหัวหมูที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอล โดยการหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin–Ciocalteu และวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate assay (DPPH assay) และ Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay) และนอกจากนี้ยัง

*Corresponding Author E-mail: parichat@nmc.ac.th

ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Broth dilution เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) โดยทำการศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณสารฟีนอลิกรวมทั้งหมดเท่ากับ 53.71 ± 0.002 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP assay แสดงผลด้วยค่า IC₅₀ มีค่าเท่ากับ 43.56 ± 0.044 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 38.43 ± 0.013 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจากผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่าสารสกัดจากดอกแคหัวหมูมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 1.56 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากดอกแคหัวหมูมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยการแยกองค์ประกอบของสารต่อไป

คำสำคัญ : แคหัวหมู, ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ, ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

1. บทนำ

ปัจจุบันมีการใช้สมุนไพรและมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลชีพอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากพบว่ามีความสำคัญในการป้องกันและฟื้นฟูสุขภาพหรือโรคเรื้อรังในมนุษย์ เช่น โรคเบาหวาน และโรคหลอดเลือดและหัวใจ [1,2] โดยพบว่ายารักษาโรคเบาหวานทั่วโลกจำนวนร้อยละ 60 โดยประมาณได้จากการพัฒนายาจากสารสำคัญที่พบในพืช [3] นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ที่เกิดจากความไม่สมดุลของการสร้างและการกำจัดอนุมูลอิสระ (Free radicals) ในร่างกาย ถือเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ [4] หากมีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินไปจะสามารถเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) กับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย เช่น ไขมัน โปรตีน และดีเอ็นเอ ส่งผลให้เซลล์และเนื้อเยื่อเสียหายและทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดแข็ง โรคหลอดเลือดและหัวใจ โรคชราและโรคที่เกิดจากกระบวนการอักเสบ [5] โดยปกติร่างกายมีสารต้านอนุมูลอิสระในการกำจัดอนุมูลอิสระและยังพบว่าการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในพืชก็สามารถป้องกันการเกิดโรคที่มีสาเหตุจากอนุมูลอิสระได้ [6]

สารอนุมูลอิสระในร่างกาย มีปัจจัยที่เกิดขึ้นทั้งภายในและภายนอกและภายในร่างกาย สารที่นำมาใช้ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระเรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) [7] โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ จะมีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ ได้แก่ การดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (Singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Metal chelation) หักขาดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (Synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น [8] จึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ การใช้ชีวิตในปัจจุบันที่เปลี่ยนแปลงไป การไม่ใส่ใจสุขภาพ ไม่ว่าจะเป็นการคัดเลือกคุณค่า และปริมาณของอาหารที่รับประทานที่ไม่เหมาะสม พักผ่อนไม่เพียงพอ ไม่มีเวลาออกกำลังกายและมลภาวะรอบตัว ซึ่งล้วนเป็นปัจจัยที่เพิ่มอนุมูลอิสระในร่างกาย ซึ่งในทางการแพทย์พบว่าสาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์เสื่อม และนำไปสู่การแก่ชราหรือความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ โรคเบาหวาน และโรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น [9] ทำให้พบปัญหาสุขภาพจากโรคเรื้อรังมากขึ้นในช่วงอายุที่น้อยลง ด้วยเหตุนี้

จึงเป็นผลที่ทำให้ต้องใช้ยาในการรักษา แต่การใช้ยารักษาในปริมาณมากๆ เหนื่อยล้า อาจส่งผลเสียต่อร่างกายได้ แต่ในปัจจุบันมีอีกทางเลือกในการรักษา คือ การใช้พืชสมุนไพร การบริโภคผักและผลไม้ซึ่งมีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด พืชสมุนไพรยังสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อมาตั้งแต่สมัยโบราณเนื่องจากในพืชมีสารประกอบอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลชีพก่อโรค เช่น แทนนิน อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนินและสารประกอบฟีนอลิก และยังพบว่าการใช้พืชสมุนไพรในการต้านเชื้อจุลชีพยังมีผลข้างเคียงน้อย ง่ายและราคาไม่แพง ด้วยเหตุผลดังกล่าวพืชสมุนไพรจึงมีความสำคัญในด้านเภสัชวิทยาในการพัฒนายาเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสและแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ [10,11]

แคหางค่าง หรือแคหัวหมู (*Markhamia stipulate* Seem.) วงศ์ Bignoniaceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูง 10-20 เมตร ลักษณะใบแหลมโคนใบมน ขอบใบจักฟันเลื่อย ดอกเป็นช่อสีครีมหรือสีน้ำตาลเหลือง ค่อนข้างแดง ผลแห้งแตกเป็นสองซีก มีขนปุยหนานุ่ม และพบว่าแคหัวหมูมีสารสำคัญจำพวก quinones, phytosterols และ lignans เป็นส่วนมาก จากภูมิปัญญาท้องถิ่นพบว่าส่วนของใบและเปลือกของต้นแคหัวหมูมีคุณสมบัติช่วยในการรักษาโรคผิวหนัง และใช้ในการระงับอาการปวดต่างๆ [23] โดยจะพบพืชชนิดนี้ได้มากตามป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง ป่าหญ้า ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคใต้ และทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดหยาบจากใบและเปลือกต้นแคหัวหมูที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทานอล มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio cholerae* (clinical), *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 และ *Escherichia coli* ATCC25922 [7] และเนื่องด้วยสรรพคุณทางยาและสรรพคุณทางด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของดอกแคหัวหมู จึงมีความสนใจในการศึกษาถึงสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกแคหัวหมู เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อให้ได้ใช้ในการประยุกต์ใช้สมุนไพรท้องถิ่นมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพต่อไป

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

- ศึกษาฤทธิ์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากดอกแคหัวหมู
- ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

mutans, *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* ของสารสกัดจากดอกแคหัวหมู

3. ระเบียบวิธีศึกษา

3.1 การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง

ตัวอย่างพืชดอกแคหัวหมู เก็บจากตำบลคอกช้าง อำเภอสระใคร จังหวัดหนองคาย ช่วงเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม 2563 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยนักพฤกษศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รหัส KKU No. 25789 ผากไว้ที่หอพรรณไม้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

นำดอกแคหัวหมูตัวอย่างมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำมาบดเป็นผง แล้วนำมาชั่ง 300 กรัม สกัดโดยวิธีการหมักด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 50 % ในอัตราส่วน 1:10 w/v ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และเขย่าเป็นระยะ ๆ หลังจากนั้นกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) เมื่อนำสารตัวอย่างออกจากเครื่อง Rotary evaporator แล้วจะนำตัวอย่างไปอบที่ 60 องศาเซลเซียสจนสารตัวอย่างมีลักษณะแห้งเป็นเกล็ด และเก็บสารตัวอย่างที่ได้ในภาชนะที่ป้องกันแสง และจัดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส [13] และคำนวณหาร้อยละผลผลิตของสารสกัดที่ได้จากสูตร

3.2 ร้อยละผลผลิต = (น้ำหนักหลังสกัด/น้ำหนักผงสมุนไพรก่อนสกัด) × 100 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical scavenging activity) [14]

3.2.1 เตรียมสารละลายสารสกัดหยาบแคหัวหมูความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางเพื่อเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 5, 10, 50, 100, 250, 500, 750 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.2 เตรียมสารละลาย 0.1 mM DPPH โดยชั่ง DPPH (MW = 394.33)หนัก 0.0039 กรัม ละลายในเมทานอล 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้น 0 5 10 20 30 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยการชั่งกรดแอสคอร์บิก 0.025 ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นตามที่กำหนด (0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร)

3.2.4 นำสารละลายสารสกัดตัวอย่างมา 1.35 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืดและอุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และนำค่าดูดกลืนแสงมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ และศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระรายงานเป็น IC₅₀ โดยการสร้าง

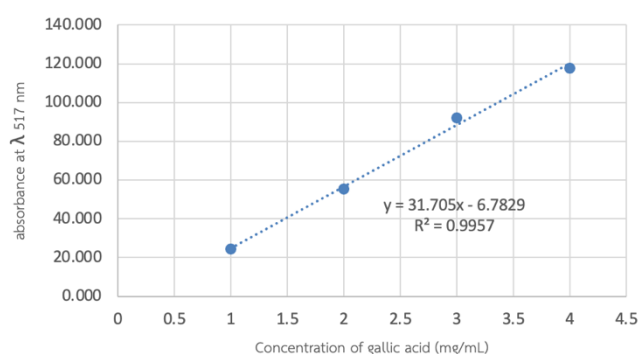
กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition DPPH⁺ กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

$$\% \text{ radical scavenging} = [1 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{control}})] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

และ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) และความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (แกน x) คำนวณค่า IC₅₀ จากสมการเส้นตรง y = ax + b



3.3 การทดสอบปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's reagent

3.3.1 เตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาบแคหัวหมูความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดแคหัวหมู 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสารละลาย 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

3.3.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่งกรดแกลลิก 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร นำมาเจือจางเพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2, 6, 10, 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.3 เตรียมสารละลาย 20% sodium carbonate โดยชั่ง Na₂CO₃ 20 กรัม แล้วละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียมสารมาตรฐาน 10% Folin-Ciocalteu phenol reagent โดยปิเปต Folin-Ciocalteu phenol มา 10 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3.3.4 นำสารละลายสกัดที่เตรียมไว้มา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 10% Folin-Ciocalteu phenol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย 20% sodium carbonate 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม โดยเทียบผลกับกราฟของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 2-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รายงานผลเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด [15]

3.4 Ferric reducing ability power (FRAP) assay

การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ด้วยวิธี FRAP โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต โดยวิธี [16] โดยเตรียมสารละลาย FRAP reagent ซึ่งมีอัตราส่วนผสมดังนี้ อะซีเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ สารละลาย 2,4,6-tri(2-pyridyl)-S-traizine (TPTZ) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สารละลาย FeCl_3 20 มิลลิโมลาร์ ผสมกันในอัตราส่วน 10:1:1 (v/v/v)

เตรียมตัวอย่างของสารสกัดเพื่อทดสอบ โดยชั่งตัวอย่าง 0.250 กรัม เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ปิเปตมา 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำ FRAP reagent ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

3.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (BHI Broth) ใช้อัตราส่วน BHI:DW = 3.7:100 ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำ BHI Broth ที่ผสมเข้ากันดีแล้วแบ่งบรรจุใส่หลอดทดลอง นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จัดเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส [17]

3.6 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

นำ *S. mutans*, *S. aureus*, *B. subtilis* และ *E. coli* มาเพาะเลี้ยงใน BHI Broth ในหลอดทดลองปริมาตร 3 มิลลิลิตรนำไปบ่มภายใต้สภาวะเดียวกัน ลักษณะเชื้อที่ได้มีสีขาวขุ่นอยู่บริเวณก้นหลอดทดลอง แยกชั้นกับ BHI Broth อย่างชัดเจน สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า แล้วนำเชื้อ ที่ได้มาปรับความขุ่นให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายแมคฟาร์แลนด์ (McFarland no. 0.5) ซึ่งมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางต่อ โดยนำเชื้อที่ทำการปรับความขุ่นแล้ว เลือกดูตามจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว 9 มิลลิลิตร ปริมาณที่ทำการเจือจางจะมีเชื้ออยู่ประมาณ 1.0×10^6 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เตรียมพักไว้ก่อนเพื่อนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป [17]

3.7 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดแคหัวหมูที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดใบพลูที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Broth dilution method โดยการเจือจางลดความเข้มข้นลงทีละครึ่งแบบ 2-Fold serial dilution ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบให้มีความขุ่นเท่ากับค่า McFarland no. 0.5 ซึ่งในแต่ละหลอดทดลองจะประกอบด้วยสารสกัดที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเชื้อแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตร มีชุดควบคุมบวกประกอบด้วย Chlorhexidine (Antibiotic positive control) ชุดควบคุมลบประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว (Negative control) และชุดควบคุมการเจริญผลบวกประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อแบคทีเรีย (Positive growth control) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5-10% CO_2 เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง บันทึกผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร

สกัดที่แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยอ่านผลจากการเจริญเติบโตของเชื้อ หากสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้จะแสดงผลเป็นลบ คือจะไม่พบตะกอนของเชื้อเกิดขึ้น เปรียบเทียบกับชุดควบคุม จะได้ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียคือค่า Minimum inhibitory concentrations (MIC) [18]

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการตรวจวิเคราะห์ Total phenolic content และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD) ของการทดลอง 3 ครั้ง สถิติที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยการทดสอบหาค่าความเข้มข้น MIC และ MBC ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบกลไกต้านการก่อพิษด้วยผลของสารสกัดที่ต้องการทดสอบต่อการลดลงของ pH ใน bacterial suspension สถิติที่ใช้คือค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของค่า pH

4. ผลการศึกษา

การศึกษาทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกแคหัวหมู โดยศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic compounds), FRAP assay วัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้แก่เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, *S. mutans*, *B. subtilis* และ *E. coli* ของสารสกัดจากดอกแคหัวหมู ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1 ผลการเตรียมสารสกัด

จากการนำตัวอย่างดอกแคหัวหมูที่สะอาดและบดให้แห้ง ชั่งน้ำหนักแล้วนำมาสกัดด้วยวิธีการหมักด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ ตัวทำละลาย 50% เอทานอล แล้วนำสารละลายไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) สีเหลืองน้ำตาล มีค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบ (%yield) คือ ร้อยละ 34.18

4.2 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity (IC_{50} mg/mL) และ FRAP ของสารสกัดดอกแคหัวหมู

Total phenolic compounds	Antioxidant activity	
	DPPH	FRAP
mg GAE/g plant extract ^a	IC_{50} , mg/mL	IC_{50} , mg/mL ^b
53.71 $\pm$ 0.002	43.56 $\pm$ 0.044	38.43 $\pm$ 0.013

^aGAE : gallic acid equivalents, ^b Fe^{2+} : Fe^{2+} equivalents

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดดอกแคหัวหมู และการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดดอกแคหัวหมู เท่ากับ

53.71±0.002 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัม และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่ามีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 เท่ากับ 43.56±0.044 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเมื่อทดสอบด้วย FRAP assay มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 38.43±0.013 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 1

4.3 การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) *S. mutans*, *S. aureus*, *B. subtilis* และ *E. coli*

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดดอกแคหัวหมูที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC) ดอกแคหัวหมู ความเข้มข้น 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Bacterial strains/compound	Concentrations of flower extract (mg/mL)	
	MIC	MBC
<i>S. mutans</i>	25	> 200
<i>S. aureus</i>	50	> 200
<i>B. subtilis</i>	25	> 200
<i>E. coli</i>	50	> 200

*** Chlorhexidine (Positive control) MIC และ MBC < 0.78 (mg/mL) โดยใช้ทดสอบเชื้อทั้ง 4 ชนิด

MIC = Minimum inhibitory concentration ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้

MBC = Minimum bactericidal concentration ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกแคหัวหมูในการต้านเชื้อ *S. mutans*, *S. aureus*, *B. subtilis* และ *E. coli* ด้วยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ของสารสกัดจากดอกแคหัวหมู ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จนถึง 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี Chlorhexidine เป็นตัวควบคุมบวก โดยสารสกัดดอกแคหัวหมู สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans*, *S. aureus*, *B. subtilis* และ *E. coli* ได้ในความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ จากตารางผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดดอกแคหัวหมามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น ดังตารางที่ 2

5. อภิปรายผลการวิจัย

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากดอกแคหัวหมู ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอลในครั้งนี้ เลือกการทดสอบ

คุณสมบัติในการเป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระ (Free radical scavenger) ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate assay (DPPH assay) ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว เนื่องจาก DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร โดยอนุมูล DPPH[•] เป็นอนุมูลไนโตรเจนคงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว ไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดเป็นอนุมูลเหมือนกับกรณีอนุมูล ABTS^{•+} โดยเป็นการวัด ความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม ซึ่งเป็นวิธีเบื้องต้นที่นิยมใช้ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยทั่วไป [19] โดยผลที่ได้จากการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากดอกแคหัวหมู มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี และยังสอดคล้องกับปริมาณสารฟีนอลิกรวม โดยพบว่าปริมาณสารฟีนอลิกรวมมีค่าเท่ากับ 53.71±0.002 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่าง ซึ่งปริมาณสารฟีนอลิกที่สูงจะส่งผลให้มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูง ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกในพืชมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสารประกอบฟีนอลิกจะจับอนุมูลอิสระ ดังนั้นจะไปยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของการเกิดออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นด้วย โดยสารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและโมเลกุลอื่นๆ ด้วย โดยการให้อะตอมไฮโดรเจนอย่างรวดเร็วและมีความเสถียร สารประกอบฟีนอลิกจึงมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก [20] นอกจากนี้ยังได้ศึกษาคุณสมบัติในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนของสารสกัดจากดอกแคหัวหมาก่อนอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้น โดยวิธีการอาศัยการวัดปฏิกิริยา Reduction ของ Fe³⁺-TPTZ ไปเป็น Fe²⁺-TPTZ ด้วยวิธี FRAP assay ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับวิธี DPPH

ผลการศึกษายังพบว่าสารสกัดจากดอกแคหัวหมามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Broth dilution โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 1.56 ถึง 200 mg/mL ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในดอกแคหัวหมูคือสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบมากในดอกแคหัวหมามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) ที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับเซลล์ของแบคทีเรีย โดยมีกลไกในการทำลายการสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรตีน (Membrane protein) ส่งผลให้แบคทีเรียเจริญช้าลง นอกจากนั้นสารประกอบฟีนอลิกสามารถเข้าไปจับโปรตีนบนผนังเซลล์ รบกวนการขนส่งผ่านเมมเบรน (Membrane permeability) นอกจากนั้นยังแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแล้วเข้าไปหยุดการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นในการสังเคราะห์กรดอะมิโน ทำให้โปรตีนตกตะกอนสารในเซลล์รั่วไหลออกมาข้างนอกเซลล์ ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียแตก จึงทำลายเซลล์แบคทีเรียได้ [21,22] และจากงานวิจัยยังพบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนของใบและเปลือกต้นดอกแคหัวหมู ที่สกัดด้วยเอทานอลช่วยรักษาโรคผิวหนังบางชนิดและยังช่วยระงับความเจ็บปวดภายในได้ [23] อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยการแยกองค์ประกอบของสารและการแยกเป็นสารบริสุทธิ์ เพื่อให้มีความเข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้มากยิ่งขึ้น

6. สรุปผลการศึกษา

สารสกัดหยาบของดอกแคหัวหมูที่สกัดด้วยเอทานอลนั้น มีองค์ประกอบของสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิก ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *S. mutans*, *S. aureus*, *B. subtilis* และ *E.coli* สารสกัดดอกแคหัวหมูจึงน่าจะมีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพหรือเครื่องสำอางต่อไป เนื่องจากมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมทั้งหมดเท่ากับ 53.71 ± 0.002 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ FRAP assay มีค่าเท่ากับ 43.56 ± 0.044 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 38.43 ± 0.013 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่าสารสกัดจากดอกแคหัวหมูมีค่า MBC มากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมทั้งในหลอดทดลอง และในสัตว์ทดลองต่อไป เพื่อสามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ทั้งในเชิงวิชาการเพื่อต่อยอดผลงานวิจัย และประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหรือยาเพื่อรักษาโรคอันเกิดจากการเกิดอนุมูลอิสระและเชื้อแบคทีเรียได้ อันจะสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับพืชสมุนไพรท้องถิ่นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักวิจัยและพัฒนา วิทยาลัยนครราชสีมา และสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ วิทยาลัยนครราชสีมา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่การทำงานวิจัย เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Zhang Y-J, Gan R-Y, Li S, Zhou Y, Li A-N, Xu D-P, et al. Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. *Molecules*. 2015;20(12):21138–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules201219753>
- Nowak D, Goslinski M, Ktebukowska L. Antioxidant and antimicrobial properties of selected fruit juices. *Plant Foods Hum Nutr*. 2022;77(3):427–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-022-00983-2>
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod [Internet]*. 2007;70(3):461–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/np068054v>
- Abbasi S, Gharaghani S, Benvidi A, Latif A. Identifying the novel natural antioxidants by coupling different feature selection methods with nonlinear regressions and gas chromatography-mass spectroscopy. *Microchem J [Internet]*. 2018;139:372–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2018.03.012>
- Goswami N, Chatterjee S. Assessment of free radical scavenging potential and oxidative DNA damage preventive activity of *Trachyspermum ammi* L. (carom) and *Foeniculum vulgare* Mill. (fennel) seed extracts. *Biomed Res Int*. 2014;2014:582767. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/582767>
- Bardaweel SK, Tawaha KA, Hudaib MM. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of *Anthemis palestina* essential oil. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14(1):297. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-14-297>
- Yaraksa N. Antioxidant Activity of *Markhamia stipulate*, *Caryota maxima*, *Amphineuron marginatum* Extracts and Cytotoxicity Effect on Human Dermal Fibroblast Cells. *RMUTI Journal*. 2019 [cited 2024 May 13];12(2):138–48. Available from: <https://ph01.tci-thaijo.org/index.php/rmutijo/article/view/212880>
- Ribeiro DB, Santos Silva G, Dos Santos DR, Castro Costa AR, Braga Ribeiro E, Badae M, et al. Determination of the antioxidant activity of samples of tea and commercial sources of vitamin C, using an enzymatic biosensor. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(2):324. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/antiox10020324>
- Papas AM. Other Antioxidants. In: *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*. CRC Press; 2019. p. 231–48.
- Devi WR, Singh SB, Singh CB. Antioxidant and anti-dermatophytic properties leaf and stem bark of *Xylosma longifolium* clos. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13(1):155. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-13-155>
- Afsar T, Khan MR, Razak S, Ullah S, Mirza B. Antipyretic, anti-inflammatory and analgesic activity of *Acacia hydaspica* R. Parker and its phytochemical analysis. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15(1):136. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-015-0658-8>
- Yaraksa N. Antibacterial activity against some human pathogenic bacteria and anti-inflammatory activity of five Thai medicinal plant extracts. *CreSci*. 2019 [cited 2024 May 14];11(1):1–10. Available from: https://ph01.tci-thaijo.org/index.php/snru_journal/article/view/130373
- Hoque MM, Rattila S, Shishir MA, Bari ML, Inatsu Y, Kawamoto S. Antibacterial activity of ethanol extract of betel leaf (*Piper betle* L.) against some food borne pathogens. *Banglad J Microbiol [Internet]*. 2012 [cited 2024 May 14];28(2):58–63. Available from: <https://www.banglajol.info/index.php/BJM/article/view/11817>
- Nie J-Y, Zhang Y, Li R, Jiang Z-T, Wang Y, Tan J, et al. Screening of radical scavenging activity and chemical constituents of the essential oil from star anise by ultra-fast GC electronic nose coupled with DPPH, OH, and ABTS assays. *J Food Process Preserv*. 2021;45(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jfpp.15022>
- Kupina S, Fields C, Roman MC, Brunelle SL. Determination of total phenolic content using the folin-C assay: Single-laboratory validation, first action 2017.13. *J AOAC Int*. 2019;102(1):320–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.18-0031>
- Kaisoon O, Siriamornpun S, Weerapreeyakul N, Meeso N. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. *J Funct Foods*. 2011;3(2):88–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2011.03.002>
- Phaiboon N, Pulbutr P, Sungthong B, Rattanakit S. Effects of the ethanolic extracts of guava leaves, licorice roots and cloves on

- the cariogenic properties of streptococcus mutans. Pharmacogn J. 2019;11(5):1029–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.5530/pj.2019.11.162>
18. Torrungruang K. Antibacterial activity of mangosteen pericarp extract against cariogenic Streptococcus mutans. Chulalongkorn University Dental Journal. 2007;30(1):1–10. Available from: <https://digital.car.chula.ac.th/cudj/vol30/iss1/1/>
 19. Mahadlek J, Tuntarawongsa S, Phaechamud T. Antioxidant activity and total phenolic contents of some Thai traditional formulation. Isan J Pharm Sci. 2017;13(1):97–105. Available from: <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/IJPS/article/view/88553>
 20. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. 2006;99(1):191–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
 21. Boulekbache-Makhlouf L, Slimani S, Madani K. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of Eucalyptus globulus cultivated in Algeria. Ind Crops Prod [Internet]. 2013;41:85–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.019>
 22. Karnwal A. In vitro antibacterial activity of Hibiscus rosa sinensis, Chrysanthemum indicum, and Calendula officinalis flower extracts against Gram negative and Gram positive food poisoning bacteria. Advances in Traditional Medicine. 2022;22(3):607–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13596-021-00562-x>
 23. Ibrahim MB, Kaushik N, Sowemimo AA, Odukoya OA. Review of the phytochemical and pharmacological studies of the genus Markhamia. Pharmacogn Rev. 2016;10(19):50–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.4103/0973-7847.176547>