



Research Article

The Antioxidant Activity and Anti *Serratia marcescens* and *Escherichia coli* from fresh and dried *Piper betle* L. Extract

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Serratia marcescens* และ *Escherichia coli* จากสารสกัดหยาบใบพลูสดและแห้ง

นิชดา สารถวัลย์แพศย์¹, ธิติพร พันธุ์บ้านแหลม², ณัฐนิชา จำปาแดง^{3*}
Nichada Santwanpas¹, Tideeporn Punbanlaem², Natnicha Jumpadang^{3*}

¹คณะพยาบาลศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร, 10520

²คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพมหานคร, 10250

³คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยปทุมธานี, ปทุมธานี, 10200

¹Nursing Science, School of Nursing, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520

²Faculty of Nursing, Ramkhamhaeng University, Bangkok, 10250

³Division of Basic and Medical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences, Pathumthani University, Pathum Thani, 12000

Article Info

Received 17 September 2025

Revised 20 March 2025

Accepted 30 June 2025

Abstract

This study investigated the potential therapeutic properties of *Piper betle* L. leaf extract against bacterial infections, particularly gastrointestinal tract including *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Serratia marcescens* (*S. marcescens*). Extracts obtained using dichloromethane and methanol solvents were evaluated for their antioxidant activity, total flavonoids content and total phenolic compound and inhibitory effects on the growth of *S. marcescens* and *E. coli* bacteria. The results revealed that leaf extracts extracted with dichloromethane exhibited broader inhibition zones compared to those extracted with methanol when tested against *E. coli*. Additionally, a trend towards bacterial inhibition was observed for both types of leaf extracts against *S. marcescens* with corresponding of antioxidant activity. These findings suggest that *Piper betle* L. leaf extract holds promise as a natural remedy for bacterial infections including in elderly people and person with immunocompromise. However, further research, including *in vivo* and toxicity studies in animal models, is needed to validate its potential therapeutic use and safety for treating bacterial infection and other bacterial pathogens.

Keywords: *Piper betle* L. extract, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ศึกษาฤทธิ์ทางการรักษาของสารสกัดใบพลู *Piper betle* L. เพื่อการต่อต้านการติดเชื้อแบคทีเรียในกระเพาะอาหารโดยเฉพาะเชื้อ *Escherichia coli* และ *Serratia marcescens* สารสกัดที่ได้ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอลในการสกัด โดยนำสารสกัดที่ได้มาประเมินความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิก และศึกษาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. marcescens* และ *E. coli* ของสารสกัดพลูที่สกัดได้พบว่าสารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนแสดงโซนการยับยั้งที่กว้างกว่าที่สกัดด้วยเมทานอล ทั้งเชื้อ *S. marcescens* และ *E. coli* ยกเว้นสารสกัดใบพลูแห้งตากแดดที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน นอกจากนี้ยังพบแนวโน้มของการยับยั้งแบคทีเรียสำหรับทั้งสารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอลกับเชื้อแบคทีเรียมี

*Corresponding Author. Email: natnicha.j@ptu.ac.th

ผลการทดลองที่สอดคล้องกับการเป็นสารออกซิเดชัน จากการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดใบพลูซึ่งเป็นสารธรรมชาติที่มีศักยภาพสามารถนำมาเป็นทางเลือกสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในผู้สูงอายุและผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมรวมถึงการทดสอบในสัตว์และการทดสอบความเป็นพิษในแบบจำลองที่ใช้สัตว์เพื่อยืนยันการใช้สารสกัดใบพลู ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียและโรคติดเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ในอนาคตรวมทั้งความปลอดภัยในการใช้งาน

คำสำคัญ: สารสกัดใบพลู, เชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens*, เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

1. บทนำ

เชื้อ *Serratia marcescens* [1, 2] และ *Escherichia coli* [3, 4] เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญในระบบสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ [5-7] ทั้งสองเชื้อนี้มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคในมนุษย์สามารถพบเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ตามสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ดิน, น้ำ, อาหาร เป็นต้น เชื้อ *S. marcescens* โดยส่วนใหญ่จะไม่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ [8-10] แต่สามารถฉวยโอกาสในการติดเชื้อได้โดยจะแสดงอาการของโรคขึ้น มักพบว่าเชื้อชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อของผู้ป่วยในโรงพยาบาล [11-13] โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ เช่น ผู้สูงอายุหรือผู้ป่วยในหอพักผู้สูงอายุ ในขณะที่เดียวกัน เชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ [14-16] มีบางสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของโรคที่สามารถถ่ายทอดผ่านการบริโภคอาหารที่ปรุงสุกไม่สะอาดหรือผ่านการสัมผัสโดยตรงกับสิ่งปนเปื้อน สายพันธุ์ที่เป็นอันตรายที่สุดของ *E. coli* คือ *E. coli* O157: H7 [17, 18] ซึ่งสามารถทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงรุนแรงได้ ดังนั้นการป้องกันการติดเชื้อจากทั้งสองชนิดจึงอยู่ที่การรักษาความสะอาดรวมถึงปฏิบัติตามมาตรการอื่น ๆ เช่น การล้างมืออย่างสม่ำเสมอ, การป้องกันการสัมผัสกับสิ่งปนเปื้อนและการรักษาความสะอาดที่มีมาตรฐานในโรงพยาบาลหรืออุตสาหกรรมอาหาร รวมถึงการใช้สารเคมีที่เหมาะสมสำหรับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้จึงเป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อชนิดนี้ด้วย [7], [19-21]

Piper betle L. หรือในชื่อท้องถิ่น "พลู" เป็นพืชที่เป็นที่รู้จักในภูมิภาคเอเชียเป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์มากมายในด้านการแพทย์และเพื่อสุขภาพมนุษย์ [22, 23] ในท้องถิ่นพลูมักถูกใช้ในการรักษาโรคและใช้ในงานพิธีกรรมทางวัฒนธรรม เช่น การบรพพรชีพและพิธีกรรมศาสนา เป็นต้น นอกจากนี้สารสกัดจากพลูยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพมากมาย เช่น มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย [24], มีฤทธิ์ต้านการเกิดเซลล์มะเร็ง [25, 26] และมีฤทธิ์ลดการเกิดอาการอักเสบ ซึ่งมีการศึกษาอย่างกว้างขวางพบว่าสารสกัดจากใบพลูมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญหลายตัว [25, 27] สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ช่วยลดสถานะการเกิดออกซิเดชันของสารชีวโมเลกุลซึ่งเป็นต้นเหตุของความเสียหายต่อโรคเรื้อรัง [28] เช่น โรคหัวใจ [28], มะเร็ง [29, 30], และเบาหวาน [23] สารสกัดที่พบในใบพลูประกอบด้วยสารฟีนอล ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์และสารชีวภาพอื่น ๆ ดังนั้นสารสกัดจากใบพลูจึงมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ป้องกันและรักษาโรคเหล่านั้นได้ [23, 31] นอกจากนี้สารสกัดใบพลูยังได้รับความสนใจในการวิจัยเพิ่มมากขึ้นจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบพลูมีฤทธิ์ต้านเชื้อโรคต่อหลายชนิด เช่นแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส มีการวิจัยชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากใบพลูมีฤทธิ์ต้านเชื้อโรคโดยการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ [32-34] โดยสารเหล่านี้สามารถทำลายเมมเบรนของเซลล์ และรบกวนกระบวนการเผาผลาญของเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นใบพลูจึงเป็นสมุนไพรทางเลือกอีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพเหมาะสำหรับนำมาพัฒนา

เป็นสารต้านเชื้อโรคจากธรรมชาติที่ใช้ในทางการแพทย์ในอนาคต [35, 36] และพัฒนาต่อยอดงานวิจัยที่สามารถนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาในการรักษาโรคติดเชื้อและเชื้อดื้อยาที่พบในปัจจุบัน [37-39] อย่างไรก็ตามสารสำคัญที่สกัดได้จากพืชสดและแห้งมีความแตกต่างกันทั้งในด้านปริมาณและองค์ประกอบเชิงเคมี ความแตกต่างนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและชีวเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการทำแห้ง ซึ่งมีผลต่อความเสถียรและความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) พืชสดมีปริมาณน้ำสูง และยังคงมีเอนไซม์ภายในเซลล์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือไฮโดรไลซิสทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบบางชนิดหลังการเก็บเกี่ยว เช่น การสลายตัวของวิตามินหรือฟลาโวนอยด์ นอกจากนี้ ความชื้นยังเป็นปัจจัยที่เอื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจส่งผลต่อความบริสุทธิ์ของสารสกัด ในทางกลับกัน การทำแห้งพืชสดด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การตากแดด การอบร้อน ส่งผลให้โครงสร้างเซลล์เปลี่ยนแปลงและอาจมีการสูญเสียหรือเสื่อมสภาพของสารสำคัญบางชนิด โดยเฉพาะสารที่ไวต่อความร้อนและแสง เช่น น้ำมันหอมระเหย (essential oils) และวิตามิน C อย่างไรก็ตาม พืชแห้งก็มีความเข้มข้นของสารสำคัญมากขึ้นเมื่อพิจารณาต่อน้ำหนักแห้ง (dry weight) และสามารถเก็บรักษาได้นานโดยมีการเสื่อมสภาพของสารออกฤทธิ์น้อยลง

ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดยาใบพลูสดและแห้งในการต้านอนุมูลอิสระและเชื้อแบคทีเรียที่เป็นต้นเหตุของโรคจากการติดเชื้อจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจในวงการวิจัยทางการแพทย์ [31, 33] งานวิจัยนี้นำเสนอผลการศึกษาเพื่อทำความเข้าใจถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบพลูกับตัวทำละลายเมทานอลและไดคลอโรมีเทน ซึ่งทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียเฉพาะต่อ *S. marcescens* [1, 8] และ *E. coli* [7, 15] ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดโรคในมนุษย์โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันต่ำและผู้สูงอายุ การนิยมใช้ใบพลูของชุมชนในผู้สูงอายุจึงเป็นโอกาสที่จะสามารถเข้าถึงและนำสารสกัดใบพลูไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาต่อยอดวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น ยา เครื่องดื่ม หรือผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพอื่น ๆ เพื่อที่จะช่วยลดการระบาดของโรคและปรับปรุงสุขภาพของผู้สูงอายุ

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมสารสกัดใบพลู

ใบพลูที่ใช้ในการศึกษาได้จาก ต.ทุ่งใหญ่ อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช ช่วงเดือนธันวาคม 2566 เตรียมสารสกัดใบพลูสดโดยการนำใบพลูล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นปั่นใบพลูให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ส่วนใบพลูแห้งต้องนำไปล้างให้สะอาดแล้วนำไปตากแดดจนแห้งกรอบ จากนั้นปั่นใบพลูให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วนำผงพลูทั้ง 2 ชนิด ซึ่งปริมาณ 10 กรัมใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำทำละลายเมทา

นอลหรือไดคลอโรมีเทนลงไปปริมาตร 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วนมวลต่อปริมาตร 1 : 10 โดยมวล/ปริมาตร) แช่ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองสารสกัดใบ พลูด้วยกระดาษกรองแล้วนำสารสกัดที่ได้มาระเหยเพื่อเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) เมื่อเสร็จสิ้นเก็บสารสกัดที่ระเหยแห้งซึ่งน้ำหนักและนำไปสารสกัดใบพลูหยาบที่ได้ไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทดลองต่อไป

2.2 การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบพลู [41]

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดกระทำโดยวิธี Folin-Ciocalteu ในไมโครเพลท 96 well plate นำสารสกัดใบพลูมาละลายในตัวทำละลาย DMSO ให้มีความเข้มข้น 0.0625-1 มิลลิกรัมต่อ1มิลลิลิตร เติมนลงใน 96 well plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 2.0 M Folin-Ciocalteu ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและเติมสารละลาย โซเดียมคาร์บอเนต (NaCO_3) ความเข้มข้น 75 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปิดทับด้วยกระดาษฟลอยด์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดใบพลูโดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานของ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.3 การทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดใบพลู [41]

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมกระทำโดยใช้วิธี colorimetric assay ในไมโครเพลท 96 well plate นำสารสกัดใบพลูความเข้มข้น 0.0625-1 มิลลิกรัมต่อ1มิลลิลิตรในสารละลาย DMSO เติมนลงใน 96 well plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่มีน้ำกลั่น 40 ไมโครลิตร ตามด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้นาน 5 นาที ตามด้วยอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้นาน 6 นาที ตามด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำมาวัดค่า absorbent ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ Quercetin เป็น positive control

2.4 วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging [40]

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบพลูถูกประเมินโดยวิธี DPPH radical scavenging assay ในรูปแบบไมโครเพลท 96 well plate โดยเตรียมสารสกัดในช่วงความเข้มข้น 0.0625-1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายในสารละลาย DMSO เติมนลงใน 96 well plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัมต่อ1มิลลิลิตร ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Microplate reader คำนวณหาค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเทียบกับความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.0625-1 มิลลิกรัมต่อ1มิลลิลิตร รายงาน ผลเป็นค่า

$$\% \text{ Inhibition} = A_0 - A_c \times 100/A_0$$

โดย A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของ DPPH

A_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เมื่อเติมสารสกัดหรือสารมาตรฐาน

2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดใบพลูด้วยวิธี Agar disc diffusion [42]

ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. marcescens* โดยตรวจสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยใช้สารสกัดใบพลูที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อ1มิลลิลิตร มี positive control ใช้ Gentamycin 30 ug โดยใช้ห้วงถ่ายเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเชื้อให้ด้วย PBS buffer ให้ได้ OD เทียบเท่า McFarland 0.5 และใช้ไม้ที่พันด้วยสาลิจุ่มลงในหลอดสารละลายเชื้อ นำมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ดูดสารสกัดใบพลูปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบน paper disc ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm แล้ววาง paper disc บนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (inhibition zone)

2.6 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

สำหรับการวิเคราะห์ทางสถิตินั้นข้อมูลทั้งหมดจะถูกระบุในรูปของ Mean and Standard Deviation (mean $\pm$ SD) (ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง) ซึ่งการคำนวณโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel

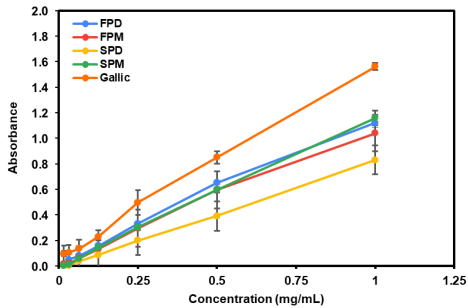
3. ผลการวิจัย

3.1ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมจากสารสกัดใบพลูในตัวทำละลายเมทานอลและไดคลอโรมีเทน

จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณสารสกัดฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบพลูที่ได้จากตัวทำละลายเมทานอลและไดคลอโรมีเทนพบค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามความเข้มข้นของสารสกัด การเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดใบพลูในตัวทำละลายทั้งสองชนิดเริ่มต้นตั้งแต่ 0.01 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อ1มิลลิลิตร โดยตัวบ่งชี้ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวมจะแสดงในรูปแบบ ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) เทียบกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid จากการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดขึ้นเรื่อยๆ ทั้งสารสกัดใบพลูแห้งและสดจากตัวทำละลายทั้งสองชนิดมีค่า absorbent เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามความเข้มข้นของสารสกัดตามลำดับ อย่างไรก็ตามใบพลูทั้งสองชนิดไม่ว่าจะเป็นใบพลูสดหรือตากแห้งที่อยู่ในตัวทำละลายเมทานอลไม่มีความแตกต่างกันแบบมีนัยสำคัญทางสถิติภาพที่ 1 ยกเว้นสารสกัดใบพลูแห้งที่ใช้ไดคลอโรมีเทนในการสกัดจะมีค่าการดูดกลืนแสง ต่ำที่สุดทั้งนี้อาจเป็นเพราะการที่นำใบพลูไปตากแดดส่งผลให้สารสำคัญบางชนิดสูญหายไปและเนื่องจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่มีขั้วต่ำละลายสารออกมาได้น้อยจึงสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการสกัดสารออกมาจากตัวอย่างใบพลูสด และแห้งโดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน ผลการศึกษานี้ช่วยให้เข้าใจถึงการสกัดสารจากใบพลูสด และแห้งว่าจะมีปริมาณสารสำคัญที่ออกมาแตกต่างกันเมื่อใช้

ตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน ดังนั้นการเตรียมตัวอย่างพืช และการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการสกัดสารเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียและทดสอบงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดใบพลูในอนาคต

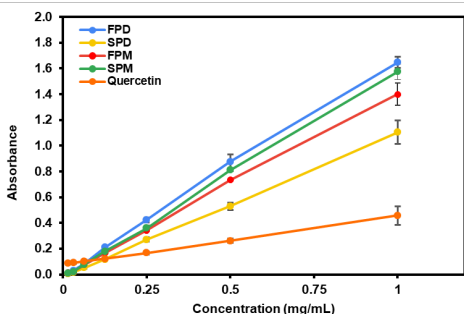
ภาพที่ 1. กราฟแสดงปริมาณค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดใบพลูที่แสดงถึงปริมาณสาร Phenolic compounds กับความเข้มข้น (mg/mL) เปรียบเทียบกับ



กรดแกลลิก (FPD: ใบพลูสดที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน, SPD: ใบพลูตากแดดสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน, FPM: ใบพลูสดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล, SPM: ใบพลูตากแดดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล).

3.2 ปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากสารสกัดใบพลูในตัวอย่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน

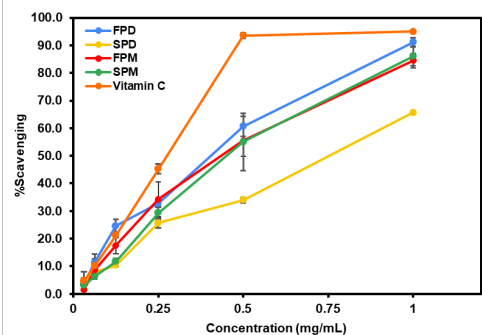
จากผลการศึกษาพบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดใบพลูมีการเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดตั้งแต่ 0.01 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Quercetin ที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยค่า absorbent ของสารสกัดใบพลูสดในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน และเมทานอลเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดลอง ตลอดจนสารสกัดใบพลูแห้งในตัวทำละลายเมทานอลก็มีค่า absorbent เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามความเข้มข้นของสารสกัดเช่นกัน ยกเว้นสารสกัดใบพลูแห้งในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนยังคงมีค่า absorbent ต่ำกว่าสารสกัดที่กล่าวข้างต้น อย่างไรก็ตามสารสกัดจากใบพลูก็ยังมีความเข้มข้นมีค่า absorbent ที่ต่ำกว่าสาร Quercetin อย่างมีนัยสำคัญ ดังภาพที่ 2 การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการสกัดฟลาโวนอยด์จากใบพลูออกมาจากตัวทำละลายเมทานอล และไดคลอโรมีเทนว่ามีประสิทธิภาพในการสกัดได้ดีมาก เพียงแต่สารสกัดจากใบพลูแห้งที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนจะมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ออกมาน้อยกว่า ผลลัพธ์ที่ได้จากการศึกษาช่วยในการเข้าใจและปรับปรุงกระบวนการสกัดสารสกัดใบพลูเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการทดสอบขั้นต่อไปได้



ภาพที่ 2. กราฟแสดงปริมาณค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดใบพลูที่แสดงถึงปริมาณสาร Flavonoid กับความเข้มข้น (mg/mL) เปรียบเทียบกับควอร์เคทิน (Quercetin) (FPD: ใบพลูสดที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน, SPD: ใบพลูตากแดดสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน, FPM: ใบพลูสดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล, SPM: ใบพลูตากแดดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล).

3.3ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH activity ของสารสกัดใบพลูในตัวอย่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน

จากผลการศึกษา 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl assay (DPPH assay) พบว่าสารสกัดใบพลูในตัวอย่างเมทานอลและเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ต่อ DPPH อย่างชัดเจน โดยค่า % scavenging activity เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Vitamin C ภาพที่ 3 ซึ่งสารสกัดใบพลูแห้งและสดในตัวทำละลายเมทานอลแสดงค่า % scavenging activity ที่สูงกว่าสารสกัดใบพลูแห้งในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนในระดับความเข้มข้นที่เทียบเท่ากัน นอกจากนี้สารสกัดใบพลูสดในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนมีค่า % scavenging activity ที่สูงกว่าสารสกัดใบพลูสดในตัวทำละลายเมทานอลในทุกระดับความเข้มข้นที่เทียบเท่ากันแบบมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลลัพธ์จากการศึกษานี้ช่วยให้เข้าใจถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบพลูในการต้านอนุมูลอิสระจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน ซึ่งจากการทดลองการหาปริมาณฟีนอลิกรวม การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจะเห็นว่าผลการทดลองที่ได้จากสารสกัดของใบพลูสดและใบพลูแห้งที่ใช้ตัวทำละลายมีขั้วต่างกันผลลัพธ์ที่ได้สอดคล้องกันและเป็นไปแนวทางเดียวกัน ซึ่งอาจช่วยในการพัฒนาสารสกัดใบพลูในการประยุกต์ใช้ในการศึกษาต่อไป



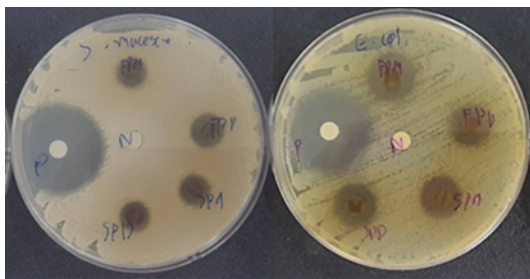
ภาพที่ 3. กราฟแสดงร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%scavenging) กับวิตามินซีที่ความเข้มข้นต่างๆในหน่วย mg/mL. (FPD: ใบพลูสดที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน, SPD: ใบพลูตากแดดสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน, FPM: ใบพลูสดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล, SPM: ใบพลูตากแดดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล).

3.4 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. marcescens* และ *E. coli* ของสารสกัดใบพลูในตัวอย่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอลมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในกรณีของเชื้อ *E. coli* พบว่าสารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีขนาดใหญ่มากกว่าสาร

สกัดเมทานอล ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดใบพลูสดหรือแห้ง โดยมีขนาดโซนยับยั้งประมาณ 17.48 ± 0.42 มิลลิเมตรและ 14.71 ± 2.1 มิลลิเมตรตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีประสิทธิภาพมากกว่าการสกัดด้วยเมทานอลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ดังภาพที่ 4 และตารางที่ 1 สำหรับเชื้อ *S. marcescens* ก็พบว่าสารสกัดใบพลูทั้งสองชนิดที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอลมีโซนยับยั้งเชื้อที่มีขนาดใกล้เคียงกัน โดยมีขนาดโซนยับยั้งประมาณ 12 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสารสกัดใบพลูไม่แตกต่างกันในกรณีของเชื้อ *S. marcescens* จะเห็นได้ว่าสารสกัดใบพลูสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการยับยั้งของสารสกัดอาจจะมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับตัวทำละลายและเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสามารถและปริมาณของสารสกัดที่ได้จะช่วยให้เข้าใจลึกซึ้งเกี่ยวกับคุณสมบัติและประสิทธิภาพของสารสกัดใบพลู

ภาพที่ 4 ภาพขนาดของบริเวณใสจากการทดสอบการแพร่กระจายของสารสกัดใบพลูแผ่นดิสก์บนต่อเชื้อ A) *S. marcescens*, B) *E. coli* *P เป็นยา Gentamycin



ที่ใช้การควบคุมเชิงบวก; N คือสารละลายตัวทำละลาย DMSO ; และสารสกัดจากใบพลู (FPD: สารสกัดจากใบพลูสดด้วยไดคลอโรมีเทน, SPD: สารสกัดจากใบพลูตากแดดด้วยไดคลอโรมีเทน, FPM: สารสกัดจากใบพลูสดด้วยเมทานอล, SPM: สารสกัดจากใบพลูตากแดดด้วยเมทานอล).

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (มม.) ของสารสกัดหยาบจากใบพลูสดและใบพลูแห้งต่อเชื้อ *S. marcescens* และ *E. coli*

Extracts	Inhibition Zone (mm±SD.)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. marcescens</i>
FPD	17.48 ± 0.42	14.67 ± 1.14
FPM	17.99 ± 2.09	12.15 ± 0.03
SPD	14.71 ± 2.13	10.26 ± 0.66
SPM	17.19 ± 0.81	12.20 ± 0.52
Gentamycin	34.13 ± 1.06	34.88 ± 0.28

4 วิจัยรณผลการทดลอง

ผลการทดลองทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาการหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม การหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด การดูฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay และการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* และ *E. coli* ของสารสกัดใบพลูสดและแห้งในตัวทำละลายเมทานอลและไดคลอโรมีเทน โดยไม่ว่าจะเป็นใบพลูสดหรือใบพลูแห้งที่อยู่ในตัวทำละลายในการสกัดชนิดใดก็ตาม ปริมาณสารฟีนอลิกรวมมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นชัดเจนว่าการสกัดสารสกัดใบพลูด้วยเมทานอลหรือไดคลอโรมีเทนนั้นมีผลต่อปริมาณสารสกัดที่เกิดขึ้นที่คล้ายกัน ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับตัวทำละลายทั้งสองชนิดมีความพอเหมาะในการสกัดสารที่เป็นฟีนอลิกเนื่องจากคุณสมบัติที่มีขั้วของฟีนอลิกทำให้ เมทานอลและไดคลอโรมีเทนสามารถสกัดสารเหล่านี้ออกมาได้ จึงนิยมนำสารทั้งสองชนิดมาเป็นการเลือกที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญของพืชในห้องปฏิบัติการ โดยทั่วไปสารฟีนอลิก ที่พบในพืชใบพลูมีหลายชนิดได้แก่ gallic acid คาเฟอิค caffeic acid รวมถึง chlorogenic acid ที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระและการเกิดการอักเสบ นอกจากนี้ยังมีสารพวก Lignanng เช่น ไพโนเรซิน pinoresinol sesamin ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ อีกทั้งยังพบสาร phenolic glycosides ที่สามารถยับยั้งเชื้อและมีคุณสมบัติฆ่าเซลล์มะเร็งได้เช่นกัน นอกจากนี้สารสกัดใบพลูแห้งในตัวทำละลายเมทานอลมีความสามารถในการสกัดสารฟลาโวนอยด์ได้มากกว่าไดคลอโรมีเทน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบพลูแห้งในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนมีฟลาโวนอยด์ต่ำกว่าสารสกัดใบพลูแห้งในตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งอาจแสดงถึงประสิทธิภาพในการสกัดสารฟลาโวนอยด์ที่ต่ำกว่าในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนเนื่องจากใบพลูแห้งมีปริมาณสารสำคัญสูญหายไปบางส่วนจึงทำให้การใช้สารละลายที่มีขั้วต่ำสกัดสารออกมาได้น้อยลงเช่นกัน แต่การสกัดใบพลูด้วยไดคลอโรมีเทนแสดงปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากกว่าเมทานอลเนื่องจากใบพลูสดมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลักและน้ำเป็นตัวช่วยในการละลายสารฟลาโวนอยด์ออกมาปริมาณที่มากกว่า (dynamic extraction process) ดังนั้นผลการศึกษาครั้งนี้มีความสำคัญสำหรับการนำไปปรับปรุงกระบวนการสกัดสารสกัดใบพลูเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการทดสอบขั้นต่อไปได้ดีขึ้น สารฟลาโวนอยด์ที่พบในใบพลูได้แก่ myricetin Luteolin ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและลดการอักเสบรวมถึงยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังมีสาร apigenin kaempferol quercetin ที่เป็นสารสำคัญในใบพลูที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันโรคจากเซลล์ประสาทเสื่อม รวมทั้งยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย สารสกัดใบพลูที่ใช้ตัวทำละลายเมทานอลและไดคลอโรมีเทนเป็นที่น่าสนใจอย่างมากเนื่องจากพบว่าทั้งสารสกัดใบพลูในตัวทำละลายเมทานอลและไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างชัดเจน สารสกัดใบพลูสดในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนมีค่า % scavenging activity ที่สูงกว่าในตัวทำละลายเมทานอล ยกเว้นการสกัดใบพลูแห้งเมื่อเทียบในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน ทำให้เห็นถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบพลูในตัวทำละลายเมทานอลและไดคลอโรมีเทนที่มีประโยชน์ในการป้องกันการเกิดอันตรายจากอนุมูลอิสระในร่างกาย มีงานวิจัยรายงานพบว่าสารสกัดใบพลูไม่จะเป็นตัวทำลายสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น เมทานอล เอนทานอล ไดคลอโรมีเทน เฮกเซน เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม หรือน้ำ ล้วนแต่มีประสิทธิภาพในการ

สกัดและส่งผลต่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบพลู แต่อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระยังคงต้องได้รับการศึกษาและการตรวจสอบเพิ่มเติมเพื่อให้เข้าใจถึงคุณสมบัติของสารสกัดใบพลูได้อย่างละเอียดมากขึ้น เช่นความสามารถในการละลาย สารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบ รวมถึงความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมที่ต้องคำนึงเป็นหลักสำคัญในการสกัด นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบพลูทั้งสองชนิดในสองตัวทำลายต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. marcescens* และ *E. coli* พบว่า พืชสดที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีโซนยับยั้งที่กว้างกว่าเมทานอลเมื่อถูกทดสอบกับเชื้อ *E. coli* ในขณะที่เดียวกันยังพบแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อของสารสกัดดังกล่าวในเชื้อ *S. marcescens* อีกด้วย มีหลายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดพินอลในใบพลู มีความสามารถเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโต (bacteriostatic) และ สารทำลายเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal) ซึ่งสารชนิดนี้จะไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อโรคทำให้เชื้อแบคทีเรียถูกทำลาย. รวมทั้ง carboxyl group ใน aromatic hydrocarbons ของสารที่พบในใบพลูยังสามารถไปจับกับโครงสร้างของแบคทีเรียทำให้เสียสภาพและไม่สามารถติดเชื้อได้ ซึ่งมีรายงานว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้โดยเฉพาะโครงสร้างที่เป็นผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิด รวมทั้งทำให้เซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียเสียสภาพไปอีกด้วย

จากงานวิจัยนี้ นอกจากตัวทำลายที่ใช้ในการสกัดใบพลูแล้วผู้วิจัยได้สนใจความเป็นไปได้ของฤทธิ์ทางชีวภาพของใบพลูแห้งและสดที่นำมาทดสอบว่ามีปริมาณสารที่พบรวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน เนื่องจากสารสกัดใบพลูแห้งในตัวทำลายไดคลอโรมีเทนแสดงผลการทดลองได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับใบพลูสด อาจเป็นเพราะใบพลูสดยังมีสารสำคัญที่มีปริมาณมากกว่า รวมถึงอาจไม่ถูกทำลายหรือระเหยไปเนื่องจากรังสียูวีและความร้อนจากแสงแดดรวมทั้งการมีน้ำเป็นส่วนประกอบหลักทำให้มีความสามารถในการสกัดและการละลายในการทำให้สารออกมาจากใบพลูได้มากกว่า ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อปริมาณสารสำคัญได้ ดังนั้นการเลือกวิธีเก็บตัวอย่างพืชและการสกัดจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการรักษาปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อให้สอดคล้องกับบริบทของชุมชนในผู้สูงอายุและเป็นผลดีต่อการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดใบพลูมาใช้ในการงานด้านการแพทย์หรืออุตสาหกรรมอาหารที่เป็นเรื่องที่น่าสนใจในอนาคต

5 สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดใบพลู มีศักยภาพมากเป็นแหล่งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่โดดเด่นในการต้านอนุมูลอิสระและในการรักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียโดยเฉพาะอาการของการติดเชื้อในทางเดินอาหารและไวต่อการติดเชื้อต่อผู้สูงอายุและภูมิคุ้มกันอ่อนแอ อย่างไรก็ตามสารสกัดใบพลูจำเป็นต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติมก่อนที่จะนำมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารจากแบคทีเรียและเชื้อชนิดอื่นๆ รวมถึงการหาสารสำคัญหลักเพื่อที่จะทดสอบในสัตว์ทดลองและการทดสอบความเป็นพิษต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Tavares-Carreón, F.; De Anda-Mora, K.; Rojas-Barrera, I. C.; Andrade, A., *Serratia marcescens* antibiotic resistance mechanisms of an opportunistic pathogen: a literature review. *PeerJ* 2023, 11, e14399.
2. Bello Gonzalez, T. d. J.; van Gelderen, B.; Harders, F.; Vloet, R.; Voorbergen-Laarman, M.; de Ruiter, B.; Haenen, O. L., Molecular Characterization of *Serratia marcescens* Strain Isolated from Yellow Mealworms, *Tenebrio molitor*, in The Netherlands. *Insects* 2023, 14 (9), 770.
3. Allocati, N.; Masulli, M.; Alexeyev, M. F.; Di Ilio, C., *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International journal of environmental research and public health* 2013, 10 (12), 6235-6254.
4. Harrington, S. M.; Dudley, E. G.; Nataro, J. P., Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS microbiology letters* 2006, 254 (1), 12-18.
5. ทิพย์รัตน์, ป.; คงทวีเลิศ, ป.; ดวงนิล, ณ.; จุลศรีไกรวัล, ส.; จันทราภิมิตร, พ.; ปิ่นมณี, ส., ฤทธิ์ต้านอักเสบต่อเซลล์ผิวหนังและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดเมทานอลจากใบกล้วยงาช้าง: ฤทธิ์ต้านอักเสบและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดจากใบกล้วยงาช้าง. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์* 2023, 65 (3), 145-168.
6. Abreo, E.; Altier, N., Pangenome of *Serratia marcescens* strains from nosocomial and environmental origins reveals different populations and the links between them. *Scientific Reports* 2019, 9 (1), 46.
7. Su, C.; Brandt, L. J., *Escherichia coli* O157: H7 infection in humans. *Annals of internal medicine* 1995, 123 (9), 698-707.
8. Yu, V. L., *Serratia marcescens*: historical perspective and clinical review. *New England Journal of Medicine* 1979, 300 (16), 887-893.
9. Acar, J. F., *Serratia marcescens* infections. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 1986, 7 (5), 273-280.
10. Cristina, M. L.; Sartini, M.; Spagnolo, A. M., *Serratia marcescens* infections in neonatal intensive care units (NICUs). *International journal of environmental research and public health* 2019, 16 (4), 610.
11. Hejazi, A.; Aucken, H.; Falkiner, F., Epidemiology and susceptibility of *Serratia marcescens* in a large general hospital over an 8-year period. *Journal of Hospital Infection* 2000, 45 (1), 42-46.
12. Passaro, D. J.; Waring, L.; Armstrong, R.; Bolding, F.; Bouvier, B.; Rosenberg, J.; Reingold, A. W.; McQuitty, M.; Philpott, S. M.; Jarvis, W. R., Postoperative *Serratia*

- marcescens wound infections traced to an out-of-hospital source. *Journal of Infectious Diseases* 1997, 175 (4), 992-995.
13. Millán-Lou, M. I.; López, C.; Bueno, J.; Pérez-Laguna, V.; Lapresta, C.; Fuertes, M. E.; Rite, S.; Santiago, M.; Romo, M.; Samper, S., Successful control of *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal unit of a tertiary-care hospital in Spain. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica* (English ed.) 2022, 40 (5), 248-254.
14. Puvača, N.; de Llanos Frutos, R., Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from humans and pet animals. *Antibiotics* 2021, 10 (1), 69.
15. Johnson, J. R.; Owens, K.; Gajewski, A.; Clabots, C., *Escherichia coli* colonization patterns among human household members and pets, with attention to acute urinary tract infection. *The Journal of infectious diseases* 2008, 197 (2), 218-224.
16. Toombs-Ruane, L. J.; Benschop, J.; French, N. P.; Biggs, P. J.; Midwinter, A. C.; Marshall, J. C.; Chan, M.; Drinković, D.; Fayaz, A.; Baker, M. G., Carriage of extended-spectrum-beta-lactamase-and AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains from humans and pets in the same households. *Applied and environmental microbiology* 2020, 86 (24), e01613-20.
17. Lim, J. Y.; Yoon, J. W.; Hovde, C. J., A brief overview of *Escherichia coli* O157: H7 and its plasmid O157. *Journal of microbiology and biotechnology* 2010, 20 (1), 5.
18. Mead, P. S.; Griffin, P. M., *Escherichia coli* O157: H7. *The Lancet* 1998, 352 (9135), 1207-1212.
19. Korzeniewska, E.; Korzeniewska, A.; Harnisz, M., Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicology and environmental safety* 2013, 91, 96-102.
20. Fasugba, O.; Gardner, A.; Mitchell, B. G.; Mnatzaganian, G., Ciprofloxacin resistance in community-and hospital-acquired *Escherichia coli* urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMC infectious diseases* 2015, 15, 1-16.
21. Daga, A. P.; Koga, V. L.; Soncini, J. G. M.; de Matos, C. M.; Perugini, M. R. E.; Pelisson, M.; Kobayashi, R. K. T.; Vespero, E. C., *Escherichia coli* bloodstream infections in patients at a university hospital: virulence factors and clinical characteristics. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2019, 9, 191.
22. Pradhan, D.; Suri, K.; Pradhan, D.; Biswasroy, P., Golden heart of the nature: *Piper betle* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2013, 1 (6), 147-167.
23. Rekha, V.; Kollipara, M.; Gupta, B.; Bharath, Y.; Pulicherla, K. K., A review on *Piper betle* L.: nature's promising medicinal reservoir. *American Journal of Ethnomedicine* 2014, 1 (5), 276-289.
24. Nayaka, N. M. D. M. W.; Sasadara, M. M. V.; Sanjaya, D. A.; Yuda, P. E. S. K.; Dewi, N. L. K. A. A.; Cahyaningsih, E.; Hartati, R., *Piper betle* (L): Recent review of antibacterial and antifungal properties, safety profiles, and commercial applications. *Molecules* 2021, 26 (8), 2321.
25. Dasgupta, N.; De, B., Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract in vitro. *Food chemistry* 2004, 88 (2), 219-224.
26. Ali, I.; Khan, F. G.; Suri, K. A.; Gupta, B. D.; Satti, N. K.; Dutt, P.; Afrin, F.; Qazi, G. N.; Khan, I. A., In vitro antifungal activity of hydroxychavicol isolated from *Piper betle* L. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 2010, 9, 1-9.
27. Alam, B.; Akter, F.; Parvin, N.; Pia, R. S.; Akter, S.; Chowdhury, J.; Sifath-E-Jahan, K.; Haque, E., Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory activities of the methanolic extract of *Piper betle* leaves. *Avicenna journal of phytomedicine* 2013, 3 (2), 112.
28. Lubis, R. R.; Wahyuni, D. D., Antibacterial activity of betle leaf (*Piper betle* L.) extract on inhibiting *Staphylococcus aureus* in conjunctivitis patient. *American journal of clinical and experimental immunology* 2020, 9 (1), 1.
29. Kudva, A. K.; Rao, S.; Rao, P.; Periera, R.; Bhandari, G.; Mathew, J. M.; Ashwini, K.; Pais, M. L.; Swamy, M. K.; Baliga, M. S., *Piper betle* Linn. in cancer: past, present, and future. *Anticancer plants: Properties and Application: Volume 1* 2018, 327-347.
30. Majumdar, A. G.; Subramanian, M., Hydroxychavicol from *Piper betle* induces apoptosis, cell cycle arrest, and inhibits epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Biochemical pharmacology* 2019, 166, 274-291.
31. Jayalakshmi, B.; Raveesha, K.; Murali, M.; Amruthesh, K., Phytochemical, antibacterial and antioxidant studies on leaf extracts of *Piper betle* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2015, 7 (10), 23-29.
32. Ahsana, D., The Effectiveness Of Education And Workshop For Making Natural Disinfectants With Antiseptics From Water Steam Of *Piper betle* Leaves In The Production Warehouse Telaga Bidadari Village. *Prosiding Pengembangan Masyarakat Mandiri*

- Berkemajuan Muhammadiyah (Bamara-Mu) 2021, 1 (1), 98-109.
33. Dewi, B. E.; Tannardi, K.; Sudiro, T. M., The potency of piper betle leave extract as antiviral drug to dengue virus in vitro. Teikyo Medical Journal 2021, 44 (2), 677-686.
34. Tu Quy, P.; Thi Ai My, T.; Thi Thanh Hai, N.; Bui, T. Q.; Tuan Quang, D.; Thanh Triet, N.; Phuoc Hien, P.; Thi Ai Nhung, N., A computational screening on inhibitability of piper betle essential oil chemical structures against spike proteins of mutated SARS-CoV-2-variants D614G, N501Y, and S477N. Smart Science 2022, 10 (3), 246-263.
35. Das, S.; Parida, R.; Sriram Sandeep, I.; Nayak, S.; Mohanty, S., Biotechnological intervention in betelvine (Piper betle L.): A review on recent advances and future prospects. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2016, 9 (10), 938-946.
36. Saravanan, R.; Rajendra Prasad, N.; Pugalendi, K. V., Effect of Piper betle leaf extract on alcoholic toxicity in the rat brain. J Med Food 2003, 6 (3), 261-5.
37. Rekha, V. P. B.; Kollipara, M.; Gupta, B.; Bharath, Y.; Pulicherla, K. K., A Review on Piper betle L.: Nature's Promising Medicinal Reservoir. American Journal of Ethnomedicine 2014, 1, 276-289.
38. Haslan, H.; Suhaimi, F. H.; Thent, Z. C.; Das, S., The underlying mechanism of action for various medicinal properties of Piper betle (betel). Clin Ter 2015, 166 (5), 208-14.
39. Lubis, R. R.; Marlisa; Wahyuni, D. D., Antibacterial activity of betle leaf (Piper betle L.) extract on inhibiting Staphylococcus aureus in conjunctivitis patient. Am J Clin Exp Immunol 2020, 9 (1), 1-5.
40. Baliyan, S.; Mukherjee, R.; Priyadarshini, A.; Vibhuti, A.; Gupta, A.; Pandey, R. P.; Chang, C.-M., Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of Ficus religiosa. Molecules 2022, 27 (4), 1326.
41. Saeed, N.; Khan, M. R.; Shabbir, M., Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts Torilis leptophylla L. BMC complementary and alternative medicine 2012, 12, 1-12.
42. Domig, K. J.; Mayrhofer, S.; Zitz, U.; Mair, C.; Petersson, A.; Amtmann, E.; Mayer, H. K.; Kneifel, W., Antibiotic susceptibility testing of Bifidobacterium thermophilum and Bifidobacterium pseudolongum strains: Broth microdilution vs. agar disc diffusion assay. International Journal of Food Microbiology 2007, 120 (1-2), 191-195.