

ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะเปรียง

Antibacterial and Antioxidant Activity of Nam-Nam Fruit Extract

อรอนงค์ สมทรัพย์^{1*}, กรกนก พิบูลย์ผล¹, คอลิพ ปะหยังหลี¹, จารุวรรณ แดงโรจน์²
On-Anong Somsap^{1*}, Gorganak Piboonpol¹, Kolip Payanglee¹, Charuwan Daengrot²

(Received: December 21, 2018; Revised: February 11, 2019; Accepted: March 4, 2019)

บทคัดย่อ

สารสกัดจากสมุนไพรเป็นทางเลือกหนึ่งในการยับยั้งแบคทีเรียและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดผลมะเปรียงต่อการยับยั้งแบคทีเรียและการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดผลมะเปรียงทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าน้ำมะเปรียงสดและสารสกัดด้วยเอทานอลยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* ATCC11778 ไวต่อสารสกัดทั้งสองแบบมากที่สุด โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 17 และ 25 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ยับยั้งระหว่างสารสกัดผลมะเปรียงกับยาปฏิชีวนะ (Gentamicin, 10 ไมโครกรัม) พบว่า MRSA142 ไวต่อสารสกัดผลมะเปรียงแต่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ค่า MIC ของน้ำมะเปรียงสดและสารสกัดด้วยเอทานอลในการต้าน MRSA142 เท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH พบว่าน้ำมะเปรียงสดและสารสกัดด้วยเอทานอลมี % Inhibition มากกว่า 50% ที่ความเข้มข้น 71.21 และ 76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในน้ำมะเปรียงสดและสารสกัดด้วยเอทานอลเท่ากับ 5.48 และ 7.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: มะเปรียง ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เอ็มอาร์เอสเอ142

Abstract

Medicinal plant extract is recognized as antibacterial and antioxidant substance. This research aimed to investigate the efficacy of Nam-Nam fruit extract to against bacterial and antioxidant activity. Antibacterial activity was determined by agar well diffusion method. The results showed that only Gram-positive bacteria susceptible to Nam-Nam fresh fruit juice and ethanol extract. *Bacillus cereus* ATCC11778 showed susceptibility to Nam-Nam-fresh fruit juice and ethanol extract with inhibition zone of 17 and 25 mm, respectively. Comparison antibacterial activity between Nam-Nam fruit extract with gentamicin (10 ug) it was found that both extract of Nam-Nam fruit against MRSA142 was 500 mg/ml. For the study of antioxidant activity was determined by using DPPH solution. The result showed antioxidant activity more than 50% inhibition at concentration of 71.21 and 76 mg/ml, respectively. Moreover, the total flavonoids content in both of Nam-Nam fruit extract were 5.48 and 7.10 mg/ml, respectively.

Keywords: Nam-Nam, Antibacterial, Antioxidant, MRSA142

¹ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

¹ Faculty of Medicine, Princess of Naradhiwas University

² คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

² Faculty of Science and Technology, Princess of Naradhiwas University

^{1*} Corresponding



บทนำ

การดื้อยาของแบคทีเรียเป็นปัญหาใหญ่ทั่วโลกโดยเฉพาะประเทศกำลังพัฒนา สาเหตุหลักในการดื้อยาของแบคทีเรียเริ่มต้นเกิดจากความสามารถของยาที่ลดลงในการต้านการเจริญของแบคทีเรีย นอกจากนี้การดื้อยาอาจมาจากปัจจัยอื่น เช่น ความเข้มข้นของยาที่ใช้ระหว่างการรักษาไม่เหมาะสม ส่งผลให้การดื้อยายังคงต่อเนื่องในอนาคต และสารสกัดจากพืชจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้เป็นยาในการยับยั้งแบคทีเรียดื้อยา เนื่องจากพืชให้สารสำคัญหลายชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) อัลคาลอยด์ (Alkaloid) ไกลโคไซด์ (Glycoside) (Das, Tiwari & Shrivastava, 2010) นอกจากนี้พืชสมุนไพรถูกนำมาใช้ในการแพทย์เพื่อใช้เป็นยาทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อ (Singh, Gupta & Saraf, 2012)

มะเปรียง (*Cynometra cauliflora* L.) เป็นไม้ยืนต้น มีความสูง 3-5 เมตร มีดอกและผลที่ขรุขระบริเวณลำต้นและกิ่งขนาดใหญ่ โดยลำต้นมีสีน้ำตาลเทาและมีความแข็งแรง เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae พบได้ทั่วไปทางภาคตะวันออกและภาคเหนือของแหลมมลายูและกระจายไปยังภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และอินเดีย (Vichakaset, 2016) มะเปรียงเป็นผลไม้พื้นบ้านที่ปลูกโดยทั่วไปในจังหวัดนราธิวาส มีคุณค่าทางโภชนาการ และเป็นผลไม้ที่ติดต่อดูสุขภาพ น้ำต้มใบมะเปรียงมีการใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาเบาหวานและรักษาภาวะไขมันในเลือดสูง (Aziz & Iqbal, 2013; Ado, Abas, Mohammed & Ghazali, 2013) และจากการวิเคราะห์คุณสมบัติของสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ในสารสกัดทุกส่วนของมะเปรียง เช่น ใบ ผล เปลือกพบว่า มีซาโปนิน (Saponin) แทนนิน (Tannin) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ส่วนเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoid) พบเฉพาะในใบและผล สำหรับ Cardiac glycoside พบทั้งในใบแก่และใบอ่อนรวมทั้งเปลือกไม้ แต่ไม่พบในเนื้อไม้ (Aziz & Iqbal, 2013)

ผลมะเปรียงมีองค์ประกอบทางเคมีมากมาย ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เส้นใย คาร์โบไฮเดรต วิตามินซี แคลเซียม สังกะสี เหล็ก โซเดียม ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก (Khoo, Azlan, Kong & Ismail, 2016) โดยเฉพาะสารกลุ่มฟีนอลิกซึ่งพบได้มากในผักและผลไม้ เช่น วิตามินซี (Ascorbic acid) วิตามินอี (Tocopherol) และสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) (Sopittummakhun & Rattanasinganchan, 2017) สารสกัดผลมะเปรียงให้ค่าสารกลุ่มฟีนอลิกและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง รวมถึงยับยั้งมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Rabeta, Chan, Neda, Lam & Ong, 2013; Tajudin et al., 2012) และมีรายงานว่าในสารสกัดผลมะเปรียงที่มีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกที่สูงไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่ถึง 50% เมื่อเทียบกับสารสกัดอื่นๆ (Ikram et al., 2009) และพบว่าสารสกัดผลมะเปรียงยังมีฤทธิ์ในการต้านกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Ado et al., 2013) นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากผลมะเปรียงยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* โดยมีบริเวณยับยั้ง 16 มิลลิเมตร (Sukandar & Amelia, 2013)

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดผลมะเปรียงด้วยเอทานอลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะเปรียงด้วยเอทานอล

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การสกัดสารจากผลมะเปรียง

1.1 การสกัดสารจากผลมะเปรียงด้วยเอทานอล

ผลมะเปรียงที่ใช้ในการทดลองเป็นมะเปรียงไทย ที่ปลูกในเขตพื้นที่จังหวัดนราธิวาส การเตรียมสารสกัดผลมะเปรียงทำได้โดย ปอกเปลือกและนำเมล็ดออก นำส่วนเนื้อของผลมะเปรียงหั่นเป็นแผ่นบางๆ แล้วนำไปแช่สกัดด้วย 95% เอทานอล เป็นเวลา 3 วัน สกัดซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอทานอลด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบหมุน

Rotary Evaporator จนแห้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จนแห้งสนิท ได้สารสกัดหยาบเป็นของหนืดสีน้ำตาลเข้ม เก็บรักษาสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.2 การสกัดสารจากผลไม้เปรี้ยวด้วยวิธีคั้นสด

ปอกเปลือกและนำเมล็ดออก นำส่วนเนื้อของผลไม้เปรี้ยวไปปั่นเป็นแผ่นบางๆ แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ จากนั้นกรองเอาเฉพาะน้ำมะเปรี้ยวด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปทำให้เป็นแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้เปรี้ยวต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar well diffusion

2.1 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

แบคทีเรีย 7 สายพันธุ์คือ (1) *Pseudomonas aeruginosa* TISTR1467 (2) *Escherichia coli* ESB182 (3) *Micrococcus luteus* TISTR884 (4) *Staphylococcus aureus* TISTR517 (5) *Salmonella typhimurium* TISTR292 (6) *Bacillus cereus* ATCC 11778 (7) MRSA142

นำมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Luria Bertani Broth (LB) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อเลี้ยงในอาหารเหลว LB เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และนำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบมาปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 0.5 Mcfarland (1.5×10^8 CFU/ml) ด้วย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์

2.2 การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้เปรี้ยวด้วยวิธี Agar well diffusion

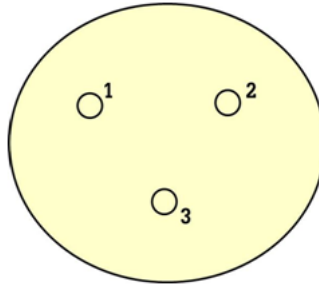
นำเชื้อในข้อ 2.1 มาตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้เปรี้ยวด้วยวิธี Agar well diffusion (ภาพที่ 1) โดยนำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบมาทำการเกลี่ย (Swab) ให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ด้วยไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (Cotton swab) จากนั้นเจาะหลุมด้วยชุดทึบปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เติมน้ำสารสกัดผลไม้เปรี้ยวที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (Inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier caliper) ในหน่วยมิลลิเมตร บันทึกผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้ยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน (Gentamicin) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวก และใช้ DMSO เป็นชุดควบคุมที่แสดงผลลบ

2.3 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดผลไม้เปรี้ยวที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration; MIC) และการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดผลไม้เปรี้ยวที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration; MBC)

หาค่า MIC ด้วยวิธี Agar well diffusion method โดยนำสารสกัดที่มีบริเวณโซนยับยั้ง (Inhibition zone) จากข้อ 2.2 มาเตรียมสารสกัดความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางลงทีละ 2 เท่า (Serial dilution) ด้วย DMSO จะมีค่าความเข้มข้นสารสกัดระหว่าง 62.5 - 1,000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบความเข้มข้น 10^6 CFU/มิลลิลิตร มาทำการ swab บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB จากนั้นทำการเจาะหลุมด้วยทึบปราศจากเชื้อ เติมน้ำสารสกัดผลไม้เปรี้ยวที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในแต่ละหลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 -24 ชั่วโมง การอ่านผลหาค่า MIC สังเกตบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ทดสอบและวัดขนาดบริเวณยับยั้งด้วย Vernier caliper เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง



หาค่า MBC โดยใช้วิธี streak plate โดยเขียนเชื้อจากบริเวณยับยั้งของค่า MIC ที่ความเข้มข้นต่ำสุด อย่างน้อย 2 ความเข้มข้น นำมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ใหม่ นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง อ่านผลหาค่า MBC หากสารสกัดผลไม้เปรี้ยวสามารถฆ่าเชื้อได้จะแสดงผลลบ คือ ไม่มีโคโลนีของเชื้อปรากฏ ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดผลไม้เปรี้ยวที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้คือค่า MBC โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง



ภาพที่ 1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion (หลุมที่ 1 คือ สารสกัดผลไม้เปรี้ยว; หลุมที่ 2 คือ ยาปฏิชีวนะ Gentamicin (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร); หลุมที่ 3 คือ ชุดควบคุม (DMSO))

3. ทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัด (ดัดแปลงจากวิธีของ Murugan, Mishra & Paul, 2018)

3.1 การทำกราฟมาตรฐานของวิตามินซี (Ascorbic acid) กับสารละลาย DPPH

ซึ่ง ascorbic acid 0.01 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเข้มข้น (stock solution) 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับชุดควบคุมคือการผสมกันระหว่างสารละลาย DPPH กับ เมทานอล นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร บันทึกค่า (A_0) ขณะที่ blank ใช้เมทานอลอย่างเดียว

นำสารละลายวิตามินซีแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร บันทึกค่า (A_{30}) แล้วคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH (% Radical scavenging) จากสูตร

$$\% \text{ Radical scavenging} = [(A_0 - A_{30}) / A_0] \times 100$$

A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงสารละลาย DPPH ก่อนทำปฏิกิริยา

A_{30} คือ ค่าการดูดกลืนแสงสารละลาย DPPH หลังทำปฏิกิริยาเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที

3.2 การทดสอบสารสกัดผลไม้เปรี้ยวกับสารละลาย DPPH

เจือจางสารสกัดผลไม้เปรี้ยวให้ได้ความเข้มข้นที่ 12.5, 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดของแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (A_{30}) รายงานผลเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ascorbic acid

จากนั้นคำนวณค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้ 50%) จากกราฟระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัด

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์

การทดลองนี้ดัดแปลงจากวิธีการของ Dewanto, Wu, Adom & Liu, 2002; Barreira, Ferreira, Oliveira & Pereira, 2010 โดยนำสารสกัดผสมเบรียงปริมาตร 40 ไมโครลิตรผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำละลาย 5% NaNO_2 ปริมาตร 60 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม สารละลาย 10% AlCl_3 ปริมาตร 120 ไมโครลิตร และเติมน้ำละลาย 1 โมลาร์ NaOH ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดผสมเบรียงเทียบโดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐาน Quercetin ที่ความเข้มข้น 1 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รายงานผลเป็น มิลลิกรัม Quercetin ต่อกรัมน้ำหนักสด

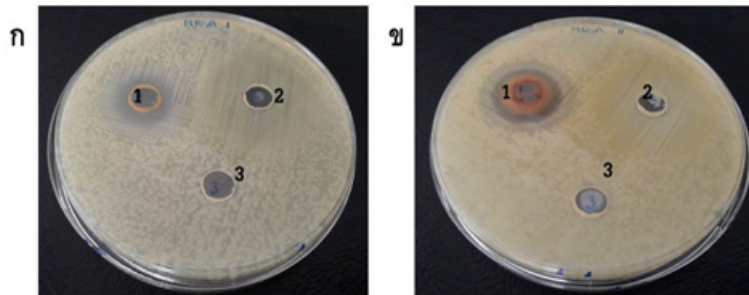
ผลการวิจัย

1.ฤทธิ์ของสารสกัดผสมเบรียงต่อการยับยั้งแบคทีเรีย

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผสมเบรียงที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าน้ำมะเบรียงสดและสารสกัดผสมเบรียงด้วยเอทานอล สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดังตารางที่ 1 โดยน้ำมะเบรียงสดและสารสกัดด้วยเอทานอลยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 ได้ดีที่สุด นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งระหว่างน้ำมะเบรียงสด สารสกัดด้วยเอทานอลกับยาปฏิชีวนะ (Gentamicin) ในการยับยั้ง MRSA142 พบว่าน้ำมะเบรียงสดและสารสกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้ง MRSA142 ได้ดีเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ (Gentamicin) เนื่องจาก MRSA142 ไวต่อสารสกัดผสมเบรียงแต่ดื้อต่อยา Gentamicin ดังภาพที่ 2 ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR1467, *Escherichia coli* ESBL182 และ *Salmonella typhimurium* TISTR292 ดื้อต่อฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมะเบรียงสดและสารสกัดด้วยเอทานอล และเมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งแบคทีเรียระหว่างน้ำมะเบรียงสดและสารสกัดด้วยเอทานอลพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าน้ำมะเบรียงสด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดผสมเบรียง

แบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบ (Indicator strains)	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) (Inhibition zone)		
	น้ำมะเบรียงสด (500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารสกัดด้วยเอทานอล (500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	Gentamicin (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TISTR1467	-	-	37±0.001
<i>Escherichia coli</i> ESBL182	-	-	28±0.001
<i>Salmonella typhimurium</i> TISTR292	-	-	40±0.001
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	17.00±0.001	25.00±0.001	38±0.001
<i>Micrococcus luteus</i> TISTR884	12.00±0.001	20.00±0.001	35±0.001
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR517	14.00±0.001	21.00±0.001	38±0.001
MRSA142	15.00±0.001	18.00±0.001	-



ภาพที่ 2 แสดงฤทธิ์ยับยั้ง MRSA142 ของสารสกัดผลมะเปรียง (ก) น้ำมะเปรียงสด (ข) สารสกัดด้วยเอทานอล (หลุมที่ 1 คือ สารสกัดผลมะเปรียง (500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร), หลุมที่ 2 คือ ยาปฏิชีวนะ (Gentamicin 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), หลุมที่ 3 คือ ชุดควบคุม (DMSO))

2. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดผลมะเปรียงที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดผลมะเปรียงที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration; MBC)

ค่า MIC ของน้ำมะเปรียงสดต่อเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778, *M. luteus* TISTR884, *S. aureus* TISTR517 และ MRSA142 เท่ากันคือ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MIC ของสารสกัดผลมะเปรียงด้วยเอทานอลต่อเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778, *M. luteus* TISTR884, *S. aureus* TISTR517 และ MRSA142 คือ 250, 250, 500 และ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่น้ำมะเปรียงสดมีค่า MBC ต่อเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778, *M. luteus* TISTR884, *S. aureus* TISTR517 และ MRSA142 เท่ากับ 500, 500, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าค่า MBC ของสารสกัดผลมะเปรียงด้วยเอทานอลต่อเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778, *M. luteus* TISTR884, *S. aureus* TISTR517 และ MRSA142 คือ 250, 500, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 2

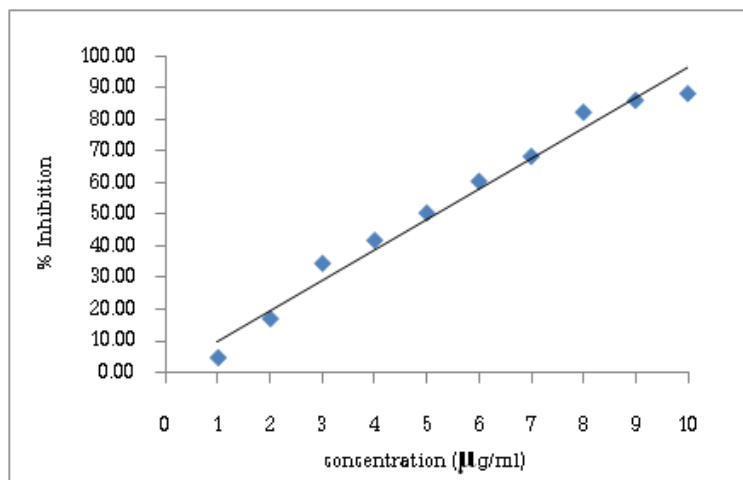
ตารางที่ 2 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดผลมะเปรียง

แบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบ (Indicator strains)	น้ำมะเปรียงสด		สารสกัดด้วยเอทานอล	
	MIC (มก/มล)	MBC (มก/มล)	MIC (มก/มล)	MBC (มก/มล)
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	500±0.001	500±0.001	250±0.001	250±0.001
<i>M. luteus</i> TISTR884	500±0.001	500±0.001	250±0.001	500±0.001
<i>S. aureus</i> TISTR517	500±0.001	500±0.001	500±0.001	500±0.001
MRSA142	500±0.001	1000±0.001	500±0.001	1000±0.001

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับสารละลาย DPPH

เมื่อวัดการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานวิตามินซี (Vitamin C) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ความเข้มข้นต่างๆ กัน และนำไปหาค่า % Inhibition ได้ค่าดังภาพที่ 3 และเมื่อนำข้อมูลจากภาพที่ 3 ของสารมาตรฐาน Vitamin C มาจัดทำกราฟเส้นตรงระหว่าง % Inhibition กับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า IC_{50} พบว่าสารมาตรฐาน Vitamin C มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าทั้งน้ำมะเปรียงสดและสารสกัดด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มี % Inhibition เท่ากับ 71.37% และ 66.27% ตามลำดับ ดังตารางที่ 3 และเมื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า

น้ำมะเปรียงสดและสารสกัดด้วยเอทานอลมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 5.26 และ 6.87 ไมโครกรัม Ascorbic acid ต่อกรัมน้ำหนักสด นอกจากนี้พบว่าค่า IC_{50} ของน้ำมะเปรียงสดและสารสกัดด้วยเอทานอล เท่ากับ 71.21 และ 76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 5



ภาพที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรของสารมาตรฐานวิตามินซี (Vitamin C)

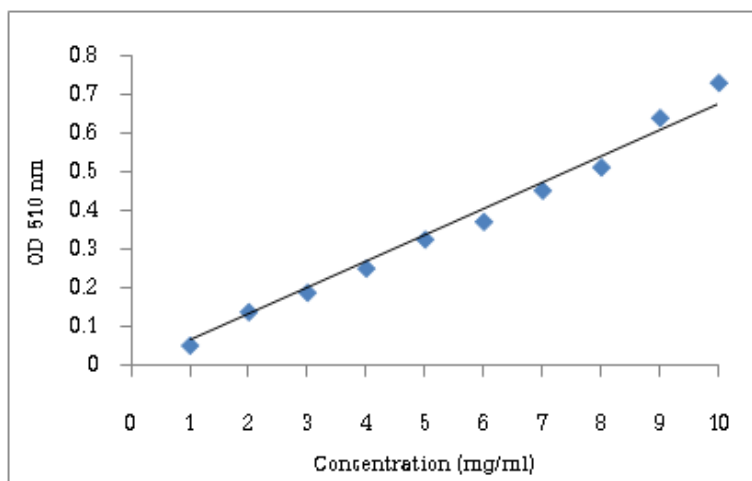
ตารางที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร (OD517 nm) ของสารสกัดผลมะเปรียง

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	น้ำมะเปรียงสด	% Inhibition	สารสกัดด้วยเอทานอล	% Inhibition
12.50	0.414±0.001	18.82	0.488±0.001	4.31
25.00	0.349±0.001	31.57	0.450±0.001	11.76
50.00	0.251±0.001	50.78	0.372±0.001	27.06
100.00	0.146±0.001	71.37	0.172±0.001	66.27

*(ค่าเฉลี่ย 3 ครั้ง ± S.D.)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์

จากการศึกษาพบว่าน้ำมะเปรียงสดและสารสกัดด้วยเอทานอลมีการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.373 และ 0.483 นาโนเมตร ดังตารางที่ 4 เมื่อนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร Quercetin ดังภาพที่ 4 ปรากฏว่าน้ำ มะเปรียงสดและสารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 5.48 และ 7.10 มิลลิกรัม Quercetin ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ดังตารางที่ 5



ภาพที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ของสารมาตรฐาน Quercetin กับ OD510 นาโนเมตร

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผลไม้เปรี้ยวที่มีความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

สารสกัดผลไม้เปรี้ยว	ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (ค่าเฉลี่ย 3 ครั้ง $\pm$ S.D.)
น้ำมะเปรี้ยวสด	0.373 $\pm$ 0.001
สารสกัดด้วยเอทานอล	0.483 $\pm$ 0.001

ตารางที่ 5ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดผลไม้เปรี้ยวและปริมาณสารฟลาโวนอยด์

สารสกัดผลไม้เปรี้ยว	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ		ปริมาณสารฟลาโวนอยด์
	ไมโครกรัม ascorbic acid ต่อกรัม น้ำหนักสด	IC ₅₀ (mg/ml)	
น้ำมะเปรี้ยวสด	5.26	71.21	5.48
สารสกัดด้วยเอทานอล	6.87	76.00	7.10

อภิปรายผล

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้เปรี้ยวที่มีความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าน้ำมะเปรี้ยวสดและสารสกัดผลไม้เปรี้ยวด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานว่าสารสกัดจาก *Cuminum cyminum* มีฤทธิ์ยับยั้งแคบโดยยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น (Mostafa et al., 2018) นอกจากนี้พืชสมุนไพรจากฟิลิปปินส์ เช่น *Psidium guajava* L. และ *Phyllanthus niruri* แสดงฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก (Valle, Andrade, Puzon, Cabrera, & Rivera, 2015) การที่แบคทีเรียแกรมลบดื้อต่อสารสกัดอาจเป็นเพราะแบคทีเรียแกรมลบมีเมมเบรนชั้นนอกที่มีไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) เป็นองค์ประกอบ มีหน้าที่ป้องกันสารไม่ให้เข้าสู่ภายในเซลล์ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มีเมมเบรนชั้นนอก สารจึงเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ (Shan, Cai, Brooks & Corke, 2007) นักวิจัยหลายท่านรายงานว่าสารสกัดพืช เช่น terpenoid, alkaloid และ phenolic compound สามารถเกิดฤทธิ์

กับโปรตีนและเอนไซม์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย สารภายในเซลล์ไหลออกนอกเซลล์ นอกจากนี้สามารถยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนนำไปสู่การตายของเซลล์ (Gill & Holley, 2006) สารสกัดพืชที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำจะทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ไมโตคอนเดรียของจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสาเหตุให้โครงสร้างเซลล์จุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไปรวมถึงความสามารถในการให้สารซึมผ่านเปลี่ยนแปลงไปด้วย (Tiwari et al., 2009) นอกจากนี้แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดสามารถสร้างไบโอฟิล์มในการป้องกันตัวมันเองจากการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ (Frieri, Kumarb & Boutinc, 2017) ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดผลไม้เปรี้ยวต่อเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778, *M. luteus* TISTR884, *S. aureus* TISTR517 และ MRSA142 ให้ค่าการยับยั้งที่เท่าๆ กัน เพราะเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเหมือนกัน มีโครงสร้างและมีการกลไกในการป้องกันตัวเองที่เหมือนกัน และมีรายงานการวิจัยพบว่าสารสกัดน้ำทับทิมยับยั้ง *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ด้วยค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และมีค่า MBC เท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และยับยั้ง *Rothia dentocariosa* ด้วยค่า MIC และ MBC เท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และ 140 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ (Ferrazzano et al., 2017)

การดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Vitamin C ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน และนำไปหาค่า % Inhibition เมื่อนำข้อมูลของสารมาตรฐาน Vitamin C มาจัดทำกราฟเส้นตรงระหว่าง % Inhibition กับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า IC_{50} พบว่าสารมาตรฐาน Vitamin C มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากค่า % Inhibition ของสารสกัดผลไม้เปรี้ยว พบว่า ทั้งน้ำมะขามเปรี้ยวสดและสกัดด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มี % Inhibition เท่ากับ 71.37% และ 66.27% ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 71.21 และ 76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ทั้งนี้ขั้นตอนการสกัดสารอาจจะมีผลต่อค่า % Inhibition เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการสกัดและขั้นตอนการทำให้สารสกัดมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมีผลต่อการลดลงของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืช (Praychoen, Praychoen & Phongtongpasuk, 2013; Abubakar & Simon, 2015; Kaleem et al., 2016) และมีรายงานการวิจัยพบว่าสารสกัดจากผลของ *Camellia japonica* ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ให้ % Inhibition ที่สูงเกิน 90% (Woo et al., 2017) ในขณะที่สารสกัดจากต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*Nepenthes ampullaria*) แสดงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.148 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Fitri, Azizan & Goh, 2018)

น้ำมะขามเปรี้ยวสดและสารสกัดด้วยเอทานอลมีสารฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ 5.48 และ 7.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เนื่องจากวิธีการสกัดต่างกันทำให้ได้สารที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ต่างกัน โดยการสกัดด้วยเอทานอลจะมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากกว่าน้ำมะขามเปรี้ยวสด ซึ่งการศึกษาสอดคล้องกับรายงานที่กล่าวว่า ดอกส้มซ่าที่สกัดด้วยเอทานอล น้ำ และเมทานอล ให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ต่างกัน (Karimi, Oskoueian, Hendra, Oskoueian & Jaarar, 2012) นอกจากนี้มีการรายงานว่ามีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมที่สกัดจากเปลือกของ *Citrus mitis* Blanco โดยใช้พื้นที่อุณหภูมิ 80, 90, 100 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าส่วนสกัดที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายเข้มข้น 50, 60, 70, 80 และ 95 % โดยปริมาตร (Lou, Lai, Hsu & Ho, 2014)

สรุป

น้ำมะขามเปรี้ยวสดและสารสกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งได้เฉพาะจุลินทรีย์แกรมบวก โดย *B. cereus* ATCC11778 ไวต่อสารสกัดผลไม้เปรี้ยวทั้งสองแบบมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งระหว่างสารสกัดผลไม้เปรี้ยวกับยาปฏิชีวนะ (Gentamicin, 10 ไมโครกรัม) พบว่า MRSA142 ไวต่อสารสกัดผลไม้เปรี้ยวแต่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ค่า MIC และ MBC ของน้ำมะขามเปรี้ยวสดและสารสกัดด้วยเอทานอลในการต้าน MRSA142 เท่ากับ 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้



น้ำมะเปรียงสดและสารสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยพบว่ามี % Inhibition มากกว่า 50% ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ น้ำมะเปรียงสดและสารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 5.48 และ 7.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

แนวทางในการศึกษาเพื่อต่อยอดงานวิจัยขึ้นนี้อาจดำเนินการศึกษาในเชิงลึกเพิ่มขึ้น เช่น การทำบริสุทธิ์สารสกัดผลมะเปรียงเพื่อหาสารที่แท้จริงที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่สามารถนำไปใช้ทางการแพทย์ได้ หรือในเชิงประยุกต์ เช่น ทำผลิตภัณฑ์ล้างมือจากสารสกัดผลมะเปรียง

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนเป็นอย่างดีด้านทุนสำหรับการทำวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2560 และได้รับความอนุเคราะห์เชื้อสายพันธุ์ทดสอบจาก รศ. ดร. มณฑล เลิศคุณวานิชกุล สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ทำให้โครงการสามารถดำเนินไปได้เป็นอย่างดี

รายการอ้างอิง (References)

- Abubakar, E. I., & Simon, O. (2015). Effect of Temperature and Storage on Vitamin C Content in Fruits Juice. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, 1(2), 17-21.
- Ado, M. A., Abas, F., Mohammed, A. S., & Ghazali, H. M. (2013). Anti- and pro-lipase activity of selected medicinal, herbal and aquatic plants, and structure elucidation of an anti-lipase compound. *Molecules*, 18(146), 51-69.
- Aziz, A. F. A., & Iqbal, M. (2013). Antioxidant activity and phytochemical composition of *Cynometra cauliflora*. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 3, 337-41.
- Barreira, J. C., Ferreira, I. C., Oliveira, M. B., & Pereira, J. A. (2010). Antioxidant potential of chestnut (*Castanea sativa* L.) and almond (*Prunus dulcis* L.) by-products. *Food Science and Technology International*, 16(3), 209-16.
- Das, K., Tiwari, R. K. S., & Shrivastava, D. K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant product as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 104-11.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8(10), 3010-4.
- Ferrazzano, G. F., Sateriale, E. S. D., Pastore, G., Colicchio, R., Pagliuca, C., Cantile, T.,... & Pagliarulo, C. (2017). In Vitro Antibacterial Activity of Pomegranate Juice and Peel Extracts on Cariogenic Bacteria. *BioMed Research International*, 2017(5), 1-7.
- Fitri, M. A., Azizan, K. A., & Goh, H. H. (2018). Antioxidant Activity of Pitcher Extracts from Three *Nepenthes* Species. *Sains Malaysiana*, 47(12), 3069-3075.



- Frieri, M., Kumarb, K., & Boutinc, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10, 369-378.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-9.
- Ikram, E. H. K., Eng, K. H., Jalil, A. M. M., Ismail, A., Idris, S., Azlan, A., ... Mokhtar, R. A. M. (2009). Antioxidant capacity and total phenolic content of Malaysian underutilized fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(5), 388-393.
- Kaleem, A., Nazir, N., Pervaiz, S., Iqtedar, M., Abdullah, R., Aftab, M., & Naz, S. (2016). Investigation of the effect of temperature on vitamin C in fresh and packed fruit and packed fruit juices. *FUUAST Journal of Biology*, 6(1), 117-120.
- Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Oskoueian, A., & Jaarar, H. Z. (2012). Phenolic Compounds Characterization and Biological Activities of *Citrus aurantium* Bloom. *Molecules*, 17, 1203-1218.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Kong, K. W., & Ismail, A. (2016). Phytochemicals and medicinal properties of indigenous tropical fruits with potential for commercial development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1, 1-20.
- Lou, N. S., Lai, C. Y., Hsu, S. Y., & Ho, T. C. (2014). Flavonoid compositions and antioxidant activity of calamondin extracts prepared using different solvents. *Journal of Food and Drug analysis*, 22, 290-295.
- Murugan, N. B., Mishra, B. K., & Paul, B. (2018). Antioxidant and antibacterial evaluation of medicinal plants used in the starter culture (*Wanti*) of fermented rice beverage in West Garo hills, Meghalaya. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1), 1669-1674.
- Mostafa, A. A., Al-Askar, A. A., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Sholkamy, E. N., & Bakri, M. M. (2018). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, 361-366.
- Praychoen, P., Praychoen, P., & Phongtongpasuk, S. (2013). Effect of Thermal Treatment on Phytochemical Contents and Antioxidant Activity of Gac Juice. *Burapha Science Journal*, 2, 90-96.
- Rabeta, M. S., Chan, S., Neda, G. D., Lam, K. L., & Ong, M. T. (2013). Anticancer effect of underutilized fruits. *International Food Research Journal*, 20(2), 551-556.
- Singh, D., Gupta, R., & Saraf, S. A. (2012). Herbs: Are they safe enough? An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 876-98.
- Shan B., Cai Y-Z., Brooks J. D., & Corke H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 112-9.
- Sopittummakhun, K., & Rattanasinganchan, P. (2017). Extraction and determination of antioxidant activity in herbal plant. *Huachiew Chalermprakiet Science and Technology Journal*, 3(1), 86-93.
- Sukandar, D., & Amelia, E. R. (2013). Karakterisasi Senyawa Aktif Antioksidan dan Antibakteri Dalam Ekstrak Etanol Buah Nam Nam (*Cynometra cauliflora* L.). *Valensi*, 3(1), 35-40.



- Tajudin, T. J. S. A., Mat, N., Siti-Aishah, A. B., Yusran, A. A. M., Alwi, A., & Ali, A. M. (2012). "Cytotoxicity, antiproliferative effects, and apoptosis induction of methanolic extract of *Cynometra cauliflora* Linn. whole fruit on human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, Article ID 127373, 6 pages.
- Tiwari, B. K., Valdramidi, V. P., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5987-6000.
- Valle Jr, D. L., Andrade, J. I., Puzon, J. J. M., Cabrera, E. C., & Rivera, W. L. (2015). Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(7), 532-540.
- Vichakaset. (2016). *Nam Nam*. Retrived Dec 15, 2018, from <http://www.vichakaset.com>
- Woo Y., Lee H., Jeong Y.S., Shin G. Y., Oh J.G., Kim J.S., & Oh J. (2017). Antioxidant Potential of Selected Korean Edible Plant Extracts. *BioMed Research International*, 2017(21), 1-9.