

ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบพิงูล Antibacterial and Antioxidant Capacities of Tanjong (*Mimusops elengi* L.) Leaf Extract

กรกนก พิบูลย์ผล¹, เกรือวัลย์ ห้วนกั้ง¹, ณัฐธิดา ชุนชนะ¹, มนต์นันท์ สันติภราดร¹, อรอนงค์ สมทรัพย์^{1*}
Gornganok Piboonpol¹, Kruawan Hounkong¹, Nattanicha Khunchana¹,
Manutsanun Santiparadon¹, On-Anong Somsap^{1*}

(Received: Jul 31, 2019; Revised: Oct 3, 2019; Accepted: Oct 28, 2019)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบพิงูลการตรวจเบื้องต้นเพื่อหาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบพิงูลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion ผลที่ได้พบว่าสารสกัดใบพิงูลสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Micrococcus luteus* TISTR884, Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* 142 (MRSA142) และ *Staphylococcus aureus* TISTR517 ด้วยบริเวณยับยั้งเท่ากับ 21.7, 21.3, 29.0 และ 21.8 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบคือต่อสารสกัดใบพิงูล และพบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) เชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ATCC 11778 ของสารสกัดใบพิงูลเท่ากับ 9.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ MIC สำหรับ *M. luteus* TISTR884, MRSA142 และ *S. aureus* TISTR517 มีค่าเท่ากับ 18.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่า (MBC) เชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ATCC 11778, *M. luteus* TISTR884 และ *S. aureus* TISTR517 ของสารสกัดใบพิงูลในการฆ่า เท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ MBC สำหรับ MRSA142 เท่ากับ 600 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสารพฤกษเคมีผลปรากฏว่า สารสกัดใบพิงูลมีสารฟลาโวนอยด์ฟีนอล และซาโปนิน เป็นองค์ประกอบ สารสกัดใบพิงูลมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 3.2 ไมโครกรัม Ascorbic acid ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีค่า IC50 เท่ากับ 23.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้พบว่าสารสกัดใบพิงูลมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 0.8 มิลลิกรัม Quercetin ต่อกรัมน้ำหนักสด ขณะที่ปริมาณสารฟีนอร์ลิกในสารสกัดใบพิงูลเท่ากับ 0.72 มิลลิกรัมต่อกรัม gallic acid ต่อกรัมน้ำหนักสด

คำสำคัญ: ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย พิงูลสาร พฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

The objective of this research was to study antibacterial activity, phytochemical. The objective of this research was to study antibacterial activity, phytochemical screening, and antioxidant activity of Tanjong leaf extract. Antibacterial activity was determined by agar well diffusion method. The result showed that Tanjong leaf extract exhibited against gram positive bacteria such as *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Micrococcus luteus* TISTR884, as well as the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 142 (MRSA142) and *Staphylococcus aureus* TISTR517 with the inhibition zone 21.7, 21.3, 29.0 and 21.8 mm, respectively.

¹ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

¹ Faculty of Medicine, Princess of Naradhiwas University

* Corresponding: On-Anong.s@pnu.ac.th



However, gram negative bacteria were resistant to Tanjong leaf extract. The MIC value of the Tanjong leaf extract gave 9.38 mg/ml with *B. cereus* ATCC 11778 and MIC value were given equally: 18.75 mg/ml with *M. luteus* TISTR884, MRSA142 and *S. aureus* TISTR517. The MBC value to inhibit *B. cereus* ATCC 11778, *M. luteus* TISTR884 and *S. aureus* TISTR517 were 300 mg/ml and MBC value for MRSA142 was 600 mg/ml. Phytochemical screening test showed that Tanjong leaf extract contained flavonoids, phenols, and saponins. The Tanjong leaf extract showed antioxidant activity at 3.2 µg ascorbic acid/g fresh weights and the IC₅₀ at 23.35 µg/ml. Moreover, the total flavonoid content was 0.8 mg Quercetin/g fresh weights and phenolic content was 0.72 mg gallic acid/ g fresh weights.

Keywords: Tanjong, *Mimosa elengi* L., Antibacterial Activity, Phytochemical, Antioxidant

บทนำ

ปัญหาการดื้อยาจัดเป็นปัญหาใหญ่ทั่วโลกโดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนาสำหรับประเทศไทยนั้นมิใช่ชีวิตที่เกิดจากการติดเชื้อดื้อยาประมาณปีละ 19,000 ราย คิดเป็นร้อยละ 42.22 (จากจำนวนผู้ที่เสียชีวิตทั้งหมด 45,000 ราย) เชื้อดื้อยาในประเทศไทยที่สำคัญ ได้แก่ เชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae และ *Pseudomonas* spp. รวมถึง *Methicillin-resistant S. aureus* (MRSA) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Indrawattana & Vanaporn, 2015) สาเหตุการดื้อยาของเชื้อก่อโรคอาจมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณที่ไม่เหมาะสม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานถึงการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสมในโรงพยาบาล ส่งผลให้เชื้อที่ดื้อยาสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาไปยังรูลูกและรูลานได้ หรือส่งผ่านคุณสมบัติการดื้อยาให้กับแบคทีเรียตัวอื่น จึงมีการคิดค้นวิธีการแก้ปัญหาเชื้อดื้อยา โดยใช้พืชสมุนไพรหลากหลายชนิดมาสกัดและศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยา และมีการรายงานพบว่าการใช้สารสกัดจากเปลือกผลไม้ 5 ชนิด ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียดื้อยา ได้แก่ พุเรียนพันธุ์หมอนทอง มังคุดสุก ส้มเขียวหวาน กล้วยน้ำว้าดิบ และหมากสงดิบ (Tantipaibulvut, Nuamsetti & Dechayuenyon, 2012) รวมถึงการใช้สารสกัดจากชาเขียว (Radji, Agustama, Elya & Tjampakasari, 2013) นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยพบว่าสารสกัดผลมะเปรียงสามารถยับยั้ง MRSA142 ซึ่งเป็นเชื้อดื้อยาได้ (On-Anong, Gornganok, Kolip & Charuwan, 2019) พิกุลเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย พม่า มาเลเซีย และไทย ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปทุกภาคของประเทศไทย นิยมปลูกเป็นไม้ประดับนอกจากนี้พิกุลถือเป็นต้นไม้ประจำมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ สำหรับประโยชน์ของพิกุลพบว่ามีประโยชน์ในหลายส่วนโดยดอกใช้เป็นยาบำรุงหัวใจ ยาแผนโบราณ ใช้เข้ายาหอมบำรุงหัวใจ เป็น 1 ในเกสรทั้ง 5 ทั้ง 7 และทั้ง 9 เปลือกมีรสฝาด นำไปสับแล้วต้ม โดยใช้น้ำอมบวนปากแก่โรคเหงือกอักเสบ และทำให้ฟันหนาเมล็ดตำแล้วทำเป็นยาเหน็บทวารหนักเด็ก แก้อาการท้องผูก แก่นที่รากมีสีน้ำตาลเข้ม ประขาว เรียกชื่อใหม่ว่า “ซอนดอก” จะสีกลิ่นหอม ใช้ทำเป็นยาบำรุงหัวใจ แก้ไข้ และรักษากรรม ส่วนใบมีสรรพคุณ ได้แก่ ช่วยรักษากามโรค แก้ที่ตี เป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยพบว่าสารสกัดจากใบพิกุลด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คืออนุมูลอิสระ DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) และ ABTS (2, 2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) โดยมีค่าการยับยั้ง IC₅₀ เท่ากับ 10.25 และ 13.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ (Gadamsetty, et al., 2013) นอกจากนี้พบว่า สารสกัดใบพิกุลด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ เมื่อเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน indomethacin ในขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Gadamsetty, et al., 2013) สำหรับการศึกษาฤทธิ์แก้ปวด ลดไข้ พบว่าสารสกัดใบพิกุลด้วยเมทานอล มีฤทธิ์แก้ปวดและลดไข้ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ขนาดยา 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Sehgal, Gupta, Gupta & Saraf, 2011) และพบว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกและใบของพิกุลสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 35.08 ± 2.92

และ 67.46 ± 4.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเพิ่มการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในการกำจัดเซลล์ผิดปกติและเซลล์มะเร็งภายในร่างกาย จาก 0.24% เป็น 60% และ 69% ตามลำดับ (Ganesh, Abhishek, Saurabh & Sarada, 2014) สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้เห็นถึงความสำคัญต่อการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรมาใช้ในการยับยั้งเชื้อดื้อยาและมีโอกาสในการนำสารสกัดไปพิกุลไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์มากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบพิกุลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบพิกุล
3. เพื่อศึกษาสารประกอบพฤษเคมีเบื้องต้นที่เป็นองค์ประกอบสารสกัดใบพิกุล

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การสกัดสารจากใบพิกุลด้วยน้ำ

ใบพิกุลที่ใช้ในการทดลองปลูกในเขตพื้นที่มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ จังหวัดนราธิวาส โดยการนำใบพิกุลแห้งเป็นชิ้นเล็กๆ จำนวน 70 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 210 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 ต่อ 4) แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง รोजนสารสกัดเย็นกรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยเพื่อให้ได้สารที่เข้มข้นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบลดความดัน (Rotary Evaporator) และนำมาทำให้เป็นผงแห้งด้วยเครื่องอบแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dryer) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

แบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้คือ *Staphylococcus aureus* TISTR517, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Micrococcus luteus* TISTR884, *Salmonella typhimurium* TISTR292, *Escherichia coli* ESBL182, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR1467 และ MRSA142

การเตรียมเชื้อทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบเลี้ยงในอาหารเหลว 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% NaCl

3. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพิกุล

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR517, *B. cereus* ATCC 11778, *M. luteus* TISTR884, *S. typhimurium* TISTR292, *E. coli* ESBL182, *P. aeruginosa* TISTR1467 และ MRSA142 ด้วยวิธี Agar-well diffusion method โดยการนำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบมาปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 0.5 Mcfarland (1.5×10^8 CFU/mL) แล้ว swab เชื้อบน LB agar ให้ทั่ว ด้วย Cotton swab จากนั้นเจาะหลุมด้วยทิวป์ปราศจากเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เติมสารสกัดใบพิกุลที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการวัดบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ (Vernier caliper) บันทึกผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง



4. การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบพิทูลที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentrations, MIC)

การหาค่า MIC ด้วยวิธี agar well diffusion method (Mostafa et al, 2017) โดยนำสารสกัดที่มีบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) จากข้อ 3 มาเตรียมให้ได้ความเข้มข้นที่ 300, 150, 75, 37.5, 18.75 และ 9.375 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางทีละ 2 เท่า ด้วยน้ำกลั่น นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบมาปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 0.5 Mcfarland (1.5×10^8 CFU/mL) ด้วย 0.85% NaCl จากนั้นทำการ swab บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และเจาะหลุมด้วยทิวปราคาจากเชื้อเต็มสารสกัดใบพิทูลที่มีความเข้มข้นต่างๆ ลงในแต่ละหลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 -24 ชั่วโมง การอ่านผลค่า MIC ให้สังเกตค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบและวัดขนาดบริเวณยับยั้งด้วย Vernier caliper โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

5. การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบพิทูลที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อ (Minimum bactericidal concentrations, MBC)

การหาค่า MBC ทำการศึกษาตามวิธีของ (Mostafa et al, 2017) โดยใช้วิธีขีดเชื้อบนอาหารแข็ง (streak plate) โดยเขี่ยเชื้อจากบริเวณยับยั้งของค่า MIC ที่ความเข้มข้นต่ำสุดอย่างน้อย 3 ความเข้มข้น นำมาขีดเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ใหม่อีกครั้ง นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง การอ่านผลค่า MBC หากสารสกัดใบพิทูลที่มีความเข้มข้นใดสามารถฆ่าเชื้อได้จะแสดงผลบ คือ ไม่มีโคโลนีของเชื้อปรากฏ ดังนั้นความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดใบพิทูลที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้คือค่า MBC โดยทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

6. การคัดกรองสารพิษเคมีในสารสกัดใบพิทูล (Phytochemical screening) (ดัดแปลงจากวิธีของ Saritha, Rajest, Manjulatha, Setty & Yenugu, 2015)

6.1 การตรวจหาสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

เตรียมสารสกัดใบพิทูลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 2-3 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา หากพบฟลาโวนอยด์สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

6.2 การตรวจหาสารฟีนอล (Phenols)

เตรียมสารสกัดใบพิทูลปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 2 มิลลิลิตร ของสารละลาย 3% $FeCl_3$ สังเกตสีที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ถ้าเกิดเป็นสีฟ้าหรือเขียวแสดงว่าสารสกัดใบพิทูลมีสารฟีนอลเป็นองค์ประกอบ

6.3 การตรวจหาสารซาโปนิน (Saponins)

สารสกัดใบพิทูลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร กวนสารให้ผสมกันต่อเนื่องเป็นเวลา 15 นาที สังเกตฟองที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา หากพบซาโปนินจะเกิดฟองหนาประมาณ 1 เซนติเมตร

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

7.1 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 (Ac) 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

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

A_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงสารละลาย DPPH ก่อนทำปฏิกิริยา

A_{30} คือ ค่าการดูดกลืนแสงสารละลาย DPPH หลังทำปฏิกิริยาเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที

7.2 การทดสอบสารสกัดใบพิทูลกับสารละลาย DPPH

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ (Murugan, et al., 2018) นำสารสกัดใบพิทูลมาทำการเจือจางให้ได้ 4 ความเข้มข้นคือ 12.5, 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติม 1 มิลลิลิตรของสารละลาย DPPH ลงใน 1 มิลลิลิตรของสารสกัดใบพิทูลแต่ละความเข้มข้น บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืดเมื่อครบเวลาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สำหรับชุดควบคุมผสม 1 มิลลิลิตรของสารละลาย DPPH กับ 1 มิลลิลิตร เมทานอล ในขณะที่ blank ใช้เฉพาะเมทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐานโดยมีความเข้มข้นในช่วง 1-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระแสดงในรูป ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของวิตามินซี เปอร์เซนต์ในการต้านอนุมูลอิสระคำนวณได้จากสูตร

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

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

8. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (ดัดแปลงจากวิธีของ Dewanto, Wu, Adom & Liu, 2002; Barreira, Ferreira, Oliveira & Pereira, 2010)

นำสารสกัดใบพิทูลปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 5% $NaNO_2$ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร และเติม สารละลาย 1 โมลาร์ NaOH ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบพิทูลโดยเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐาน Quercetin ที่ความเข้มข้น 1 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รายงานผลเป็น มิลลิกรัม Quercetin ต่อกรัม น้ำหนักสด

9. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิก

 (ดัดแปลงจากวิธีของ Ikram et al., 2009)

การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดใบพิทูลโดยวิธีวิเคราะห์ด้วย Folin-Ciocalteu โดยผสม 10 ไมโครลิตรของสารสกัดใบพิทูลกับ 1 มิลลิลิตรของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นเติม 100 ไมโครลิตรของสาร Folin-Ciocalteu's phenol และเติม 300 ไมโครลิตรของ 20% Na_2CO_3 ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในที่มืด จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 735 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-Vis สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นช่วง 0.02-0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดแสดงในหน่วย มิลลิกรัม gallic acid equivalent (GAE) ต่อกรัม น้ำหนักสด



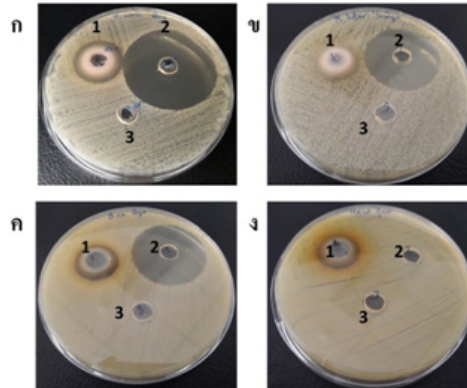
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1.ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดใบพิทูกุล

สารสกัดใบพิทูกุลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR517, *B. cereus* ATCC 11778, *M. luteus* TISTR884 และ MRSA142 ได้ดี เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ gentamicin โดยมีค่าบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) เท่ากับ 29.0, 21.7, 21.3 และ 21.8 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ทดสอบต่อสารสกัดใบพิทูกุล ดังตารางที่ 1 และ ภาพที่ 1 ซึ่งผลจากการวิจัยสอดคล้องกับผลการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของสารสกัดจาก *Cuminum cyminum* ซึ่งมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น (Mostafa et al., 2017) และสมุนไพรจากฟิลิปปินส์ เช่น *Psidium guajava* L. และ *Phyllanthus niruri* มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก (Valle, Andrade, Puzon, Cabrera & Rivera, 2015) เช่นเดียวกับสารสกัดจากผลมะเปรียงให้ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น (On-Anong, et al., 2019) ทั้งนี้การที่แบคทีเรียแกรมลบต่อต้านสารสกัดอาจเป็นเพราะแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างต่างจากแบคทีเรียแกรมบวก กล่าวคือ แบคทีเรียแกรมลบมีเมมเบรนชั้นนอกที่มีไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีหน้าที่ป้องกันไม่ให้สารเข้าสู่ภายในเซลล์ (Shan, Cai, Brooks & Corke, 2007) นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากพืชประเภท terpenoid, alkaloid และ phenolic compound สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนและเอนไซม์ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย (Gill & Holley, 2006) สำหรับสารสกัดพืชที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ พบว่าคุณสมบัติของสารสกัดคือจะทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ของไมโทคอนเดรียของจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสาเหตุให้โครงสร้างเซลล์จุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ความสามารถในการให้สารซึมผ่านเปลี่ยนแปลงไปด้วย (Tiwari et al., 2009) แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดพบว่ามีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มสำหรับการป้องกันตัวมันเองจากการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ (Friari, Kumarb & Boutinc, 2017)

ตารางที่ 1 ผลของสารสกัดใบพิทูกุลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion

เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบ (Indicator strains)	บริเวณการยับยั้ง (มม.)		
	สารสกัดใบพิทูกุล	Gentamicin (10 ug)	Sterile H ₂ O
<i>S. aureus</i> TISTR517	29.00±0.251	41.00±0.001	-
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	21.70±0.057	40.33±0.001	-
<i>M. luteus</i> TISTR884	21.30±0.028	40.33±0.001	-
MRSA142	21.80±0.225	-	-
<i>S. typhimurium</i> TISTR292	-	40.33±0.001	-
<i>E. coli</i> ESBL182	-	31.00±0.001	-
<i>P. aeruginosa</i> TISTR1467	-	41.00±0.001	-



ภาพที่ 1 ผลของสารสกัดใบพิกุลต่อการยับยั้ง ก) *S. aureus* TISTR517 ข) *M. luteus* TISTR884

ค) *B. cereus* ATCC11778 ง) MRSA142 โดย หลุมที่ 1 คือ สารสกัดใบพิกุล หลุมที่ 2 คือ ยาปฏิชีวนะ gentamicin หลุมที่ 3 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

2. ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบพิกุลที่สามารถยับยั้งเชื้อ (Minimum inhibitory concentrations, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบพิกุลที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อ (Minimum bactericidal concentrations, MBC)

ค่า MIC ของสารสกัดใบพิกุลต่อเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778, *M. luteus* TISTR884, *S. aureus* TISTR517 และ MRSA142 คือ 9.38, 18.75, 18.75 และ 18.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ค่า MBC ของสารสกัดใบพิกุลต่อเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778, *M. luteus* TISTR884, *S. aureus* TISTR517 และ MRSA142 คือ 300, 300, 300 และ 600 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 จากการทดลองพบว่ค่า MIC ต่อเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778, *M. luteus* TISTR884, *S. aureus* TISTR517 และ MRSA142 ใกล้เคียงกันเนื่องจากเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเหมือนกัน ซึ่งมีกลไกในการป้องกันตัวเองเหมือนกัน ขณะที่ค่า MBC ต่อเชื้อ MRSA142 จะสูงกว่าเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ อาจจะเป็นเนื่องจาก MRSA142 เป็นแบคทีเรียดื้อยา จึงมีค่า MBC ที่สูงกว่าเชื้อตัวอื่นๆ

ตารางที่ 2 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดใบพิกุล

แบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบ	MIC (มก./มล.)	MBC (มก./มล.)
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	9.38±0.001	300±0.001
<i>M. luteus</i> TISTR884	18.75±0.001	300±0.001
<i>S. aureus</i> TISTR517	18.75±0.001	300±0.001
MRSA142	18.75±0.001	600±0.001

3. การคัดกรองสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดใบพิกุล

สารสกัดใบพิกุลประกอบด้วยสารพฤกษเคมีคือ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอล ซาโปนิน ดังตารางที่ 3 ซึ่งผลวิจัยสอดคล้องกับรายงานที่กล่าวไว้ว่าในสารสกัดของใบพิกุล เช่น ใบ พบว่ามีซาโปนิน (Saponin) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) (Aziz & Iqbal, 2013)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบพฤกษเคมีในสารสกัดใบพิกุล

สารสกัดใบพิกุล	ฟลาโวนอยด์	ซาโปนิน	ฟีนอล
	+	+	+



4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับสารละลาย DPPH และการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์และฟีนอร์ลิก

เมื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดใบพิทูลมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 3.2 ไมโครกรัม Ascorbic acid ต่อกรัมน้ำหนักสด นอกจากนี้พบว่าค่า IC₅₀ ของสารสกัดใบพิทูล เท่ากับ 23.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะเดียวกันมีรายงานสารสกัดใบพิทูลด้วยเมทานอลมีค่าการยับยั้ง IC₅₀ เท่ากับ 10.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Gadamsetty, et al., 2013) อย่างไรก็ตามสารสกัดใบพิทูลด้วยเอทานอลมีค่า IC₅₀ น้อยมากเมื่อเทียบกับสารสกัดจากผลมะเปรียงที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (On-Anong, Gornganok, Kolip & Charuwan, 2019) และจากการศึกษาพบว่าสารสกัดใบพิทูลมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 0.8 มิลลิกรัม Quercetin ต่อกรัมน้ำหนักสด ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยมากเช่นกันเมื่อเทียบกับสารสกัดผลมะเปรียงที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 7.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (On-Anong, et al., 2019) นอกจากนี้ปริมาณสารฟีนอร์ลิกในสารสกัดใบพิทูลเท่ากับ 0.72 มิลลิกรัมต่อกรัม gallic acid ต่อกรัมน้ำหนักสด ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์และฟีนอร์ลิก

<i>M. elengi</i> leaves extract	Antioxidant activity		Total flavonoid content	Total phenolic content
	Ascorbic acid (µg)/g fresh wt	IC ₅₀ (µg/ml)	Quercetin Mg /g fresh wt	Gallic acid Mg/ml/g fresh wt
	3.2±0.001	23.35±0.050	0.80±0.012	0.72±0.006

สรุป

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบพิทูลและการตรวจเบื้องต้น ผลที่ได้พบว่าใบพิทูลสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* ATCC 11778, *M. luteus* TISTR884, MRSA142 และ *S. aureus* TISTR517 ด้วยบริเวณยับยั้งเท่ากับ 21.7, 21.3, 29.0 และ 21.8 มิลลิเมตร ตามลำดับ และมีค่า MIC ของสารสกัดใบพิทูลที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ATCC 11778 คือ 9.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *M. luteus* TISTR884, MRSA142 และ *S. aureus* TISTR517 ได้มีค่าเท่ากัน คือ 18.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับค่า MBC ของสารสกัดใบพิทูลในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ATCC 11778, *M. luteus* TISTR884, *S. aureus* TISTR517 เท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC สำหรับ MRSA 142 เท่ากับ 600 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสารพฤกษเคมีผลปรากฏว่า สารสกัดใบพิทูลมีสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoid), ฟีนอล (phenol) และซาโปนิน (saponin) เป็นองค์ประกอบสารสกัดใบพิทูลมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 3.2 ไมโครกรัม Ascorbic acid ต่อกรัมน้ำหนักสด และมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 23.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้พบว่าสารสกัดใบพิทูลมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 0.8 มิลลิกรัม Quercetin ต่อกรัมน้ำหนักสด ขณะที่ปริมาณสารฟีนอร์ลิกในสารสกัดใบพิทูลเท่ากับ 0.72 มิลลิกรัมต่อกรัม gallic acid ต่อกรัมน้ำหนักสด

ข้อเสนอแนะ

แนวทางในการศึกษาเพื่อต่อยอดงานวิจัยชิ้นนี้อาจดำเนินการศึกษาในเชิงลึกเพิ่มขึ้นเช่นการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบพิทูลในการยับยั้งแบคทีเรียที่สามารถนำไปใช้ทางการแพทย์ได้หรือศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดใบพิทูลเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ได้



กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีคณะผู้ทำวิจัยขอขอบพระคุณ รศ.ดร. มณฑล เลิศคนาวนิชกุล สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เชื่อมต่อทดสอบที่ใช้ในงานวิจัย สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนในการทำงานวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2562

รายการอ้างอิง (References)

- Aziz, A.F.A., & Iqbal, M. (2013). Antioxidant activity and phytochemical composition of *Cynometracauliflora*. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 3(4), 337-341.
- 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.
- 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.
- Frieri, M., Kumarb, K., & Boutinc, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10, 369-378.
- Gadamsetty, G., Maru, S., & Sarada, N.C. (2013). Antioxidant and anti-inflammatory activities of the methanolic leaf extract of traditionally used medicinal plant *Mimusops elengi* L. *Journal of Pharmaceutical and Reserch*, 5(6), 125-130.
- Ganesh, G., Abhishek, T., Saurabh, M., & Sarada, N.C. (2014). Cytotoxic and apoptosis induction potential of *Mimusops elengi* L. in human cervical cancer (SiHa) cell line. *Journal of King Saud University - Science*, 26, 333-337.
- 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. (2009). Antioxidant capacity and total phenolic content of Malaysian underutilized fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(5), 388-393.
- Indrawattana, N., & Vanaporn,Muthita. (2015). Nosocomial infection. *Journal of Medicine and Health Sciences*, 22(1), 81-92.
- 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. (2017). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 361-366.



- On-Anong, S., Gornganok, P., Kolip, P & Charuwan, D. (2019). Antibacterial and Antioxidant Activity of Nam-Nam Fruit. *Extract*, 11(2), 156-167.
- Radji, M., Agustama, R.A., Elya, B., & Tjampakasari, C.R. (2013). Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3, 663-667.
- Saritha, K., Rajesh, A., Manjulatha, K., Setty, O.H., & Yenugu, S. (2015). Mechanism of antibacterial action of the alcoholic extracts of *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. ex Schult, *Leucas aspera* (Wild.), *Plumbago zeylanica* L., and *Tridax procumbens* (L.) R. Br. ex Schult. *Frontiers in Microbiology*, 6, 577.
- Sehgal, S., Gupta, V., Gupta, R., & Saraf, S.A. (2011). Analgesic and antipyretic activity of *Mimusops elengi* L. (bakul) leaves. *Pharmacologyonline*, 3, 1-6.
- 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, 112-119.
- Tantipaibulvut, S., Nuamsetti, T., & Dechayuenyong, P. (2012). Antibacterial Activity of Some Fruit-Peel Extracts. *KKU Research Journal*, 17(6), 880-894.
- 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.