

ปริมาณฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจากสารสกัดหญาารีแพร์
Total Phenolic Content, Antioxidant and Antibacterial Activities
from *Centotheca lappacea* L. Desv. Extract

นฤวัตร ปักดี ภานิชา พงศ์นราทร วรินทร์ โอนอ่อน จงกล พูลสวัสดิ์
เพ็ญศิริ จันทร์แอ และ รณชัย ภูวนา*

Naruwat Pakdee Panicha Pongnaratorn Warin Ohn-on Jongkol Poonsawat
Pensiri Chan-ae and Ronnachai Poowanna*

สาขาแพทยแผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ประเทศไทย
Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan,
Sakon Nakhon Campus, Thailand

*E-mail: Ronnachai.pw@rmuti.ac.th Tel.080-1936562

(Received 11/08/2024, Revised 12/05/2025, Accepted 19/05/2025)

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหญาารีแพร์ (*Centotheca lappacea*) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion method หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย Minimum Bactericidal Concentration (MBC) พบว่า สารสกัดหญาารีแพร์มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ (IC₅₀) 21.182 µg/ml และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 16.61 mg GAE/g extract สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus pyogenes* ได้ โดยมีโซนการยับยั้ง MIC และ MBC ได้เท่ากับ 19.33±1.15 mm, 125 µg/ml และ 125 µg/ml ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิด *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* และ *P. aeruginosa* ได้ สรุปผลการศึกษาของสารสกัดหญาารีแพร์มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. pyogenes* ซึ่งสามารถใช้เป็นทางเลือกในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียดังกล่าวได้ในอนาคตได้

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย สารสกัดหญาารีแพร์

Abstract

This research aimed to investigate the antioxidant properties, total phenolic content, and antibacterial activity of *Centotheca lappacea* extract. The antioxidant activity was evaluated using the DPPH assay, total phenolic content was analyzed by the Folin-Ciocalteu method, and the antibacterial activity was tested using the disc diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined to assess the extract's efficacy against bacteria. The results showed that *C. lappacea* extract exhibited significant antioxidant activity with an IC₅₀ value of 21.182 µg/ml and a total phenolic content of 16.61 mg GAE/g extract. It effectively inhibited the growth of *Streptococcus pyogenes* with an inhibition zone, MIC, and MBC of 19.33±1.15 mm, 125 µg/ml, and 125 µg/ml, respectively. However, it did not inhibit the growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. These findings demonstrate that *C. lappacea* extract

possesses antioxidant properties and exhibits antibacterial activity against *S. pyogenes*, suggesting its potential as a natural therapeutic agent.

Keywords: Antioxidant activity, Antibacterial activity, *Centotheca lappacea* extract

1. บทนำ

โรคติดเชื้อส่วนใหญ่มักเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ มาจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น โรคทางผิวหนัง ได้แก่ ผื่นพุพอง ผื่นหนังอักเสบ รุขุมขนอักเสบ และฝี เป็นต้น โรคทางระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ ปอดอักเสบ คอหอยอักเสบ และกล่องเสียงอักเสบ เป็นต้น โรคระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ อาหารเป็นพิษ ท้องร่วง และอหิวาตกโรค เป็นต้น และโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ได้แก่ กรวยไตอักเสบเฉียบพลัน ท่อปัสสาวะอักเสบ และกระเพาะปัสสาวะอักเสบ เป็นต้น ซึ่งการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ เป็นการติดเชื้อที่พบบ่อยและมีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับต้นของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Danchaiwijitr et al., 2007) โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะได้บ่อยคือ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Foxman, 2010; McLellan & Hunstad, 2016) ซึ่งในปัจจุบันโรคติดเชื้อดังกล่าวก็สามารถรักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะ แต่ยาบางชนิดก็มีผลข้างเคียงต่อร่างกายรวมทั้งมีอัตราการดื้อยาที่สูง (Boonyasiri et al., 2014) ในปัจจุบันมีพืชผักสมุนไพรมีหลากหลายชนิดที่สามารถนำมารับประทานเป็นอาหาร พืชสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกสำคัญแห่งหนึ่งของสารพฤกษเคมี ซึ่งถูกใช้มาตั้งแต่สมัยอดีตเพื่อรักษาโรคต่าง ๆ และใช้บำรุงร่างกาย ซึ่งมีแนวโน้มการใช้สมุนไพรเพิ่มมากขึ้นทุกปี (Musa et al., 2023) ดังนั้น จึงมีการนำสมุนไพรมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคสำหรับเป็นทางเลือกในการดูแลสุขภาพ

ปัจจุบันสมุนไพรได้รับความนิยมในการรักษาโรคต่าง ๆ ตลอดจนการนำมาสกัดสารที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Wongsrisom et al., 2014) โดยหญ้าริแพร์ (*Centotheca lappacea*) ในประเทศไทยมีรายงานการใช้ประโยชน์จากหญ้าริแพร์ในสตรีหลังคลอดเพื่อช่วยบำรุงร่างกาย อาการปวดเมื่อย รักษาโรคผิวหนัง ขับปัสสาวะ โดยนำมา อบ รับประทาน หรือทา ให้ผิวพรรณชุ่มชื้น แต่งตั้งได้ (Kamoltham et al., 2017) จากการศึกษาที่ผ่านมาโดยทำการแยก Endophytic fungi จากใบ ราก ของ *C. lappacea* พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* (Hazalin et al., 2009) แต่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจากสารสกัดโดยตรง ดังนั้น เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะศึกษาคุณสมบัติฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเอทานอลของหญ้าริแพร์ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนานำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และเภสัชต่อไป

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมสารสกัดหญ้าริแพร์โดยวิธีการสกัดแบบหมัก

ชั่งน้ำหนักสมุนไพรหญ้าริแพร์ 350 กรัม นำมาล้าง และบดละเอียด จากนั้นใส่ลงในขวดสีชา โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล 95% ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิทด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ เก็บไว้ในที่แห้ง เย็น 2 ครั้ง (เช้าและเย็น) ครั้งละ 30 นาที แช่ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนด 7 วัน นำสารสกัดที่ได้มารองเอทานอลด้วยผ้าขาวบาง กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1 นำสารสกัดหญ้าริแพร์สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหย (Rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดที่แห้งสนิท จากนั้นชั่งส่วนที่เหลือจากการระเหยเพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณของสารสกัดที่ได้ (%Yield) ดังสมการ (1) และเก็บสารสกัดของหญ้าริแพร์ระเหยแห้งแล้วบรรจุขวดแก้วทึบแสง แล้วห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

การคำนวณหาปริมาณสารสกัด (%Yield crude extract) แสดงไว้ในสมการ (1)

$$\% \text{ yield} = \frac{A}{B} \times 100 \quad (1)$$

โดยที่

$$\begin{aligned} A &= \text{น้ำหนักของสารที่สกัดได้ (กรัม)} \\ B &= \text{น้ำหนักวัตถุดิบสมุนไพรตั้งต้นที่ใช้ (กรัม)} \end{aligned}$$

2.2 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH assay

2.2.1 ขั้นตอนการเตรียมสาร

(1) การเตรียมสาร DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

การเตรียมสาร DPPH 0.2 mM โดยการชั่งสารหนัก 0.08 g ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 95% ให้เป็น 200 ml เขย่าให้เข้ากัน และเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

(2) การเตรียมสารมาตรฐาน Trolox

การเตรียมสาร Trolox ความเข้มข้น 100 µg/ml โดยชั่งสารมา 1 mg ปรับ ปริมาตรด้วยเอทานอล 95% ให้เป็น 50 ml และเจือจางให้มีความเข้มข้น 50-800 µg/ml

(3) การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง

การเตรียมสารสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 5,000 µg/ml นำสารสกัดหยาบที่ด้วยสกัดเอทานอล ซึ่งสารสกัดตัวอย่างมา 50 mg ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 95% ให้เป็น 10 ml ให้มีความเข้มข้น 5,000 µg/ml และเจือจางให้มีความเข้มข้น 10-500 µg/ml

2.2.2 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH assay

เติมเอทานอล 95% ปริมาตร 200 µl ลงในหลุมที่ 1 ของ 96 well plate จากนั้นเติมสารมาตรฐาน DPPH 0.5 mM ปริมาตร 200 µl ลงในหลุมที่ 2 ของ 96 well plate จากนั้นเติมสารมาตรฐาน Trolox ปริมาตร 100 µl ลงในหลุมที่ 3 ของ 96 well plate และเติม DPPH ปริมาตร 100 µl ลงในหลุมที่มีสารมาตรฐาน Trolox จากนั้นเติมสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้น โดยเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปหามาก ความเข้มข้นละ 100 µl ลงในหลุมที่ 4 ของ 96 well plate แล้วจึงเติม DPPH ปริมาตร 100 µl ลงในหลุมที่มีสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ ทำการทดสอบตัวอย่าง 3 ซ้ำ เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate reader) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (%Radical scavenging) ที่ 50% (IC₅₀) คำนวณดังสมการที่ (2)

$$\text{Radical scavenging (\%)} = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100 \quad (2)$$

โดยที่

$$\begin{aligned} A_{\text{control}} &= \text{ค่า Absorbance ที่วัดได้ของสารละลาย DPPH} \\ A_{\text{sample}} &= \text{ค่า Absorbance ที่วัดได้ของสารผสมระหว่างสารละลาย DPPH กับสารตัวอย่าง} \end{aligned}$$

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu assay

2.3.1 ขั้นตอนการเตรียมสาร

(1) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Folin-Ciocalteu reagent

การเตรียมสาร Folin-Ciocalteu reagent โดยเตรียมในอัตราส่วน 1 : 10 ตวง Folin-Ciocalteu 10 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 ml

(2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml โดยชั่งสารมา 0.001 g ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล ให้ได้ 10 ml จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20, 40 และ 80 µg/ml

(3) การเตรียม Sodium carbonate (Na₂CO₃) 7.5%

การเตรียมสาร Na₂CO₃ โดยชั่งมา 7.5 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้เป็น 100 ml

(4) การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง

การเตรียมสารสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 5,000 µg/ml นำสารสกัดหยาบที่เตรียมด้วยสกัดเอทานอล ชั่งสารสกัดตัวอย่างมา 50 mg ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 95% ให้ได้ 10 ml ให้มีความเข้มข้น 5,000 µg/ml จากนั้นนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100-5,000 µg/ml

2.3.2 ขั้นตอนการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu

(1) เติมน้ำเอทานอล 95% ปริมาตร 200 µl ลงในหลุมที่ 1 ของ 96 well plate

(2) เติมน้ำ Folin-Ciocalteu ปริมาตร 200 µl ลงในหลุมที่ 2 ของ 96 well plate

(3) เติมน้ำมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ปริมาตร 20 µl ลงในหลุมที่ 3 ของ 96 well plate จากนั้นจึงเติมน้ำ Folin-Ciocalteu ปริมาตร 100 µl และเติมน้ำ Na₂CO₃ ปริมาตร 80 µl ลงในหลุมที่ 3 ของ 96 well plate ที่มีสารมาตรฐาน Gallic acid

(4) เติมน้ำสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้น โดยเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก ความเข้มข้นละ 20 µl ลงในหลุมที่ 4 ของ 96 well plate แล้วจึงเติมน้ำ Folin-Ciocalteu ปริมาตร 100 µl และเติมน้ำ Na₂CO₃ ปริมาตร 80 µl ลงในหลุมที่มีสารสกัดจากหยาบที่เตรียมไว้ จากนั้น เขย่า 96 well plate

(5) เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

(6) นำสารที่ได้มาวัดค่าจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate reader)

(7) สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย Gallic acid และวิเคราะห์ปริมาณ สารประกอบ Phenolic รวมในตัวอย่างสารสกัด

(8) คำนวณปริมาณสารประกอบ Phenolic รวมเฉลี่ยในรูป mg ของ gallic acid equivalents (GAE) /g crude extract

2.4 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบที่เตรียม**2.4.1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion**

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ในจานเพาะเชื้อ (Petri dish) จากนั้นจุ่มไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ ชุบแบคทีเรียที่ปรับความชื้นโดยให้มีปริมาณเชื้อ 10⁵-10⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เกลี่ยให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวางแผ่น Paper disc ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หยดสารสกัดปริมาณเข้มข้น 1,000 µg/ml ลงบนแผ่น Paper disc โดยใช้ Dimethyl Sulfoxide (DMSO) เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (Negative control) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง (Inhibition zone) วัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร

2.4.2 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration, MIC)

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ด้วยวิธี Microbroth dilution method โดยเจือจางสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ โดยเจือจางทีละสองเท่า (Two fold dilution) จากนั้นเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ โดยปรับความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียให้เท่ากับ 0.5 McFarland จากนั้นดูดเชื้อมาจำนวน 100 µl ใส่หลอด Microcentrifuge และเติมน้ำสกัดที่เตรียมไว้ตัวอย่างละ 100 µl จากนั้นนำไปเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4.3 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum bactericidal concentration, MBC)

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Microbroth dilution method โดยเจือจางสารสกัดเหี่ยวฝรั่ง โดยเจือจางทีละสองเท่า (Two fold dilution) จากนั้นเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ โดยปรับเชื้อความเข้มข้นให้เท่ากับ 0.5 McFarland จากนั้นดูดเชื้อมาจำนวน 100 μ l ใส่ Microcentrifuge tube และเติมสารสกัดที่เตรียมไว้อย่างละ 100 μ l จากนั้นนำไปเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสารจำนวน 20 μ l หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อทำการเขี่ยเชื้อลงบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยกำหนดให้ Positive control เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ และใช้ Negative control เป็น Distilled water จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงมาตรวจผล โดยดูจากโคโลนีที่เกิดขึ้น หากไม่มีโคโลนีเกิดขึ้นให้ใช้ความเข้มข้นนั้นเป็นค่า MBC

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 การเตรียมสารสกัดจากเหี่ยวฝรั่งที่ทำละลายเอทานอล 95%

จากการนำเหี่ยวฝรั่ง 2,300 g มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% และนำไประเหยแห้งโดยวิธี Evaporation จะได้น้ำหนักสารสกัดและนำมาคำนวณตามสมการ (1) พบว่าเหี่ยวฝรั่งได้ %Yield เท่ากับ 12.5 ของปริมาณสมุนไพรที่ใช้ (Table 1) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการสกัดเหี่ยวฝรั่ง (*C. lappacea*) ด้วยเอทานอล 95% โดยใช้วิธีการหมัก (Maceration) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้การเขย่า ให้ปริมาณสารสกัดหยาบอยู่ที่ร้อยละ 3.3 ซึ่งสูงกว่ารายงานในงานวิจัยที่ผ่านมาหลายฉบับ ซึ่งรายงานค่าร้อยละของสารสกัดหยาบในช่วงระหว่าง 1.0% ถึง 3.0% (Kamoltham et al., 2018; Kamoltham et al., 2017; Tinlapat et al., 2020) ดังนั้น ค่าร้อยละของสารสกัดที่ได้จากการศึกษานี้สามารถถือเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา หรือการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบต่อไปได้

Table 1 Percentage yield of *C. lappacea* extract

Sample	Total sample weight (g)	Weight of crude extract (g)	Extraction yield (%)
<i>C. lappacea</i> extract	2,300.00	289.52	12.50

3.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหี่ยวฝรั่ง ด้วยวิธี (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm จากนั้นนำมาคำนวณค่า % DPPH radical scavenging activity และหาค่า IC₅₀ (50% inhibitory concentration) ของสารสกัดจากเหี่ยวฝรั่ง ได้กราฟของสารสกัดเหี่ยวฝรั่งสมการเส้นตรงคือ $y = 0.0347x + 49.265$ และมีค่า R² = 0.9996 ดัง Figure 1 ค่า IC₅₀ ของสารสกัดเหี่ยวฝรั่ง ได้เท่ากับ 21.182 μ g/ml แสดงใน Table 2

Table 2. IC₅₀ values of *C. lappacea* extract and Trolox

Sample	IC ₅₀ (μ g/ml)
<i>C. lappacea</i> extract	21.182
Trolox	10.68

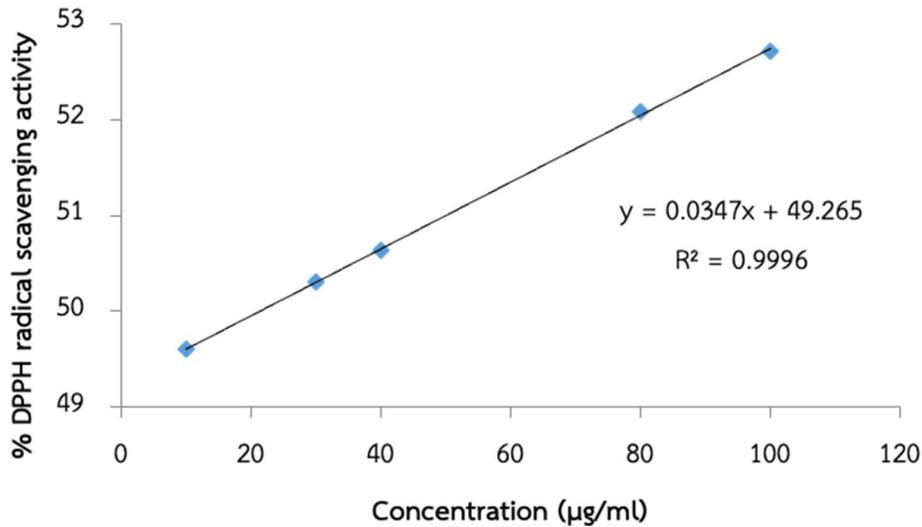


Figure 1 Standard calibration curve of Trolox determined by the DPPH radical scavenging assay

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity) โดยแสดงปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระลดลง 50% ของสารสกัดหุ้มารีแพร์ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox พบว่ามีค่าสูงกว่าสารสกัดหุ้มารีแพร์ แสดงว่าสารมาตรฐาน Trolox มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดหุ้มารีแพร์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหุ้มารีแพร์ของส่วนเนื้อดินหุ้มารีแพร์มีค่า IC_{50} เท่ากับ 97.16 µg/ml (Wanmanee et al., 2021)

3.3 ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหุ้มารีแพร์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย Gallic acid ที่มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 2.5, 5, 10, 20, 40 และ 80 µg/ml โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเฉลี่ยในรูปมิลลิกรัมของ Gallic acid equivalents (GAE) ต่อ 1 g crude extract ดัง Figure 2

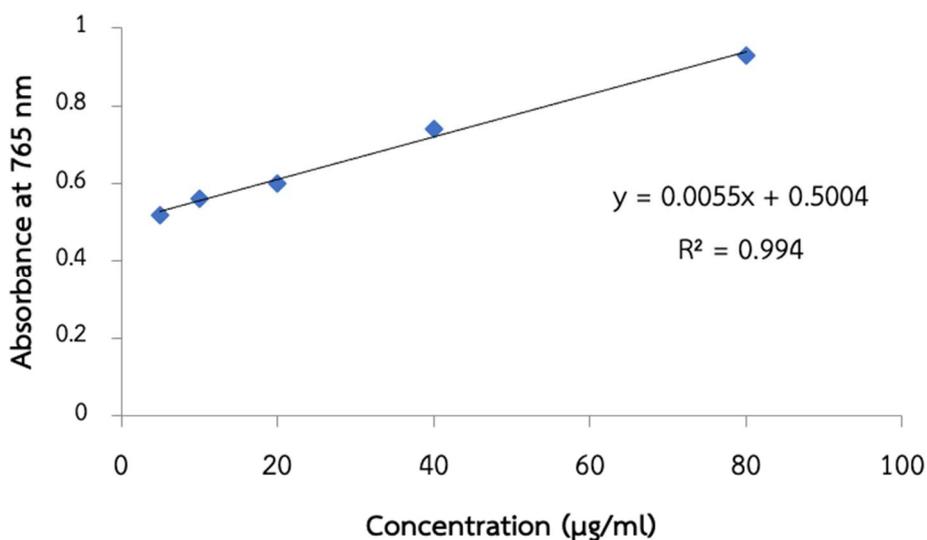


Figure 2 Standard calibration curve of Gallic acid determined by the Folin-Ciocalteu method

Table 3 IC₅₀ values and total phenolic content of *C. lappacea* extract

Extract	IC ₅₀ (µg/ml)	Total phenolic content (mg GAE/g crude extract)
<i>C. lappacea</i>	21.182	16.61

จากการศึกษาการปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า สารสกัดหยาบรีแพร์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 16.61 mg GAE/g crude extract (Table 3) สารประกอบฟีนอลิกพบได้มากมายทั้งในผัก ผลไม้ และสมุนไพร (Bonoli et al., 2004) กลไกในการต้านอนุมูลอิสระเกิดจากการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระของสารจำพวกฟีนอลิก ซึ่งจะได้เป็นสารที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระอีกต่อไป (Gulcin & Alwaseel, 2023) เมื่อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมาก ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระจะมากขึ้นด้วยเนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระมักจะเป็นสารประกอบพวกกลุ่มฟีนอลิก (Kim et al., 2005) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี จากการศึกษาการสกัดสมุนไพรหยาบด้วยเอทานอล 95% นำไปทำการศึกษหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า สารสกัดหยาบรีแพร์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 16.61 mg GAE/g crude extract เนื่องจากองค์ประกอบในสารสกัดจากหยาบรีแพร์ส่วนใหญ่ประกอบด้วย ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ สเตียรอยด์ (Wanmanee et al., 2021) ที่โครงสร้างของโมเลกุลมีหมู่ hydroxyl (-OH) ซึ่งเป็น functional group ที่มีความเป็นขั้วสูง จึงสามารถละลายออกมาได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วมาก (Zuorro et al., 2019) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pramokchon and Chomchoei (2017) ได้ศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบรีแพร์ พบว่า สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตตที่สกัดแยกออกจากชั้นเอทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดเท่ากับ 14.48±0.03 mg GAE/g และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kamoltham et al. (2017) ที่ได้ศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบรีแพร์ พบว่า หยาบรีแพร์ที่สกัดด้วยน้ำได้ค่าที่มากกว่าหยาบรีแพร์ที่สกัดด้วยเอทานอล โดยมีค่าเท่ากับ 43.26 และ 39.22 mg GAE/g dried extract ตามลำดับ

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบรีแพร์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity พบว่า มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 21.182 µg/ml (Table 3) มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 29.686 µg/ml ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH activity เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย ซึ่งอนุมูล DPPH เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัวมีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้วโดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูล อนุมูล DPPH เมื่ออยู่ในสารละลายจะมีสีม่วง และเมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูล DPPH จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Naik et al., 2003) ในการวัดการยับยั้ง IC₅₀ ที่มีค่าน้อยที่สุดจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด (Kaisoon et al., 2011) การที่หยาบรีแพร์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากในหยาบรีแพร์มีสารประกอบฟีนอลิก (Kamoltham et al., 2017) จากการศึกษาการสกัดสมุนไพรหยาบรีแพร์ด้วย 95% Ethanol นำไปทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบรีแพร์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 21.182 µg/ml ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Pramokchon and Chomchoei (2017) ที่ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของหยาบรีแพร์ พบว่าสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตตที่สกัดแยกออกจากชั้นเอทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.792±0.010 และ 0.400±0.008 mg/ml ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ตามลำดับ

3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบรีแพร์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3.4.1 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบรีแพร์ได้โดยวิธี Disc diffusion

จากการตรวจหาค่าของฤทธิ์การยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 5 ชนิด คือ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. pyogenes*, *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli*, *K. pneumoniae* และ *P. aeruginosa* พบว่าสารสกัดจากหยาบรีแพร์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. pyogenes* และมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดคือ 19.33±1.15 mm ดังแสดงใน Table 4 แต่ไม่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* และ *P. aeruginosa* ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาในพืชวงศ์เดียวกันจากงานวิจัยของ Suwanpujdee et al. (2012) ที่ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนม โดยมีเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *S. agalactiae* ที่พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *S. agalactiae* ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ

12.5, 3.125, 3.125 และ ค่า MBC ได้เท่ากับ 25, 6.25, 25 ตามลำดับ ซึ่งการหาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ ได้ทำการเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ Tetracycline ซึ่งเป็น Positive control มีกลไกการออกฤทธิ์การยับยั้งตัวของแบคทีเรียโดยการขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์แบคทีเรียที่มีความไวต่อยา

Table 4 Inhibition zones (mean \pm standard deviation) of *C. lappacea* extract against *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*

Samples	Inhibition zone (mm)				
	<i>S. pyogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Positive control	32.10 \pm 1.03	45.13 \pm 0.70	30.02 \pm 1.15	19.00 \pm 2.50	9.27 \pm 1.36
Negative control	–	–	–	–	–
<i>C. lappacea</i> extract	19.33 \pm 1.15	–	–	–	–

Note: – indicates no inhibition zone.

3.4.2 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC)

ผลการทดสอบการประเมินค่า MIC พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรหยาบที่ตัวทำละลายเอทานอล 95% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. pyogenes* ได้ดีที่สุดโดย ให้ค่า MIC เท่ากับ 125 μ g/ml ส่วนผลการทดสอบประเมินค่า MBC พบว่า สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. pyogenes* ได้ดีที่สุด โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 125 μ g/ml ดังแสดงใน Table 5 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jantanu et al. (2016) ที่ทำการศึกษายับยั้งเชื้อ *S. pyogenes* โดยใช้แผ่นฟิล์มบิโกลดผสมสารสกัดมะรุม พบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะรุมสามารถยับยั้งเชื้อได้ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 31.33 มิลลิเมตร รองลงมาคือสารสกัดจากดอก ผัก ราก กิ่ง และใบมะรุมตามลำดับ ผักและรากมะรุมมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ เท่ากับ 12.50 mg/ml และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบ เท่ากับ 25.00 mg/ml และงานวิจัยของ Sutabhaha and Khantawa (2011) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดใบผักขวก่อนนำไปพัฒนาตำรับยารักษาโรคผิวหนัง จากการสกัดด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต เอทานอล และเมทานอล และทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดด้วยวิธี Agar well diffusion method และ Agar dilution method ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดใบผักขวก่อนที่สกัดด้วยเฮกเซน ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (*S. aureus*, *S. pyogenes* และ *E. coli*) และเชื้อรา ที่ใช้ในการทดสอบได้ ส่วนสารสกัดจากเมทานอล ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด และเชื้อรา *Candida albicans* และ *Aspergillus flavus* แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราอโรคลากทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* และ *Epidermophyton floccosum* ได้ (MIC = 78.125–312.5 mg/ml : zone size 12.2 \pm 2.1–15.0 \pm 0.5 mm) ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลและเอทิลอะซิเตต มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดแกรมบวก (*S. aureus* และ *S. pyogenes*) และเชื้อราอโรคลากทั้ง 4 ชนิด โดยมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา (MIC = 156.250–312.5 mg/mL: zone size 12.0 \pm 0.5–24.0 \pm 1.5 mm) ดีกว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (MIC = 625.0 mg/mL: zone size 12.0 \pm 0.5–14.0 \pm 0.5 mm) และงานวิจัยของ Limsuwan et al. (2012) ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรไทยต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. pyogenes* พบว่ากระชายและโทะ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. pyogenes* ได้ดี โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วงเดียวกันคือ 3.91–62.5 μ g/ml ส่วนหอมแดงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. pyogenes* โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วงเดียวกันคือ 250–500 μ g/ml จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดจากหยาบสมุนไพรมาพัฒนาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะที่เกิดจากการติดเชื้อจากแบคทีเรีย *S. pyogenes* ได้เนื่องจากสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อได้ ส่วนการติดเชื้อที่เกิดจาก *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*

และ *P. aeruginosa* สารสกัดจากหญาารี่แพร์ที่นำมาทดลองในการศึกษาครั้งนี้ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้นำตัวอย่างหญาารี่แพร์มาจากแหล่งเดียวคือ อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร ทำให้ปริมาณสารสกัดหญาารี่แพร์ที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้เพียงชนิดเดียว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Poowanna et al. (2014) ที่พบว่าสารสกัดจากแหล่งต่าง ๆ 15 แหล่ง มีปริมาณสารสำคัญแตกต่างกันในแต่ละแหล่งของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา นอกจากนี้ ในการศึกษาครั้งนี้มีการใช้หญาารี่แพร์ทั้งต้นในการสกัดโดยไม่ได้แยกส่วนประกอบ จึงทำให้ไม่ทราบถึงส่วนที่ออกฤทธิ์แต่ละส่วนได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Visutthi (2017) ที่พบว่า ส่วนต่าง ๆ ของพืชชนิดเดียวกันมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในกลุ่ม *Staphylococcus* แตกต่างกัน ทั้งนี้ การศึกษาครั้งนี้ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายเพียงชนิดเดียวในการสกัดสารสำคัญ ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัด เนื่องจากตัวทำละลายที่แตกต่างกันสามารถส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของสารสกัดได้แตกต่างกันได้ (Srisukong et al., 2016)

Table 5 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *C. lappacea* extract against *S. pyogenes*

Extract	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
<i>C. lappacea</i>	125	125

4. สรุป

สารสกัดหญาารี่แพร์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 16.61 mg GAE/g crude extract โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 125 µg/ml มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. pyogenes* ได้ ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าสารสกัดหญาารี่แพร์อาจสามารถพัฒนาเป็นทางเลือกหรือใช้เสริมในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *S. pyogenes* ได้ในอนาคต การนำไปประยุกต์ใช้ดังกล่าวอาจช่วยลดการพึ่งพาการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดเดิม และเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงด้วยความช่วยเหลือจากคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร และการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

6. เอกสารอ้างอิง

- Bonoli, M., Marconi, E., & Caboni, M. F. (2004). Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.) flours: Evaluation of the extraction capability of different solvent mixtures and pressurized liquid methods by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry. *Journal of Chromatography A*, 1057(1-2), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.09.024>
- Boonyasiri, A., Tangkoskul, T., Seenama, C., Saiyarin, J., Tiengrim, S., & Thamlikitkul, V. (2014). Prevalence of antibiotic resistant bacteria in healthy adults, foods, food animals, and the environment in selected areas in Thailand. *Pathog Glob Health*, 108(5), 235-245. <https://doi.org/10.1179/2047773214Y.0000000148>
- Danchaivijit, S., Judaeng, T., Sripalakij, S., Naksawas, K., & Plipat, T. (2007). Prevalence of nosocomial infection in Thailand 2006. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 90(8), 1524-1529.
- Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*, 7(12), 653-660. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.190>
- Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2023). DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes*, 11(8), 2248. <https://doi.org/10.3390/pr11082248>

- Hazalin, N. A. M. N., Ramasamy, K., Lim, S. S. M., Wahab, I. A., Cole, A. L. J., & Abdul Majeed, A. B. (2009). Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9(1), 46. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-46>
- Jantanu, S., Yuentrakul, P., & Jirapong, C. (2016). Inhibition of *Streptococcus pyogenes* by edible film containing *Moringa oleifera* Lam. extracts. *Huachiew Chalermprakiet Science and Technology Journal*, 2(2), 20-27.
- Kaisoon, O., Siriamornpun, S., Weerapreeyakul, N., & Meeso, N. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. *Journal of Functional Foods*, 3(2), 88-99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.03.002>
- Kamoltham, T., Manosroi, J., Chankhampan, C., Manosroi, W., & Manosroi, A. (2018). In vitro anti-aging activities of *Centotheca lappacea* (L.) desv. (Ya repair) extract. *Chiang Mai Journal of Science*, 45(2), 846-857.
- Kamoltham, T., Rungsimakan, S., Supan, K., & Rodsienglump, P. (2017). Chemical Constituents of *Centotheca lappacea* (L.) Desv. Aerial Parts. *Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine*, 15(1), 14-29. [in Thai]
- Kim, H. J., Chen, F., Wang, X., Chung, H. Y., & Jin, Z. (2005). Evaluation of antioxidant activity of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) oil and identification of its antioxidant constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7691-7695. <https://doi.org/10.1021/jf050833e>
- Limsuwan, S., Kayser, O., & Voravuthikunchai, S. P. (2012). Antibacterial Activity of *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. Leaf Extract against Clinical Isolates of *Streptococcus pyogenes*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 697183. <https://doi.org/10.1155/2012/697183>
- McLellan, L. K., & Hunstad, D. A. (2016). Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends in Molecular Medicine*, 22(11), 946-957. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.09.003>
- Musa, H. H., Musa, T. H., Oderinde, O., Musa, I. H., Shonekan, O. O., Akintunde, T. Y., & Onasanya, A. K. (2023). Traditional herbal medicine: overview of research indexed in the scopus database. *Advances in Traditional Medicine*, 23(4), 1173-1183. <https://doi.org/10.1007/s13596-022-00670-2>
- Naik, G. H., Priyadarsini, K. I., Satav, J. G., Banavalikar, M. M., Sohoni, D. P., Biyani, M. K., & Mohan, H. (2003). Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. *Phytochemistry*, 63(1), 97-104. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00754-9](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00754-9)
- Poowanna, R., Nualkaew, N., & Nualkaew, S. (2014). Standardization of Thai Traditional Medicine Method for Treatment of *Garcinia hanburuyi* Hook.f Resins. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 124-135.
- Pramokchon, P., & Chomchoei, A. (2017). *Antioxidant Activity, Total Phenolic Compound and Antibacterial Activity of Crude Extracts of Thai Medicinal plant Centotheca lappacea (L.) Desv.* In Proceedings of the 10th Rajamangala University of Technology Tawan-ok Research Conference, Chonburi, Thailand. Rajamangala University of Technology Tawan-ok.
- Srisukong, A., Jantree, K., & Hanpakphum, S. (2016). The study of antibacterial in weed extracts. *VRU Research and Development Journal Science and Technology*, 11(1), 69-82.
- Sutabhaha, B., & Khantawa, B. (2011). Antibacterial and antifungal activities Fak Khaao leaf extract. *The Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences*, 44(1), 31-37.

- Suwanpugdee, A., Saisornthip, R., & Sutthimusik, S. (2012). The inhibitory efficiency of the essential oil from lemon grass and citronella grass on the growth of Bovine mastitis pathogens: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 40(2), 230-235.
- Tinlapat, J., Ingkaninan, K., Meethang, S., Munsing, S., & Hematulin, A. (2020). The radioprotective potential of *Centotheca lappacea* (L) desv. extract in human endothelial cell. *Journal of Associated Medical Sciences*, 53(3), 55–61. <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/bulletinAMS/article/view/243915>
- Visutthi, M. (2017). Antagonistic effect of *Staphylococci* of extracts from some local plants in Nakorn-Ratchasima Province. *KKU Science Journal*, 45(4), 805-816.
- Wanmanee, N., Siriwattanavorakul, P., Munee, S., Maneechot, A., Marde, W., & Noipha, K. (2021). Phytochemical study, total phenolic, and antioxidant activity of herbal extracts for development of a hand treatment serum. *Journal of Traditional Thai Medical Research*, 7(2), 31-44.
- Wongsrisom, N., Jinata, J., Manosan, B., Kuntakhoo, J., Wankuan, S., & Sriyam, S. (2014). Anti-bacterial activities of essential oils from Mah-Khwuaen (*Zanthoxylum limonella* Alston). *KMUTT Research and Development Journal*, 37(1), 3-15.
- Zuorro, A., Iannone, A., & Lavecchia, R. (2019). Water–organic solvent extraction of phenolic antioxidants from brewers’ spent grain. *Processes*, 7(3), 126. <https://doi.org/10.3390/pr7030126>