

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Proteus mirabilis*

ของสารสกัดหยาบจากมะแขว่น

Antioxidant and Antibacterial Activity of *Proteus mirabilis*

from Crude *Zanthoxylum limonella* Extract

จุฑามาศ ดวงกมล^{1*} อิศริยา ดุษฎีสุรพจน์² นันทน์ภัส พุ่มนวล² ปิยธิดาภรณ์ ดิษฐเวชชัย³

ภาสวิษฐ์ วรรณพาน⁴ ณัฐวุฒิ ธิติวิรัตน์⁴ และ ปัทมกร เจียมธีระนาถ⁵

Chuthamat Duangkamol^{1*} Isareeya Dusadeesurapoj² Nannaphat Pumnuat²

Piyatidapond Dittthavejchai³ Passawit Wannapanop⁴ Nutthiwut Thitiwirat⁴

and Pabhungkorn Jeamthiranart⁵

¹สาขาวิทยาศาสตร์พื้นฐานและวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยปทุมธานี ประเทศไทย

²สาธิตนานาชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

³โรงเรียนเบญจมราชูทิศ ประเทศไทย

⁴โรงเรียนสาธิตนานาชาติ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประเทศไทย

⁵โรงเรียนนานาชาติเอ็กมา ประเทศไทย

^{1*}Division of Basic and Medical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences, Pathumthani University, Thailand

²Mahidol University International Demonstration School, Thailand

³Benchamarachuthit school, Thailand

⁴KMIDS: King Mongkut's International Demonstration School, Thailand

⁵Ekamai International School, Thailand

*E-mail: chuthamat.d@ptu.ac.th Tel. (+66)804040816

(Received 01/10/2024, Revised 26/05/2025, Accepted 29/06/2025)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Proteus mirabilis* ของสารสกัดหยาบจากมะแขว่นโดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันสองชนิด พบว่า สารสกัดหยาบจากมะแขว่นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลได้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน โดยให้ร้อยละของสารสกัดหยาบเท่ากับ 12.7 และ 7.7 ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากมะแขว่นที่ใช้ตัวทำละลายเมทานอลมีบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. mirabilis* เท่ากับ 23.83 ± 0.624 มิลลิเมตร ในขณะที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนมีบริเวณการยับยั้ง เท่ากับ 15.33 ± 0.623 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากมะแขว่นโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล มีค่าเท่ากับ 3.678 ± 0.025 mgGAE/gDW และ 4.279 ± 0.540 mgQE/gDW ส่วนสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน เท่ากับ 3.217 ± 0.103 mgGAE/gDW และ 2.722 ± 0.125 mgQE/gDW ตามลำดับ จากการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากมะแขว่นซึ่งเป็นสารธรรมชาติที่มีศักยภาพสามารถนำมาเป็นทางเลือกสำหรับการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมรวมถึงการทดสอบในสัตว์และการทดสอบความเป็นพิษในแบบจำลองที่ใช้สัตว์เพื่อยืนยันการใช้สารสกัดจากมะแขว่นในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียและโรคติดเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ในอนาคตรวมทั้งความปลอดภัยในการใช้งาน

คำสำคัญ: มะแขว่น แบคทีเรีย *Proteus mirabilis* ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

Abstract

This study examined the antioxidant activity and antibacterial *Proteus mirabilis* activity of a crude *Zanthoxylum limonella* extract using two distinct polarity solvents. The crude *Zanthoxylum limonella* extraction yield was 12.7% when methanol was used as the solvent and 7.7% when dichloromethane was used. *Zanthoxylum limonella* crude extracts suppressed *P. mirabilis* bacterial growth with an average area of 23.83 ± 0.624 mm in methanol and 15.33 ± 0.623 mm in dichloromethane. Moreover, the total phenolic and flavonoid contents of *Zanthoxylum limonella* were found to be 3.618 ± 0.107 mgGAE/gDW and 4.279 ± 0.539 mgQE/gDW in the methanol extract and 3.217 ± 0.103 mgGAE/gDW and 2.722 ± 0.125 mgQE/gDW in the dichloromethane extract, respectively. Based on the results of the experiment, it is possible to conclude that the crude extract of *Zanthoxylum limonella*, a potentially beneficial natural compound, could be used to treat patients with urinary tract infections. However, additional research, including animal testing and toxicity assessments in animal models, is required to confirm the future use of *Zanthoxylum limonella* extract in treating bacterial infections and other related diseases, as well as to ensure its safety for use.

Keywords: *Zanthoxylum limonella*, *Proteus mirabilis*, Antioxidant, Antibacterial activity

1. บทนำ

แบคทีเรีย *Proteus mirabilis* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคในมนุษย์ ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ และในสิ่งปฏิกูล (Schaffer & Pearson, 2017; Jacobsen et al., 2011) แต่ในทางการแพทย์นั้นแบคทีเรีย *P. mirabilis* มักจะพบปนเปื้อนอยู่ในเครื่องมือทางการแพทย์ ในประเทศไทยการติดเชื้อ *P. mirabilis* มีแนวโน้มพบมากขึ้นในโรงพยาบาลและในชุมชนผู้ป่วยที่มีภาวะเสี่ยงสูง คือกลุ่มผู้ป่วยที่มีการใช้เครื่องมือทางการแพทย์ โดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ (Urinary Tract Infection: UTIs) (Bartges, 2004; Gupta et al., 2017) เนื่องจากผู้ป่วยมีการใส่สายสวนปัสสาวะเป็นเวลานานจึงเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ และเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการเคลื่อนที่และสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ทำลายเนื้อเยื่อ ซึ่งทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงได้ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง การติดเชื้อจากเชื้อนี้อาจนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อน เช่น นิ่วในไต การติดเชื้อในกระแสเลือด และอาการติดเชื้อที่รุนแรงหากไม่ได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที (Panumgul et al., 2021)

มะแขว่น (*Zanthoxylum limonella*) เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่พบได้ในป่า สูงประมาณ 10-20 เมตร ลักษณะผลจะกลมติดกัน 3 ผล ดิบจะเป็นสีเขียว เมื่อแก่จัดผลจะแตกเป็นแฉก ๆ และมีเมล็ดข้างในเป็นสีดำ ส่วนผลแห้งจะมีผิวขรุขระสีน้ำตาล (Nadon et al., 2023; Tangjitjaroenkun et al., 2012) ดัง Figure 1 มะแขว่นเป็นพืชสมุนไพรที่พบได้ทั่วไปในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในภาคเหนือของประเทศไทย (Khruengsai et al., 2023) ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีในฐานะเครื่องเทศพื้นบ้านที่มีรสชาติและกลิ่นเฉพาะตัว โดยปกตินิยมนำมะแขว่นมาใช้เป็นเครื่องเทศในการปรุงรสอาหารหลายประเภท เช่น ลาบ หลู้ และแกงต่าง ๆ จึงถูกใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องเทศในอาหารมาอย่างยาวนาน

ยิ่งไปกว่านั้นมะแขว่นยังมีสรรพคุณทางยาที่น่าสนใจ (Tangjitjaroenkun et al., 2012) และมักถูกนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในตำรายาพื้นบ้าน เช่น การนำผลมะแขว่นมาใช้เป็นส่วนประกอบในยาบำรุงหัวใจ ขับลมในทางเดินอาหาร แก้ววิงเวียนศีรษะ แก้โลหิตเป็นพิษ บำรุงโลหิต เป็นต้น (Charoenying et al., 2010) นอกจากนี้สารสกัดจากมะแขว่นยังมีคุณสมบัติต้านจุลชีพ ต้านอนุมูลอิสระ (Palasuwan et al., 2005; Wipoosanapan et al., 2018) และคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ (Kalyani et al., 1989 and Charoensup et al., 2016) เนื่องจากสารสกัดจากมะแขว่นมีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลาย เช่น ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก คูมาริน ลิโมนีน และแอลคาลอยด์ เป็นต้น (Pattanawongsa et al., 2021; Pitasawat et al., 2007; Wongkattiya et al., 2018) ที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายประการ หนึ่งในคุณสมบัติที่น่าสนใจ คือ ความสามารถ

ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* (Khruengsai et al., 2023 and Tangjitjaroenkun et al., 2012) *Escherichia coli* (Elcocks et al., 2020) *Pseudomonas aeruginosa* (Khruengsai et al., 2023 and Elcocks et al., 2020) และ *Staphylococcus epidermidis* (Wongsrisom et al., 2014) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค ดังนั้นจึงทำให้สารสกัดจากมะแขว่นเป็นที่สนใจของนักวิจัยในการศึกษาเกี่ยวกับประโยชน์ต่อสุขภาพ

งานวิจัยในปัจจุบันมุ่งเน้นการศึกษาเกี่ยวกับน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น (Das et al., 2015) โดยศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากส่วนต่าง ๆ ของมะแขว่น เช่น เมล็ด เปลือก และกิ่ง การศึกษาเหล่านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุองค์ประกอบทางเคมีที่มีศักยภาพในยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค รวมถึงการประเมินความปลอดภัยและประสิทธิภาพในการใช้งานทางการแพทย์ (Charoensup et al., 2016) จากข้อมูลวิจัยเบื้องต้นนั้นยังไม่พบว่ามีรายงานเกี่ยวกับการนำสารสกัดหยาบจากมะแขว่นที่ออกฤทธิ์และให้ประสิทธิภาพอย่างจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในทางเดินปัสสาวะ *P. mirabilis* ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินปัสสาวะของสารสกัดหยาบจากมะแขว่นโดยใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน และเมทานอล



Figure 1 Makwaen pepper

Source: Nadon et al. (2023)

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมสารสกัดจากมะแขว่น

มะแขว่นที่ใช้ในการศึกษานำมาจาก ต.วังเหนือ อ.วังเหนือ จ.ลำปาง เตรียมสารสกัดมะแขว่นโดยการนำมะแขว่น เด็ดเอาเฉพาะผลแก่ที่ติดกับก้านมาล้างน้ำให้สะอาด หลังจากนั้นนำมาแกะเอาเมล็ดออกแล้วนำไปอบเพื่อไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมะแขว่นที่อบจนแห้งแล้วไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ซึ่งมะแขว่นปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด แล้วเติมตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน หรือเมทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 : 10) แช่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองสารสกัดมะแขว่นด้วยกระดาษกรองแล้วนำสารสกัดที่ได้มาระเหยเพื่อเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) เมื่อสารสกัดระเหยแห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณร้อยละของผลผลิตที่ได้ (%yield) ดังสมการที่ (1) และนำสารสกัดหยาบมะแขว่นที่ได้เก็บไว้ที่ก่อนนำไปทดลองต่อไป

$$\text{ร้อยละของผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักของผลผลิตจากมะแขว่นที่สกัดได้จริง (g)} \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างมะแขว่นแห้งตั้งต้น (g)}} \quad (1)$$

2.2 วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay (Baliyan et al., 2023)

นำสารสกัดมะแขว่นความเข้มข้น 0.3125–10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เติมลงใน 96 well plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Microplate reader คำนวณหาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเทียบกับความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 0.3125–10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รายงานผลเป็นค่า % Inhibition ดังสมการที่ (2)

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_0 - A_c}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

โดย A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) A_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เมื่อเติมสารสกัดหรือสารมาตรฐาน

2.3 การทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดมะแขว่น (Saeed et al., 2012)

นำสารสกัดมะแขว่นความเข้มข้น 0.3125–10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เติมลงใน 96 well plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่มีน้ำกลั่น 40 ไมโครลิตร ตามด้วยโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วยอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ Quercetin เป็น Positive control

2.4 การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดมะแขว่น (Saeed et al., 2012)

นำสารสกัดมะแขว่นความเข้มข้น 0.3125–10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เติมลงใน 96 well plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 2.0 โมลาร์ Folin-Ciocalteu ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate) ความเข้มข้น 75 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปิดทับด้วยกระดาษฟลอยด์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer และคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดมะแขว่นโดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิก (Gallic Acid) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดมะแขว่น (Domig et al., 2007)

ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. mirabilis* โดยตรวจสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยใช้สารสกัดหยาบจากมะแขว่นที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใช้ Ciprofloxacin 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็น Positive control และใช้ตัวทำละลาย DMSO เป็น Negative control โดยใช้หว่านถ่ายเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar base (Infusion Agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเชื้อให้ด้วย PBS buffer ให้ได้ OD เทียบเท่า McFarland 0.5 และใช้ไม้ที่พันด้วยสำลีจุ่มลงในหลอดสารละลายเชื้อ นำมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร Blood agar base (Infusion Agar) ดูดสารสกัดมะแขว่นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบน Paper disc ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้ววาง Paper disc บนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (Inhibition Zone)

2.6 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

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

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 ร้อยละของผลผลิต (%yield) ของสารสกัดหยาบจากมะแขว่น

จากการเปรียบเทียบการหาปริมาณร้อยละของสารสกัดหยาบจากมะแขว่น พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลให้ปริมาณร้อยละของสารสกัดหยาบจากมะแขว่นมากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนเนื่องจากสารสำคัญในมะแขว่นส่วนมากเป็นสารประกอบที่มีขั้ว เช่น ฟลาโวนอยด์ 1-octanol Thymol Terpinene-4-ol 2,6-octadien-1-ol และ 9-octadecenamide เป็นต้น (Nadon et al., 2023) ดังนั้นตัวทำละลายเมทานอลที่ขั้วสูงกว่าตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนจึงสามารถละลายสารสำคัญออกมาในปริมาณที่มากกว่าจึงทำให้ปริมาณร้อยละของสารสกัดหยาบมีมากกว่า ซึ่งจะให้ร้อยละของสารสกัดหยาบจากมะแขว่นเท่ากับ 12.7 และ 7.7 ตามลำดับ ดังแสดงไว้ใน Table 1

Table 1 The percentage yield of crude extract from *Zanthoxylum limonella*

No.	Solvent	Crude extract from <i>Zanthoxylum limonella</i> (%yield)
1	ไดคลอโรมีเทน	7.7
2	เมทานอล	12.7

3.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH activity ของสารสกัดมะแขว่น

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากมะแขว่น พบว่าสารสกัดมะแขว่นในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Activity) ต่อ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) อย่างชัดเจน โดยค่า %Inhibition เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (Figure 2) ซึ่งสารสกัดมะแขว่นในตัวทำละลายเมทานอลแสดงค่า %Inhibition ที่สูงกว่าสารสกัดมะแขว่นในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน จากการศึกษาช่วยให้เข้าใจถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดมะแขว่นในการต้านอนุมูลอิสระจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน

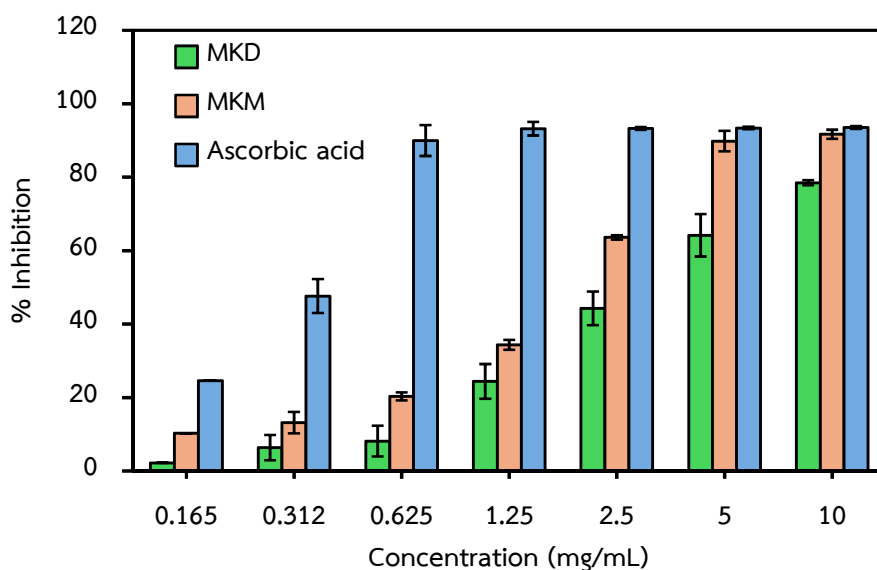


Figure 2 Percentage of free radical inhibition of crude extracts of *Zanthoxylum limonella* compared to ascorbic acid at various concentrations (mg/mL). MKD: Extracted with dichloromethane; MKM: Extracted with methanol

3.3 ปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากสารสกัดมะแขว่น

จากการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานแควอซีทินมีสมการเส้นตรง คือ $y = 0.3664x + 0.068$ มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9999 (Figure 3) พบว่า มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากมะแขว่นที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีค่าเท่ากับ 2.722 ± 0.125 mgQE/gDW และสารสกัดหยาบจากมะแขว่นที่สกัดด้วยเมทานอลมีค่าเท่ากับ 4.279 ± 0.540 mgQE/gDW ดัง Table 2 ผลการทดลองพบ ว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่สกัดจากตัวทำละลายทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นซึ่งจะแปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่เพิ่มขึ้น จากงานวิจัยที่รายงานก่อนหน้านี้พบว่าในมะแขว่นมีสารประกอบที่มีขี้ และไม่มีขี้ในปริมาณที่ต่างกันเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ 1-octanol Cyclohexanol Terpinene-4-ol Thymol 9-octadecenamide Sabinene และ Beta-myrcene เป็นต้น (Nadon et al., 2023) โดยส่วนมากจะเป็นสารประกอบประเภทแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีขี้ สารสำคัญเหล่านี้จะสามารถละลายออกมาได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขี้ ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้สารสกัดหยาบจากมะแขว่น MKM มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเฉลี่ยมากกว่า MKD จึงสอดคล้องกับรายงานข้างต้น เนื่องจากตัวทำละลายเมทานอลมีขี้สูงกว่าตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนจึงทำให้สามารถละลายสารสำคัญที่มีอยู่ในมะแขว่นออกมาได้ดีกว่า

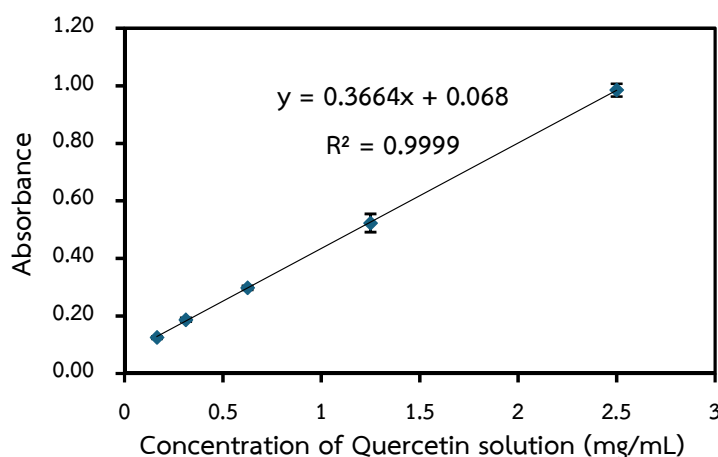


Figure 3 Standard curve of quercetin used for determining total flavonoid content

3.4 ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมจากสารสกัดมะแขว่น

จากการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากมะแขว่น โดยเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกมีสมการเส้นตรง คือ $y = 0.3691x + 0.0667$ มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9998 (Figure 4) พบว่า มีปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากมะแขว่นที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีค่าเท่ากับ 3.217 ± 0.103 mgGAE/gDW และสารสกัดหยาบจากมะแขว่นที่สกัดด้วยเมทานอลมีค่าเท่ากับ 3.678 ± 0.025 mgGAE/gDW ดัง Table 2 จากผลการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัดหยาบจากมะแขว่นที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และเมทานอลที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะมีค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ความเข้มข้น 0.625 และ 1.25 mg/mL ของกรดแกลลิกตามลำดับ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าประสิทธิภาพของตัวทำละลายมีผลต่อความสามารถในการสกัดสารสำคัญบางชนิดออกมาในปริมาณมากน้อยที่ต่างกัน ดังที่กล่าวมาข้างต้นว่าตัวทำละลายเมทานอลมีขี้มากกว่าตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ซึ่งตัวทำละลายเมทานอลมี Polarity Index เท่ากับ 5.1 ซึ่งมากกว่าตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน Polarity Index เท่ากับ 3.1 (Kleiman et al., 2016) ดังนั้นตัวทำละลายเมทานอลจึงมีประสิทธิภาพในการสกัดสารที่มีขี้จำพวกสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ออกมาได้ดีกว่าตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

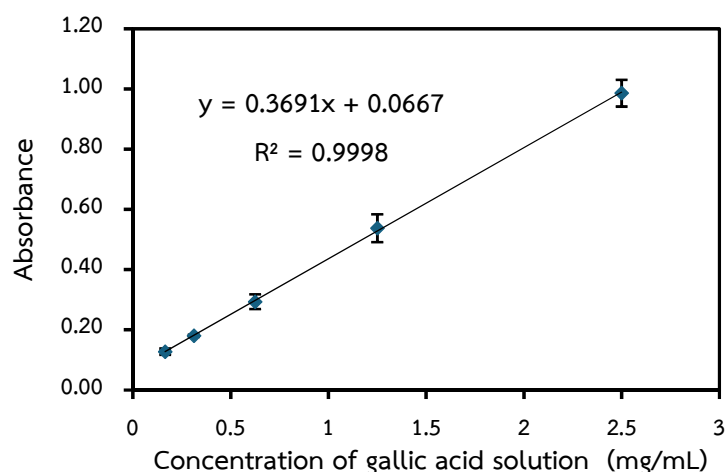


Figure 4 Standard curve of gallic acid used for determining total phenolic content

Table 2 Total flavonoid content (TFC) and total phenolic content (TPC) of crude extracts from *Zanthoxylum limonella*.

Concentrations (mg/mL)	TFC (mgQE/gDW)	
	MKM	MKD
0.17	0.596±0.051	0.291±0.013
0.31	0.780±0.008	0.314±0.002
0.63	1.157±0.060	0.556±0.038
1.25	1.331±0.086	0.912±0.058
2.50	1.804±0.049	1.436±0.028
5.00	2.409±0.027	2.110±0.233
10.00	4.279±0.540	2.722±0.125

Concentrations (mg/mL)	TPC (mgGAE/gDW)	
	MKM	MKD
0.17	0.609±0.055	0.258±0.016
0.31	0.806±0.031	0.319±0.022
0.63	1.178±0.074	0.561±0.031
1.25	1.347±0.012	0.851±0.034
2.50	1.855±0.058	1.356±0.127
5.00	2.524±0.058	2.308±0.068
10.00	3.678±0.025	3.217±0.103

Note All data were expressed as mean ± SD for 3 replications.

MKM: Extracted with methanol; MKM: Extracted with dichloromethane.

3.5 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *P.mirabilis* ของสารสกัดหยาบจากมะแขว่น

จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากมะแขว่นที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอลมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *P. mirabilis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารสกัดหยาบจากมะแขว่นที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนพบว่ามีโซนยับยั้งน้อยกว่าสารสกัดหยาบจากมะแขว่นที่สกัดด้วยเมทานอล โดยมีค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งมีค่าเท่ากับ 15.33 ± 0.62 มิลลิเมตร และ 23.83 ± 0.62 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีประสิทธิภาพมากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนในการยับยั้งเชื้อ *P. mirabilis* แต่ยังคงมีประสิทธิภาพน้อยกว่า Ciprofloxacin ดัง Figure 5 และ Table 3 จะเห็นได้ว่าสารหยาบจากมะแขว่นที่สกัดจากตัวทำละลายทั้งสองชนิดมีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *P. mirabilis* ได้ จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากมะแขว่นมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* *B. subtilis* *P. aeruginosa* และ *E. coli* (Nadon et al., 2023) แต่ยังไม่พบว่ามีกรรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรีย *P. mirabilis* ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจนำมาศึกษา อย่างไรก็ตามความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดนั้นจะมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับตัวทำละลาย และเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบด้วย ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปริมาณของสารสกัดที่ได้และองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจะช่วยให้เข้าใจเกี่ยวกับคุณสมบัติและประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากมะแขว่นเพิ่มมากขึ้น



Figure 5 Images of disc diffusion assay showing Ciprofloxacin (P), negative control (C), Zanthoxylum limonella extracted with methanol (MKM), and dichloromethane (MKD)

Table 3 Average inhibition zone of crude extracts from Zanthoxylum limonella.

Bacteria	Inhibition Zone (mm)		
	MKD	MKM	Ciprofloxacin
<i>Proteus mirabilis</i>	15.33 ± 0.62	23.83 ± 0.62	32.33 ± 1.03

Note MKM: Extracted with methanol; MKM: Extracted with dichloromethane.

4. สรุป

สารสกัดหยาบจากมะแขว่นโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล และตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนในการสกัด พบว่าสารสกัดหยาบจากมะแขว่นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลให้ร้อยละผลผลิตสูงกว่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน คือร้อยละ 12.7 และ 7.7 และพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 3.678 ± 0.025 mgGAE/gDW และ 3.217 ± 0.103 mgGAE/gDW และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 4.279 ± 0.540 mgQE/gDW และ 2.722 ± 0.125 mgQE/gDW ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบจากมะแขว่นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. mirabilis* ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน โดยมีค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 15.33 ± 0.623 มิลลิเมตร และ 23.83 ± 0.624 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากมะแขว่นอาจเป็นทางเลือกสำหรับการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ และใช้ในการต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เนื่องจากมะแขว่นเป็นสมุนไพรไทยถูกใช้เป็นประจำสำหรับคนภาคเหนือมาอย่างช้านาน อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมรวมถึงการทดสอบในสัตว์ทดลอง และการทดสอบความเป็นพิษเพื่อความปลอดภัยต่อการใช้งาน และเป็นประโยชน์ทางด้านการแพทย์ได้ในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ (ถ้ามี)

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยปทุมธานีที่สนับสนุนทุนวิจัยให้บุคลากรในมหาวิทยาลัยได้พัฒนาศักยภาพทางด้านการวิจัยร่วมกับกลุ่มนักเรียนมัธยมศึกษาตอนปลายที่มีความสนใจในด้านงานวิจัย และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการกลาง คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยปทุมธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย และความช่วยเหลือด้านต่างๆ จนคณะผู้วิจัยสามารถทำ งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

- Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., & Chang, C.-M. (2022). Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, 27(4), 1326. <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>
- Bartges, J. W. (2004). Diagnosis of urinary tract infections. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 34(4), 923–933. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.03.001>
- Charoensup, R., Duangyod, T., Phuneerub, P., & Singharachai, C. (2016). Pharmacognostic specification of *Zanthoxylum limonella* (Dennst.) Alston: Fruits and seeds in Thailand. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 7(4), 134–138. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.191421>
- Charoenying, P., Teerarak, M., & Laosinwattana, C. (2010). An allelopathic substance isolated from *Zanthoxylum limonella* Alston fruit. *Scientia Horticulturae*, 125(3), 411–416. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.04.045>
- Das, N. G., Dhiman, S., Talukdar, P. K., Rabha, B., Goswami, D., & Veer, V. (2015). Synergistic mosquito-repellent activity of *Curcuma longa*, *Pogostemon heyneanus* and *Zanthoxylum limonella* essential oils. *Journal of Infection and Public Health*, 8(4), 323–328. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.02.005>
- Domig, K. J., Mayrhofer, S., Zitz, U., Mair, C., Petersson, A., Amtmann, E., Mayer, H. K., & Kneifel, W. (2007). Antibiotic susceptibility testing of *Bifidobacterium thermophilum* and *Bifidobacterium pseudolongum* strains: Broth microdilution vs. agar disc diffusion assay. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1–2), 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.064>
- Elcocks, E. R., Spencer-Phillips, P. T. N., & Adukwu, E. C. (2020). Rapid bactericidal effect of cinnamon bark essential oil against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 1025–1037. <https://doi.org/10.1111/jam.14538>
- Gupta, K., Grigoryan, L., & Trautner, B. (2017). Urinary tract infection. *Annals of Internal Medicine*, 167(7), ITC49–ITC64. <https://doi.org/10.7326/AITC201710030>
- Jacobsen, S. M., & Shirliff, M. E. (2011). *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Virulence*, 2(5), 460–465. <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17783>
- Kalyani, H. A., Aithal, K. S., & Srinivasan, K. K. (1989). In vitro anthelmintic activity of essential oil from the fruits of *Zanthoxylum limonella*. *Fitoterapia*, 60(2), 160–162.
- Khruengsai, S., Sripahco, T., & Pripdeevech, P. (2023). Antibacterial activity and synergic effects of the essential oils of *Amomum verum* Blackw and *Zanthoxylum limonella* (Dennst.) Alston. *Archives of Microbiology*, 205(3), Article 102. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03436-9>

- Khruengsai, S., Promhom, N., Sripahco, T., & Pripdeevech, P. (2023). Optimization of enzyme-assisted microwave extraction of *Zanthoxylum limonella* essential oil using response surface methodology. *Scientific Reports*, 13, Article 12872. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40142-4>
- Kleiman, M., Ryu, K. A., & Esser-Kahn, A. P. (2016). Determination of factors influencing the wet etching of polydimethylsiloxane using tetra-n-butylammonium fluoride. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 217(2), 284–291. <https://doi.org/10.1002/macp.201500225>
- Nadon, S., Leksawasdi, N., Jantanasakulwong, K., Rachtanapun, P., Ruksiriwanich, W., Sommano, S. R., Khaneghah, A. M., Castagnini, J. M., Barba, F. J., & Phimolsiripol, Y. (2023). Antioxidant and antimicrobial properties and GC-MS chemical compositions of Makwaen pepper (*Zanthoxylum myriacanthum*) extracted using supercritical carbon dioxide. *Plants*, 12(11), 2211. <https://doi.org/10.3390/plants12112211>
- Palasuwan, A., Soogarun, S., Lertlum, T., Pradniwat, P., & Wiwanitkit, V. (2005). Inhibition of Heinz body induction in an *in vitro* model and total antioxidant activity of medicinal Thai plants. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 6(4), 458–463.
- Panumgul, L., Puwarawuttipanit, W., Pongkaew, A., & Rongrungruang, Y. (2021). Factors predicting sepsis in medical patients. *Nursing Science Journal of Thailand*, 39(3), 74–90. [in Thai]
- Pattanawongsa, A., Kongsirwet, C., Thaina, P., Prammano, A., Maneechai, N., Saengphrom, P., Yusakul, G., & Utsintong, M. (2021). *In vitro* and *in vivo* effects of *Zanthoxylum limonella* (Dennst.) Alston crude extracts and volatile oil on blood glucose reduction (TJPS-2021-0321. R1). *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(6).
- Pitasawat, B., Champakaew, D., Choochote, W., Jitpakdi, A., Chaithong, U., Kanjanapothi, D., Rattanachanpichai, E., Tippawangkosol, P., Riyong, D., Tuetun, B., & Chaiyasit, D. (2007). Aromatic plant-derived essential oil: An alternative larvicide for mosquito control. *Fitoterapia*, 78(3), 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.01.003>
- Saeed, N., Khan, M. R., & Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, Article 221. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-221>
- Schaffer, J. N., & Pearson, M. M. (2017). *Proteus mirabilis* and urinary tract infections. In M. A. Mulvey, D. J. Klumpp, & A. E. Stapleton (Eds.), *Urinary tract infections* (Chapter 17). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555817404.ch17>
- Supabphol, R., & Tangjitjareonkun, J. (2014). Chemical constituents and biological activities of *Zanthoxylum limonella* (Rutaceae): A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(12), 2119–2130.
- Tangjitjareonkun, J., Supabphol, R., & Chavasiri, W. (2012). Antioxidant effect of *Zanthoxylum limonella* Alston. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(8), 1407–1414. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.846>
- Tangjitjareonkun, J., Chavasiri, W., Thunyaharn, S., & Yompakdee, C. (2012). Bactericidal effects and time–kill studies of the essential oil from the fruits of *Zanthoxylum limonella* on multi-drug resistant bacteria. *Journal of Essential Oil Research*, 24(4), 363–370. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.692907>

- Wipoosanapan, P. (2018). *Antioxidant and antimutagenic activity of extracts from pericarp and seed of Zanthoxylum limonella Alston* (Master's thesis, Chulalongkorn University). Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD). <https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd/2383>
- Wongkattiya, N., Akekawatchai, C., Sanguansermsri, P., Fraser, I. H., Pratoomsoot, C., & Sanguansermsri, D. (2018). Chemical compositions and biological properties of essential oils from *Zanthoxylum rhetsa* (Roxb.) DC and *Zanthoxylum limonella* Alston. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 15(2), 12–18. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v15i2.2>
- Wongsrison, 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.