

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ของสารสกัดจากพะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don)

Antioxidant activity and inhibition effect on *Pseudomonas aeruginosa* of extracts from Pa-Yom (*Shorea roxburghii* G. Don)

กรรณิการ์ พิมพรัส^{1*} เกศริน ทีมายู¹ และ พิรดา สุดประเสริฐ¹
Kannika Pimrote^{1*}, Kesarin Teekayu¹ and Pirada Sudprasert¹

บทคัดย่อ

พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don) ถูกนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ มากมายทั้งเป็นยาสมุนไพรรักษาโรค หรือใช้ในการยับยั้งการหมักของน้ำตาลมะพร้าวระหว่างการเก็บเกี่ยว ปัจจุบันมีการศึกษาและรายงานเกี่ยวกับสารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenols) ที่สกัดได้จากส่วนของพะยอมๆ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง และต้านจุลินทรีย์หลายชนิด งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาศักยภาพต้านอนุมูลอิสระ และต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดที่ได้จาก 3 ส่วนของพะยอม ได้แก่ ราก เปลือก และใบ ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากราก เปลือก และใบพะยอม ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกพะยอม มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด และปริมาณแทนนินทั้งหมด มากกว่าสารสกัดหยาบจากราก และใบ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH• วิธี ABTS•+ วิธีไฮดรอกซิล และความสามารถในการคีเลตโลหะ พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนของเปลือกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด จากนั้นได้นำสารสกัดหยาบจากราก เปลือก และใบพะยอมในข้างต้นมาทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้เอทิลอะซิเตตเป็นตัวทำละลาย และนำสารสกัดบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทำการการศึกษาศักยภาพต้านจุลินทรีย์ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาล พบว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก ราก และเปลือกพะยอมมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีกว่ายาปฏิชีวนะ (Azithromycin) ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการต่อยอดในการพัฒนายาจากสารสกัดพะยอมที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* เพื่อประโยชน์ในการรักษาผู้ติดเชื้อดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ: พะยอม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ *P. aeruginosa*

Abstract

Pa-Yom (*Shorea roxburghii* G. Don) has been used for various purposes such as an herbal for traditional medicine, and an inhibitor of palm sugar juice fermentation during harvesting. In present, it has been reported that polyphenol compounds extracted from Pa-Yom have antioxidant, anticancer and antimicrobial properties. This research was to study the investigation of antioxidant and antimicrobial properties of the 3 parts extracted from Pa-Yom,

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ชลบุรี 20110

¹ Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Tawan-ok, Chonburi 20110, Thailand

* Corresponding author. E-mail: kpimrote@gmail.com

Received: October 22, 2019; Revised: January 15, 2020; Accepted: March 13, 2020

including root, stem bark, and leave. The antioxidant properties of crude extracted from roots, stem bark and leaves of Pa-Yom using 95% ethanol showed that the crude extracted from stem bark had the total phenolic and total tannin contents higher than the crude extracted from root and leave. The antioxidant activities by DPPH•, ABTS• +, OH• radical and ferrous-ion chelating assays showed that the crude extracted from the stem bark of Pa-Yom showed the highest antioxidant activities. After that, the crude extracted from roots, stem bark and leaves of Pa-Yom were purified with ethyl acetate as a solvent, and these pure extracts were then investigated the inhibition effect against *P. aeruginosa*, which is known as a pathogenic organism found in a hospital. It was found that the pure extracted from stem bark and root of Pa-Yom demonstrated stronger inhibition against *P. aeruginosa* infection than an antibiotic (Azithromycin). These results may provide a guideline for developing antibiotic derived of Pa-Yom extracts, which had a potential inhibitory effect on *P. aeruginosa*, in order to apply to infected patients with this pathogen.

Keywords: Pa-Yom, antioxidant activity, antimicrobial, *P. aeruginosa*

บทนำ

อนุมูลอิสระ (free radical หรือ oxidant) เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร และมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีในลักษณะปฏิกิริยาถูกโซ่ สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่รอบข้างในทันที ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย (Ames, Shigenaga, & Hagen, 1993) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระ แล้วเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่เสถียรมากกว่า และช่วยหยุดวงจรการเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ได้ ซึ่งบ่อยครั้งสารต้านอนุมูลอิสระมักมีความสามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ด้วย สารต้านอนุมูลอิสระ แบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิด คือ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) เช่น propyl gallate, 2- butylated hydroxyanisole, 3- butylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone อีกชนิดคือสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) เช่น วิตามินซี วิตามินอี

เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น แชนโธน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้มาจากพืชผัก ผลไม้ เครื่องเทศ และสมุนไพร (Jirum, & Srihanam, 2011)

สารประกอบฟีนอลหรือสารประกอบฟีนอลิก มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ ดังแสดงใน (Figure 1) มีความสามารถละลายได้ในน้ำ สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดธัญพืช ซึ่งมีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืช และมีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพกล่าวคือมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูง (antioxidant) (Keawsaard, 2012) มีกลไกการออกฤทธิ์ที่หลากหลาย เช่น สารคีเลต (chelating agent) ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) และเสริมฤทธิ์ (synergism) เป็นต้น (Sanchez-Moreno, Jimenez-Escria, & Saura-Calixto, 2000)

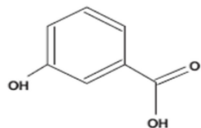


Figure 1 Structure of phenolic acid (Cheuyglintase, Namhong, & Cheuyglintase, 2013).

สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติอีกชนิดที่มี การศึกษาอย่างกว้างขวาง และพบได้ในธรรมชาติ คือ แทนนิน ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอลชนิดหนึ่ง ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ และโครงสร้างซับซ้อน มีสูตร โมเลกุลคือ $C_{75}H_{52}O_{46}$ ประกอบด้วย gallic acid 9 โมเลกุลและน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล ดังแสดงใน (Figure 2) ในการสกัดสารแทนนินสามารถใช้ตัวทำ ละลายชนิดต่างๆ เช่น น้ำกลั่น เอทานอล หรืออะซิโตน เป็นต้น โดยแทนนินมีสถานะเป็นกรดอ่อน ให้รสฝาด (astringency) และรสขม (bitter) พบได้ในใบพืชหลาย ชนิด เช่น ใบชา ใบฝรั่ง ใบพลู ใบชุมเห็ด รวมทั้งพบได้ ในผลไม้ดิบ เช่น กัวยัดดิบ ในเปลือก และเมล็ดของ ผลไม้ เช่น เปลือก มังคุด องุ่น เม็ดในของมะขาม เปลือกมะพร้าวอ่อน เป็นต้น นอกจากนี้มีรายงาน พบว่าแทนนินเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาการเกิด สีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (enzymatic browning reaction) ของผลไม้ และมีฤทธิ์เป็นสารกันเสีย (preservative) ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

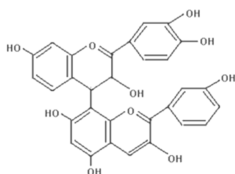


Figure 2 Structure of tannin (Sanchez-Moreno, Jimenez-Escria, & Saura-Calixto, 2000).

พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don) เป็นพืช อยู่ในวงศ์ Dipterocarpaceae สกุลยางนา องค์ประกอบ ทางเคมีของพืชในวงศ์ยางนาส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่ม oligostilbenoids ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) ฤทธิ์ ต้านเชื้อรา (antifungal) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และยับยั้งเชื้อเอชไอวี (anti-HIV activity) (Dai, Hallock, Cardellina, & Boyd, 1998; Essawi & Srour, 2000) นอกจากนี้มีการศึกษาและรายงานถึง องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสาร สกัดหยาบจากเปลือกของพะยอมพบว่าเป็นสารใน กลุ่มโพลีฟีนอล แทนนิน ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็งได้ และมีฤทธิ์ต้าน แบคทีเรียก่อโรคในพืชได้ (Leksomboon, Thaveechai, & Kositratana, 2000; Winitra, 2009; Chalemmoo, 2012) มีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร โดยการพ่นสารสกัดจาก เปลือกพะยอมในเนื้อหมูสด พบว่า สามารถเก็บรักษา ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นานขึ้น 4 วัน โดย ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น (Intarapichet, & Nukuew, 1994) ยังมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทาง เภสัชวิทยาของสารสกัดหยาบจากเปลือกพะยอม พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Colletotrichum* sp. ซึ่งทำการแยก ได้จากพริก และมะละกอด้วยวิธี tissue transplanting technique โดยสารประกอบสำคัญที่คาดว่าเป็นสาร ที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ Phayomphenol A1, Phayomphenol A2, 1'S-dihydrophayomphenol A2, Phayomphenol B1 และ Phayomphenol B2 (Morikawa et al., 2012)

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง aerobic ปกติจะพบกระจายในดิน น้ำ ขยะ หรือในพืช และเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้คนสุขภาพดี ทั้งนี้ *P. aeruginosa* สามารถทำให้เกิดโรคในคน เชื้อสายพันธุ์นี้เป็นเชื้อก่อโรคทำให้เกิดการติดเชื้อในหลายระบบของร่างกาย ได้แก่ ระบบประสาทส่วนกลาง หัวใจและหลอดเลือด ทางเดินปัสสาวะ ตา หู ปอด ผิวหนัง และเนื้อเยื่ออ่อน (Mulcahy, Isabella, & Lewis, 2014) เชื้อ *P. aeruginosa* เป็นเชื้อโรคที่สามารถแพร่เชื้อในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำซึ่งยาปฏิชีวนะที่สามารถต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ได้แก่ Isepamicin, Piperacillin, Tobramycin และ Azithromycin ซึ่งบางพื้นที่ได้พบการดื้อยาดังกล่าวของเชื้อ *P. aeruginosa* (Thavorncharoensap, Montakantikul, Yeamsavad, & Chutimanitskul, 2004; Gillis, et al., 2005) ปัจจุบันมีเพียงยาปฏิชีวนะ 4 ชนิดเท่านั้นที่มีแนวโน้มสามารถต่อต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ได้แก่ ceftazidime-avibactam (Avycaz®), ceftolozane-tazobactam (Zerbaxa®), cefiderocol และ imipenem cilastatin / relebactam (Nguyen, Garcia, Gruenberg, & MacDougall, 2018) การแพร่กระจายของ *P. aeruginosa* ภายในโรงพยาบาลพบได้หลายทาง โดยเฉพาะอุปกรณ์ทางการแพทย์ ทั้งยังมีรายงานพบการติดเชื้อ *P. aeruginosa* เชื้อก่อโรคชนิดนี้จัดเป็นสาเหตุอันดับที่ 2 ของการระบาดของโรคปอดบวมภายในโรงพยาบาล เนื่องจาก *P. aeruginosa* เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะทำให้ยากต่อการรักษาในปัจจุบัน ล่าสุดในประเทศเม็กซิโกปี 2019 ที่ผ่านมามีการรายงานโดยองค์การอนามัยโรคถึงภาวะการดื้อยาปฏิชีวนะ (Carbapenem) ของเชื้อ

P. aeruginosa ซึ่งก่อให้เกิดการติดเชื้อ *P. aeruginosa* บริเวณแผลผ่าตัดในผู้ป่วย 20 ราย (WHO, 2019)

ปัจจุบันมีความพยายามในการศึกษา ค้นคว้าเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ โดยเฉพาะจากพืช เพื่อทดแทนสารสังเคราะห์ และหลีกเลี่ยงอันตรายจากการตกค้างของสารเคมีต่างๆ จากรายงานถึงสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกที่พบได้ในสารสกัดจากพะยอม รวมถึงความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายของสารสกัดจากพะยอมที่กล่าวมาข้างต้น ผู้วิจัยจึงเกิดแนวคิดที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของพะยอม ได้แก่ ราก เปลือก และใบต่อการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในคนที่พบการแพร่ระบาดได้บ่อยในโรงพยาบาล เพื่อเป็นแนวทางในการนำสารสกัดจากพะยอม ซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยา เพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะต่อไปในอนาคต

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้แก่ เปลือก ราก และใบของพะยอม โดยมีวิธีการเก็บแบ่งตามส่วนต่างๆ ของพะยอม ดังนี้ ส่วนของใบ เลือกใบที่ขนาดไม่แก่ หรืออ่อนเกินไป ไม่มีการเข้าทำลายของโรคพืช หรือแมลง และเป็นใบที่แสงสว่างส่องถึง และส่วนเปลือกไม้ และราก เก็บจากต้นพะยอม ที่มีอายุในช่วง 10-15 ปี จากจังหวัดมหาสารคาม นำแต่ละส่วนมาอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน จนแห้งสนิท แล้วนำมาบดหยาบๆ

2. การเตรียมสารสกัดหยาบจากพะยอม

ทำการสกัดสารโดยวิธี maceration โดยดัดแปลงวิธีการจาก Voravuthikunchai, Phongpaichit, & Subhadhirasakul (2005) นำตัวอย่างที่บดหยาบของพะยอม (ราก เปลือก และใบ) ตามข้อที่ 1 มาสกัดด้วยเอทานอล (Ajax finechem, AR grade) ความเข้มข้นร้อยละ 95 ที่อัตราส่วนพืชต่อตัวทำละลาย 1:2 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วย Gyrotory shaker ยี่ห้อ GFL รุ่น 1803 ที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 3 วัน กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำส่วนของสารสกัดที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสูญญากาศ Rotary vacuum evaporator ยี่ห้อ BUCHI รุ่น V-850 จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดข้น และเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบหาสารประกอบฟีนอลิก และแทนนินทั้งหมด รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายอะซิเตตเพื่อทดสอบประสิทธิภาพทางชีวภาพจากสารสกัดบริสุทธิ์ที่แยกได้ต่อไป

3. การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ดัดแปลงวิธีการจาก Hou et al. (2003)

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดพะยอมแยกตามส่วนต่างๆ (เปลือก ราก และใบ) โดยเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Sigma-Aldrich, AR grade) ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์โดยนำสารสกัด หรือสารละลายมาตรฐาน 0.20 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ 2.50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเฟอร์ริน (Sigma-Aldrich, AR grade) ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (Ajax finechem, AR

grade) เข้มข้นร้อยละ 7 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 748 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis Spectrophotometer (Varian Cary 50 Bio)

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารแทนนินทั้งหมด ดัดแปลงวิธีการจาก Hou et al. (2003)

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารแทนนินทั้งหมดของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของพะยอม (เปลือก ราก และใบ) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิน (Sigma-Aldrich, AR grade) ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์โดยนำสารสกัด หรือสารละลายมาตรฐาน 0.20 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ 2.50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเฟอร์รินปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเติมโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้นร้อยละ 7 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis Spectrophotometer (Varian Cary 50 Bio)

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH (DPPH scavenging activity)

ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH ตามวิธีของ Cheuyglintase, Namhong, & Cheuyglintase (2013) โดยใช้สารละลายกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid; Loba Chemie, AR grade) และบีไฮที (BHT; Loba Chemie, AR grade) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ทำการเตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอล ความเข้มข้น 0.24 มิลลิกรัม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และวัดค่าโดยผสมเมทานอล สารละลายมาตรฐาน หรือสารตัวอย่างที่ละลายในเอทานอลที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50, และ

100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กับ สารละลาย DPPH ที่เตรียมไว้ 2 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่ อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis Spectrophotometer (Varian Cary 50 Bio)

การเก็บข้อมูลทำโดยนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟ ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการจับอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัด และ คำนวณหาค่า IC_{50} จากสมการ (1) ดังนี้

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = \frac{(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad (1)$$

เมื่อ $\text{Abs}_{\text{control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม (สารละลาย DPPH ผสมเมทานอล)
 $\text{Abs}_{\text{sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical)

ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลไฮดรอกซิล ตามวิธีของ Nagai, Myoda, & Nagashima (2005) ผสม Fe_2SO_4 EDTA (Ajax finechem, AR grade) ที่ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล, 2-deoxyribose และกรด แกลลิกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล หรือสารสกัด ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50, และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างละ 200 ไมโครลิตร เติม ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ชาลิน (Qrec, AR grade) pH 7.4 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมล ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (RCI Labscan, AR grade) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น เวลานาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายกรดไทรคลอโรแอซิดิก (Ajax finechem, AR grade) ความเข้มข้น ร้อยละ 2.8 และกรดไทรบาร์บิทูริก (Sigma-Aldrich, AR grade) เข้มข้นร้อยละ 1 อย่างละ 1 มิลลิลิตร ต้มใน

น้ำเดือด เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วทำให้เย็น ในน้ำแข็ง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis Spectrophotometer (Varian Cary 50 Bio) นำค่าที่ได้มาคำนวณร้อยละการยับยั้งโดยใช้สูตร ตามการทดสอบ DPPH และสร้างกราฟความสัมพันธ์ ระหว่างความสามารถในการจับอนุมูลอิสระกับความ เข้มข้นของสารสกัด และคำนวณหาค่า IC_{50}

7. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS (ABTS Scavenging activity)

ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูล ABTS ตาม วิธีของ Phansawan (2013) โดยใช้โทรลอคซ์ (Trolox) เป็นตัวเทียบมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่างที่ความ เข้มข้น 5, 10, 15, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์โดยปิเปตเมทานอล สารละลาย มาตรฐานโทรลอคซ์ (Sigma-Aldrich, AR grade) หรือ สารละลายตัวอย่างปริมาตร 40 ไมโครลิตรผสมกับ สารละลาย ABTS (Sigma-Aldrich, AR grade) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เป็นเวลานาน 6 นาที ทำการอ่านค่าการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer (Varian Cary 50 Bio) นำค่าที่ได้มาคำนวณร้อยละการยับยั้งโดยใช้สูตรตามการทดสอบ DPPH และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการจับอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัด และคำนวณหาค่า IC_{50}

8. การทดสอบความสามารถในการคีเลตโลหะ (Ferrous-ion chelating activity)

การทดสอบคีเลตโลหะ Fe^{2+} ดัดแปลงจากวิธีรายงานโดย Kosem, Han, & Moongkarndi (2007) โดยใช้ EDTA เป็นตัวเทียบมาตรฐาน ทำการเตรียมสารมาตรฐาน EDTA และสารสกัดที่ละลายในเมทานอล ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50, และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์โดยปิเปต เมทานอล สารมาตรฐาน EDTA หรือสารสกัดปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Iron (II) chloride ; Qrec, AR grade)) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย ferrozine (Sigma-Aldrich, AR grade) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer (Varian Cary 50 Bio) ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ การยับยั้งการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ferrozine- Fe^{2+} จาก (สมการที่ 1) และคำนวณหาค่า IC_{50}

9. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพะยอม

9.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ของสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของพะยอมด้วยวิธี disc

diffusion ดัดแปลงวิธีการจาก (Waramit, & Charoensuk, 2016) ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะใช้ในการกระตุ้นและเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการดูดเชื้อที่ได้ด้วยปิเปตต์ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ถ่ายใส่หลอดทดลอง นำไปวัดค่า OD ให้ได้ 0.50 โดยใช้ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Varian Cary 50 Bio) จากนั้นนำเชื้อมาถ่ายลงบนอาหารแข็งสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ ทำการเกลี่ยเชื้อโดยการ spread plate ให้กระจายทั่วจานเพาะเชื้อ และคืบจับ paper disc (WhatmanTM; CAT No. 2017-006 ขนาด 6 มิลลิเมตร) จุ่มลงในสารสกัดจากพะยอม ยาปฏิชีวนะ ตัวทำลาย หรือตัวควบคุม และวางลงบนผิวหน้าอาหารแข็งที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง บันทึกและคำนวณหาความกว้างพื้นที่บริเวณใส (clear zone) จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณร้อยละของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของสารสกัดจากพะยอมเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Srisukong, Jantree, & Hanpakphum, 2016)

9.2 การหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของสารสกัดพะยอม ค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ทดสอบได้อย่างสมบูรณ์ หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้ คือ การเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมียาปฏิชีวนะ หรือสารที่ต้องการทดสอบในปริมาณความเข้มข้นต่างๆ ผสมอยู่ด้วย และสังเกตการเจริญของเชื้อ การทดสอบโดยวิธี macro broth dilution technique ดัดแปลงวิธีจาก Srisukong, Jantree, & Hanpakphum (2016) การ

อ่านผลหาค่า MIC ให้สังเกตความขุ่นของเชื้อที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอดเปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงบวก

9.3 การหาค่า minimal bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดพะยอม ดัดแปลงจาก Srisukong, Jantree, & Hanpakphum (2016) ค่า MBC คือความเข้มข้นของสารตัวอย่างหรือยาที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ หาได้โดยนำหลอดที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดไป spread plate บนอาหาร ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ก็จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเชื้อไม่ตายก็จะพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

10. การวิเคราะห์ผล และการเก็บข้อมูลทำโดย

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS (SPSS Statistics 11.0 for Windows) โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีดันแคน (Duncan's new multiple test, DMRT)

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณแทนนินทั้งหมดในสารสกัดจากพะยอม

ผลการศึกษาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดพะยอม ส่วนเปลือก ราก และใบ เปรียบเทียบ

กับสารมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงใน (Table 1) พบว่าสารสกัดจากส่วนของเปลือกพะยอมมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากรากและใบ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 111.50, 110.74 และ 91.92 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับการหาปริมาณแทนนินทั้งหมดในสารสกัดพะยอม พบว่า สารสกัดจากส่วนของเปลือกพะยอมมีปริมาณแทนนินทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากรากและใบ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 23.33, 19.35 และ 18.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงใน (Table 1) การสกัดโดยวิธี maceration โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 สามารถสกัดสารในกลุ่มฟีนอลิกและแทนนินได้จากส่วนต่างๆ (ราก เปลือก และใบพะยอม) เมื่อเทียบปริมาณสารสกัดจากส่วนต่างๆ จะพบสารกลุ่มนี้มากที่สุดในสารสกัดจากเปลือกพะยอม สอดคล้องกับ Chalermmoo (2012) ได้ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากเปลือกพะยอมด้วยวิธีการแช่ทิ้งไว้ในเอทานอลนาน 1 สัปดาห์ และพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและแทนนินเช่นกัน แต่พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบแทนนินทั้งหมดที่พบเท่ากับ 47.72 และ 68.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองอาจกล่าวว่าการแช่ที่นานขึ้นอาจจะทำให้ได้ปริมาณสารสกัดแทนนินที่มากขึ้น แต่ก็เกิดการสูญเสียของสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกเช่นกัน

Table 1 Total phenolic content (TPC) and total tannin content (TTC) of extracts from the root, stem bark and leave of Pa-Yom.

part of Pa-Yom	TPC ($\mu\text{g/mL}$) ^{1/, 2/}	TTC ($\mu\text{g/mL}$)
root	110.74 $\pm$ 0.03 ^b	19.35 $\pm$ 0.02 ^b
stem bark	111.5 $\pm$ 0.02 ^a	23.33 $\pm$ 0.02 ^a
leave	91.92 $\pm$ 0.01 ^c	18.19 $\pm$ 0.01 ^c

Note: ^{1/ a-c} Means difference in the same column ($p \leq 0.05$), ^{2/} Values are mean $\pm$ SD, n=3.

2. ผลการวิเคราะห์หาความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพะยอม

ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้แสดงผลการวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของสารสกัดจากพะยอมส่วนเปลือก ราก และใบ รวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ได้แก่ วิตามินซี บีเอชที โพรลอกซ์ และอิดีทีเอ ดังแสดงใน (Table 2) ค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ถึงร้อยละ 50 อาจกล่าวได้ว่าสารที่ใช้ความเข้มข้นน้อยกว่าในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ถึงร้อยละ 50 เป็นสารที่มีประสิทธิภาพออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่า จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดจากส่วนราก และเปลือกมีค่า IC_{50} ต่ำใกล้เคียงกันเท่ากับ 1.11 และ 1.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าสารมาตรฐานวิตามินซีและบีเอชทีที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.60 และ 1.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการทดสอบด้วยวิธี ABTS พบว่าสารสกัดจากเปลือกพะยอมมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากรากและใบ รวมถึงสารมาตรฐานโพรลอกซ์ ส่วนการทดสอบด้วยวิธีไฮดรอกซิล พบว่าสารสกัดจากเปลือกพะยอมมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการทดสอบ

ความสามารถในการคีเลทโลหะ พบว่าสารสกัดจากเปลือกพะยอมมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.85 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากราก และใบ รวมถึงสารมาตรฐานอิดีทีเอ

จากผลการวิเคราะห์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระข้างต้นสรุปได้ว่า สารสกัดหนายจากเปลือกพะยอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดจากรากและใบ ซึ่งสอดคล้องกับผลปริมาณฟีนอลิก และปริมาณแทนนินทั้งหมดที่พบได้ในส่วนของสารสกัดจากเปลือกมากที่สุดเช่นกัน และจากรายงานการวิจัยการสกัดสารจากวัตถุดิบธรรมชาติล้วนพบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในทิศทางเดียวกัน (Kaewamatawong, & Juengmunkong, 2006; Lorsuwan, Rachtanapun, & Chantanawarangoon, 2008)

3. ผลการวิเคราะห์หาความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ของสารสกัดจากพะยอม

ผลการทดสอบประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยเทคนิควิธีการทดสอบ disc diffusion และการทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และการทดสอบหาค่า minimal bactericidal concentration (MBC) จากสารบริสุทธิ์ของสารสกัดหนายจากส่วนต่างๆ ของต้น

พะยอมด้วยตัวทำลายเอทิลอะซิเตต แสดงใน (Figure 3) และ (Table 3) พบว่า เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของสารสกัดจากเปลือก ราก และใบของพะยอมเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ Azithromycin ซึ่งเคยเป็นยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* จนกระทั่งในปี 2005 พบการดื้อยาปฏิชีวนะ Azithromycin ของเชื้อ *P. aeruginosa* เนื่องจากแบคทีเรียได้พัฒนากลไกต่อต้านโดยสร้างชั้นฟิล์มที่ผนังเซลล์ซึ่งมีความสามารถด้านฤทธิ์การทำลายของ Azithromycin (Gillis, et al., 2005) ในการทดสอบพบว่าสารสกัดจากเปลือก และรากของพะยอมทำให้เกิดบริเวณใส (clear zone) ขนาด 14.33 และ 18.33 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* เปรียบเทียบกับขนาดบริเวณใสของยาปฏิชีวนะ Azithromycin (13.33 มิลลิเมตร) คิดเป็นร้อยละ 107.50 และ 137.51 ตามลำดับ ดังแสดงใน (Table 3) จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือก และรากของพะยอมมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีกว่ายาปฏิชีวนะ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *P. aeruginosa* มีการดื้อยา

และสามารถปรับสภาพของเชื้อให้คงอยู่ได้ต่อ ยาปฏิชีวนะอย่างรวดเร็ว (Luvira, 2006)

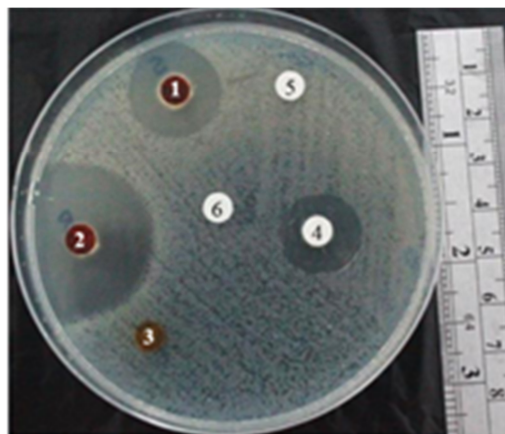


Figure 3 Inhibition on *P. aeruginosa* DMST4739 of pure extracted from root, stem bark and leave of Pa-Yom with ethyl acetate (1: pure extracted from root, 2: pure extracted from stem bark, 3: pure extracted from leave, 4: Azithromycin, 5: ethyl acetate and 6: sterile water).

Table 2 DPPH•, ABTS•⁺, OH• radical and ferrous-ion chelating assay (IC₅₀) of extracts from the root (ERP), stem bark (EBP) and leave (ELP) of Pa-Yom.

sample	DPPH• (IC ₅₀) (μg/mL) ^{1/} , ^{2/}	ABTS• (IC ₅₀) (μg/mL)	OH• (IC ₅₀) (μg/mL)	FIC (IC ₅₀) (μg/mL)
ERP	1.11±0.02 ^{cd}	1.06±0.02 ^b	1.20±0.10 ^b	1.07±0.01 ^b
EBP	1.08±0.02 ^d	0.08±0.01 ^c	1.00±0.01 ^c	0.85±0.01 ^c
ELP	1.15±0.01 ^c	1.12±0.02 ^a	1.38±0.02 ^a	1.47±0.01 ^a
Vitamin C	1.60±0.01 ^a	-	-	-
BHT	1.27±0.01 ^b	-	-	-
Trolox	-	1.01±0.02 ^b	-	-
EDTA	-	-	-	1.35±0.01 ^a

Note: ^{1/a-d} Means difference in the same column ($p \leq 0.05$), ^{2/} Values are mean $\pm$ SD, n=3.

Table 3 Inhibition effects, minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimal bactericidal concentrations (MBC) on *P. aeruginosa* of extracts from the root, stem bark and leave of Pa-Yom.

part of Pa-Yom	clear zone (mm)	inhibition effects (%) ^{1/, 3/}	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
root	18.33±0.02 ^a	137.51±0.02 ^a	3.12±0.01 ^b	12.50±0.02 ^a
stem bark	14.33±0.01 ^b	107.50±0.01 ^b	6.25±0.02 ^a	12.50±0.02 ^a
leave	ND ^{2/}	ND	ND	ND
Azithromycin	13.33±0.01 ^b	ND	0.08±0.01	0.39±0.02 ^b

Note: ^{1/} means the values calculated from clear zone compared with antibiotic value as 100%, ^{2/}ND means not detected.

Values are mean ± SD, n = 3. ^{3/} a-b Means difference in the same column (p≤0.05).

ผลการทดสอบค่า MIC และ MBC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของต้นพะยอมในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ดังแสดงใน (Table 3) พบว่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (ค่า MIC) ของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม มีค่าต่ำกว่าสารสกัดจากราก มีค่าเท่ากับ 6.25 และ 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าได้เชื้อ *P. aeruginosa* ได้ (MBC) ของสารสกัดจากเปลือกและรากพะยอม มีค่าเท่ากันที่ 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ Azithromycin (ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.08 และ 0.39 ตามลำดับ) พบว่าระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อต่ำกว่าสารสกัดอย่างมาก อาจเพราะว่ายาปฏิชีวนะ Azithromycin มีความบริสุทธิ์มากกว่า แต่หากเจอนำสารสกัดจากเปลือก และรากพะยอมที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตมาทำให้บริสุทธิ์ เพื่อให้ได้สารสกัดกลุ่มฟีนอลิก หรือแทนนินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากรายงานวิจัยที่ผ่านมา จึงมีความเป็นไปได้อย่างยิ่งว่าปริมาณความเข้มข้นที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อจะน้อยกว่านี้ สอดคล้องกับผล

การศึกษาของ Tafesse et al. (2018) พบว่าเมื่อนำสารสกัดจากไบนเวอร์รีนเนีย (*Vernonia galamensis*) มาแยกให้บริสุทธิ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบ

สรุป

จากการศึกษาคุณสมบัติขั้นต้นของสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของพะยอม ได้แก่ ราก เปลือก และใบ ซึ่งสกัดด้วยวิธี maceration ด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 รวมทั้งการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่พบการระบาดในโรงพยาบาล และมีการพัฒนากลายเป็นเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะ จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบจากเปลือกพะยอมมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด และแทนนินทั้งหมดสูงที่สุด โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบแทนนินทั้งหมดที่พบเท่ากับ 47.72 และ 68.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบจากรากและใบพะยอม โดยปริมาณสารที่มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งกิจกรรมของอนุมูลอิสระร้อยละ 50 (IC₅₀) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH,

ABTS, ความสามารถจับกับหมู่ไฮดรอกซิล และการ
 คีเลทโลหะ Ferric ion เท่ากับ 1.08, 0.08, 1.00 และ 0.85
 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจากผลการศึกษา
 ฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกจากสารสกัดหยาบด้วย
 ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตพบว่าสารบริสุทธิ์ที่แยก
 จากสารสกัดหยาบจากเปลือกพะยอบ มีประสิทธิภาพ
 ในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ ดังนั้นผลการวิจัย
 ข้างต้นจึงเป็นแนวทางในการพัฒนาด้านการทดสอบฤทธิ์
 ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดธรรมชาติจากเปลือกพะยอบ
 เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยาโดยเฉพาะ
 ยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa*
 ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(17), 7915-7922.
- Chalermmoo, W. (2012). *Efficiency of hair dye cream from Don bark and Linn bark crude extract* (Master's thesis). Valaya Alongkorn Rajabhat University, Pathumthani. (in Thai)
- Cheuyglintase, S., Namhong, T., & Cheuyglintase, K. (2013). Effect of pretreatment of the dried longan, rambutan and lychee pulps by microwave and infrared followed by hot air drying on the sugars and antioxidant power. *RMUTSB Academic Journal*, 1(2), 115-127. (in Thai)
- Dai, J. R., Hallock, Y. F., Cardellina, J. H., & Boyd, M. R. (1998). HIV-inhibitory and cytotoxic oligostilbenes from the leaves of *Hopea malibato*. *Journal of Natural Products*, 61(3), 351-353.
- Essawi, T., & Srour, M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacol*, 70(3), 343-349.
- Gillis, R. J., White, K. G., Choi, K. H., Wagner, V. E., Schweizer, H. P., & Iglewski, B. H. (2005). Molecular basis of Azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(9), 3858-3867.
- Hou, W. C., Lin, R. D., Cheng, K. T., Hung, Y. T., Cho, C. H., Chen, C. H., Hwang, S. Y., & Lee, M. H. (2003). Free radical-scavenging activity of Taiwanese native plants. *Phytomedicine*, 10(2-3), 170-175.
- Intarapichet, K., & Nukuew, L. (1994). Effects of *Cotylelobium lanceolanceolatum* and *Shorea talura* extract on microorganisms and storage of meat at low temperatures. *Suranaree Journal of Science and Technology*, 1(2), 81-87.
- Jirum, J., & Srihanam, P. (2011). Oxidants and antioxidants: Sources and mechanism. *Academy Journal of Kalasin Rajabhat University*, 1(1), 59-70. (in Thai)
- Kaewamatawong, R., & Juengmunkong, Z. (2006). DPPH free radical scavenging activity and total phenol compounds content of some Thai medicinal plant extracts. *Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University*, 8(2), 76-88. (in Thai)
- Keawsaard, S. (2012). *Ocimum sanctum* Linn. and free radical scavenging activity. *Journal of Science Ladkrabang*, 21(2), 54-65. (in Thai)
- Kosem, N., Han, Y. H., & Moongkamdi, P. (2007). Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Garcinia mangoatana* hulls. *Science Asia*, 33, 283-292.
- Leksomboon, C., Thaveechai, N., & Kositratana, W. (2000). *Effect of Thai medicinal plant extracts on growth of phytopathogenic bacteria*. Retrieved

- May, 5 2019, from <http://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/KC3601008.pdf> (in Thai)
- Lorsuwan, P., Rachtanapun, C., & Chantanawarangoon, S. (2008). Total phenolics, radical scavenging capacity and antimicrobial property of fruit peels. In *The 46th Kasetsart University Annual Conference* (pp. 554-561). Bangkok: Kasetsart University. (in Thai)
- Luvira, V. (2006) Overview of antibiotic resistance. *Songklanagarind Medical Journal*, 24(5), 45-459. (in Thai)
- Morikawa, T., Chaipech, S., Matsuda, H., Hamao, M., Umeda, Y., Sato, H., Tamura, H., Kon'I, H., Ninomiya, K., Yoahikawa, M., Pongpiriyadacha, Y., Hayakawa, T., & Muraoka, O. (2012). Antidiabetogenic oligostilbenoids and 3-ethyl-4-phenyl-3, 4-dihydroisocoumarins from the bark of *Shorea roxburghii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(2), 832-840.
- Mulcahy, L. R., Isabella, V. M., & Lewis, K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microbial Ecology*, 68(1), 1-12.
- Nagai, T., Myoda, T., & Nagashima, T. (2005). Antioxidative actives of water extract and ethanol extract from field horsetail (*tsukushi*) *Equisetum arvense* L. *Food Chemistry*, 91(3), 389-394.
- Nguyen, L., Garcia, J., Gruenberg, K., MacDougall, C. (2018). Multidrug-resistant *Pseudomonas* infections: Hard to treat, but hope on the horizon?. *Current Infectious Disease Reports*, 20(23), 1-10.
- Phansawan, B. (2013). Free radicals, antioxidants, antioxidant activity determination. *Thai Science and Technology Journal*, 21(3), 275-286. (in Thai)
- Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escrig, A., & Saura-Calixto, F. D. (2000). Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Research*, 20(7), 941-953.
- Srisukong, A., Jantree, K., & Hanpakphum, S. (2016). The study of antibacterial in weed extract. *VRU Research and Development Journal Science and Technology*, 11(1), 69-82. (in Thai)
- Tafesse, G., Mekonnen, Y., Makonnen, E., Majinda, T. R., Bojase-Moleta, G., & Yeboah, O. S. (2018). Antibacterial activity of crude extracts and pure compounds isolated from *Vernonia galamensis* leaves. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 12(11), 136-141.
- Thavorncharoensap, M., Montakantikul, P., Yeamsavad, P., & Chutimanitskul, V. (2004). Survey of Thai pharmacist's acceptance and opinion regarding continuing education. *Thai Journal of Hospital Pharmacy*, 14(3), 225-233. (in Thai)
- Voravuthikunchai, S. P., Phongpaichit, S., & Subhadhirasakul, S. (2005). Evaluation of antibacterial activities of medicinal plants widely used among AIDS patient in Thailand. *Pharmaceutical Biology*, 43(8), 701-706.
- Waramit, W., & Charoensuk, K. (2016). Effective on Pak-wan tree (*Sauropus androgynus*) extraction to bacterial inhibition of *Salmonella pullorum* in native chicken. *RMUTSB Academic Journal*, 4(2), 120-128. (in Thai)
- World health organization (WHO). (2019). *Carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa infection – Mexico. Disease outbreak news*. Retrieved March, 5 2019, from <https://www.who.int/csr/don/5-march-2019-carbapenem-resistant-p-aeruginosa-mex/en/>