

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากผลมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.)

และการประยุกต์ใช้ในการลดจำนวนแบคทีเรียบนเนื้อหมู

Antibacterial Activity of Indian Gooseberry (*Phyllanthus emblica* L.) Fruit Extracts

and the Application to Reduce Number of Bacteria on Pork

มณฑล วิสุทธิ* และ ศรีนวล ตันสุวรรณ

Monton Visutthi* and Srinuan Tansuwan

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

Biology Program, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University

*E-mail: monton.v@nrnu.ac.th

Received: Jan 04, 2023

Revised: Mar 04, 2023

Accepted: Mar 07, 2023

บทคัดย่อ

มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย และมีการรายงานทางวิทยาศาสตร์ว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากผลมะขามป้อมด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ในระดับห้องปฏิบัติการ และการประยุกต์ใช้สารสกัดดังกล่าวด้วยเอทานอลในการลดจำนวนแบคทีเรียบนเนื้อหมู ในงานวิจัยนี้ได้สกัดผลมะขามป้อมด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน ได้แก่ อะซิโตน เมทานอล เอทานอล และน้ำ การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดดังกล่าวใช้วิธี agar disc diffusion และเลือกสารสกัดที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับเนื้อหมู (สารสกัดด้วยเอทานอล) มาหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดในการยับยั้ง (MICs) และค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดในการฆ่าแบคทีเรีย (MBCs) กับแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 5 ชนิด และแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 7 ชนิด ด้วยวิธี broth microdilution ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และสารสกัดมะขามป้อมที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า MICs และค่า MBCs ต่อแบคทีเรียทดสอบอยู่ระหว่าง 2.5-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การประยุกต์ใช้สารสกัดด้วยเอทานอลกับเนื้อหมูแสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 8MIC (80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 16MIC (160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถลดจำนวนเซลล์แบคทีเรียบนเนื้อหมูได้อย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผลมะขามป้อมมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

คำสำคัญ: มะขามป้อม ผลมะขามป้อม ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เนื้อหมู

Abstract

Indian gooseberry (*Phyllanthus emblica* L.) is a medicinal plant that has been widely used and scientifically shown to have antibacterial activity. This research aimed to examine the antibacterial activity of Indian gooseberry fruit extracts with different solvents *in vitro* and the application of its ethanolic extract to reduce the number of bacteria on pork. In this study, Indian gooseberry fruit was extracted with different solvents including acetone, methanol, ethanol and water. The antibacterial activity of the extracts was examined by agar disc diffusion. The extract to be applied to pork (the ethanolic extract) was selected to determine its minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal bactericidal concentrations (MBCs) against 5 species of gram positive bacteria and 7 species of gram negative bacteria by broth microdilution. The results revealed that Indian gooseberry fruit extracts with different solvents had antibacterial activity against gram positive bacteria. The ethanolic extract had MICs and MBCs against tested bacteria in the ranges of 2.5-10 mg/mL and 10-40 mg/mL,

respectively. The application of ethanolic extract to pork showed that the extract at concentrations of 8MIC (80 mg/mL) and 16MIC (160 mg/mL) significantly reduced the number of bacterial cells on pork. This research indicated that Indian gooseberry fruit extracts had bactericidal activity and had the potential to be developed as an active ingredient to control bacterial growth.

Keywords: *Phyllanthus emblica* L., Indian gooseberry fruit, Antibacterial activity, Pork

1. บทนำ

การเก็บรักษา และยืดอายุอาหารประเภทเนื้อสัตว์ โดยเฉพาะเนื้อวัว และเนื้อหมู ที่นิยมมาทำการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพื่อการบริโภคในอนาคต ต้องคำนึงถึงการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหาร โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรีย ซึ่งมีทั้งแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหารระหว่างการเก็บรักษา การยืดอายุการเก็บรักษาจึงมีการเติมสารเคมีกลุ่มไนเตรต เช่น Potassium nitrate หรือ Sodium nitrate โดยผสมกับเกลือ อย่างไรก็ตาม มีการวิจัยเกี่ยวกับผลกระทบที่จะเกิดขึ้นกับร่างกาย เมื่อได้รับสารเคมีที่ใช้ถนอมอาหารเป็นเวลานาน [1], [2] จึงก่อให้เกิดความกังวลกับผู้บริโภค ในปัจจุบันจึงมีการวิจัยเพื่อนำสารพิษจากพืชไปใช้ทดแทนการใช้สารเคมีที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน [3], [4]

การใช้สารหรือผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเพื่อควบคุมเชื้อในอาหารมีการเริ่มใช้อย่างแพร่หลาย เช่น สารที่ได้จากพืช (สารกลุ่มฟอสโฟโนล และน้ำมันหอมระเหย) สารที่ได้จากแบคทีเรีย (สารกลุ่ม Bacteriocin) และสารที่ได้จากสัตว์ (สารกลุ่ม Peptides และโคโคแซน) เป็นต้น โดยเฉพาะสารที่ได้จากพืช ซึ่งเป็นสารที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในอดีต ซึ่งพบได้จากตำรายาสมุนไพรของแต่ละประเทศ ในประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เช่น พืชสมุนไพร และ มะขามป้อม (gooseberry fruit, *Phyllanthus emblica* L.) เป็นต้น มะขามป้อมเป็นพืชในวงศ์ยางพารา (Euphorbiaceae) พบมากในประเทศอินเดีย จีน และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้ประโยชน์ในการแพทย์แผนโบราณของอินเดีย และจีน รวมถึงในประเทศไทย ผลมะขามป้อมอยู่ในมหาพิภักตตรีผลา มีสรรพคุณทางสมุนไพร ได้แก่ ละลายเสมหะ แก้ไอ แก้อ่อนเพลีย เป็นต้น จากการวิจัยพบว่าผลมะขามป้อมมีสารกลุ่ม Phenolics ในปริมาณสูง รวมไปถึงวิตามินซี [5], [6] ส่งผลให้ผลมะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ได้แก่ การต้านการอักเสบที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (Anti-inflammatory) การทำลายเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

[5] งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของสารสกัดจากผลมะขามป้อมด้วยตัวทำลายที่มีชีวิต และไม่มีชีวิต ได้แก่ อะซิโตน เมทานอล เอทานอล และน้ำ และการประยุกต์ใช้สารสกัดดังกล่าวด้วยเอทานอลในการลดจำนวนแบคทีเรียบนเนื้อหมู

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง และการเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียแกรมบวก 5 สายพันธุ์ และแกรมลบ 7 สายพันธุ์ (Table 1 และ Table 2) แบคทีเรียรหัส ATCC, NRC และ DMST ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. ศุภยาศ์ วรวิฑูรย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และเชื้อรหัส NRRU ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยจุลชีววิทยา โรงพยาบาลมหาราชนคร จังหวัดนครราชสีมา แบคทีเรียทั้งหมดถูกนำมาแยกให้เป็นโคโลนี โดยเลี้ยงในอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA, Hi-media) จากนั้นเชื้อโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB, Hi-media) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการถ่ายเชื้อจากอาหาร TSB ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB, Hi-media) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4-5 ชั่วโมง และนำมาปรับความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย NaCl ร้อยละ 0.85 ให้เท่ากับความเข้มข้นของสารละลาย McFarland Standard No. 0.5 จะได้ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^8 Colony forming unit ต่อมิลลิลิตร (CFUต่อมิลลิลิตร) และนำไปทดสอบในวิธีอื่นต่อไป

2.2. การเตรียมสกัดสารจากพืช

ผลมะขามป้อมซึ่งถูกเก็บที่อำเภอยางชุมน้อย จังหวัดนครราชสีมา (น้ำหนักสด 4 กิโลกรัม) ถูกนำมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 5-7 วัน นำผลมะขามป้อมทั้งผลไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด (ได้น้ำหนักแห้งประมาณ 3.3

กิโลกรัม) จากนั้นแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ๆ ละ 0.8 กิโลกรัม และนำแต่ละส่วนไปแช่ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (ใช้ ปริมาตรสารละลาย 2.5 ลิตร) อะซิโตน (Acetone) เมทานอล (Methanol) เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (95% Ethanol) และน้ำ เป็นเวลา 7 วัน [7] จากนั้นกรองด้วยผ้าขาว บาง เพื่อแยกกากออกจากสารละลาย นำสารละลายที่ได้ไป ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator นำ สารสกัดที่ได้ใส่ขวด แล้วนำไปชั่งน้ำหนักสารสกัด และ คำนวณหาร้อยละของเนื้อสารสกัดที่ได้ จากนั้นละลายสารสกัด ด้วยสารละลาย Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Hi-media) ให้ ได้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.3. การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion

นำสารสกัดแต่ละชนิดมาเตรียมเป็นแผ่นสารสกัด โดยการหยดสารสกัด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกระดาษ กรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และตรวจสอบ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion [7] เชื้อ แบคทีเรียที่เตรียมได้ข้างต้นถูกนำมาใช้ทดสอบ ด้วยการ ใช้ Cotton swab จุ่มเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว เกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำ อาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA) จากนั้นวางแผ่นสาร สกัด ในการทดลองนี้ได้ใช้ชุดควบคุม Negative control เป็น Dimethyl sulfoxide (DMSO) และ Positive control ใช้ เป็นยาปฏิชีวนะ Tetracycline นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการ ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยการวัดขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นรอบแผ่นสารสกัดด้วย Vernier caliper 3 ครั้ง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยของ วงการยับยั้ง (Inhibition zone)

2.4. การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Broth microdilution

สารสกัดที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ดี (เมื่อเทียบขนาด การยับยั้งแบคทีเรียกับสารสกัดแต่ละชนิด) ถูกนำมาศึกษา ปริมาณการยับยั้งแบคทีเรียด้วยการหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) และค่า Minimal bactericidal inhibition (MBC) [7] โดยมีวิธีดังนี้ นำเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นแล้ว ข้างต้น มาเจือจางด้วยอาหารเหลว MHB ให้มีปริมาณเชื้อ ประมาณ 1.0×10^6 CFUต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดที่ต้องการ

ทดสอบมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ให้มีความเข้มข้น เริ่มต้นเท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดสารสกัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate ที่เดิม อาหารเลี้ยงเชื้อไปก่อนแล้วหลุมละ 100 ไมโครลิตร และทำ การเจือจางแบบลำดับสอง (Two-fold dilution) ดูดเชื้อที่ เตรียมไว้ข้างต้น ใส่ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate หลุม ละ 100 ไมโครลิตรจะได้ความเข้มข้นสุทธิของสารสกัดเป็น 10-0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยให้มีหลุมควบคุมเป็นเชื้อกับ อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารสกัดที่มีความเข้มข้น ต่าง ๆ กัน (Negative control) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลองด้วย เครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และบันทึกผลการทดลอง ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นของสาร สกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับชุดการทดลอง Negative control ซึ่งหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย จะมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับหรือใกล้เคียงกับหลุม Negative control ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่เท่ากัน

จากนั้นนำอาหารของแต่ละหลุมที่ไม่มีการเจริญของ เชื้อแบคทีเรียจากการหาค่า MIC ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มา หยดลงบนอาหาร MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง การอ่านผล บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของสาร สกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของผิวน้ำอาหาร จะได้ เป็นค่า MBC ซึ่งก็คือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่ สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย หรือทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถ กลับมาเจริญได้อีก

2.5. การเตรียมสารละลายมะขามป้อม

นำสารละลาย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (ปราศจากเชื้อ) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ไปผสมกับสารสกัดจาก ผลมะขามป้อมที่มีความเข้มข้น 4MIC 8MIC และ 16MIC จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ทั้งหมด 3 ตัวอย่างไปตรวจสอบฤทธิ์การ ยับยั้งเชื้อในการทดลองต่อไป

2.6. การตรวจสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สารสกัด มะขามป้อมต่อการลดปริมาณแบคทีเรีย

2.6.1. การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบ

เพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยว ๆ จำนวน 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงในอาหาร Mueller-Hinton Broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland no. 0.5 และเจือจางต่อด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 เพื่อให้มีประมาณเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 1.5×10^6 CFUต่อมิลลิลิตร

2.6.2. การทดสอบประสิทธิภาพการลดจำนวนแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ข้างต้น ป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (โดยเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* จะป้ายบนอาหาร Mannitol Salt Agar (MSA) และเชื้อ *E. coli* จะป้ายบนอาหาร Eosin methylene blue (EMB) agar) จากนั้นฉีดพ่นผลิตภัณฑ์สารสกัดมะขามป้อมทั้งหมด 3 ความเข้มข้นลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และชุดควบคุม (สารละลาย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง สังเกตผลการยับยั้ง และถ่ายรูปผลการทดลอง

2.6.3. การทดสอบประสิทธิภาพการลดจำนวนแบคทีเรียบนเนื้อหมูของผลิตภัณฑ์สารสกัดมะขามป้อม

วิธีการที่ใช้ในการทดลองนี้ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Visutthi and Earm-aot [8] นำเนื้อหมูสดมาล้างทำความสะอาด และตัดให้เป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 4x5 เซนติเมตร (ซึ่งสามารถวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้) จากนั้นแช่เนื้อหมูในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 นาน 10 นาที (ระยะเวลาที่ใช้แช่เนื้อหมู นานพอที่จะฆ่าเชื้อที่ปนมากับเนื้อหมูได้) และผึ่งให้แห้ง ทาเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นให้ทั่วผิวเนื้อหมูทั้งให้แห้ง และนำไปทดลอง โดยแบ่งเนื้อหมูออกเป็น 3 กลุ่มๆ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 (สำหรับควบคุมจำนวนเชื้อที่ทาลงบนเนื้อ) กลุ่มที่ 2 เนื้อหมูที่ทาด้วยน้ำเกลือ และกลุ่มที่ 3 ทาเนื้อหมูด้วยผลิตภัณฑ์สารสกัดมะขามป้อม โดยได้เตรียมไว้ทั้งหมด 3 ความเข้มข้น (4MIC 8MIC และ 16MIC) นำเนื้อหมูไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน การเก็บเนื้อหมูในอุณหภูมิดังกล่าว (ในตู้เย็น) ใช้เพื่อเก็บรักษาเนื้อหมูในระยะสั้น หากเก็บรักษาในอุณหภูมินี้ เชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนยังสามารถเจริญได้ แต่จะเจริญได้ช้าลง ผู้วิจัยจึงได้เลือกสภาวะนี้ในการทดลอง จากนั้นนำเนื้อหมูแต่ละกลุ่มไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อนาน 1 นาที (โดยกลุ่มตัวอย่างที่ทาเชื้อ

แบคทีเรีย *S. epidermidis* จะวางบนอาหาร MSA และกลุ่มตัวอย่างที่ทาเชื้อ *E. coli* จะวางบนอาหาร EMB โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นอาหารที่จำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ) นำเนื้อหมูออก แล้วนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง สังเกตผลการทดลองด้วยการนับจำนวนโคโลนี คำนวณเป็นร้อยละของจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเทียบกับชุดควบคุม และถ่ายรูปผลการทดลอง

2.7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองจะถูกคำนวณทางสถิติ ด้วยการหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน รวมถึงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธี One way ANOVA ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) เวอร์ชัน 22

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1.ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากมะขามป้อม

สารสกัดจากมะขามป้อมที่สกัดด้วยอะซิโตน เมทานอล เอทานอล และน้ำ ถูกนำมาตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion กับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* ATCC 29213 และ MRSA NRPC 001R เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 และ *E. coli* NRRU 001R (Table 1) ผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า สารสกัดผลมะขามป้อมมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ MRSA แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 และ *E. coli* สายพันธุ์ดื้อยา (*E. coli* NRRU 001R) สารสกัดผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยอะซิโตนมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองได้ดีกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ ตามลำดับจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า หากมีการศึกษาการแยกสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย หรือการนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ภายนอกร่างกาย การเตรียมสารสกัดจากผลมะขามป้อมด้วยการใช้ตัวทำละลายอะซิโตน อาจจะเหมาะสมกว่าการใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ

เนื่องจากงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการประยุกต์ใช้สารสกัดในผลิตภัณฑ์อาหาร การทดลองถัดไปจึงได้เลือกสารสกัดผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยเอทานอลไปทำการศึกษาความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ด้วยวิธี

Broth microdilution ผลการศึกษาค่า MIC และ MBC ของการสกัดผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยเอทานอลต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบสายพันธุ์อื่น ๆ (Table 2) พบว่า ค่า MIC และค่า MBC ของสารสกัดผลมะขามป้อมต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกอยู่ระหว่าง 2.5-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าอัตราส่วนระหว่าง MBC/MIC อยู่ระหว่าง 2-8 ส่วนของค่า MIC ของสารสกัดผลมะขามป้อมต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MBC อยู่ระหว่าง 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าอัตราส่วนระหว่าง MBC/MIC อยู่ระหว่าง 1-4

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion และ Broth microdilution จะเห็นได้ว่ามีผลการทดลองที่ต่างกัน โดยเมื่อทดสอบสารสกัดด้วยวิธี Agar disc diffusion สารสกัดไม่มีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แต่เมื่อทดสอบด้วยวิธี Broth microdilution สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโดยมีค่า MIC เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความแตกต่างของผลการทดลองนี้สามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากเป็นข้อจำกัดของวิธี Agar disc diffusion ที่คุณสมบัติของสารสกัดหรือสารที่นำมาทดสอบควรมีคุณสมบัติการละลายน้ำที่ดี และมีการแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงได้ดี ผลการทดลองแบบนี้สามารถพบได้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ [9], [10]

การควบคุมเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารสด เพื่อชะลอการเน่าเสียของอาหารด้วยสารสกัดจากธรรมชาติ เช่น พืชสมุนไพร เป็นแนวทางที่น่าสนใจ โดยเฉพาะพืชสมุนไพรที่บริโภคได้ มะขามป้อมเป็นพืชที่มีฤทธิ์ทางสมุนไพร มีการนำไปใช้เป็นส่วนผสมในตำรับยาสมุนไพร เช่น พิกัดตรีผลา และมีการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์ยาแก้ไอ จากการรวบรวมข้อมูลของ Ahmad et al. [4] ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากมะขามป้อมที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เช่น อะซิโตน เมทานอล น้ำ เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) และคลอโรฟอร์ม (Chloroform) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ มีการรายงานถึงสารฟลักซ์เคมีที่พบในสารสกัดจากผลมะขามป้อมหลายกลุ่ม ได้แก่ พอลิฟีนอลิก (Polyphenolic) แทนนิน (Tannins) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) อัลคาลอยด์ (Alkaloids) และวิตามิน (โดยเฉพาะวิตามินซี) อย่างไรก็ตามยังไม่พบการรายงานถึงสารที่โดดเด่นในการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย [5] การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากผลมะขามป้อมอาจเป็นผลจากการรบกวนออกฤทธิ์ของสารฟลักซ์เคมี

ที่มีลักษณะเป็นกรด [4] ซึ่งแสดงให้เห็นในผลการทดลองของงานวิจัยนี้ จากผลการทดลองที่ได้ฉีดพ่นผลิตภัณฑ์สารสกัดมะขามป้อมลงอาหาร MSA แสดงให้เห็นว่า สารสกัดมะขามป้อมมีลักษณะทางกายภาพเป็นกรด ซึ่งเปลี่ยนสีอาหาร MSA เป็นสีเหลือง (Figure 1C และ Figure 1D) โดยลักษณะทางกายภาพของสารสกัดที่เป็นกรดสอดคล้องกับรสชาติของผลมะขามป้อม และผลการศึกษาค่าประจุบวกของสารฟลักซ์เคมีในผลมะขามป้อม พบว่า มีปริมาณวิตามินซีสูง (เนื้อมะขามป้อมสด 100 กรัม มีวิตามินซี ประมาณ 400 มิลลิกรัม และเป็นกรดอื่น ๆ ที่อยู่ในสารกลุ่มพอลิฟีนอลิก แทนนิน และอัลคาลอยด์) ผลการวิจัยนี้ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน เมทานอล เอทานอล และน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีทั้งเชื้อสายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์ดื้อยานอกจากนี้ ยังได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดมะขามป้อมที่สกัดด้วยเอทานอล เมื่อทดสอบด้วยวิธี Broth microdilution ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ และมีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย (Bactericidal activity) การระบุว่าเป็นสารชนิดหนึ่ง ๆ มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียหรือมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Bacteriostatic) สามารถใช้การหาอัตราส่วนของค่า MBC ต่อค่า MIC ได้ ซึ่งหากอัตราส่วนของค่า MBC ต่อค่า MIC มีค่าน้อยกว่า 4-6 จะถือว่าสารชนิดนั้นมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถฆ่าได้มากกว่า 99.9% หากอัตราส่วนของค่า MBC ต่อค่า MIC มากกว่า 6 จะถือว่าสารชนิดนั้น มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ [11] จากการคำนวณอัตราส่วนค่า MBC/MIC สารสกัดจากผลมะขามป้อมมีอัตราส่วนค่า MBC/MIC น้อยกว่า 6 จึงมีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย ยกเว้นในเชื้อดื้อยา MRSA สารสกัดจากผลมะขามป้อมมีอัตราส่วนค่า MBC/MIC มากกว่า 6 ผลการทดลองนี้ อาจจะต้องได้รับการตรวจสอบได้อีกครั้งด้วยวิธี Time kill assay

นอกจากนี้ ปริมาณสารฟลักซ์เคมีต่าง ๆ ที่พบในสารสกัดมะขามป้อมที่มีการปลูกในสภาพพื้นที่แตกต่างกัน มีปริมาณองค์ประกอบสารแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระที่ดีมาก เมื่อเทียบกับสารควบคุม แต่พบว่ามีสารสกัดจากผลมะขามป้อมบางพื้นที่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่ากลุ่มตัวอย่าง [12]

Table 1 Antibacterial activity of Indian gooseberry fruit extracts studied by agar disc diffusion

Bacterial strains	Inhibition Zone (mm±SD)				
	Acetone	Methanol	Ethanol	Water	Tetracycline
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	13.0±0.00	8.0±0.00	12.0±0.50	10.0±0.00	33.0±1.50
MRSA NPRC 001R	12.0±0.50	10.0±0.00	11.0±0.50	10.0±0.00	18.0±0.00
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	27.0±0.00
<i>Escherichia coli</i> NRRU 001R	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	8.0±0.00

Table 2 Minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs) of Indian gooseberry fruit extracts against various bacterial species

Bacterial strains	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MBC/MIC ratio
Gram positive bacteria			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	5	10	2
Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> NPRC 001R	2.5	20	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35989	5	20	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	10	20	2
<i>Staphylococcus intermedius</i> TISTR 668	5	20	4
Gram negative bacteria			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10	40	4
<i>Escherichia coli</i> NRRU 001R	10	40	4
<i>Chromobacterium violaceum</i> DMST 21761	10	10	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> NRRU 001	10	20	2
<i>Salmonella enterica</i> NRRU 002	10	20	2
<i>Salmonella</i> Typhi NRRU 003	10	20	2
<i>Klebsiella</i> sp. NRRU 004	10	40	4

3.2. การประยุกต์ใช้สารสกัดมะขามป้อม

สารสกัดมะขามป้อมที่สกัดด้วยเอทานอลถูกนำมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบที่ความเข้มข้น 4MIC 8MIC และ 16MIC เพื่อตรวจหาความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมที่สามารถยับยั้งเชื้อ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ต้นแบบที่ความเข้มข้น 8MIC และ 16MIC สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. epidermidis* ได้จากการสังเกตจำนวนโคโลนี (Figure 1C และ 1D) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Figure 1A) ผลิตภัณฑ์ที่ผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 4MIC สามารถยับยั้งเชื้อได้บางส่วน (Figure 1B) และผลิตภัณฑ์ต้นแบบที่ความเข้มข้น 16MIC สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* ได้บางส่วน (Figure 1H)

ผลการศึกษาการลดปริมาณแบคทีเรียบนผิวเนื้อหุ้มของผลิตภัณฑ์สารสกัดมะขามป้อม แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวที่มีความเข้มข้น 4MIC 8MIC และ 16MIC สามารถลดปริมาณแบคทีเรียแกรมบวก (*S. epidermidis*) ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้ 10% NaCl พบว่าผลิตภัณฑ์สารสกัดมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 8MIC และ 16MIC สามารถลดปริมาณแบคทีเรียแกรมบวกได้อย่างมีนัยสำคัญ (Figure 2) ส่วนผลการทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) พบว่าผลิตภัณฑ์สารสกัดมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 8MIC และ 16MIC สามารถลดปริมาณเซลล์แบคทีเรียได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้ 10% NaCl

พบว่าผลิตภัณฑ์สารสกัดมะขามป้อมที่ความเข้มข้นทุกความเข้มข้น (4MIC 8MIC และ 16MIC) ไม่สามารถลดปริมาณ *E. coli* ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Figure 3)

งานวิจัยนี้ได้แสดงผลการประยุกต์ใช้สารสกัดจากผลมะขามป้อมบนเนื้อหมู สารสกัดที่ความเข้มข้น 8MIC (80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 16MIC (160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถควบคุมการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบที่ใช้ในการทดสอบได้ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งได้มีการประยุกต์ใช้สารสกัดมะขามป้อมในการรักษาอาการแรกเริ่มของเต้านมอักเสบในโคนม (Subclinical mastitis) สารสกัดจากผลมะขามป้อมที่ละลายในน้ำเกลือ (300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถลดการติดเชื้อของเต้านมโคได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม [13] รวมไปถึงงานวิจัยของ Van Doan et al. [14] ที่ได้มีการประยุกต์ใช้สารสกัดจากผลมะขามป้อมกับปลานิล ด้วยการพัฒนาเป็นอาหารปลา ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปลานิลที่ได้รับอาหารที่ผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทนต่อการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ได้

อย่างมีนัยสำคัญ รวมไปถึงมีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารปกติ

4. บทสรุป

สารสกัดจากผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ อะซิโตน เมทานอล เอทานอล และน้ำ ให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี และได้เลือกศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากผลมะขามป้อมที่สกัดด้วยเอทานอลต่อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์ดื้อยาทั้งหมด 12 สายพันธุ์ พบว่ามีค่า MIC อยู่ระหว่าง 2.5-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MBC อยู่ระหว่าง 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การประยุกต์ใช้สารสกัดจากผลมะขามป้อมบนเนื้อหมูได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผลมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 8MIC (80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 16MIC (160 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรียบนเนื้อหมูได้ งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผลมะขามป้อมมีศักยภาพที่จะพัฒนาต่อไป เพื่อใช้เป็นสารเคมีจากธรรมชาติเพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหาร

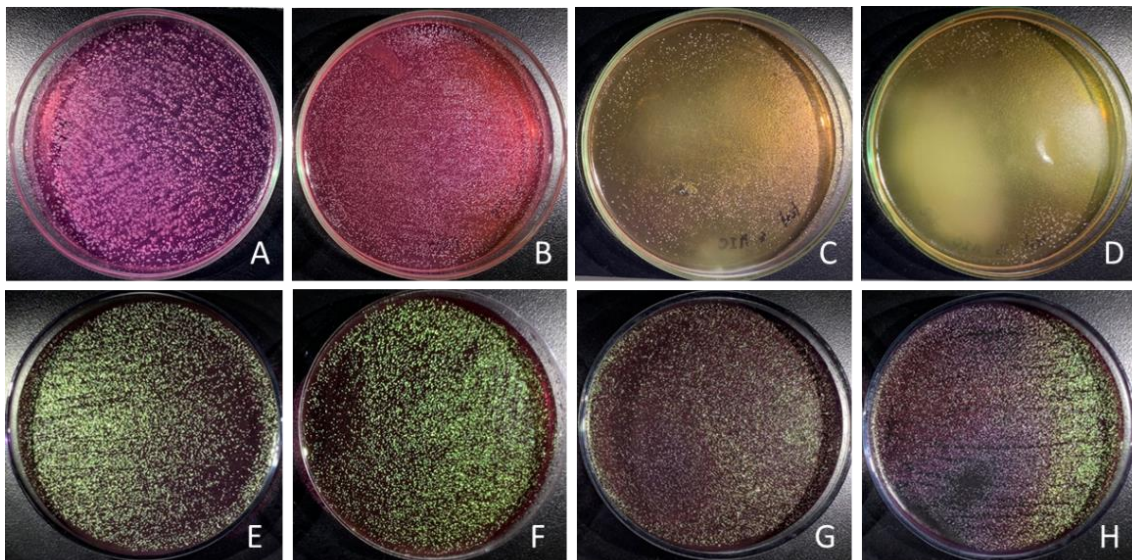


Figure 1 Inhibitory effect of Indian gooseberry fruit extract with different concentrations on *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (A, B, C, D) and *Escherichia coli* ATCC 25922 (E, F, G, H)
A, E = treated with 0.85% NaCl (control); B, F = treated with 4MIC of the extract;
C, G = treated with 8MIC of the extract; D, H = treated with 16MIC of the extract.

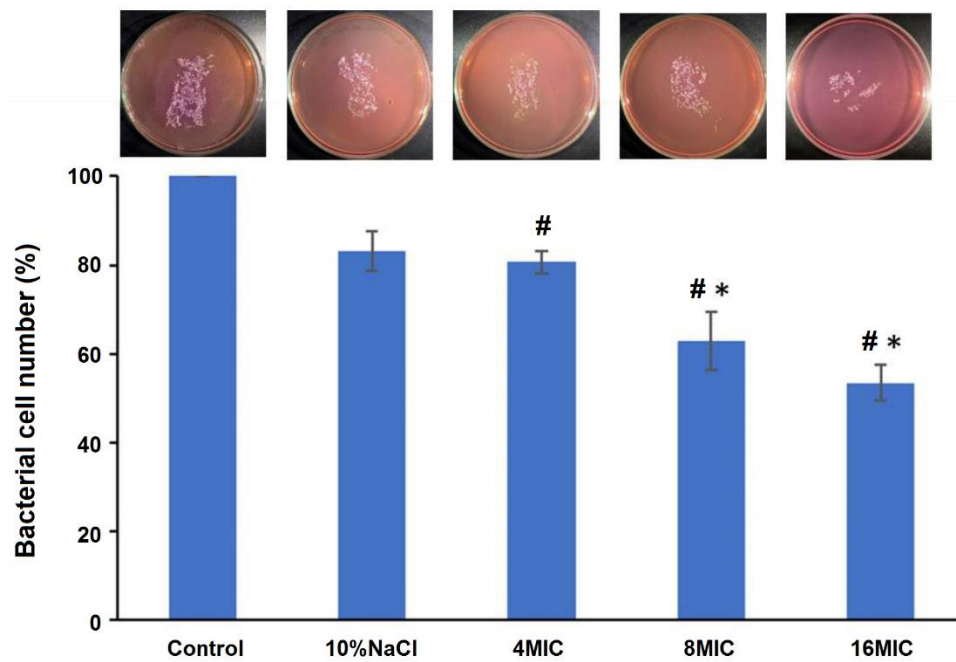


Figure 2 Inhibitory effect of Indian gooseberry fruit extract against *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 on pork

#Significantly different at $p < 0.05$ compared with the control,

*Significantly different at $p < 0.05$ compared with the 10% NaCl treatment

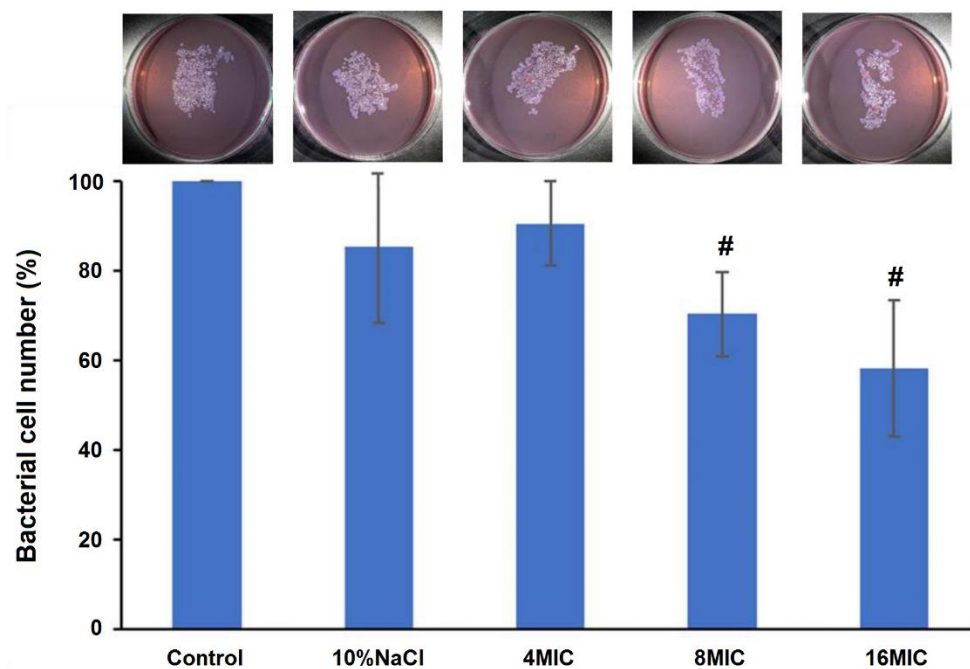


Figure 3 Inhibitory effect of Indian gooseberry fruit extract against *Escherichia coli* ATCC 25922 on pork

#Significantly different at $p < 0.05$ compared with the control

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวสลิตา เรือนมา และนางสาวสุภาภรณ์ งามกระโทก นักศึกษาสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา ที่ให้ความร่วมมือในการทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วง

6. References

- [1] Dwivedi, S. and et al. 2017. A review on food preservation: Methods, harmful effects and better alternatives. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 3(6): 193-199.
- [2] Amit, S.K. and et al. 2017. A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. **Agriculture & Food Security**. 6: 51.
- [3] Campelo, M.C.S., Medeiros, J.M.S. and Silva, J.B.A. 2019. Natural products in food preservation. **International Food Research Journal**. 26(1): 41-46.
- [4] Phumkhachorn, P., Thothom, P. and Rattana chaikunsopon, P. 2022. Antimicrobial activity and mechanism of thymol against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University**. 24(2): 40-47. (in Thai)
- [5] Ahmad, B. and et al. 2021. *Phyllanthus emblica*: A comprehensive review of its therapeutic benefits. **South African Journal of Botany**. 138: 278-310.
- [6] Saini, R. and et al. 2022. Traditional uses, bioactive composition, pharmacology, and toxicology of *Phyllanthus emblica* fruits: A comprehensive review. **Journal of Ethnopharmacology**. 282: 114570.
- [7] Visutthi, M. 2016. Anti-bacterial and anti-quorum sensing properties of selected medicinal plants from Nakhon Ratchasima province, Thailand. **Progress in Applied Science and Technology**. 6(1): 1-13.
- [8] Visutthi, M. and Earm-aot, A. 2018. *In situ* anti-*Staphylococcus aureus* activities of ethanolic leaf extract of *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. in raw chilled pork. **Progress in Applied Science and Technology**. 8(2): 169-178. (in Thai)
- [9] Visutthi, M. 2016. Anti-staphylococcal screening of selected Thai medicinal plants from Nakhon Ratchasima province. **Suranaree Journal of Science and Technology**. 23: 109-114.
- [10] Visutthi, M. 2017. Antagonistic effect of staphylococci of extracts from some local plants in Nakorn Ratchasima province. **KKU Science Journal**. 45(4): 805-816. (in Thai)
- [11] Davis, J.L. 2018. Chapter 2 - Pharmacologic Principles. In: Reed, S.M., Bayly, W.M., Sellon, D.C. (eds.) **Equine Internal Medicine**. 4th edition. Philadelphia: W.B. Saunders.
- [12] Liu, X. and et al. 2008. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. **Journal of Food Composition and Analysis**. 21(3): 219-228.
- [13] Khan, A. and et al. 2018. Comparative therapeutic efficacy of *Phyllanthus emblica* (Amla) fruit extract and procaine penicillin in the treatment of subclinical mastitis in dairy buffaloes. **Microbial Pathogenesis**. 115: 8-11.
- [14] Van Doan, H. and et al. 2022. Impacts of Amla (*Phyllanthus emblica*) fruit extract on growth, skin mucosal and serum immunities, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised under biofloc system. **Aquaculture Reports**. 22: 100953.