

ผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณฟีนอลิครวมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ
สารสกัดจากใบกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) ที่สกัดด้วยเอทานอล

Effect of Extraction Methods on Total Phenolic Content, Antioxidant Activity and
Antibacterial Activity of Ethanolic Leaf Extracts of Kratom (*Mitragyna speciosa*)

วิมลรัตน์ อินศวร ศีลัญญ์ วิเศษสมบัติ ธนಿಸอร์น กรเลิศวานิช ธีรพงศ์ เดชวุ่น และ ทิพยรัตน์ ชาหอมชื่น*

Wimonrut Insuan Silanat Wisetrsombat Thanisoron Konlertvanich Teerapong Detwoon and
Thippayarat Chahomchuen*

ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Veterinary Technology, Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University

*E-mail: cvttyr@ku.ac.th

Received: Mar 27, 2023

Revised: Apr 28, 2023

Accepted: May 01, 2023

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณฟีนอลิครวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) ที่สกัดด้วยเอทานอล โดยใช้วิธีการสกัด 2 วิธี คือ การแช่ในตู้ทำละลาย และการสกัดสารด้วยคลื่นอัลตราโซนิก การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิครวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method แสดงให้เห็นว่าปริมาณฟีนอลิครวมในสารสกัดที่ได้จากวิธีการแช่ในตู้ทำละลาย และการสกัดสารด้วยคลื่นอัลตราโซนิก มีค่าเท่ากับ 2.51 ± 0.03 และ 2.89 ± 0.03 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดแห้ง ตามลำดับ การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay แสดงให้เห็นว่าค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากวิธีการแช่ในตู้ทำละลาย และการสกัดสารด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 15.60 ± 0.25 และ 15.56 ± 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion method และ broth microdilution method พบว่าสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดทั้ง 2 แบบสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* ได้ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดทั้ง 2 วิธี คือ การแช่ในตู้ทำละลาย และการสกัดสารด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อปริมาณฟีนอลิครวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบกระท่อมที่สกัดด้วยเอทานอล

คำสำคัญ: ใบกระท่อม ปริมาณฟีนอลิครวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย การสกัดสารด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

Abstract

This research aimed to examine the effect of extraction methods on total phenolic contents, antioxidant activity and antibacterial activity of ethanolic leaf extracts of kratom (*Mitragyna speciosa*) prepared by 2 extraction methods including maceration and ultrasonic extraction. Total phenolic content analysis using the Folin-Ciocalteu method revealed that total phenolic contents of the extracts prepared by maceration and ultrasonic extraction were 2.51 ± 0.03 and 2.89 ± 0.03 mg gallic acid equivalent/g dry extract, respectively. Antioxidant activity analysis using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay demonstrated that half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) of free radical DPPH of the extracts prepared by maceration and ultrasonic extraction were 15.60 ± 0.25 and 15.56 ± 0.18 μ g/mL, respectively. Antibacterial activity analysis using disc diffusion method and broth microdilution method revealed that the extracts from both extraction methods inhibited *Bacillus subtilis*,

Staphylococcus aureus and *Staphylococcus epidermidis* but not *Escherichia coli*. This research demonstrated that both extraction methods, maceration and ultrasonic extraction, did not have statistically significant effect on total phenolic contents, antioxidant activity and antibacterial activity of ethanolic leaf extracts of kratom.

Keywords: Kratom leaf, Total phenolic content, Antioxidant activity, Antibacterial activity, Ultrasonic extraction

1. บทนำ

พืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) เป็นไม้ยืนต้น พบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นิยมปลูกและบริโภคในเขตภาคใต้ของประเทศไทย มาเลเซียและอินโดนีเซีย การใช้ในรูปแบบการเคี้ยวใบสด ซึ่งเป็นชาจากใบแห้ง เพื่อรักษาอาการปวดเมื่อย ลดไข้ แก้ท้องผูก หรือลดความรู้สึกเมื่อยล้าจากการทำงาน และทนแดดมากขึ้น [1] ในตำรับยาไทย มีการระบุสรรพคุณของใบกระท่อมเพื่อใช้ระงับอาการปวดท้อง แก้บิด แก้ท้องเสีย ระงับประสาท รักษาโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง และโรคผิวหนังเป็นต้น ในปี พ.ศ. 2564 ประกาศราชกิจจานุเบกษา เมื่อวันที่ 26 พ.ค. 2564 ได้มีการแก้ไข พ.ร.บ. ยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 8) ถอดพืชกระท่อมออกจากยาเสพติด ประเภท 5 ทำให้พืชกระท่อมไม่เป็นยาเสพติดตามกฎหมาย มีการอนุญาตให้ใช้พืชกระท่อมในรูปแบบของพืชสมุนไพร ส่งผลให้ประชาชนหันมาปลูกพืชกระท่อมกันมากขึ้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่พบปริมาณมากในใบกระท่อมคือ Mitragynine [2] ซึ่งเป็นสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ (Alkaloid) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากใบกระท่อมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ [3] กระตุ้นกระบวนการสมานแผล [3] ต้านอนุมูลอิสระ [4], [5] และต้านแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Salmonella Typhi*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* [6]-[8]

วิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชมีหลายวิธี เช่น วิธีดั้งเดิมเป็นการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Solvent extraction) วิธีการสกัดแบบดั้งเดิมเป็นวิธีการสกัดที่ง่าย แต่ข้อจำกัดคือ สิ้นเปลืองตัวทำละลาย และใช้ระยะเวลาในการสกัดนาน [9] ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคอัลตราโซนิกมาใช้ในการสกัดร่วมกับสารละลายอินทรีย์ (Ultrasonic extraction) เพื่อให้ได้สารสำคัญเพิ่มมากขึ้น โดยการใช้อัตราเร็วในการสกัดที่มากขึ้นและเวลาที่ใช้ในกระบวนการสกัดสั้นลง [10]

จากรายงานผลการวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นว่านักวิจัยมักใช้เมทานอล (Methanol) เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบกระท่อม แต่ก็มีรายงานการใช้เอทานอล (Ethanol) ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก

ใบกระท่อมเช่นกัน [4] การใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายจะทำให้สามารถแยกตัวทำละลายออกจากสารสกัดได้ง่าย ทำให้สารสกัดด้วยเอทานอลมีความเป็นพิษต่ำกว่าสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์สำหรับคนและสัตว์ได้อย่างปลอดภัย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบกระท่อม และใช้วิธีการสกัด 2 วิธี คือ การแช่ในตัวทำละลาย (Maceration) ซึ่งเป็นวิธีการดั้งเดิม และการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic extraction) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดที่ได้มาจากการสกัดทั้ง 2 วิธี

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. การเตรียมสารสกัดจากใบกระท่อม

ใบกระท่อมที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นสายพันธุ์ก้านแดง (Figure 1) ซื้อจากร้านค้าในอำเภอเขาทะลุ จังหวัดชุมพร ในเดือนพฤษภาคม ปี 2565 นำใบกระท่อมมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่น ผึ่งให้แห้ง ตัดตัวอย่างให้มีขนาดประมาณ 1 นิ้ว อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง บดให้เป็นผงด้วยเครื่องบดเก็บในภาชนะปิดสนิทใส่ไว้ในตู้ดูดความชื้น (Desiccator) เพื่อกันแสง ความชื้น และเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้นก่อนนำไปสกัด

สกัดตัวอย่างจากใบกระท่อมด้วยตัวทำละลายเอทานอล อัตราส่วนของผงใบกระท่อมต่อตัวทำละลาย 1:5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ การสกัดด้วยการแช่ (Maceration) ทำการแช่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน โดยกวนด้วยเครื่องกวนสารละลายตลอดเวลา การสกัดด้วยวิธีใช้คลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic extraction) นำไปสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic cleaner VGT-1990T, 42 kHz, 240W, China) เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ใส่ในขวดสีชา นำสารสกัดไประเหยตัวทำละลาย ซึ่งน้ำหนักสารสกัดหยาบของใบกระท่อม เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นคำนวณปริมาณสารสกัดในหน่วยร้อยละได้ดังนี้

$$\text{ร้อยละของผลผลิตโดยน้ำหนัก (\% w/w)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบใบกระต้อม (กรัม)}}{\text{น้ำหนักใบกระต้อมแห้ง (กรัม)}} \times 100$$



Figure 1 Kratom (*Mitragyna speciosa*) leaves

2.2. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) ของสารสกัดจากใบกระต้อมใช้วิธี Folin-Ciocalteu method โดยใช้ gallic acid (GA) เป็นสารมาตรฐาน [11] นำสารสกัดหยาบมาละลายด้วยเอทานอลให้ได้ความเข้มข้น 1,000 ppm จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 500 ppm และ 250 ppm นำสารละลายปริมาตร 75 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่เจือจาง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และสารละลาย โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) (7.5% w/v) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปตั้งในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร การสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้น 0-300 ppm ในการสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) และสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น รวมทั้งหาค่า Coefficient of determination (R^2) เมื่อได้กราฟมาตรฐานแล้วให้นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากชุดการทดลองของสารสกัดมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน และรายงานค่าปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mg of gallic acid equivalent/g of extract หรือ mg GAE/g extract)

2.3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay ทำโดยนำสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ความเข้มข้น 1,000 ppm

ในเอทานอล จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 1.56-50 ppm ปิเปตสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง จากเติมสารละลาย 0.004% DPPH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 519 [4] ใช้กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) หรือวิตามินซี เป็น สารควบคุมเชิงบวก โดยเตรียมให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.312-5.00 ppm โดยการเจือจางแบบ 2 fold dilution จากนั้นคำนวณหาร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และคำนวณประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 (IC_{50}) ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

โดยที่ A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

2.4. การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

การทดลองนี้ใช้แบคทีเรียทดสอบ 5 ชนิด ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก 4 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* TISTR 1248, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* TISTR 518 และ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 และแบคทีเรียแกรมลบ 1 ชนิด คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 นำแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดมาซัดลงบนอาหารวุ้น Luria-Bertani Agar (LB agar) (Himedia, India) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลว Luria-Bertani broth (LB broth) (Himedia, India) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.5. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

2.5.1. ทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion method

ใช้สารสกัดหยาบความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Germany) นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เลี้ยงไว้ข้างต้น มาปรับค่าความขุ่นให้มีค่าเท่ากับค่ามาตรฐาน McFarland Standard No. 0.5 (เชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/mL) ด้วยอาหารเหลว Muller Hilton broth (MHB) (Difco, USA) จากนั้นใช้ก้านสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อแล้วนำไปถูนบน Muller Hilton agar (MHA) (Difco, USA) ให้ทั่ว โดยทำการถูนแนวทแยง 3 แนว ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาทีเพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง วางกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ (Paper disc) เส้นผ่าน

ศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ หยดสารสกัดจากใบกระท่อมปริมาตร 10 ไมโครลิตรบนกระดาษกรอง และชุดควบคุมบวกใช้ยาเจนตามัยซิน (Gentamicin) ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อดิส (Disc) ชุดควบคุมลบใช้ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อดิส นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสบริเวณรอบกระดาษกรอง เพื่อรายงานผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Inhibition zone) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.5.2. การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากใบกระท่อมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากใบกระท่อมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) ทดสอบด้วยวิธีการเจือจางในอาหารเหลว (Broth microdilution method) ในไมโครเพลท (Microplate) ขนาด 96 หลุม [12] นำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มาปรับความเข้มข้นให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.01 โดยใช้ Muller Hilton broth (MHB) ในการเจือจาง ทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดจากใบกระท่อม 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางด้วยวิธี Two-fold dilution ชุดทดลองประกอบด้วยสารละลายแบคทีเรีย 180 ไมโครลิตร สารสกัดจากใบกระท่อม 20 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเจือจางแบบ Two-fold dilution ด้วยสารละลายแบคทีเรีย 100 ไมโครลิตร ดูดสารละลายที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 100 ไมโครลิตร และชุดควบคุมลบใช้สารละลายแบคทีเรีย 100 ไมโครลิตร ใช้อาหารเหลว MHB เพื่อยืนยันการปลอดเชื้อของการทดลอง จากนั้นนำไมโครเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (Microplate reader, BioRad) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่า MIC จากผลการอ่านค่าการดูดกลืนแสง โดยแถวที่มีความเข้มข้นของสารสกัดน้อยที่สุดที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียคือค่า MIC ทำการยืนยันการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยปียืด Resazurin indicator (TCI, Japan) ลงในหลุมทดสอบหลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อยืนยันค่า MIC โดยหากมีการเจริญของแบคทีเรีย สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู หากไม่มีการเจริญของแบคทีเรียสารจะไม่เปลี่ยนสี

2.6. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลจากการทดลอง 3 ซ้ำ ($n=3$) นำมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) และวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี t-test โดยพิจารณาว่าสำคัญทางสถิติเมื่อ $p\text{-value} < 0.05$

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1. การสกัดสารจากใบกระท่อม

การใช้ตัวทำละลาย และวิธีการสกัดที่แตกต่างกันส่งผลถึงปริมาณของสารสกัดจากใบกระท่อมที่ต่างกัน [13] สารสกัดจากใบกระท่อมที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี [4] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ตัวทำละลายเอทานอลเพราะสามารถแยกออกจากสารสกัดได้ง่าย มีความเป็นพิษต่ำกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ ผลการสกัดใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล เปรียบเทียบวิธีการสกัดระหว่างการแช่ร่วมกับการกวนเป็นเวลา 3 วัน กับการใช้คลื่นอัลตราโซนิก 60 นาที แสดงผลใน Table 1 สารสกัดจากทั้งสองวิธีมีลักษณะหนืด ร้อยละของปริมาณสารสกัดจากวิธีการแช่มีปริมาณมากกว่าวิธีการใช้คลื่นอัลตราโซนิก โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งวิธีการแช่มีระยะเวลาที่นานกว่า ทำให้สารจากใบพืชสามารถละลายออกมาได้ในปริมาณที่สูงกว่า สารสกัดที่ได้นำไปทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียต่อไป

3.2. ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากใบกระท่อม

สารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ในพืชทั่วไป มีสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระให้อยู่ในรูปที่มีความเสถียร และกำจัดแอกทีฟออกซิเจนได้ [14] ดังนั้นปริมาณสารฟีนอลิกสามารถบอกถึงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรได้ [15] ผลการสกัดใบกระท่อมด้วยวิธีการแช่และการใช้คลื่นอัลตราโซนิก คำนวณจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Figure 2) พบปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 2.51 ± 0.03 และ 2.89 ± 0.03 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดแห้งตามลำดับ (Table 1) ถึงแม้สารสกัดจากทั้ง 2 วิธีจะมีปริมาณฟีนอลิกรวมน้อย แต่มีรายงานว่าองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบกระท่อมในตัวทำละลายเอทานอล ประกอบด้วยอัลคาลอยด์ (Alkaloid) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ไตรเทอพรีนอยด์ (Triterpenoid) สเตียรอยด์ (Steroid) ซาโปนิน (Saponin) และแทนนิน (Tanin) ซึ่งส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี [4]

Table 1 Yields, total phenolic contents and antioxidant activity (from DPPH assay) of ethanolic leaf extracts of Kratom prepared by maceration and ultrasonic extraction

Extraction method	%Yield	Total phenolic content (mg GAE/g dry extract)	IC ₅₀ (µg/mL)
Maceration	13.04±1.03 ^a	2.51±0.03 ^a	15.60±0.25 ^a
Ultrasonic extraction	9.73±0.55 ^b	2.89±0.03 ^a	15.56±0.18 ^a

The results are expressed as mean±SD (n=3).

Values in a column followed by different superscript letters are significantly different (p<0.05).

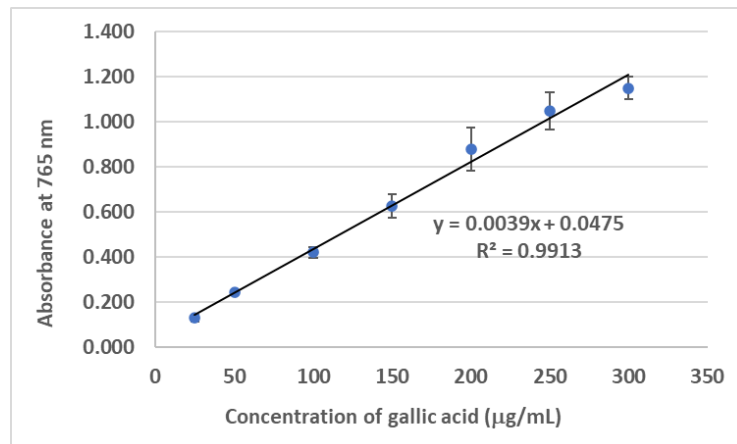


Figure 2 Standard curve of gallic acid

3.3.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบกระท่อม

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบกระท่อมด้วยวิธี DPPH scavenging assay (Figure 3) ค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูล DPPH ได้ร้อยละ 50 ของสารสกัดใบกระท่อมจากการใช้คลื่นอัลตราโซนิก (15.56±0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) มีค่าน้อยกว่าสารสกัดจากการแช่ (15.60±0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) (Table 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากการใช้คลื่นอัลตราโซนิกมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าวิธีการแช่ แต่สารสกัดทั้ง 2 วิธีมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานว่าสารสกัดจากใบกระท่อมในตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีค่า IC₅₀ จากวิธี DPPH เท่ากับ 38.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม [4] และ 21.61±0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม [5] ในขณะที่งานวิจัยนี้มีค่าอยู่ระหว่าง 15.56±0.18 ถึง 15.60±0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม แสดงถึงคุณภาพของสารสกัดมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่างานวิจัยที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดชนิดเดียวกัน เนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการสกัดโดยการแช่ร่วมกับการกวนตลอดเวลา

และวิธีการใช้คลื่นอัลตราโซนิกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด และอาจเป็นผลที่เกิดจากความแตกต่างของสายพันธุ์ แหล่งเพาะปลูก ฤดูกาลเก็บเกี่ยวที่ทำให้สารออกฤทธิ์ที่สำคัญมีความแตกต่างกัน [16]

3.4. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบกระท่อม

การทดสอบสมบัติเบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ของสารสกัดจากใบกระท่อมเปรียบเทียบกับขนาดของโซนใสของสารสกัดกับยาเจนตามัยซินเป็นชุดควบคุมบวกและ Dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นชุดควบคุมลบ (Figure 4) พบว่าสารสกัดใบกระท่อมจากการสกัดด้วยวิธีการแช่และการใช้คลื่นอัลตราโซนิก ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ได้ เนื่องจากความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบต่ำกว่ารายงานก่อนหน้านี้ที่ 25% [7] แต่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ทดสอบได้ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับยามาตรฐาน (p<0.05) ดังแสดงใน Figure 5

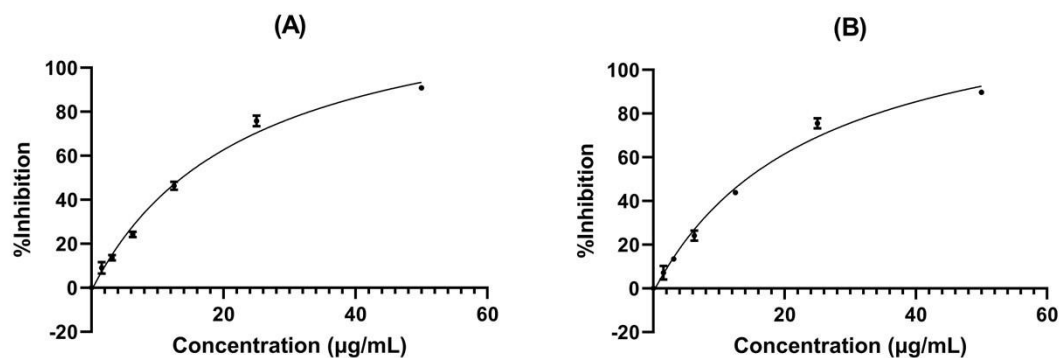


Figure 3 Antioxidant activity analysis using DPPH assay of ethanolic leaf extracts of Kratom prepared by maceration (A) and ultrasonic extraction (B)

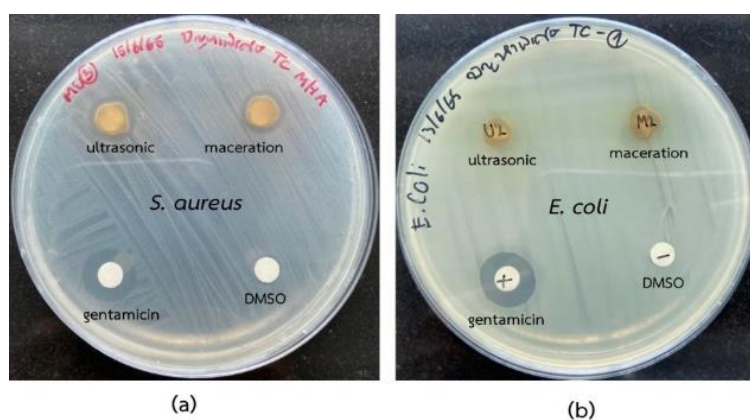


Figure 4 Antibacterial activity against *S. aureus* (a) and *E. coli* (b) of ethanolic leaf extracts of Kratom prepared by maceration and ultrasonic extraction
Gentamicin and DMSO were used as a positive control and a negative control, respectively.

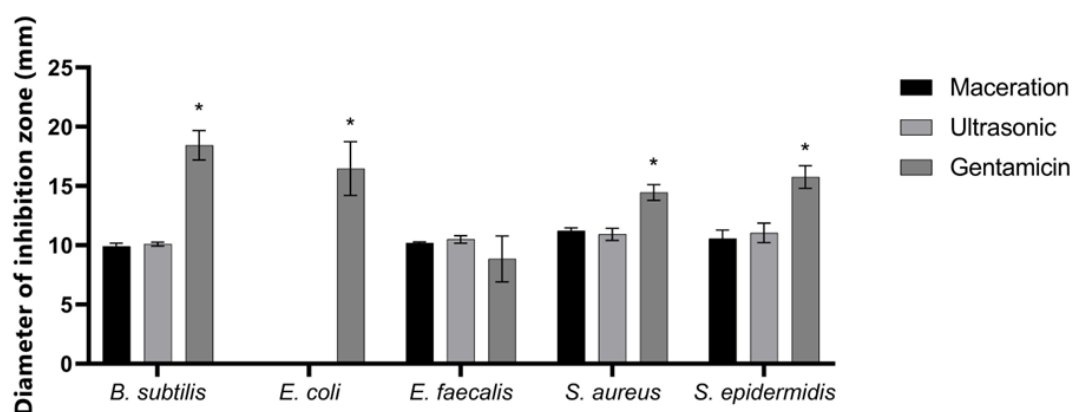


Figure 5 Inhibition zone diameters resulted from ethanolic leaf extracts of Kratom prepared by maceration and ultrasonic extraction against different bacterial strains

Gentamicin was used as a positive control. The results are expressed as mean±SD (n=3).

* indicates significant difference (p<0.05) among control and treatment groups for each tested bacterium.

ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบกระท่อมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด พบว่าสารสกัดจากทั้ง 2 วิธีมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *S. epidermidis* และ *S. aureus* ตามลำดับ โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 2) แต่สารสกัดทั้ง 2 ชนิดไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. faecalis* ได้ เนื่องจากความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ใช้คือ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าในการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusionฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* ของสารสกัดใบกระท่อมสอดคล้องและใกล้เคียงกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ ที่รายงานว่าสารสกัดใบกระท่อมในตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella Typhi* และ *B. subtilis* ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 3.12-6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [7] ยับยั้งเชื้อ *S. pneumoniae* และ *E. coli* ที่ความเข้มข้น 6.25% และ 25% ตามลำดับ [8] ยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่ความเข้มข้น 24% งานวิจัยส่วนใหญ่รายงานผลการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดใบกระท่อมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล [13] ดังนั้นผลงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดใบกระท่อมด้วยเอทานอล เพื่อเป็นข้อมูลของสารสกัดจากใบกระท่อมสำหรับศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ ต่อไป

4. บทสรุป

งานวิจัยนี้วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบกระท่อมที่สกัดโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย และใช้วิธีการสกัด 2 วิธี คือ การแช่ในตัวทำละลาย และการสกัดสารด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดทั้งสองวิธีมีปริมาณสารฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดดังกล่าวยับยั้งได้แต่เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการสกัดใบกระท่อมโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิก ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็ว ให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ไม่แตกต่างจากการสกัดใบกระท่อมโดยการแช่ในตัวทำละลาย จึงอาจใช้ทดแทนกันได้ นอกจากนี้ความปลอดภัยจากการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ทำให้สามารถนำสารสกัดไปใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์สำหรับคนและสัตว์ในการยับยั้งแบคทีเรียหรือต้านอนุมูลอิสระได้อย่างปลอดภัย

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากงบประมาณโครงการปัญหาพิเศษ ปีการศึกษา 2565 คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Table 2 The Minimum inhibitory concentration (MIC) of ethanolic leaf extracts of Kratom prepared by maceration and ultrasonic extraction against different bacterial strains

Microorganism	MIC (mg/mL)	
	Maceration	Ultrasonic extraction
<i>B. subtilis</i>	0.5	0.5
<i>E. coli</i>	Ni	Ni
<i>E. faecalis</i>	Ni	Ni
<i>S. aureus</i>	2.0	2.0
<i>S. epidermidis</i>	1.0	1.0

The results are expressed as mean of triplicate.

Ni = no inhibition

6. References

[1] Rungruang, W. 2020. Toxicology of Kratom. Thai Journal of Hospital Pharmacy. 30(2): 118-124. (in Thai)

[2] Orio, L. and et al. 2012. UAE, MAE, SFE-CO₂ and classical methods for the extraction of *Mitragyna speciosa* leaves. **Ultrasonics Sonochemistry**. 19(3): 591-595.

- [3] Shaik Mossadeq, W.M. and et al. 2009. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Mitragyna speciosa* Korth methanolic extract. **Medical Principles and Practice**. 18(5): 378-384.
- [4] Yuniarti, R. and et al. 2020. Characterization, phytochemical screenings and antioxidant activity test of Kratom leaf ethanol extract (*Mitragyna speciosa* Korth) using DPPH method. **Journal of Physics: Conference Series**. 1462: 012026.
- [5] Zhang, P. and et al. 2023. Antidiabetic and antioxidant activities of *Mitragyna speciosa* (kratom) leaf extract in type 2 diabetic rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. 162: 114689.
- [6] Juanda, E., Andayani, S. and Maftuch, M. 2019. Phytochemical screening and antibacterial activity of Kratom leaf (*Mitragyna Speciosa* Korth.) against *Aeromonas Hydrophilla*. **The Journal of Experimental Life Science**. 9(3): 155-158.
- [7] Parthasarathy, S. and et al. 2009. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of aqueous, methanolic and alkaloid extracts from *Mitragyna speciosa* (Rubiaceae Family) leaves. **Molecules**. 14(10): 3964-3974.
- [8] Salim, H.M. and et al. 2021. Antibacterial mechanism of Kratom (*Mitragyna speciosa*) methanol extract on *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli* bacteria. **Biomolecular and Health Science Journal**. 4(2): 99-103.
- [9] Lertkao, P. and et al. 2021. Comparison of traditional and ultrasonic-assisted extraction methods on anthocyanin, total phenolic compounds and antioxidant activity of Homdaeng ST.1 and Homdum ST.2 brown rice. **PSRU Journal of Science and Technology**. 6(1): 109-122. (in Thai)
- [10] Siramon, P. and Weanukul, R. 2020. Using ultrasound-assisted solvent extraction of phenolic compounds from *Curcuma aromatica* Salisb. rhizomes. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University**. 22(1): 40-44. (in Thai)
- [11] Insuan, W., Hansupalak, N. and Chahomchuen, T. 2022. Extraction of curcumin from turmeric by ultrasonic-assisted extraction, identification, and evaluation of the biological activity. **Journal of Herbmmed Pharmacology**. 11: 188-196.
- [12] Chahomchuen, T., Insuan, O. and Insuan, W. 2020. Chemical profile of leaf essential oils from four eucalyptus species from Thailand and their biological activities. **Microchemical Journal**. 158: 105248.
- [13] Firmansyah, A., Sundalian, M. and Taufiq, M. 2021. Kratom (*Mitragyna Speciosa* Korth) for a new medicinal: A review of pharmacological and compound analysis. **Biointerface Research in Applied Chemistry**. 11(2): 9704-9718.
- [14] Zeb, A. 2020. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. **Journal of Food Biochemistry**. 44 (9): e13394.
- [15] Lovric, V. and et al. 2017. Effect of microwave-assisted extraction on the phenolic compounds and antioxidant capacity of Blackthorn flowers. **Food Technology and Biotechnology**. 55(2): 243-250.
- [16] Adeggbaju, O.D. and et al. 2020. Effects of growth stage and seasons on the phytochemical content and antioxidant activities of crude extracts of *Celosia argentea* L. **Heliyon**. 6(6): e04086.