

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์

แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดหยาบจากผล

ของบาร์บาโดสเซอร์รี (*Malpighia glabra*)

Antimicrobial, Antioxidant and Anti-alpha-glucosidase Activities of Crude Extracts from Fruits of *Malpighia glabra*

พฤทธิกร ศุภพล*

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

ตำบลบ้านพร้าว อำเภอบาเพายอม จังหวัดพัทลุง 93210

Preuttiporn Supaphon*

Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung campus,

Baan Prao, Papayom, Phatthalung 93210

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดหยาบจากผลบาร์บาโดสเซอร์รี โดยสกัดผลด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล นำสารสกัดหยาบมาประเมินฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสด้วยวิธี colorimetric broth microdilution, DPPH free radical scavenging และ alpha-glucosidase inhibitory activity assay ตามลำดับ ใช้จุลินทรีย์ 6 สายพันธุ์ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดเฮกเซนมีฤทธิ์ต้าน *C. albicans* ให้ค่า MIC 8 และ MFC 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดฆ่าเซลล์เป้าหมายด้วยการทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ส่วนสารสกัดไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ให้ค่า IC₅₀ 1.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ให้ค่า EC₅₀ 1.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากผลบาร์บาโดสเซอร์รีเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายและน่าสนใจสำหรับประยุกต์ในอนาคต

คำสำคัญ : บาร์บาโดสเซอร์รี; จุลินทรีย์; อนุมูลอิสระ; แอลฟาไกลูโคซิเดส

Abstract

This research aims to evaluate the antimicrobial, antioxidant and anti-alpha-glucosidase activities of crude extracts from *Malpighia glabra* fruits. The fruits were extracted with hexane, dichloromethane and methanol. Three crude extracts were evaluated for their antimicrobial, antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities by using a colorimetric broth microdilution test, DPPH free radical scavenging assay and alpha-glucosidase inhibitory activity assay, respectively. Six pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus*, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*, were used in the antimicrobial test. Hexane extract was the most active against *C. albicans* with MIC and MFC of 8 of 16 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The extract killed target microorganism by destroying cell surface. Dichloromethane extract had the strongest anti-alpha-glucosidase activity with IC_{50} value of 1.12 mg/mL . On the other hand, methanol extract had the strongest antioxidant activity with EC_{50} value of 1.15 mg/mL . These results showed that crude extracts from the *M. glabra* fruits are interesting because they are a good source of many bioactive compounds.

Keywords: *Malpighia glabra*; microorganism; free radical; alpha-glucosidase

1. บทนำ

ปัจจุบันโรคติดเชื้อเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญ เนื่องจากมีแนวโน้มสูงขึ้นทุก ๆ ปี โดยจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อมีการปรับตัว ทำให้ตัวยาปฏิชีวนะได้เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้สาเหตุของการดื้อยาอาจมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะเกินขนาดหรือใช้อย่างพร่ำเพรื่อ โดยปัจจัยดังกล่าวเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้มีอัตราการติดเชื้อเพิ่มสูงขึ้น จนในที่สุดปัญหาโรคติดเชื้อจึงกลายเป็นปัญหาสำคัญในการรักษา [1] โดยโรคติดเชื้อมักพบร่วมในผู้ป่วยโรคอื่น ๆ โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวาน ซึ่งในผู้ป่วยโรคเบาหวานหากเป็นแผลหรือมีบาดแผลอาจหายช้ากว่าคนปกติและอาจลุกลามได้ง่าย เนื่องจากในกระแสเลือดของผู้ป่วยมีระดับน้ำตาลสูง ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารและเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว จนทำให้เกิดอาการแทรกซ้อนอื่น ๆ ตามมา นอกจากนี้พบว่าใน

ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีภาวะอนุมูลอิสระในร่างกายเพิ่มมากขึ้นกว่าคนปกติ ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นต้นเหตุของโรคต่าง ๆ เช่น เซลล์เสื่อมสภาพเร็วกว่าปกติ ผิวหนังเหี่ยวย่น และกระตุ้นให้เกิดโรคเมตาบอลิก เช่นเดียวกับผู้ป่วยโรคเบาหวานต้องรักษาโรคโดยการรับประทานยาหรือฉีดฮอร์โมนอินซูลินเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือดให้ปกติ โดยในกระบวนการย่อยอาหารของคนปกติจะย่อยคาร์โบไฮเดรตไปเป็นน้ำตาล โดยใช้เอนไซม์จากตับอ่อนและลำไส้เล็กมาย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้กลายเป็นโมเลกุลเดี่ยว เพื่อให้ร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ แต่สำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานจะมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าคนปกติ และมากกว่าความต้องการของร่างกาย หากสามารถยับยั้งหรือชะลอการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต ก็จะส่งผลดีต่อผู้ป่วยโรคเบาหวาน โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ

ดังกล่าว คือ เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส เห็นได้ว่าในผู้ป่วยโรคเบาหวานพบปัญหาแทรกซ้อนต่าง ๆ ตามมา นอกจากปัญหาระดับน้ำตาลในเลือดสูงซึ่งเป็นสาเหตุของโรค ยังพบปัญหาอนุมูลอิสระในร่างกายและปัญหาแผลติดเชื้อมาได้ง่ายในผู้ป่วย โดยนักวิจัยพยายามหาแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถแก้ปัญหาดังกล่าว จึงมีการศึกษาแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ ด้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสแทนการใช้ยารักษาในปัจจุบัน [2] โดยการนำสมุนไพรมาร่วมเป็นสารสกัด ซึ่งสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ด้านอนุมูลอิสระ และสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส อีกทั้งสารที่ได้จากธรรมชาติไม่เป็นพิษต่อเซลล์ [3] การศึกษาสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพรจึงได้รับความสนใจอย่างมาก ก่อนหน้านี้นี้มีรายงานการศึกษาพืชสมุนไพรหลายชนิดในประเทศไทยที่นิยมใช้ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน และพบว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรมีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านอนุมูลอิสระก่อโรคได้เป็นอย่างดี การรักษาโรคเบาหวานในปัจจุบันยังต้องใช้ยาแผนปัจจุบันร่วมด้วย โดยพืชที่สนใจศึกษาในงานวิจัยนี้คือ *Malpighia glabra* ซึ่งจัดเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่ง มีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย ประกอบด้วยสารฟลักโกลินหลายชนิด ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก แอนโทไซยานิน วิตามิน และแร่ธาตุอื่น ๆ [4] สารเหล่านี้มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ประกอบกับมีรายงานการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชชนิดนี้ไม่มากนัก โดยพบว่าสารสกัดจากผลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ก่อโรคและต้านอนุมูลอิสระได้ดี ซึ่งถือเป็นข้อมูลที่น่าสนใจ นอกจากนี้บริเวณที่ศึกษายังไม่มีรายงานหรือการศึกษามาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพของสารสกัดหยาบจากผลของบาร์บาโดสเซอร์รี่ในการยับยั้งอนุมูลอิสระก่อโรคร่วมกับ

การศึกษาผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด นอกจากนี้ยังศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัด

2. วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1. การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำผลของบาร์บาโดสเซอร์รี่ตากแห้งเป็นเวลา 14 วัน แล้วนำผลที่แห้งมาปั่นละเอียดและนำไปแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด เริ่มจากแซนโทเซน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเทตัวทำละลายแซนโทเซนออกและเก็บในขวดก้นกลม แช่ตัวอย่างด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน เป็นเวลา 7 วัน แล้วเทตัวทำละลายออกใส่ในขวดก้นกลม และสุดท้ายแช่ตัวอย่างด้วยเมทานอล เป็นเวลา 7 วัน เทตัวทำละลายเมทานอลออกใส่ในขวดก้นกลม นำตัวทำละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัด 3 ส่วน คือ แซนโทเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล นำสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วน ละลายด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเก็บไว้เป็น stock solution ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

2.2. การเตรียมยาปฏิชีวนะมาตรฐาน

ละลายยาแวนโคไมซินและเจนตามัยซินด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนยาแอมโฟเทอริซินบีเตรียมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยยาแวนโคไมซินและเจนตามัยซินใช้เป็นยามาตรฐานสำหรับแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ ตามลำดับ ส่วนยาแอมโฟเทอริซินบีใช้เป็นยามาตรฐานสำหรับยีสต์

2.3 การเตรียมเชื้อทดสอบ

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ (1) แบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) SK1 (2) แบคทีเรียแกรมลบ 2 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli* ATCC25922 กับ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 และ (3) ยีสต์ 2 สายพันธุ์ คือ *Candida albicans* ATCC 90028 และ *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112

2.3.1 streak แบคทีเรียทดสอบลงบนอาหาร nutrient agar (NA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีของแบคทีเรียขึ้นบนจานอาหาร จากนั้นเตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเชยแบคทีเรีย 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร nutrient broth (NB) ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ 0.5 McFarland standard (ประมาณ 1.5×10^8 CFU/mL) และเจือจางต่อที่อัตราส่วน 1:200 ด้วยอาหาร Mueller-Hinton broth (MHB)

2.3.2 streak ยีสต์ทดสอบลงบนอาหาร Sabouraud's dextrose agar (SDA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สำหรับ *C. albicans* และ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับ *C. neoformans* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตเห็นโคโลนีของยีสต์ขึ้นบนจานอาหาร จากนั้นเตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเชยยีสต์ 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร Sabouraud's dextrose broth (SDB) ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ 2 McFarland standard และเจือจางต่อที่อัตราส่วน 1:20 ด้วยอาหาร SDB

2.4. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดด้วยวิธี colorimetric broth microdilution test

2.4.1 ทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ใน sterile 96-well microtiter plate หลุมละ 12 ไมโครลิตร แล้วเติมอาหาร MHB สำหรับแบคทีเรียและเติมอาหาร SDB สำหรับยีสต์ลงไปหลุมละ 88 ไมโครลิตร และเติมเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ซึ่งปรับความขุ่นแล้วใส่ใน sterile 96-well microtiter plate ที่มีสารสกัดและอาหารอยู่หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยทดสอบ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 ชั่วโมง สำหรับ *C. neoformans* หยด resazurin indicator (0.18 %) ลงในหลุมทดสอบหลุมละ 30 ไมโครลิตร และนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดอ่านผลการทดสอบโดยสังเกตสีของ resazurin หากยังคงเห็นเป็นสีน้ำเงินให้ผลเป็นบวกแสดงว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อทดสอบ และหากเปลี่ยนเป็นสีชมพูให้ผลเป็นลบแสดงว่าสารสกัดไม่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อทดสอบ

2.4.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (MIC, minimum inhibitory concentration) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบ (MBC, minimum bactericidal concentration หรือ minimum fungicidal concentration, MFC)

(1) การหาค่า MIC นำสารสกัดที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบหาค่า MIC ในช่วงความเข้มข้น 512-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการเติมอาหารเหลว MHB สำหรับแบคทีเรีย และอาหารเหลว SDB สำหรับ

ยีสต์ ใส่ลงใน sterile 96-well microtiter plate หลุมละ 89 ไมโครลิตร แล้วดูดสารสกัดหยาบใส่ sterile 96-well microtiter plate หลุมเดียวกันกับอาหารเหลวอยู่ หลุมละ 11 ไมโครลิตร จากนั้นเจือจางแบบ 2-fold dilution เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 512-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วดูดอาหารและสารสกัดที่ความเข้มข้นสุดท้ายทิ้ง 50 ไมโครลิตร โดยทดสอบความเข้มข้นละ 3 ข้ำ จากนั้นดูดเชื้อทดสอบที่มีอัตราส่วน 1:200 สำหรับแบคทีเรียและเชื้อที่มีอัตราส่วน 1:20 สำหรับยีสต์ ที่เตรียมไว้ใส่ใน sterile 96-well microtiter plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 ชั่วโมง สำหรับ *C. neoformans* จากนั้นหยด resazurin indicator (0.18 เปอร์เซ็นต์) ลงในหลุมทดสอบหลุมละ 30 ไมโครลิตร และนำไปบ่มต่อที่ 35 องศาเซลเซียส สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ *C. Albicans* และ 25 องศาเซลเซียส สำหรับ *C. neoformans* เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด อ่านผลการทดสอบ บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เป็นค่า MIC

(2) การหาค่า MBC หรือ MFC นำผลทุกความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ในการทดสอบ MIC มา streak บนอาหาร NA สำหรับแบคทีเรีย และ streak บนอาหาร SDA สำหรับยีสต์ แล้วนำจานอาหารไปบ่มที่สภาวะเดียวกับการทดสอบข้างต้น อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียเป็นค่า MBC และอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อยีสต์ได้เป็นค่า MFC

2.4.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อเซลล์จุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM)

นำสารสกัดที่มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์มาศึกษาผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยเตรียมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 4 เท่า ของค่า MIC แล้วบ่มร่วมกับจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นตรึงตัวอย่างเซลล์ด้วยสารละลาย 25 เปอร์เซ็นต์ glutaraldehyde ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ตรึงตัวอย่างเซลล์อีกครั้งด้วยสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ osmium tetroxide เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำตัวอย่างเซลล์มาแช่ในสารละลายเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 50, 70, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย สงขลา นครินทร์

2.5. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

การยับยั้งอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity (DPPH) ศึกษาด้วยวิธีดัดแปลงจาก Premianu และ Jaynthy [6] โดยนำสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน DMSO ดูดใส่ใน sterile 96-well microtiter plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้วิตามินซี (ascorbic acid) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) และใช้ DMSO เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การ

ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ และค่า EC_{50} ของการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ radical scavenging activity} = [A_0(A_1 - A_2)/A_0] \times 100$$

เมื่อ A_0 คือ blank; A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่มีสารสกัด; A_2 คือ negative control

2.6 การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแอลฟา กลูโคซิเดส โดยเตรียมตัวอย่างของสารสกัดที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายสารตัวอย่างใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่พีเอช 6.9 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดสความเข้มข้น 0.1 ยูนิต ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาเบื้องต้นเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเติม p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาให้หยุดกิจกรรมของแอลฟา กลูโคซิเดสโดยใช้โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นตรวจติดตามปริมาณของ p-nitrophenol ที่เกิดขึ้นโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้ยาอะคาโบส (acarbose) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแอลฟา กลูโคซิเดสและค่า IC_{50} ของสารสกัดในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดสเช่นเดียวกับการทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระ

3. ผลการวิจัยและอภิปราย

3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น

วิธี colorimetric broth microdilution ที่

ดัดแปลงจากวิธีของ Supaphon และคณะ [5] ให้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากบาร์บาโดสเซอร์รี่ของสารสกัด 3 สาร ประกอบด้วยสารสกัดเมทานอล สารสกัดไดคลอโรมีเทน และสารสกัดเฮกเซน พบว่าสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้ง *C. albicans* และเมื่อทดสอบหาค่า MIC พบว่าสารสกัดเฮกเซนให้ค่า MIC 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร MFC 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดไดคลอโรมีเทนและเมทานอลให้ค่า MIC มากกว่า 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้พบว่าสารสกัดทั้ง 3 สาร ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 2 สายพันธุ์ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*) (ตารางที่ 1)

3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อเซลล์จุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ผลการศึกษาศักยภาพของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานของจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 1) พบว่าสารสกัดหยาบจากผลของบาร์บาโดสเซอร์รี่ที่สกัดด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ทำลายผนังเซลล์ของ *C. albicans* (รูปที่ 1c) เช่นเดียวกับยา amphotericin B ซึ่งเป็นชุดควบคุมเชิงบวก (รูปที่ 1b) ซึ่งต่างจากเซลล์ปกติที่ไม่มีการเติมสารสกัดและยาปฏิชีวนะ (รูปที่ 1a)

3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด 3 สาร คือ เมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดให้ค่าการยับยั้ง 82.50 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 70.13 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 70.10

เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยสารมาตรฐานวิตามินซีที่เป็นตัวควบคุมเชิงบวกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 83.01 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาเตรียมใหม่ให้ได้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางแบบ 2-fold dilution ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด

10-0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบหาค่า 50 เปอร์เซ็นต์ effective concentration (EC_{50}) พบว่าสารสกัดเมทานอลให้ค่า EC_{50} ดีที่สุด 1.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารมาตรฐานวิตามินซีให้ค่า EC_{50} 0.008 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Table 1 The potential active extracts from *M. glabra* and their antimicrobial activity against six pathogenic microorganisms at MIC concentrations ranged from 1 to 512 $\mu\text{g/mL}$.

Extracts	MIC values ($\mu\text{g/mL}$)					
	SA	MRSA	EC	PA	CA28	CN12
Methanol	512	512	-	-	512	512
Dichloromethane	512	512	-	-	512	512
Hexane	512	512	-	-	8/16	512
Antimicrobial drugs						
Vancomycin	1/2	1/2				
Gentamicin			0.25/1	0.25/1		
Amphotericin B					0.5/1	0.5/1

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923; MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) SK1; EC = *Escherichia coli* ATCC25922; PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; CA28 = *Candida albicans* ATCC90028; CN12 = *Cryptococcus neoformans* ATCC90112

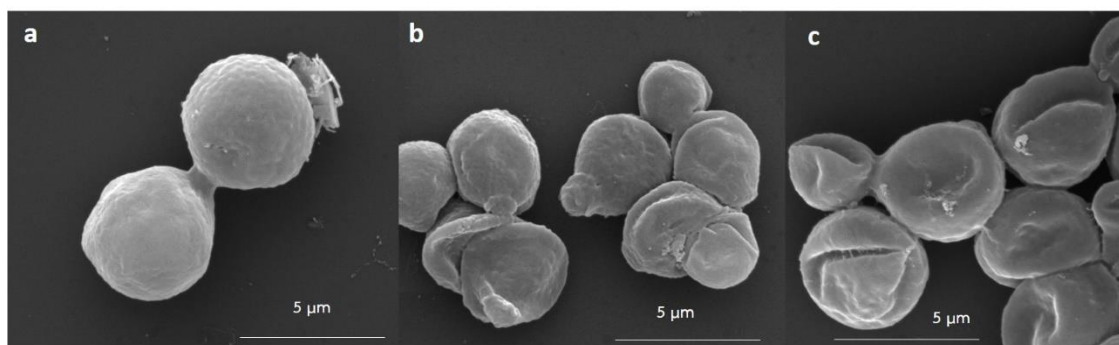


Figure 1 Scanning electron micrographs of *C. albicans*. (a), *C. albicans* after incubation with 1 % DMSO (b), *C. albicans* after incubation with amphotericin B (c), *C. albicans* after incubation with hexane extract at concentrations of 4x MIC values.

Table 2 Antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activities of the extracts

Extracts	Antioxidant activity		Alpha-glucosidase inhibitory activity	
	% inhibition	EC ₅₀ (mg/mL)	% inhibition	IC ₅₀ (mg/mL)
Methanol	82.50	1.15	70.12	15.11
Dichloromethane	70.13	11.46	83.43	1.12
Hexane	70.10	11.49	65.50	19.03
Positive control				
Ascorbic acid	83.01	0.008	-	-
Acarbose	-	-	90.91	0.11

3.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดสของสารสกัด 3 สาร คือ เมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเฮกเซน พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดให้ค่าการยับยั้ง 83.43 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดเมทานอลและเฮกเซนให้ค่าการยับยั้ง 70.12 และ 65.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดมาเตรียมใหม่ให้ได้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางแบบ 2-fold dilution ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 10-0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบหาค่า 50 เปอร์เซ็นต์ inhibitory concentration (IC₅₀) พบว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนให้ค่า IC₅₀ ต่ำที่สุด 1.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยาอะคาโบสให้ค่า IC₅₀ 0.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เนื่องจากปัญหาการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานในปัจจุบัน ทั้งปัญหาระดับน้ำตาลในเลือด ปัญหาอนุมูลอิสระ และปัญหาการติดเชื้อจุลินทรีย์ในแผลของผู้ป่วย นักวิจัยจึงสนใจศึกษาศักยภาพของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยเฉพาะพืชสมุนไพร เนื่องจากปัจจุบันมีการนำสมุนไพรมาใช้อย่างกว้างขวาง ดังนั้น

งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของบาร์บาโดสเซอร์รี่ เนื่องจากเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาและยังมีการศึกษาน้อย ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากบาร์บาโดสเซอร์รี่ของสารสกัดเมทานอล สารสกัดไดคลอโรมีเทน และสารสกัดเฮกเซน พบว่าสารสกัดเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้ง *C. albicans* ได้ดีที่สุด โดยให้ค่า MIC 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร MFC 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดไดคลอโรมีเทนและเมทานอลให้ค่า MIC 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้พบว่าสารสกัดทั้ง 3 สาร ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 2 สายพันธุ์ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*)

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาศักยภาพของสารสกัดในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ให้ค่าการยับยั้ง 82.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารสกัดเมทานอลให้ค่า EC₅₀ 1.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารมาตรฐานวิตามินซีให้ค่า EC₅₀ 0.008 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร งานวิจัยนี้ยังศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดสสูงที่สุด ให้ค่าการยับยั้ง 83.43 เปอร์เซ็นต์ โดยสาร

สกัดไดคลอโรมีเทนให้ค่า IC_{50} 1.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับยาอะคาโบส ซึ่งให้ค่า IC_{50} 0.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานองค์ประกอบของสารจากบาร์บาโดสเซอร์รี โดยพบสารพฤษเคมีหลายชนิด ได้แก่ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอล แทนนิน และเทอร์พีน เป็นต้น [4] โดยสารเหล่านี้มีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์และอนุมูลอิสระได้ดี [4,7,8] แต่ยังไม่พบรายงานศักยภาพของสารสกัดจากบาร์บาโดสเซอร์รีในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสมาก่อน งานวิจัยส่วนใหญ่ศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากผลของบาร์บาโดสเซอร์รีในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและการต้านอนุมูลอิสระ [9, 10] อย่างไรก็ตาม การศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากบาร์บาโดสเซอร์รียังมีน้อย พบเพียงบางรายงาน เช่น Venugopal และคณะ [11] รายงานว่าสารสกัดเมทานอลจากผลของบาร์บาโดสเซอร์รีมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis* และ *S. salivarius* โดยสามารถยับยั้งเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ค่า IC_{50} 153.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากผลของบาร์บาโดสเซอร์รีที่สกัดด้วยน้ำในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดต้านอนุมูลอิสระได้ถึง 80.50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้การศึกษานี้ยังยืนยันว่าสารสกัดจากบาร์บาโดสเซอร์รีไม่เป็นพิษหรือก่อให้เกิดอาการแพ้ต่อเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ [12] โดยผลการศึกษาศักยภาพยับยั้งจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลของบาร์บาโดสเซอร์รีในงานวิจัยนี้ต่างจากการศึกษาที่เคยรายงานมาก่อนหน้า อาจเนื่องจากหลายปัจจัย ทั้งแหล่งของตัวอย่าง อายุ ส่วนของพืชที่ศึกษา ฤดูกาล

รวมทั้งตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด โดยปัจจัยเหล่านี้ อาจส่งผลต่อปริมาณสารพฤษเคมีและศักยภาพของสารสกัดจากพืช [13,14] ซึ่งอาจศึกษาเพิ่มเติมในส่วนอื่น ๆ ของพืช เช่น ราก ใบ ร่วมกับการศึกษาสารสกัดจากผลของบาร์บาโดสเซอร์รี และควรศึกษาชนิดและปริมาณของสารพฤษเคมีในสารสกัดหยาบเพื่อเพิ่มฐานข้อมูล ดังนั้นการศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากพืชและองค์ประกอบทางพฤษเคมีจึงมีความสำคัญ นอกจากจะช่วยให้ประโยชน์ด้านการรักษาโรคแล้ว ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชสมุนไพรชนิดนั้น ๆ ด้วย การศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากผลบาร์บาโดสเซอร์รีชี้ให้เห็นว่าสารสกัดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจและหลากหลาย ทั้งฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการศึกษาในอนาคต

4. สรุป

การศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากผลของบาร์บาโดสเซอร์รีในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และนำผลของสารสกัดที่ศักยภาพสูงที่สุดในการยับยั้งมาศึกษาการเปลี่ยนของเซลล์จุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้ง *C. albicans* ได้ดีที่สุด (MIC 8 และ MFC 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้สารสกัดอีก 2 ชนิดที่ศึกษา คือ เมทานอลและไดคลอโรมีเทนมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดี ให้ค่า EC_{50} และ IC_{50} 1.15 และ 1.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าสารสกัดจากบาร์บาโดสเซอร์รีมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายและหากมีการศึกษาเพิ่มเติมอาจสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. วชิรินทร์ รุกขไชยศิริกุล และศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้คำปรึกษาและคอยช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำวิจัย ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) ที่อำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

6. References

- [1] Khamsam, S., Nampoosak, Y., Busamaro, S. , Tangkoskul, T. , Seenama, C. , Rattanaumpawan, P., Boonyasiri, A. and Thamlikitkul, V. , 2016, Epidemiology of antibiotic use and antimicrobial resistance in selected communities in Thailand, J. Med. Assoc. Thai. 99: 270-275.
- [2] Deerochanawong, C. and Ferrario, A., 2013, Diabetes management in Thailand: A literature review of the burden, costs, and outcomes, Global Health 9: 1-18.
- [3] Dusman, E. , Ferreira, M.F.S. , Berti, A.P. , Mariucci, R. G. , Mantovani, M. S. and Vicentini, V. E. P. 2012, Investigation of cytotoxic and mutagenic effects of *Malpighia glabra* L. (barbados cherry) fruit pulp and vitamin C on plant and animal test systems, Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas. 32: 405-411.
- [4] Nascimento, E. M. M. , Rodrigues, F. F. G. , Costa, W.D., Teixeira, R.N.P., Aline, N.P.T., Erlanio, A. B. , Fabiola, O. S. , Rodrigues, F.F.G., Coutinho, H.D.M. and Costa, J.G.M., 2018, HPLC and *in vitro* evaluation of antioxidant properties of fruit from *Malpighia glabra* (Malpighiaceae) at different stages of maturation, Food. Chem. Toxicol. 119: 457-463.
- [5] Supaphon, P., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj, J., 2013, Antimicrobial potential of endophytic fungi derived from three seagrasses (*Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* and *Thalassia hemprichii*) from Thailand, PLoS ONE 8(8): e72520.
- [6] Premianu, N. and Jaynthy, C., 2014, Antioxidant activity of endophytic fungi isolated from *Lansea coromendalica*, Int. J. Res. Pharm. Sci. 5: 304-308.
- [7] Sagar, S.B., Padmavathi, A.T.V.N., Kavitha, C. and Durgarani, T.S.A.V., 2013, Estimation of physico-chemical properties, nutrient composition and antioxidant activity of Acerola *Malpighia emarginata* DC, J. Res. Angra. 41: 97-101.
- [8] Johnson, P.D., 2003, Acerola (*Malpighia glabra* L., *M. punicifolia* L., *M. emarginata* D.C.): Agriculture, production and nutrition, plants in human health and nutrition policy, World Rev. Nutr. Diet 91: 67-75.
- [9] Nunes, R.S., Kahl, V.F.S., Sarmiento, M.S., Richter, M.F., Costa-Lotufo, L.V., Rodrigues, F.A.R., Abin-Carriquiry, J.A., Martinez, M.M., Ferronato, S., Ferraz, A.B.F. and Silva, J., 2011, Antigenotoxicity and antioxidant activity of acerola fruit (*Malpighia glabra*

- L.) at two stage of ripeness, Plant Foods Hum. Nutri. 66: 129-135.
- [10] Schmourlo, G., de Moraes-Filho, Z.B., de Oliveira, D.B., Costa, S.S., Mendonça-Filho, R.R., Alviano, C.S. and Miranda, A.L.P., 2007, antioxidant and antimicrobial activity of edible plants and their potential as nutraceuticals, Acta. Hort. 765: 355-365.
- [11] Venugopal, T.M., Mallikarjun, N., Somasundar, K., Nagaraj, K. and Prabhuswamy, B., 2014, Antioxidant and antibacterial activity of methanol extract of *Malpighia glabra* against viridans group of *Streptococci* involved in dental caries, Adv. Biores. 7: 173-180.
- [12] Wang, L., Li, F., He, C., Dong, Y. and Wang, Q., 2015, Antioxidant activity and melanogenesis inhibitory effect of acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) aqueous extract and its safe use in cosmetics, Asian J. Chem. 27: 957-960.
- [13] Altemini, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watsan, D.G. and Lightfoot, D.A., 2017, Phytochemicals: Extraction, isolation and identification of bioactive compounds from plant extracts, Plants 6: 1-23.
- [14] Borges, C.V., Minatel, I.O., Gomez-Gomez, H.A., Lima, G.P.P., 2017, Medicinal Plants: Influence of Environmental Factors on the Content of Secondary Metabolites, pp. 259-277, In Ghorbanpour, M. and Varma, A. (Eds.), Medicinal Plants and Environmental Challenges, Springer, Cham.