



ปริมาณฟีนอลิกรวมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมะนาว ส้มเขียวหวาน และมะกรูด

Total Phenolic Content, Antioxidant and Antibacterial Activities of Lime, Tangerine and Kaffir Lime Peel Extracts

ชนิสรา ฤดีกุลธำรง,¹ จารุณี ควรพิบูลย์^{2*}

¹โรงเรียนสตรีวิทยา กรุงเทพมหานคร 10200

²สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก สาขาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

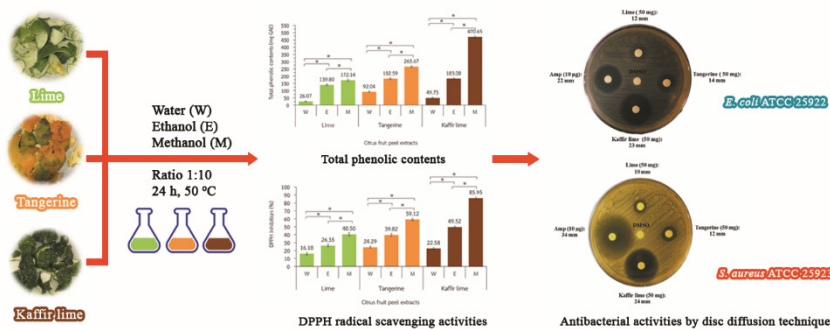
Chanisara Rudeekulthamrong,¹ Jarunee Kaulpiboon^{2*}

¹Satriwithaya School, Bangkok 10200

²Department of Preclinical Science (Biochemistry), Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120

Received 13 April 2025; Received in revised 4 June 2025; Accepted 9 June 2025

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

This research aimed to compare the total phenolic content (TPC), antioxidant activity, and antibacterial activity of crude extracts from the peels of three citrus fruits: lime, tangerine, and kaffir lime. Extraction was performed through maceration using three different solvents, distilled water, ethanol, and methanol, in a 1:10 solute-to-solvent ratio at 50°C for 24 hours.

Among the solvents tested, methanol proved to be the most effective for extracting phenolic compounds, followed by ethanol and then distilled water. The highest TPC was observed in the methanol extract of kaffir lime peel (11.76 ± 0.15 milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry weight), followed by the methanol extracts of tangerine and lime peels. Antioxidant activity, assessed via the DPPH radical scavenging assay, was highest in the methanol extracts for all citrus types and showed a positive correlation with TPC. For antibacterial activity, methanol extracts from lime, tangerine, and kaffir lime peels were tested using the agar disc diffusion method, producing inhibition zones of 12, 14, and 23 millimeters, respectively, against *Escherichia coli*, and 10, 12, and 24 millimeters, respectively, against *Staphylococcus aureus*. Further analysis of MIC and MBC values indicated that the methanol extract from kaffir lime peel exhibited superior antibacterial and bactericidal effects compared to the other citrus extracts. It also showed greater efficacy against *S. aureus* (a gram-positive bacterium) than *E. coli* (a gram-negative bacterium). HPLC analysis identified hesperidin as the main phenolic compound in the extracts.

คำสำคัญ	บทคัดย่อ
สารต้านแบคทีเรีย; สารต้านอนุมูลอิสระ; เปลือกผลไม้ตระกูลส้ม; เฮสเพอริดิน; สารประกอบฟีนอลิก Keywords Antibacterial agent; Antioxidant agent; Citrus-fruit peel; Hesperidin; Phenolic compound	งานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกรวมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมะนาว ส้มเขียวหวาน และมะกรูด จากการแช่อยู่ในน้ำกลั่น เอทานอล และเมทานอล ในอัตราส่วน 1:10 ที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในกลุ่มของตัวทำละลายพบว่าเมทานอลสกัดฟีนอลิกรวมออกมาได้มากที่สุด รองลงมาเป็นเอทานอลและน้ำกลั่น โดยเปลือกมะกรูดที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (11.76 ± 0.15 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ตามมาด้วยเปลือกส้มเขียวหวานและมะนาว การทดสอบ DPPH พบว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลไม้ทั้งสามชนิดมีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณฟีนอลิกรวม การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี Agar disc diffusion สารสกัดเมทานอลจากเปลือกมะนาว ส้มเขียวหวาน และมะกรูด วัดบริเวณยับยั้งได้ 12, 14 และ 23 มิลลิเมตรกับ <i>Escherichia coli</i> และ 10, 12 และ 24 มิลลิเมตรกับ <i>Staphylococcus aureus</i> ค่า MIC และ MBC แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกมะกรูดมีฤทธิ์ต้านและฆ่าแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกส้มเขียวหวานและมะนาว ทั้งนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการต้านและฆ่าแบคทีเรียแรมบวคดีกว่าแรมลบ เมื่อนำสารสกัดไปตรวจสอบหาชนิดของสารฟีนอลิกด้วยเครื่อง HPLC พบว่าประกอบด้วยเฮสเพอริดินเป็นหลัก

*ผู้รับผิดชอบบทความ: jkaulpiboon@yahoo.com

DOI: 10.14456/tstj.2025.45

1. บทนำ

ปัญหาด้านสาธารณสุขและภาวะสุขภาพที่สำคัญในปัจจุบัน สาเหตุหลักเกิดจากพฤติกรรมเสี่ยงในการดำเนินชีวิต เช่น การรับประทานอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ขอบรับประทานขนมที่มีการปรุงแต่งรสชาติ มีสีสังเคราะห์ น้ำตาล และไขมัน ขาดการออกกำลังกาย มีความเครียดสูงจากสภาพสังคมและสิ่งแวดล้อม อีกทั้งเมื่อเกิดการเจ็บป่วยก็มีการใช้ยาปฏิชีวนะที่เกินความจำเป็น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ล้วนทำให้เซลล์ในร่างกายมีการสร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้น จนเข้าสู่ภาวะ เครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) คือ ภาวะที่มีอนุมูลอิสระมากจนสารต้านอนุมูลอิสระมีไม่เพียงพอ และจากสาเหตุดังกล่าวส่งผลให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน และโมเลกุลขนาดเล็กอื่นๆ โดยการทำลายดังกล่าวจัดเป็นความเสียหายจากออกซิเดชัน (Oxidative damage) ซึ่งโมเลกุลเป้าหมายที่เกิด Oxidative damage จะแตกต่างกันไปขึ้นกับลักษณะของเซลล์ ชนิด และความรุนแรงของสภาวะ Oxidative stress ที่เกิดขึ้น ส่งผลให้เกิดโรคและภาวะต่างๆ เช่น โรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular diseases) โรคมะเร็ง (Cancer) โรคเบาหวาน (Diabetes) โรคทางระบบประสาท (Neurological diseases) โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน (Immune diseases) และภาวะชราภาพ (Aging process) ได้ [1] นอกจากนี้ พฤติกรรมการใช้ยาปฏิชีวนะมากเกินไปจนส่งผลกระทบให้เชื้อดื้อยา ทำให้มีผลเสียต่อชีวิตและมีการรักษาที่ยากลำบากขึ้น [2] อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยมากมายค้นคว้าหาแนวทางในการป้องกันภาวะ Oxidative stress และภาวะเชื้อดื้อยา แนวทางเลือกหนึ่งเป็นการใช้สารสกัดจากสมุนไพร ซึ่งเป็นแนวทางที่มีความปลอดภัย ไม่ก่อมลพิษ ไม่มีสารตกค้างและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยนักวิจัยหลายกลุ่ม [3, 4, 5] พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มอุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียได้ ซึ่งพืชสกุลส้ม (Citrus) นี้จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae มีต้นกำเนิดในเขตร้อนและเขตร้อนชื้น

ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่หรือไม้ยืนต้นขนาดเล็กสูง 5-15 เมตร มีหนามที่ต้น มีใบแบบสลับและเป็นไม้ไม่ผลัดใบ ออกดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อดอกขนาดเล็ก แต่ละดอกมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 เซนติเมตร มีกลีบดอกสีขาว 4-5 กลีบ และมีเกสรตัวผู้จำนวนมาก ปกติดอกมีกลิ่นหอม ผลกลมจนถึงยาว ขนาดยาว 4-30 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-20 เซนติเมตร [3] พืชสกุลนี้มีความสำคัญทางการค้า โดยหลายชนิดมีการปลูกเพื่อนำผลไปกินสดๆ หรือคั้นเป็นน้ำผลไม้ ผลมีกลิ่นหอม เนื่องจากมีสารฟลาโวนอยด์และลิโมนอยด์ในเปลือก ในส่วนน้ำมีกรดซิตริกจำนวนมากจึงทำให้มีรสเปรี้ยว และเป็นแหล่งวิตามินซีและฟลาโวนอยด์ อนุกรมวิธานของพืชในสกุลส้มนี้มีความซับซ้อนและไม่ทราบจำนวนชนิดที่แน่นอนในธรรมชาติ หลายชนิดที่รู้จักเป็นพันธุ์ผสมที่นิยมปลูกกันและมีความสำคัญทางการค้า ได้แก่ ส้มเขียว ส้มเกรฟฟรุท เลมอน มะนาว (Lime ชื่อวิทยาศาสตร์ *Citrus aurantifolia* swing.) ส้มเขียวหวาน (Tangerine ชื่อวิทยาศาสตร์ *Citrus reticulata* blanco) และมะกรูด (Kaffir lime ชื่อวิทยาศาสตร์ *Citrus hystrix* DC.) เป็นต้น จากข้อมูลงานวิจัย [6,7,8,9,10] พบว่า พืชสกุลนี้อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิกโดยเฉพาะกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนแอโรมาติก (Aromatic ring) ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) รวมอยู่ในโมเลกุล สามารถละลายในน้ำได้บ้างบางส่วนหรือละลายน้ำได้ไม่ดื่ก ตัวอย่างสารฟลาโวนอยด์ที่พบมากในผลไม้ตระกูลส้ม เช่น เฮสเพอริดิน (Hesperidin) เฮสเพอริติน (Hesperitin) นารินจิน (Naringin) และรูติน (Rutin) ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เฮสเพอริดิน (Hesperidin) และเฮสเพอริติน (Hesperitin) ช่วยป้องกันผนังหลอดเลือดจากการอักเสบภายในหลอดเลือด และช่วยสร้างความแข็งแรงให้คอลลาเจนบริเวณเนื้อเยื่ออ่อน เส้นเอ็น และกระดูก มีส่วนช่วยส่งเสริมการไหลเวียนของเลือดไปยังอวัยวะทั่วร่างกาย ช่วยรักษาเส้นเลือดฝอยที่เปราะแตกง่าย

เช่น อาการฟกช้ำ เส้นเลือดขอบบริเวณขา และริดสีดวงทวาร อีกทั้งยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านแบคทีเรีย และยังมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสด้วย [9]

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าเปลือกของพืชตระกูลส้มต่างสายพันธุ์ เช่น Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.), Lemon (*Citrus limon* (L.) Osbeck.), Grape fruit (*Citrus paradise* Macfad.), Sweet lime (*Citrus limetta* Risso), Fruiter shikri malta (Local names) และ Chinese citrus [3, 4] มีการรายงานถึงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียมาบ้าง แต่ก็มีวิธีการในการสกัดสารสำคัญที่หลากหลายและแตกต่างกันออกไป ดังนั้น งานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มที่นิยมบริโภคในครัวเรือนไทย ได้แก่ มะนาว (*C. aurantifolia*) ส้มเขียวหวาน (*C. reticulata*) และมะกรูด (*C. hystrix*) ซึ่งทำการสกัดสารสำคัญด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ชนิด พร้อมทั้งประเมินความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่พบกับประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและแบคทีเรีย โดยความรู้ที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา เช่น การผลิตเปลือกผลไม้อบแห้งเพื่อสุขภาพ หรือการแยกสารสำคัญในสารสกัดหยาบเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) 99% เมทานอล (Methanol) 99% เอทานอล (Ethanol) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) โฟลิน-ซีโอเคาทุล (Folin-Ciocalteu reagent) ดีพีพีเอช

(DPPH) แอมพิซิลิน (Ampicilin) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide หรือ DMSO) ซื้อจากบริษัท Sigma (USA) เปปโตน (peptone) จากบริษัท Nihon Pharmaceutical Co., Ltd. โซเดียมคลอไรด์จากบริษัท J.T. Baker (Selangor darul ehsan, Malaysia) ยีสต์สกัด (Yeast extract) และ Mannitol salt agar จากบริษัท Difco (Bacton dickinson and company, USA) และสารเคมีอื่นๆ เกรดงานวิเคราะห์ (Analytical grade)

2.2 การเตรียมสารสกัด

นำตัวอย่างเปลือกผลไม้ ได้แก่ มะนาว ส้มเขียวหวาน และมะกรูด ที่ได้มาจากตลาดสี่มุมเมืองเป็นผลผลิตของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนหนองสามวัง จังหวัดปทุมธานี (ปิ่นโตเกษตรอินทรีย์ เลขที่ 48/2 หมู่ที่ 3 ตำบลหนองสามวัง อำเภอนองเสือ จังหวัดปทุมธานี 12170) เตรียมโดยล้างเปลือกตัวอย่างให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หั่นด้วยมีดเพื่อลดขนาดตัวอย่างนำไปอบให้แห้งในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักเปลือกผลไม้อบแห้งทั้ง 3 ชนิด จำนวน 40 กรัมใส่ภาชนะสีชา หรือมีอะลูมิเนียมฟอยล์ปิด จากนั้นเติมตัวทำละลายกึ่งมีขั้ว (Semipolar solvent) ได้แก่ เมทิลแอลกอฮอล์ (เมทานอล; CH_3OH) และเอทิลแอลกอฮอล์ (เอทานอล; $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) และตัวทำละลายมีขั้ว (Polar solvent) ได้แก่ น้ำกลั่น (H_2O) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของเปลือกต่อตัวทำละลาย 1:10 กรัม/มิลลิลิตร) จากนั้นแช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลารองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) กับสารสกัดเมทานอลและเอทานอล ส่วนสารสกัดจากน้ำใช้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying)

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content - TPC)

ดูดสารสกัดจากเปลือกมะนาว ส้มเขียวหวาน และมะกรูดที่ละลายด้วย 99% เมทานอลความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นเติมสารละลาย 0.2 โมลาร์ Folin-ciocalteu reagent 1 มิลลิลิตร ลงไปผสมทิ้งไว้ 5 นาที เติมสารละลาย 7.5 % (w/v) Sodium carbonate (Na_2CO_3) ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง หาค่า OD_{725} เฉลี่ย บันทึกผลโดยนำค่า OD_{725} เฉลี่ยที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Gallic acid บันทึกค่า Total phenolic content ที่ได้จากกราฟซึ่งมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเปลือกสารตัวอย่าง (Milligrams gallic acid equivalent (GAE)/g

dry weight (DW) of the sample peels) สำหรับหลอด Blank ใส่ 99% เมทานอล 150 ไมโครลิตรผสมกับ Folin-ciocalteu reagent 1 มิลลิลิตร และ Na_2CO_3 1 มิลลิลิตร [11]

2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay [12]

ดูดสารสกัดจากเปลือกมะนาว ส้มเขียวหวาน และมะกรูดความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติมสารละลาย 6×10^{-5} โมลาร์ DPPH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดควบคุม (Control) และหลอดทดสอบที่มีสารสกัด ผสมให้เข้ากัน และบ่มทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง หาค่า OD_{520} เฉลี่ย และบันทึกผล คำนวณหาค่า % Inhibition จากค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงของสารสกัด ตามสมการ (2-1)

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{OD control} - \text{OD sample})}{\text{OD control}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (2-1)$$

กำหนดให้ OD control = ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมที่มีแต่อนุมูลอิสระ DPPH อย่างเดียว

OD sample = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH

2.5 การศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

2.5.1 ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย: แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ATCC 25922 และแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MSSA, Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*) ซึ่งพบเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal flora) บริเวณกระเพาะอาหาร-ลำไส้ และบริเวณผิวหนัง ตามลำดับ

2.5.2 การทดสอบการแพร่ (Agar disc diffusion technique) [13]

การทดสอบนี้ใช้หลักการแพร่ โดยเติมสารสกัดจากเปลือกมะนาว ส้มเขียวหวาน และมะกรูด ปริมาณ 50 มิลลิกรัมละลายใน 10% DMSO และหยดลงบนกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Filter paper disc) ซึ่งวางบนผิวหน้าวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ใช้ในการตรวจสอบไว้ โดยอัตราการแพร่ของสารออกฤทธิ์ผ่านไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส ซึ่งจะบอกถึงความสามารถของสารที่นำมาทดสอบว่าสามารถ

ยับยั้งเชื้อได้มากน้อยเพียงใด ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียวัดได้จากขนาดของโซนใสโดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสจะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration หรือ MIC) โดยในการทดลองนี้ใช้ Ampicillin (10 ไมโครกรัม ต่อแผ่นดิสก์, Wider-spectrum penicillinase-susceptible drug) [14, 15] เป็นสารเปรียบเทียบกับกลุ่ม Positive control และใช้ 10% DMSO เป็นสารเปรียบเทียบกับกลุ่ม Negative control

2.5.3 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC) โดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (Broth dilution method) [9, 13, 15, 16]

การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ขั้นแรกเตรียมสารทดสอบที่มีความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-bertani broth (LB) ที่มีสารละลาย 10% DMSO 1 มิลลิตรในหลอดทดลอง จากนั้นเตรียมสารทดสอบที่มีความเข้มข้นต่างๆ โดยการเตรียมสารทดสอบแบบเจือจางต่อเนื่อง 2 เท่า (Serial two-fold dilution) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีสารละลาย 10% DMSO กำหนดให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารทดสอบที่ใช้เป็น 100.00, 50.00, 25.00, 12.50, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเติม 10 ไมโครลิตรของเชื้อแบคทีเรียที่มีจำนวนโคโลนีเท่ากับ 10^5 - 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ($OD_{600} = 0.1$) ลงไป แล้วทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำหลอดทดลองแต่ละหลอดไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (หากไม่มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่เกิดความขุ่นและค่าการดูดกลืนแสงจะไม่เพิ่มขึ้น) โดยค่าความเข้มข้นของสารทดสอบในหลอดทดลองที่มีความเข้มข้น

น้อยที่สุดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียถือเป็นค่า MIC และกำหนดให้ Ampicillin ความเข้มข้นช่วง 0.5-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารเปรียบเทียบกับกลุ่ม Positive control และใช้ 10% DMSO ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเป็นสารเปรียบเทียบกับกลุ่ม Negative control ในการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

2.5.4 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถฆ่าแบคทีเรียทั้งหมด (Minimal bactericidal concentration (MBC) โดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (Broth dilution method) [9, 13, 15, 16]

ทำการทดสอบต่อจากการทดสอบ MIC (ข้อ 2.5.3) โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 100 ไมโครลิตรจากทุกหลอดทดลองที่ไม่เกิดความขุ่น (ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย) มาทำการเขย่ากระจายลงบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้ออีกครั้ง โดยหลอดทดลองที่มีความเข้มข้นของสารน้อยที่สุดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อจะถือเป็นค่า MBC กำหนดให้ Ampicillin ความเข้มข้นช่วง 0.5-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารเปรียบเทียบกับกลุ่ม Positive control และ 10% DMSO เป็นสารเปรียบเทียบกับกลุ่ม Negative control ในการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถฆ่าแบคทีเรียทั้งหมด

2.6 การตรวจวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วยเครื่อง HPLC

สารสกัดของเปลือกผลไม้ที่มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด และมีฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุด จะถูกนำมาตรวจสอบหาสารสำคัญด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent technologies 1260) โดยฉีดสารสกัด 25 ไมโครลิตร ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ SphereClone™ C₁₈ Column (เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 x 250 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร) (Phenomenex, USA) ตรวจวัดสารสำคัญด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้ Acetonitrile: water (20:80, ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็น Mobile phase ในการชะสารสกัด

ที่อัตราการชะ 0.5 มิลลิเมตรต่อนาที ที่ 40 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบชนิดสารสำคัญที่ได้กับสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐานที่พบได้ในเปลือกผลไม้ของพืชตระกูลส้ม [9]

2.7 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

การทดลองต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้ จะทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่า $\text{mean} \pm \text{SD}$ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ โดยใช้โปรแกรม *t*-test (GraphPad software) กำหนดให้ $P < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม

3. ผลการศึกษาและวิจารณ์

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content - TPC)

ผลจากการนำเปลือกมะนาว ส้มเขียวหวาน และ มะกรูด แช่ด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน 3 ชนิดในอัตราส่วนของตัวถูกละลายกับตัวทำละลายเท่ากับ 1:10 (40 กรัมต่อ 400 มิลลิเมตร) พบว่า ตัวทำละลายที่เหมาะสมซึ่งตัดสินจากปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมดสูงสุดเรียงตามลำดับประสิทธิภาพจากมากไปน้อย (Figure 1) ได้เป็น 99% เมทานอล 99% เอทานอล และน้ำกลั่น ตามลำดับ โดยสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย 99% เมทานอลจากเปลือกมะกรูด ส้มเขียวหวาน และ มะนาว มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 11.76 ± 0.15 , 6.64 ± 0.11 และ 4.30 ± 0.15 มิลลิกรัม สมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ [17] จากการทดสอบการสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่าได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกัน รวมถึงลักษณะของสารสกัดที่ได้มีสีและรูปแบบผงแห้งที่ต่างกัน ตามรายงานของ Saleem, M. et al. [3] ได้ทดสอบการใช้สารสกัด 3 ชนิด ได้แก่ 80% เอทานอล อะซีโตน และ 99% เมทานอล เพื่อสกัดผลไม้ตระกูลส้ม (Lemon, Grapefruit, Mousami,

Fruiter และ Shikri malta) พบว่าการสกัดด้วย 80% เอทานอล ได้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาเป็นอะซีโตน และ 99% เมทานอล ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทดลองที่แตกต่างจากการศึกษาอื่น ที่พบว่า 99% เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสารจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มของไทย และเมื่อวิเคราะห์ค่าความมีขั้วของสาร (Polarity) ซึ่งพิจารณาจากค่าคงที่ไดอิเล็กตริก (Dielectric material) และ โครงสร้างทางเคมี (Chemical structure) เรียงลำดับความมีขั้วจากมากไปน้อยได้เป็น $\text{Water (H}_2\text{O)} > \text{Methanol (CH}_3\text{OH)} > \text{Ethanol (C}_2\text{H}_5\text{OH)}$ [18] จะเห็นว่าความมีขั้วของเมทานอลจะอยู่ตรงกลางจึงสามารถสกัดสารสำคัญจากเปลือกผลไม้ได้ทั้งกลุ่มที่มีขั้วและไม่มีขั้วในขอบเขตที่กว้างกว่าการใช้ น้ำและเอทานอล เป็นตัวทำละลาย

3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

เมื่อนำสารสกัดความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิเมตรที่ได้จากตัวทำละลายทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าสารสกัดทุกตัวอย่างมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเปลือกผลไม้ตระกูลส้มทั้ง 3 ชนิด เมื่อใช้ตัวทำละลาย 99% เมทานอลในการสกัด พบว่าสารสกัดจากเปลือกมะกรูด ($85.95 \pm 1.23\%$) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาเป็น

ส้มเขียวหวาน ($59.12 \pm 1.38\%$) และมะนาว ($40.50 \pm 1.92\%$) ตามลำดับ (Figure 2) จากผลการทดลอง พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารฟีนอลิกรวมที่สกัดได้ ยังมีสารฟีนอลิกรวมมากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระก็จะมากตามไปด้วย

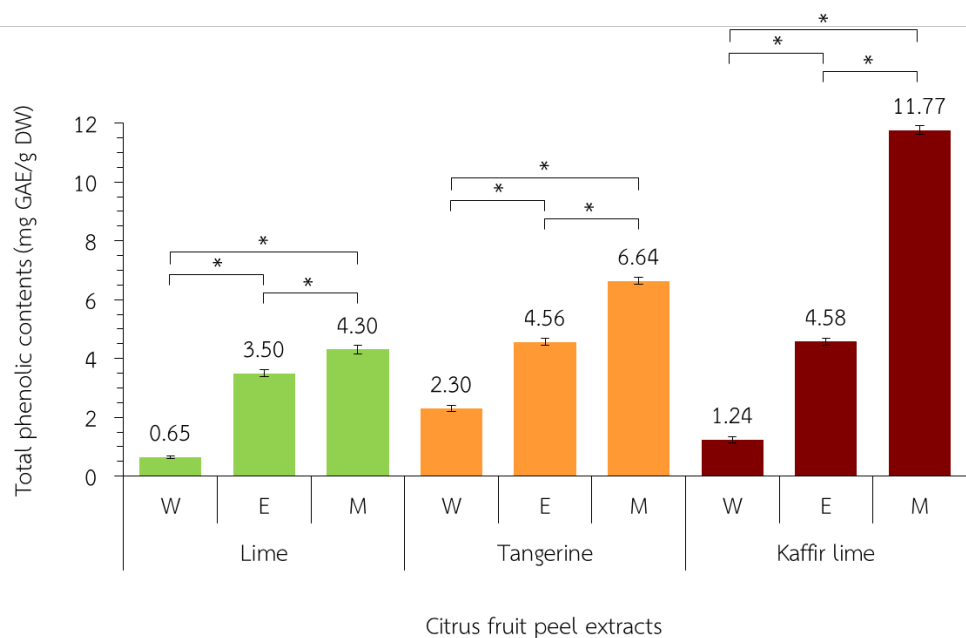


Figure 1 Total phenolic contents (TPC) presented in different extracts of different fruit peels. The data are expressed as the mean $\pm$ SD, $n \geq 3$. * $p < 0.05$ indicates significant differences among the three extracts. W, E, and M stand for water, 99% ethanol, and 99% methanol, respectively.

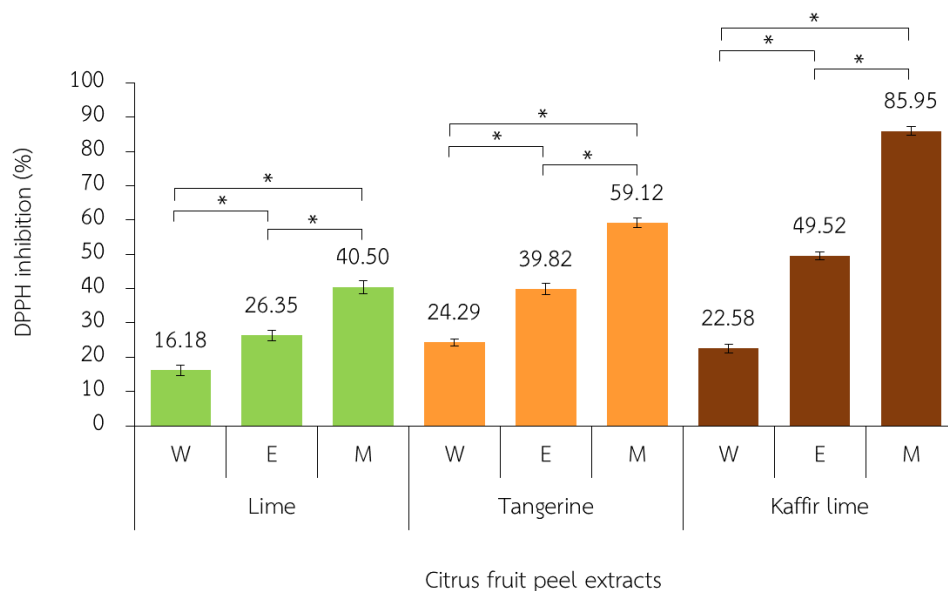


Figure 2 DPPH radical scavenging activities of different extracts of lime, tangerine and kaffir lime at concentration of 0.5 mg/mL. The data are expressed as the mean $\pm$ SD, $n \geq 3$. * $P < 0.05$ indicates significant differences among the three extracts. W, E, and M stand for water, 99% ethanol, and 99% methanol, respectively.

3.3 การศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion technique ของสารสกัดจากเปลือกผลไม้ทั้ง 3 ชนิด ผู้วิจัยได้เลือกเปรียบเทียบผลของสารสกัดที่ได้จากการใช้ 99% เมทานอลเป็นตัวทำละลาย โดยพบว่าที่ปริมาณสารสกัด 50 มิลลิกรัมที่ละลายด้วย 10% DMSO สารสกัดจากเปลือกมะนาว ส้มเขียวหวาน และมะกรูดให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli* ATCC 25922) เป็น 12, 14 และ 23 มิลลิเมตร (Figure 3A) ในขณะที่ขนาดของพื้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) วัดได้ 10, 12 และ 24 มิลลิเมตร (Figure 3B) ตามลำดับ จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดเมทานอลจากเปลือกมะกรูดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมลบและบวกได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับผลของสารสกัดจากมะนาวและส้ม อย่างไรก็ตามพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในขณะที่ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Amp, 10 ไมโครกรัม ต่อแผ่นดิสก์) แสดงผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสารละลาย 10% Dimethyl sulfoxide (10% DMSO) พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมลบและบวกได้ [9] และจากข้อมูลใน Table 1 and Table 2 ค่า MIC และ MBC ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion technique โดยค่าต่ำสุดของ MIC และ MBC ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกมะกรูดต่อ *E. coli* คือ 6.25 และ 25.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน *S. aureus* ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกมะกรูดเท่ากับ 3.13 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าอัตราส่วนระหว่าง MBC ต่อ MIC ของการยับยั้ง *E. coli* และ *S. aureus* ให้ค่า Ratio ≤ 4 [14] ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารสกัดเมทานอลจากเปลือกมะกรูดเป็นสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยตรง (Bactericidal) และมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. aureus* โดยลักษณะการออกฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอลจากเปลือกผลไม้ทั้ง 3 ชนิด น่าจะเป็นผลมาจากคุณสมบัติของ

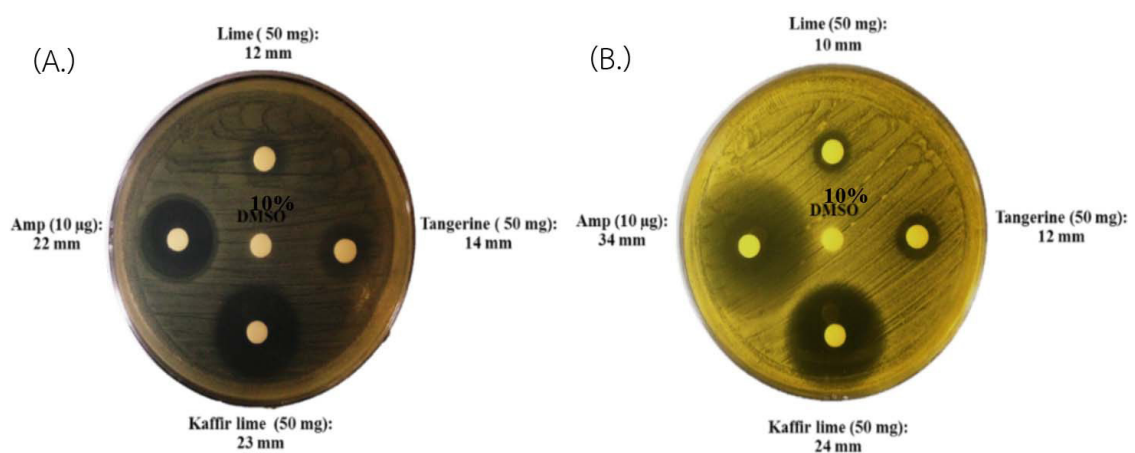


Figure 3 The inhibition zone of different extracts from lime, tangerine, and kaffir lime against (A.) *E. coli* ATCC 25922 (B.) *S. aureus* ATCC 25923

Table 1 Minimal inhibitory concentration (MIC) of citrus fruit peel methanolic extracts

Microorganisms	MIC values ^a			
	Ampicillin (mg/mL)	Lime (mg/mL)	Tangerine (mg/mL)	Kaffir lime (mg/mL)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10.00 ± 0	25.00 ± 0	25.00 ± 0	6.25 ± 0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2.50 ± 0	12.50 ± 0	6.25 ± 0	3.13 ± 0

^a All data are shown as mean ± SD derived from triplicate experiments.

Table 2 Minimal bactericidal concentration (MBC) of citrus fruit peel methanolic extracts

Microorganisms	MBC values ^a			
	Ampicillin (mg/mL)	Lime (mg/mL)	Tangerine (mg/mL)	Kaffir lime (mg/mL)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10.00 ± 0	100.00 ± 0	50.00 ± 0	25.00 ± 0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2.50 ± 0	25.00 ± 0	12.50 ± 0	6.25 ± 0

^a All data are shown as mean ± SD derived from triplicate experiments.

สาร Polyphenols ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดสามารถรบกวนหรือยับยั้งการสังเคราะห์เพปติโดไกลแคนในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย การจำลองดีเอ็นเอ หรือการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เช่น เอนไซม์ Proteinase หรืออาจไปลดความรุนแรงของเชื้อ (Bacterial virulence) เช่น ไปยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (Anti-biofilm activity) เป็นต้น [19]

3.4 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ที่สำคัญด้วยวิธี HPLC

จากการนำสารสกัดเมทานอลของเปลือกมะกรูดซึ่งมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงสุดและแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุด มาวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกหลักด้วยเทคนิค HPLC โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานภายใต้สภาวะที่กำหนด ดังแสดงใน Figure 4 พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีสารเฮสเพอริดิน ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม

ฟลาโวนอน (Flavanones) เป็นองค์ประกอบหลัก โดยสารนี้เป็นสารที่พบได้ทั่วไปในเปลือกของผลไม้ตระกูลส้ม [3] และมีค่าเวลาออกจากคอลัมน์ (Retention time, RT) ที่ไม่แตกต่างกับค่า RT ของสารมาตรฐานเฮสเพอริดินที่ 19.87 นาที สำหรับสารสกัดเมทานอลจากเปลือกมะนาวและส้มเขียวหวาน พบพีคของสารเฮสเพอริดินเช่นเดียวกัน แต่มีปริมาณของสารเฮสเพอริดินต่ำกว่า (ข้อมูลไม่แสดง)

4. สรุปผลการศึกษา

จากผลการวิจัย พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม ได้แก่ มะนาว (*C. aurantifolia*) ส้มเขียวหวาน (*C. reticulata*) และมะกรูด (*C. hystrix*) มีสารที่มีคุณสมบัติเป็นพฤษเคมี (Phytochemical) ในการ

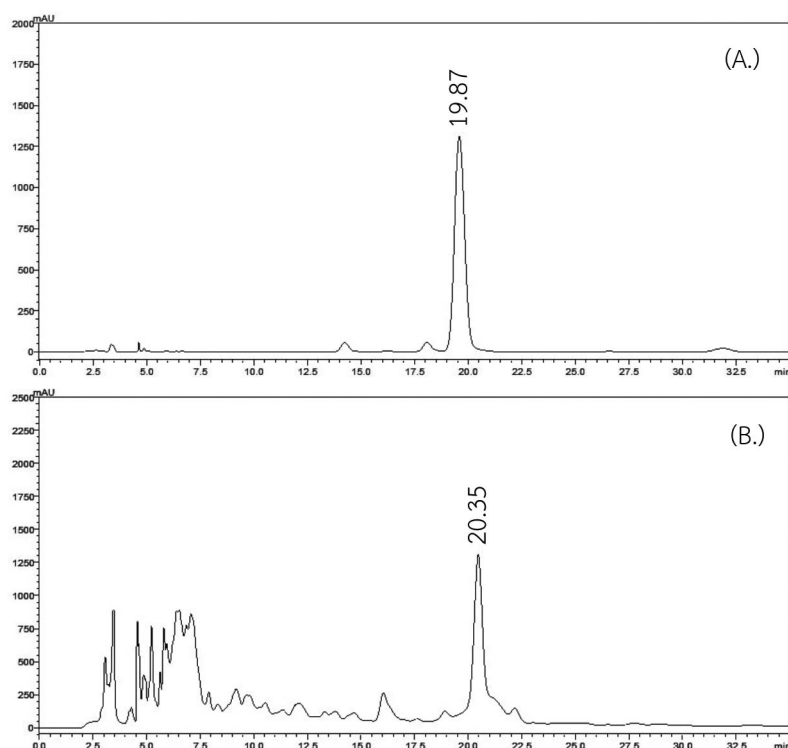


Figure 4 HPLC chromatogram of (A.) hesperidin standard and (B.) methanolic extract of kaffir lime peels

ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรีย สำหรับวิธีการสกัดที่ดีที่สุดในการทดลองครั้งนี้ คือการสกัดด้วยเมทานอลที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงซึ่งให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงสุด และสารที่สกัดด้วยเมทานอลยังออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียได้ดีที่สุดจากการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay วิธี Agar disc diffusion technique และการประเมินค่า MIC และ MBC และยังพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มมีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยตรง โดยสารสำคัญในมะกรูดกลุ่มหลักจะเป็นสารกลุ่มเฮสเพอริดินที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ เช่น ช่วยลดน้ำตาลในเลือดผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Anti-cancer

activity) ฤทธิ์ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardioprotective activity) ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลชนิดเลว (LDL) และเพิ่มคอเลสเตอรอลชนิดดี (HDL) ฤทธิ์ปกป้องระบบประสาท (Neuroprotective activity) และฤทธิ์ป้องกันการเกิดเส้นเลือดอุดตัน (Venotonic activity) ดังนั้น เฮสเพอริดินจึงเป็นสารที่ได้รับความสนใจในทางการแพทย์และโภชนาการ โดยมีการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและยาที่เกี่ยวข้องกับโรคเรื้อรังหลายชนิด [9]

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะแพทยศาสตรมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่อง HPLC และวิทยาลัยแพทย์พระมงกุฎเกล้า สำหรับการอนุเคราะห์ชุดสกัดสารและสารเคมีสำหรับการวิจัย ซึ่งช่วยให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D. and Bitto, A., 2017, Oxidative stress: harms and benefits for human health, *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017: 8416763.
- [2] Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stepień-Pysniak, D., Wieczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A. and Osek, J., 2022, Antibiotic resistance in bacteria-A review, *Antibiotics (Basel)*. 11(8): 1079.
- [3] Saleem, M., Durani, A. I., Asari, A., Ahmed, M., Ahmad, M., Yousaf, N. and Muddassar, M., 2023, Investigation of antioxidant and antibacterial effects of citrus fruits peels extracts using different extracting agents: Phytochemical analysis with in silico studies, *Heliyon*. 9: e15433.
- [4] Chen, Y., Pan, H., Hao, S., Pan, D., Wang, G. and Yu, W., 2021, Evaluation of phenolic composition and antioxidant properties of different varieties of Chinese citrus, *Food Chem.* 364: 130413.
- [5] Butkhup, L., 2011, Dietary polyphenols and their biological effects, *J. Sci. Technol. MSU*. 31(4): 443-455.
- [6] Kometani, T., Nishimura, T., Nakae, T., Takii, H. and Okada, S., 1996, Synthesis of neohesperidin glycosides and naringin glycosides by cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60(4): 645-649.
- [7] Kometani, T., Terada, Y., Nishimura, T., Takii, H. and Okada, S., 1994, Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from a *Bacillus* species and transglucosylation at alkaline pHs, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58(3): 517-520.
- [8] Kometani, T., Terada, Y., Nishimura, T., Takii, H. and Okada, S., 1994, Transglucosylation to hesperidin by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* species in alkaline pH and properties of hesperidin glycosides, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58(11): 1990-1994.
- [9] Chaisin, T., Rudeekulthamrong, P. and Kaulpi boon, J., 2021, Enzymatic synthesis, structural analysis, and evaluation of antibacterial activity and α glucosidase inhibition of hesperidin glycosides, *Catalysts*. 11(5): 532.
- [10] Ganeshpurkar, A. and Saluja, A. K., 2017, The pharmacological potential of rutin, *Saudi. Pharm. J.* 25(2): 149-164.
- [11] Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M., 1999, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.* 299: 152-178.
- [12] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C., 1995, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Sci. Technol.* 28(1): 25-30.

- [13] CLSI, 2017, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 27th Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Supplement M100. Wayne, PA, Available Source: https://goums.ac.ir/files/deputy_treat/md_labs_ef39a/files/M100-S27_CLSI_2017.pdf, April 13, 2024.
- [14] Kim, H. J., Lee, M. S., Jeong, S. K. and Lee, S. J., 2023, Transcriptomic analysis of the antimicrobial activity of prodigiosin against *Cutibacterium acnes*, Sci. Rep. 13(1): 17412.
- [15] Awwad, A. M., Salem, N. M. and Abdeen, A. O., 2013, Green synthesis of silver nanoparticles using carob leaf extract and its antibacterial activity, Int. J. Integr. Care. 4: 29-34.
- [16] Tapouk, F. A., Nabizadeh, R., Mirzaei, N., Jazani, N. H., Yousefi, M. and Hasanloei, M. V., 2020, Comparative efficacy of hospital disinfectants against nosocomial infection pathogens, Antimicrob. Resist. Infect. Control. 9: 115.
- [17] Yan, S. W. and Asmah, R., 2010, Comparison of total phenolic contents and antioxidant activities of turmeric leaf, pandan leaf and torch ginger flower, Int. Food Res. J. 17: 417-423.
- [18] Kovács, Á., Vancsik, A., Pászti, Z. and Kiss, Á., 2010, Dielectric constant and solvent polarity of water-alcohol mixtures: Dielectric spectroscopy and thermodynamic analysis, J. Solut. Chem. 39(5): 734-748.
- [19] Ivanov, M., Novović, K., Malešević, M., Dinić, M., Stojković, D., Jovčić, B. and Soković, M., 2022, Polyphenols as inhibitors of antibiotic resistant bacteria-mechanisms underlying rutin interference with bacterial virulence, Pharmaceuticals (Basel). 15(3): 385.