



องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบพลู (*Piper betle* L.) ตกเกรด Chemical Composition and Bioactivities of Low-Grade Betel (*Piper betle* L.) Leaf Extracts

พนัธฐดา มาช่วย¹, กุสุมาลย์ น้อยผา², อมรรัตน์ ถนนแก้ว³, วิไลลักษณ์ กล่อมพงษ์^{3*}

¹หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมดิจิทัล มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

²หลักสูตรการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์สุขภาพและการกีฬา มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

³หลักสูตรวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตรและชีวภาพ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

Panatda Machau¹, Kusumarn Noipha², Amonrat Thanonkaew³, Vilailak Klompong^{3*}

¹Biotechnology Program, Faculty of Science and Digital Innovation, Thaksin University, Phatthalung 93210

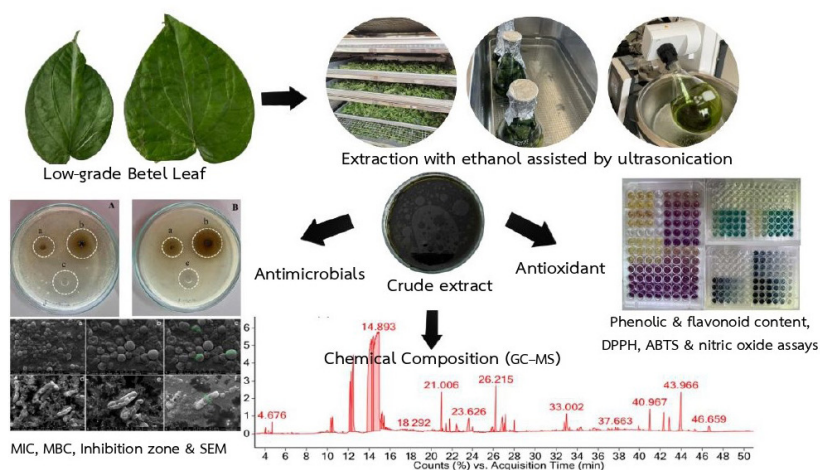
²Thai Traditional Medicine Program, Faculty of Health and Sports Sciences, Thaksin University, Phatthalung 93210

³Food Science and Technology Program, Faculty of Agro and Bio Industry, Thaksin University, Phatthalung 93210

Received 26 December 2025; Received in revised 13 February 2026; Accepted 20 February 2026

GRAPHICAL ABSTRACT

ABSTRACT



Betel leaf (*Piper betle* L.) is an important economic crop in Phatthalung Province, Thailand. After grading for export, more than one ton of low-grade betel leaves is discarded daily. This study aimed to extract bioactive compounds, analyze the chemical composition, and evaluate the biological activities of low-grade betel leaf extract. The extraction was carried out using 95% ethanol assisted by ultrasonication. The chemical composition of the extract was analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Antioxidant and antimicrobial

activities were also determined. The chromatogram revealed ten major compounds, with phytol, neophytadiene, and tolycaine as the predominant components, while phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-, eugenol and ergost-5-en-3-ol were identified as minor constituents. The extract exhibited a total phenolic content of 559.66 mg GAE/g and a total flavonoid content of 48.36 mg QE/g. The result showed antioxidant activity against both DPPH ($IC_{50}=35.53 \mu\text{g/mL}$) and ABTS ($IC_{50}=95.63 \mu\text{g/mL}$), and also inhibited nitric oxide production ($IC_{50}=1,075.75 \mu\text{g/mL}$), indicating anti-inflammatory potential. The extract also exhibited antimicrobial activity, inhibiting and killing *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Additionally, scanning electron microscopy confirmed cell wall and membrane disruption in bacterial cells. These findings suggest that low-grade betel leaf extract possesses antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities, highlighting its potential as a valuable raw material for the future development of health and cosmeceutical products, and its ability to add value to waste generated from export grading.

คำสำคัญ	บทคัดย่อ
ใบพลู; ตกเถร; GC-MS; สารประกอบฟีนอลิก; ต้านอนุมูลอิสระ;ฤทธิ์ต้านจุลชีพ Keywords Low-grade; Betel leaf; GC-MS; Phenolic compounds; Antioxidant; Antimicrobial activity	พลู (<i>Piper betle</i> L.) เป็นพืชเศรษฐกิจของจังหวัดพัทลุง หลังการคัดเกรดเพื่อส่งออกทำให้มีใบพลุดกเกรดเหลือทิ้งกว่า 1 ตันต่อวัน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสารสำคัญ วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบพลุดกเกรด โดยใช้วิธีการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS) พบสารสำคัญทั้งหมด 10 ชนิด โดยมี Phytol, Neophytadiene และ Tolucaene เป็นองค์ประกอบหลัก และพบ Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-, Eugenol, และ Ergost-5-en-3-ol เป็นองค์ประกอบรอง สารสกัดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 559.66 mg GAE/g และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 48.36 mg QE/g มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC_{50} = 35.53 μg/mL) และ ABTS (IC_{50} = 95.63 μg/mL) และมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (IC_{50} = 1,075.75 μg/mL) ซึ่งสัมพันธ์กับการอักเสบ เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> และ <i>Escherichia coli</i> ได้ ผลการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดยืนยันถึงความเสียหายของผนังและเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้นสารสกัดใบพลุดกเกรดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพ และต้านการอักเสบ ซึ่งอาจมีศักยภาพในการเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตภัณฑ์สุขภาพและเวชสำอางในอนาคต และช่วยเพิ่มมูลค่าให้วัสดุเศษเหลือจากการคัดเกรดเพื่อการส่งออก

*ผู้รับผิดชอบบทความ: vilailak@tsu.ac.th

DOI: 10.14456/tstj.2026.19

1. บทนำ

พลูเป็นพืชสมุนไพรยืนต้นในวงศ์ Piperaceae ลักษณะเป็นใบเดี่ยว รูปหัวใจ สีเขียวสด มีรสขชาติร้อน และเผ็ด มีกลิ่นเฉพาะตัว มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย มีความสำคัญในวัฒนธรรมและการแพทย์พื้นบ้านของหลายประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในประเทศไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ รวมถึงอินเดีย และประเทศอื่นๆ ในแอฟริกาตะวันออก [1] พลูมีสรรพคุณในการรักษาโรค เช่น แก้โรคผิวหนัง แก้ลมพิษ และแผลอักเสบ [2] เนื่องจากใบพลูมีสารสำคัญหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ และน้ำมันหอมระเหย โดยเฉพาะ Eugenol, Chavibetol และ Hydroxychavicol ซึ่งมีรายงานว่าใบพลูมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่โดดเด่น [3] และหลากหลาย ได้แก่ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และป้องกันมะเร็ง [4,5,6] ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงศักยภาพของใบพลูในการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพและเภสัชภัณฑ์

ในกระบวนการคัดเกรดใบพลูเพื่อการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ มีใบพลูบางส่วนตกเกรด ไม่ผ่านมาตรฐานการส่งออก เช่น มีตำหนิ หรือรูปร่างไม่สมมาตร ส่งผลให้มีใบพลูในตำบลรุ่มเมือง จังหวัดพัทลุง เหลือทิ้งมากถึง 1 ตันต่อวัน ซึ่งใบพลูตกเกรดอาจยังคงมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและมีศักยภาพในการใช้เป็น

วัตถุดิบทางธรรมชาติในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ แต่ปัจจุบันยังมีข้อมูลจำกัดเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของใบพลูตกเกรด

ดังนั้น การศึกษารังนี้จึงมุ่งสกัดสารสำคัญ วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบพลูตกเกรด เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ตลอดจนการพัฒนาสู่ผลิตภัณฑ์สุขภาพในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

คัดใบพลูสด (*Piper betle* L. สายพันธุ์พื้นเมือง) ซึ่งอยู่ในระยะที่สามารถเก็บเกี่ยวได้ (อายุประมาณ 8-12 เดือนหลังปลูก) ใบอยู่ในระยะแก่ปานกลางถึงแก่ โดยสุ่มเก็บจากหลายต้นภายในแปลงเดียวกัน คัดใบพลูตกเกรดที่มีลักษณะผิดปกติ ไม่ได้ขนาด ฉีกขาด และมีรู (Figure 1) จากสวนปลูกในตำบลรุ่มเมือง จังหวัดพัทลุง จากนั้นนำใบพลูมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำไหลเพื่อลดสิ่งสกปรก และสิ่งปนเปื้อนทันทีที่มาถึงห้องปฏิบัติการ แล้วหั่นใบพลูตามขวางให้มีขนาดประมาณ 2 เซนติเมตร นำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำตัวอย่างไปใช้ในขั้นตอนการสกัดต่อไป



Figure 1 Characteristics of low-grade betel leaves with deformity (A), tear, perforation (B), and undersize (C).

2.2 การสกัด

นำตัวอย่างใบพลูอบแห้งจำนวน 20 g (คำนวณจากน้ำหนักแห้ง) มาสกัดโดยวิธีการหมักแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 โดยบรรจุลงขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติมเอทานอล ปริมาตร 600 mL (อัตราส่วน 1:30 w/v) ให้ท่วมตัวอย่างใบพลู และช่วยการสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic bath; Bandelin sonorex digitec, รุ่น DT 510H, 35 kHz, 16 W) ระยะเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับการใช้เอทานอลร้อยละ 95 ด้วยวิธี Maceration เพียงอย่างเดียว หลังจากนั้นกรองแยกกากออกโดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum filter) นำกากใบพลูมาสกัดซ้ำด้วยเอทานอลตามวิธีข้างต้นอีก 2 ครั้ง ตัดแปลงจาก Thongsom et al. [7] นำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอาสารละลายออก ด้วยเครื่อง Vacuum rotary evaporator โดยใช้อุณหภูมิ 40°C ที่ความดัน 200 มิลลิบาร์ ได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) นำสารสกัดที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษาในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนนำไปวัดค่าสีในระบบ CIE L* a* b* ด้วย Color meter (Konica Minolta CR-400) และคำนวณปริมาณผลผลิตของสารสกัดที่ได้ (% yield) จากสมการ

$$\text{ผลผลิต (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบ}}{\text{น้ำหนักของแห้งของพืช}} \times 100$$

2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบพลูตกเกรดที่สกัดด้วยเอทานอลร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง โดยใช้ Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) (GC: Agilent Technologies 7890A; MS: Agilent Technologies G1888, U.S.A) คอลัมน์ชนิด Rtx-5MS capillary column (Restek, USA, 30 m, 0.25 mm, fused silica 0.25 µm) โดยฉีดสารสกัดใบพลูเข้มข้น 100 mg/mL ปริมาตร 1 µL โดยอุณหภูมิที่ฉีดสารตัวอย่าง 150°C ใช้แก๊สฮีเลียม

เป็นตัวพาที่อัตราการไหล 20 mL/min ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิของเครื่องแบบลำดับส่วน เริ่มจาก 50°C เป็นเวลา 2 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 290°C ด้วยอัตรา 3°C/min เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นนำสเปกตรัมที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับ Mass spectra index ของ Mass spectral libraries (NIST Libraries, 2008)

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบพลูตกเกรดที่สกัดด้วยเอทานอลร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu [8] โดยเตรียมสารมาตรฐาน Gallic acid ที่ระดับความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 µg/mL ในน้ำกลั่น และเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.0625 µg/mL นำสารละลายตัวอย่าง 50 µL ผสมกับ 10% Folin-Ciocalteu reagent (เจือจางด้วยน้ำ) ปริมาตร 50 µL เติมน้ำ NaOH 0.35 M ปริมาตร 100 µL ใน 96 well plate ตั้งไว้นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm เปรียบเทียบกับแบล็ค วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด โดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐาน ซึ่งเตรียมจากสารละลาย Gallic acid ในหน่วยมิลลิกรัม สมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง (mg GAE/g)

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด [9] ของสารสกัดใบพลูตกเกรดที่สกัดด้วยเอทานอลร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง โดยเตรียมสารมาตรฐาน Quercetin ที่ระดับความเข้มข้น 1.562, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ µg/mL ในเอทานอล เตรียม Flavonoid test โดยเติม 10% อะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl₃) 2 mL เติมน้ำ 1M โพแทสเซียมอะซิเตท 2 mL ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้ได้ 50 mL จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง ได้ส่วนใส ใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่าง 100 µL ใส่ใน 96 Well plate เติมน้ำ

Flavonoid test 100 μL ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที ในที่มืด วัดค่าดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 415 nm เทียบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดกับสารมาตรฐานเคอควิทิน (Quercetin; QE) แสดงในหน่วยมิลลิกรัมเคอควิทินต่อกรัมตัวอย่าง (mg QE/g)

2.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.5 mM ในเอทานอล ปิเปตสารสกัดใบพลูดอกเกรดที่สกัดด้วยเอทานอลร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง หรือสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 μL ผสมให้เข้ากันกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 μL ใส่ใน 96-Well plate ทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน [10] คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสมการด้านล่าง และแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะเป็นค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

$$\% \text{ inhibition of DPPH} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{(A_{\text{control}})} \times 100$$

2.7 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS

$\text{ABTS}^{+\cdot}$, 2, 2'-azinobis (3-Ethylbenzo thiazoline-6-Sulfonic acid) Radical เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm เตรียมสารละลาย ABTS โดยชั่งสาร ABTS 0.0036 g ละลายในน้ำกลั่น 1 mL ผสมสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 0.00067 g แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการทดสอบสารตัวอย่าง โดยผสมสารละลายตัวอย่าง 50 μL กับสารละลาย ABTS ปริมาตร 100 μL ใน 96 Well plate ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm [11] โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน คำนวณเปอร์เซ็นต์

การยับยั้งจากสมการด้านล่าง และแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะเป็นค่า IC_{50}

$$\% \text{ inhibition of ABTS} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{(A_{\text{control}})} \times 100$$

2.8 การทดสอบไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; NO)

วิเคราะห์ปริมาณไนตริกออกไซด์ ด้วยวิธี Griess reaction [12] เตรียมสารมาตรฐานกรดกลูติก ที่ความเข้มข้น 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ในน้ำกลั่น เตรียม Sodium nitroprusside (SNP) ที่ความเข้มข้น 5 mM ละลายใน Phosphate-buffered saline ปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน 100 μL ลงใน 96-Well plate จากนั้นเติมสารละลาย SNP (5 mM) ปริมาตร 25 μL และบ่มภายใต้แสงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม Griess reagent ปริมาตร 100 μL และบ่มในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วย Microplate reader โดยใช้กรดกลูติกเป็นสารมาตรฐาน เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ถูกคำนวณตามสมการด้านล่าง และแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ในค่า IC_{50}

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

2.9 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

2.9.1 Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

วิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดใบพลูดอกเกรดที่สกัดด้วยเอทานอลร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง โดยเติม Mueller Hinton broth ลงใน 96 Well plate ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 90 μL เติมสารสกัดใบพลูหรือสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 90 μL และ

เติม *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ที่ผ่านการปรับจำนวน (5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิเมตร) ด้วย McFarland 0.5 ปริมาตร 90 μ L หลังจากนั้นบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่า MIC ได้จากความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารที่ใช้ทดสอบที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ แสดงจากความใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวิเคราะห์ ค่า MBC ของสารสกัดใบพลูต่อเชื้อแบคทีเรีย โดยนำตัวอย่างจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกตัวอย่าง ไป Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton agar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยค่า MBC แปลผลจากความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดใบพลูที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.9.2 การวัดโซนการยับยั้ง

วัดโซนการยับยั้งของสารสกัดใบพลูตกเกรดที่สกัดด้วยเอทานอลร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงต่อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Agar well diffusion ปิเปิดเชื้อก่อโรค *S. aureus* และ *E. coli* ที่ผ่านการปรับจำนวน (5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิเมตร) ด้วย McFarland 0.5 ปริมาตร 0.1 mL ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Agar (MHA) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 20 mL ที่อุณหภูมิ 50°C ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นทิ้งไว้ให้แข็งตัวเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm บนพื้นผิวของจานด้วย Sterile cork borer หยดสารสกัดใบพลู ปริมาตร 5 μ L ที่ความเข้มข้น 15 และ 30 mg/mL ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สารสกัดใบพลูแพร่กระจายเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวก (เพนิซิลลิน 2.5 mg/mL) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งในหน่วยมิลลิเมตร

2.9.3 การวิเคราะห์การทำลายเซลล์แบคทีเรียโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ปรับจำนวนแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* (1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิเมตร) ด้วย McFarland 0.5

จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3000 $\times$ g ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Mikro 200, Hettich Zentrifugen, Germany) เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นกำจัดส่วนใส เติมน้ำสารสกัดใบพลูเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 1 mL ลงในตะกอนแบคทีเรีย ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง บั่นเหวี่ยงเซลล์แขวนลอยในสารสกัดใบพลู ตามที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ กำจัดส่วนใส เติมน้ำละลาย NaCl 0.85% ปริมาตร 1 mL ลงในตะกอนเพื่อล้างเซลล์ ผสมและบั่นเหวี่ยงภายใต้สภาวะเดียวกัน เซลล์ที่ผ่านการล้างถูกตรึงด้วยกลูตาไรต์ไฮดรเจน คลือบด้วยทองคำ และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (Quanta400, FEI, Czech Republic)

2.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n = 3$) การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ดำเนินการโดยใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) เวอร์ชัน 23.0 (IBM, Armonk, NY, USA) ทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมแบบ Post hoc ด้วยการทดสอบ Duncan's test เพื่อระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. ผลการวิจัย

3.1 ปริมาณผลผลิตและลักษณะของสารสกัด

จากการสกัดใบพลูตกเกรดด้วยเทคนิคอัลตราโซนิก โดยใช้เอทานอลร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับการใช้เอทานอลร้อยละ 95 ด้วยวิธี Maceration เพียงอย่างเดียว พบว่าสารสกัดที่ใช้เทคนิคอัลตราโซนิกร่วมด้วยมีค่าร้อยละผลผลิตสูงกว่าสารสกัดที่ไม่ใช้เทคนิคอัลตราโซนิก (Table 1) อย่างไรก็ตามค่าดังกล่าวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยสารสกัดที่ใช้เทคนิคอัลตราโซนิกร่วมด้วยมีลักษณะแตกต่างจากสารสกัดที่ไม่ใช้เทคนิคอัลตรา

โซนิค คือมีน้ำมันใบพลูผสมอยู่ด้วย (Figure 2) ทั้งนี้ สารสกัดทั้งสองมีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว เหนียว มีกลิ่นเฉพาะของใบพลู และมีสีเขียวเข้มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามค่า L^* a^* และ b^* ของสารสกัดใบพลูมีค่าความสว่าง ค่าความเป็นสีเขียว และค่าความเป็นสีเหลืองน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับใบพลูสด

3.2 สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบพลูตกเกรดที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลร่วมกับเทคนิคอัลตราโซนิคเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยเอทานอลโดยไม่ใช้เทคนิคอัลตราโซนิค พบว่า วิธีการสกัดมีผล

Table 1 Extraction yield, physical characteristics and color of low-grade betel leaf extracted by maceration with and without ultrasonication compared with fresh leaf

Betel leaf		Extraction yield (%)	Physical characteristics	Color values		
				L^*	a^*	b^*
Extract	with ultrasonic	15.44±0.57 ^{ns}	Semi-solid, oily, sticky, dark green	2.31±0.04 ^{ns}	-0.15±0.05 ^{ns}	-1.08±0.09 ^{ns}
	without ultrasonic	14.82±0.82	Semi-solid, sticky, dark green	2.27±0.05	-0.20±0.06	-1.18±0.10
Fresh leaf [13]		-	Green leaf	28.55±1.30	-6.25±0.49	10.16±1.39

Mean±SD from triplicate determinations. ^{ns} Lowercase superscripts in the same column indicate non significant difference between the extracts by maceration with and without ultrasonication ($p>0.05$). L^* , a^* , and b^* represent color parameters in the CIE color space

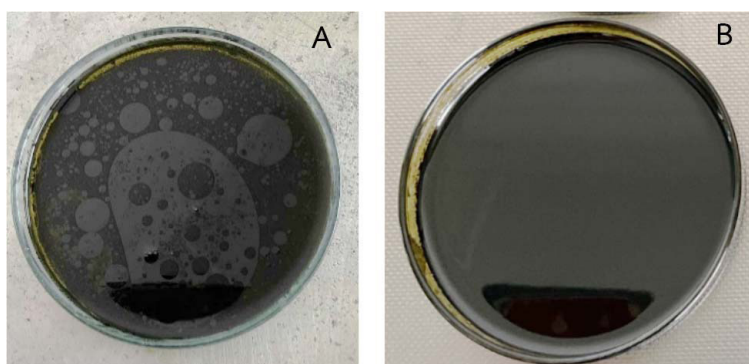


Figure 2 Low-grade betel leaf extract by maceration with ultrasonication (A) and without ultrasonication (B).

ต่อปริมาณสารออกฤทธิ์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2) โดยสารสกัดที่ใช้อัลตราโซนิกให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดที่ไม่ใช้เทคนิคอัลตราโซนิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดที่ใช้อัลตราโซนิกมีค่า IC_{50} จากการทดสอบ DPPH, ABTS และ ไนตริกออกไซด์ต่ำกว่าสารสกัดที่ไม่ใช้อัลตราโซนิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิก สารสกัดใบพลุดกเกรดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ที่พบว่าสารสกัดใบพลุดกเกรดมีฤทธิ์น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรดแกลลิก ($p < 0.05$)

ดังนั้น การสกัดด้วยเอทานอลร่วมกับอัลตราโซนิกจึงถูกเลือกเป็นวิธีการสกัดที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป เนื่องจากมีปริมาณสารสำคัญและแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าที่ไม่ใช้เทคนิคอัลตราโซนิกอย่างมีนัยสำคัญ

3.3 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบพลุดกเกรด

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วย GC-MS ของสารสกัดใบพลุดกเกรดที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลร่วมกับเทคนิคอัลตราโซนิก พบสารที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดใบพลุดกเกรดทั้งหมดจำนวน 10 ชนิด โดยเรียงลำดับตามเวลาที่สารถูกชะออกจากคอลัมน์ (Retention time) แสดงดังโครมาโทแกรม (Figure 3) ซึ่งพบ Phytol (100%) ในปริมาณสูงที่สุด รองลงมา คือ Neophytadiene (64.86%), Tolycaine (31.42%), Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)- (14.96%), Eugenol (13.77%), Ergost-5-en-3-ol (10.36%), 3,7,11,15-Tetramethylhexadec-2-en-1-yl acetate (7.35%), 1H-Inden-5-ol, 2,3-dihydro (6.85%), 9,12,15-octadecatrienoic acid (Z,Z,Z)- (4.51%) และ Vitamin E (3.16%) ตามลำดับ (Table 3)

Table 2 Total phenolic and flavonoid contents and scavenging activities of low-grade betel leaf extracts by ethanol maceration with and without ultrasonication against DPPH, ABTS and nitric oxide

Ingredient, Activities/ Extract	Active ingredients		Scavenging activities		
	Phenolic content (mg GAE/g)	Flavonoid content (mg QE/g)	IC_{50} (μ g/mL)		
			DPPH	ABTS	Nitric Oxide
with ultrasonic	559.66 $\pm$ 1.87 ^a	48.36 $\pm$ 0.35 ^a	35.53 $\pm$ 0.06 ^b	95.63 $\pm$ 0.37 ^b	1,075.75 $\pm$ 7.86 ^b
without ultrasonic	338.40 $\pm$ 4.99 ^b	30.44 $\pm$ 0.96 ^b	37.97 $\pm$ 0.59 ^a	234.03 $\pm$ 3.07 ^a	1,910.80 $\pm$ 32.96 ^a
Ascorbic/Gallic acid	-	-	14.78 $\pm$ 0.03 ^c	32.64 $\pm$ 0.05 ^c	1,031.84 $\pm$ 9.90 ^c

Mean $\pm$ SD from triplicate determinations. ^{abc} Different lowercase superscripts in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$). Scavenging activities of the extract were compared with ascorbic acid for DPPH and ABTS and compared with gallic acid for nitric oxide.

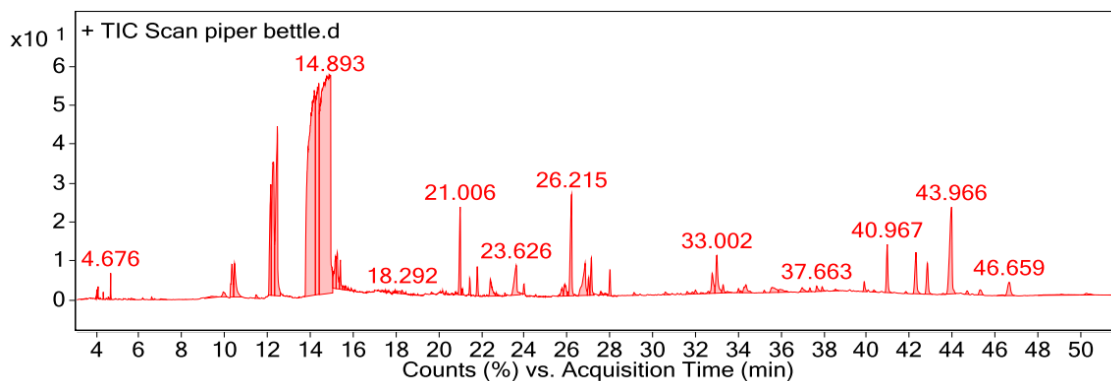


Figure 3 GC-MS chromatogram of low-grade betel leaf extract by ethanol maceration assisted by ultrasonication.

Table 3 Chemical composition of the low-grade betel leaf extract by ethanol maceration with ultrasonication detected by gas chromatography-mass spectrometry

Number	Compounds	Chemical formula	Reaction time (min)	% Area
1	1H-Inden-5-ol, 2,3-dihydro	$C_9H_{10}O$	12.157	6.85
2	Eugenol	$C_{10}H_{12}O_2$	12.284	13.77
3	Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-	$C_{10}H_{12}O_2$	12.462	14.96
4	Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	14.188	64.86
5	Tolycaine	$C_{15}H_{22}N_2O_3$	14.398	31.42
6	Phytol	$C_{20}H_{40}O$	14.893	100
7	9,12,15-octadecatrienoic acid (Z,Z,Z)-	$C_{18}H_{30}O_2$	21.006	4.51
8	3,7,11,15-Tetramethylhexadec-2-en-1-yl acetate	$C_{22}H_{42}O_2$	26.215	7.35
9	Vitamin E	$C_{29}H_{50}O$	40.967	3.16
10	Ergost-5-en-3-ol (3.beta.)-	$C_{28}H_{48}O$	43.966	10.36

3.4ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดใบพลูตกเกรดที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลร่วมกับเทคนิคอัลตราโซนิกต่อ *S. aureus* และ *E. coli* พบว่า *S. aureus* ถูกยับยั้งได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 mg/mL และสามารถฆ่าได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 mg/mL ขณะที่ *E. coli* ต้องใช้ความเข้มข้นสูงกว่าที่ระดับ 0.5 mg/mL สำหรับการยับยั้ง และ 1 mg/mL สำหรับการฆ่าเชื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *S. aureus* มีความไวต่อสารสกัดใบพลูมากกว่า *E. coli* (Table 4) ส่วนผลการวัดโซนการยับยั้งด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด โดยขนาดของโซนการยับยั้งเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น (Figure 4) แสดงให้เห็นว่าสามารถยับยั้งได้เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ทั้งนี้ขนาดโซนการยับยั้งของ *S. aureus* ทั้งสองระดับความเข้มข้นมีขนาดกว้างกว่าของ *E. coli* (Table 4) ซึ่งสอดคล้องกับค่า MIC และ MBC ที่แสดงให้เห็นว่า *S. aureus* มีความไวต่อสารสกัดใบพลูมากกว่า *E. coli* อย่างไรก็ตามสารสกัดใบพลูมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* และ *E. coli* ต่ำกว่ายาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน ยิ่งไปกว่านั้นผลการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ยังพบว่าเซลล์แบคทีเรีย

ที่สัมผัสสารสกัดใบพลูตกเกรดมีผนังเซลล์เสียหายและเซลล์ยุบตัว มีการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ การแบ่งเซลล์ผิดปกติ และผิวเซลล์ขรุขระไม่เรียบ (Figure 5) ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ปกติ [14]

4. วิจารณ์

สารสกัดใบพลูตกเกรดที่ได้จากการสกัดด้วยเทคนิคอัลตราโซนิก โดยใช้เอทานอลร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย มีค่าร้อยละผลผลิตค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดแบบแช่ (Maceration) หรือการสกัดแบบ Soxhlet ที่มีรายงานว่าให้ผลผลิตประมาณร้อยละ 5-10 เมื่อใช้เอทานอลความเข้มข้นใกล้เคียงกัน [15,16,17] แสดงให้เห็นว่าการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายผนังเซลล์พืช ส่งผลให้สารสำคัญและน้ำมันถูกปลดปล่อยออกมาได้มากขึ้น ในขณะที่ค่าสีของสารสกัดมีค่าความสว่าง (L^*) ความเป็นสีเขียว ($-a^*$) และสีเหลือง (b^*) น้อยกว่าวัตถุดิบใบพลูสด แสดงให้เห็นว่ากระบวนการสกัดส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีและลักษณะทางกายภาพ เนื่องจากการบวนการสกัดมีการใช้เอทานอลร่วมกับการก่อให้เกิดแรงเฉือนจากคลื่นอัลตราโซนิก แรงดันและอุณหภูมิที่เกิดขึ้นในระหว่างการสกัด ซึ่งอาจทำให้เกิดการสลายตัว

Table 4 Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and inhibition zones of low-grade betel leaf extracts against *S. aureus* and *E. coli*

Antibacterial activities			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
MIC (mg/mL)			0.25	0.5
MBC (mg/mL)			0.5	1.0
Inhibition zone (mm)*	Extract (mg/mL)	15	20.5±0.50 ^b	15.5±0.50 ^b
		30	27.0±0.50 ^a	26.0±0.50 ^a
	Penicillin (mg/mL)	2.5	26.5±0.50	19.5±0.50

*Mean±SD from triplicate determinations. ^{ab} Different lowercase superscripts in the same column between extract concentrations indicate a significant difference ($p < 0.05$).

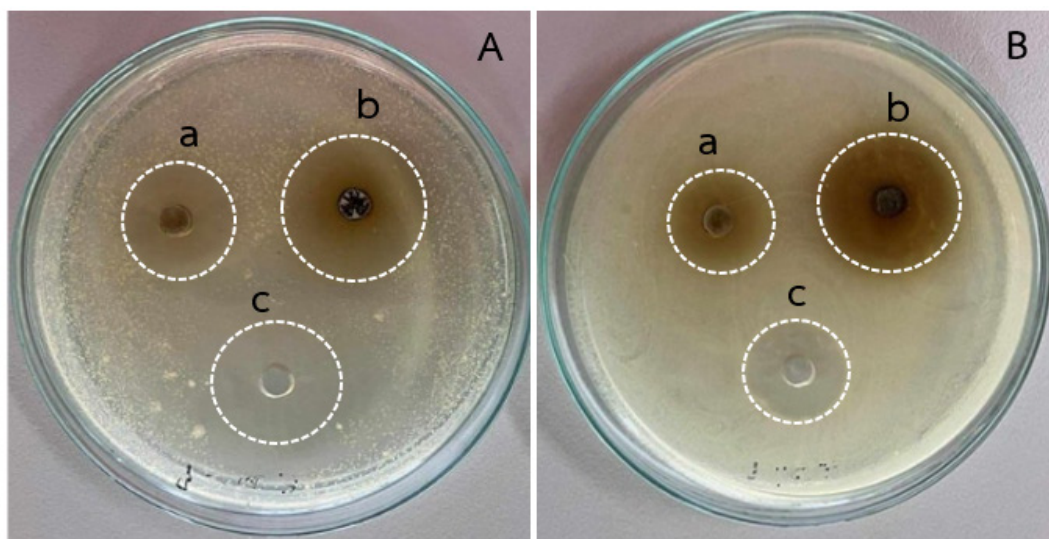


Figure 4 Inhibition zone of low-grade betel leaf extracts against *S. aureus* (A) and *E. coli* (B) at the concentration of 15 (a) and 30 mg/mL (b), compared with Penicillin at 2.5 mg/mL (c).

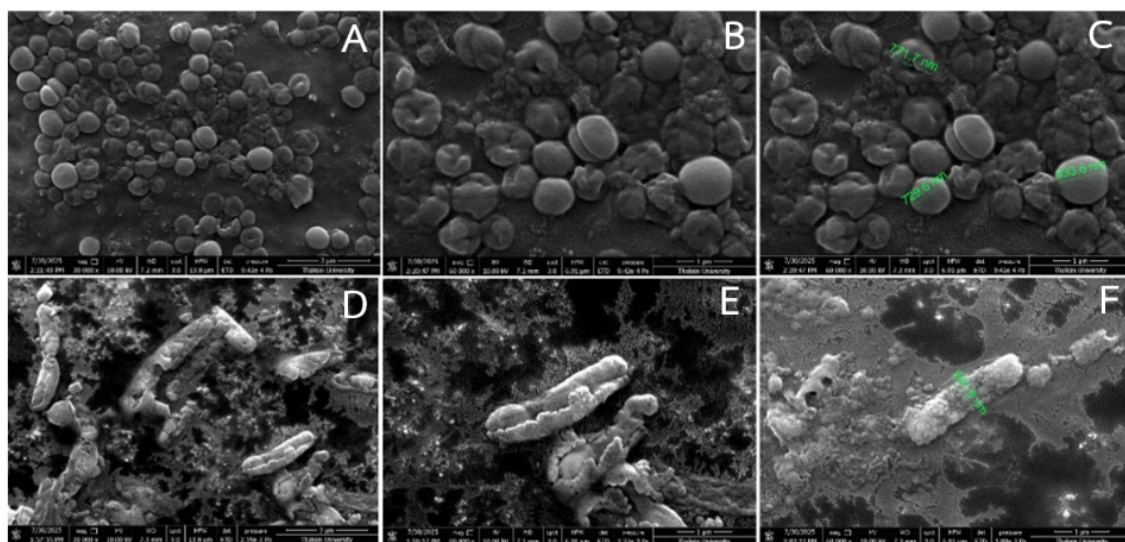


Figure 5 Scanning electron micrographs (SEM) showing the antibacterial effects of low-grade betel leaf extract against *S. aureus* at 3,000x (A) and 6,000x (B–C) and *E. coli* at 3,000x (D) and 6,000x (E–F) magnifications.

บางส่วนของรงควัตถุ รวมทั้งความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและการมีน้ำมันหอมระเหยภายในสารสกัด สารสกัดที่ได้มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหนียว สีเขียวเข้ม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา [18] ซึ่งพบว่า สารสกัดใบพลูมีสีเข้มและกลิ่นจำเพาะจากน้ำมันหอมระเหยและสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในใบ ค่าความสว่าง (L^*) ของสารสกัดมีค่าต่ำมาก ในขณะที่ค่า a^* และค่า b^* ตีลบ แสดงให้เห็นว่าสีของสารสกัดมีโทนสีเขียวอมฟ้า ซึ่งสอดคล้องกับการสังเกตลักษณะทางกายภาพที่พบ อันเนื่องมาจากการคงเหลือของคลอโรฟิลล์และสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดในสารสกัด [19]

สารสำคัญที่ตรวจพบในสารสกัดประกอบด้วย กลุ่มสารฟีนอลิก เทอร์พีนอยด์ กรดไขมัน และวิตามินหลายชนิด โดยในกลุ่มฟีนอลิกพบ Eugenol และ 2-methoxy-4-(1-propenyl)-phenol ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพสำคัญที่มีรายงานว่ามียฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และด้านจุลินทรีย์ อีกทั้งยังเป็นสารสำคัญที่พบได้ทั่วไปในใบพลู สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ [20] นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ ได้แก่ Neophytadiene และ Phytol ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัด โดยเฉพาะ Phytol มีรายงานว่ามียฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบอย่างชัดเจน รวมถึงมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด [21] สอดคล้องกับผลการทดลองซึ่งตรวจพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ส่วน 9,12,15-octadecatrienoic acid (Linolenic acid) ที่ตรวจพบเป็นกรดไขมันจำเป็นที่มีรายงานว่ามียฤทธิ์ด้านการอักเสบและช่วยเสริมความแข็งแรงของผิวหนัง ในขณะที่ Vitamin E (α -tocopherol) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายในไขมัน ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ และ Ergost-5-en-3-ol ซึ่งเป็น Sterol derivative ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์และมีรายงานว่ามียฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ [22]

สารสกัดใบพลูตกเกรดที่ผ่านการสกัดด้วยเอทานอลร่วมกับอัลตราโซนิกมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดใบพลูจากงานวิจัยที่รายงานว่ามีปริมาณฟีนอลิกอยู่ในช่วง 300-450 mg GAE/g และฟลาโวนอยด์อยู่ในช่วง 20-35 mg QE/g โดยขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ [23,24] แสดงถึงศักยภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ผลการทดสอบบ่งชี้ว่าสารสกัดใบพลูตกเกรดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา [19,25] ผลการทดสอบการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์โดยวิธี Griess reaction พบว่าสารสกัดใบพลูมีศักยภาพในการยับยั้ง NO ได้ ซึ่งสัมพันธ์กับการมีสารประกอบฟีนอลิกที่สามารถยับยั้งการสร้าง NO ผ่านการลดการเกิดไนไตรต์ [26,27]

สารสกัดใบพลูตกเกรดสามารถยับยั้งการเจริญของ *S.aureus* และ *E.coli* ได้ โดยพบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ความแตกต่างดังกล่าวสามารถอธิบายได้จากโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่า มีพอริน (Porins) ที่ช่วยจำกัดการผ่านของสารเข้าสู่เซลล์ และแกรมลบยังมีเยื่อหุ้มชั้นนอกรอบผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยลิโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) ซึ่งจำกัดการแพร่ผ่านของสารออกฤทธิ์จากภายนอก ส่งผลให้สารสกัดจากพืชเข้าสู่เซลล์ได้ยากกว่า ในขณะที่ชั้นเพปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ของแกรมบวกมีประสิทธิภาพต่ำในการเลือกผ่านสารเข้าสู่เซลล์ จึงมีความไวต่อสารสกัดจากพืชมากกว่า [28] โดยผลการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเซลล์ของ *S. aureus* และ *E. coli* ที่ผ่านการสัมผัสสารสกัดใบพลูตกเกรดมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาอย่างชัดเจน มีลักษณะผิดปกติ ได้แก่ การรั่วไหลของสารภายในเซลล์ (Cytoplasmic leakage) การแบ่งเซลล์ผิดปกติ และผิวเซลล์ขรุขระไม่เรียบ สภาพเหล่านี้สะท้อนให้เห็นว่าสารสกัดใบพลูตกเกรดส่งผลต่อความสมบูรณ์ของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโดยตรง [29] สาร

ประกอบพินอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในสารสกัดสมุนไพรมีรายงานว่าสามารถจับกับโปรตีนและไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โครงสร้างสูญเสียความเสถียรและเกิดการรั่วไหลของสารชีวโมเลกุลภายในออกสู่ภายนอก [30,31] การสังเกตที่พบว่าผิวเซลล์ไม่เรียบและมีการยุบตัวอาจเกิดจากความเสียหายต่อการสร้างเปปไทโดไกลแคนใน *S. aureus* (แกรมบวก) หรือการรบกวนเยื่อหุ้มชั้นนอกของ *E. coli* (แกรมลบ) ซึ่งทำให้กระบวนการแบ่งเซลล์ผิดปกติ ทั้งนี้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าพืชที่มีสารออกฤทธิ์กลุ่มโพลีฟีนอลสามารถก่อให้เกิดการหดตัวของเซลล์ การแตกตัว และการตายของแบคทีเรีย [18,22] นอกจากนี้สารออกฤทธิ์จากพืชยังสามารถกระตุ้นการเกิดความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) และการสร้างอนุมูลอิสระ (ROS) ซึ่งไปทำลายไขมัน โปรตีน และสารพันธุกรรม ส่งผลให้ผิวเซลล์หยابกร้านและโครงสร้างโดยรวมเสื่อมสภาพ [32] ดังนั้นกลไกการยับยั้งของสารสกัดใบพลูตกเกรดอาจเกิดผลจากหลายกลไกร่วมกัน ทั้งการรบกวนเยื่อหุ้ม การยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ และการเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายจาก ROS ซึ่งทั้งหมดสอดคล้องกับผลการทดสอบค่า MIC และ MBC รวมทั้งการวัดโซนยับยั้งที่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

5. สรุป

สารสกัดใบพลูตกเกรดประกอบด้วยสารสำคัญกลุ่มพินอลิก เทอร์พีนอยด์ กรดไขมัน และวิตามิน โดยมี Phytol, Neophytadiene และ Tolycaine เป็นองค์ประกอบหลัก และ Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-, Eugenol, และ Ergost-5-en-3-ol เป็นองค์ประกอบรอง สารสกัดมีปริมาณสารประกอบพินอลิกและฟลาโวนอยด์สูง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ จึงควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการลดหรือดื้อใช้สารกันเสียในผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดใบพลูตกเกรดเพื่อลดการใช้สารเคมีในผลิตภัณฑ์และสร้างมูลค่าให้กับวัตถุดิบ ดังนั้น

สารสกัดใบพลูตกเกรดอาจเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติที่มีศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดสู่ผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพและเวชสำอาง นำไปสู่การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลืออย่างเต็มศักยภาพ

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ขอขอบพระคุณ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมดิจิทัล หลักสูตรวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตรและชีวภาพ หลักสูตรการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาการสุขภาพและการกีฬา มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่การทำวิจัย เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

7. References

- [1] Umar, A., Imam, G., Amina, M. and Sadiya, A., 2018, Antibacterial activity of methanolic extract of *Piper betle* against selected bacterial strains, J. Med. Plants Res. 12(3): 56-62.
- [2] Rugthaworn, P., Innok, P. and Wanachantararak, P., 2010, Antimicrobial activity of *Piper betle* Linn. extracts against pathogenic bacteria, Thai J. Pharm. Sci. 34(2): 71-78.
- [3] Gogoi, R., Loying, R. and Sarma, D., 2014, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper betle* L., Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 6(5): 199-202.
- [4] Arambewela, L.S.R., Arawwawala, L.D.A.M. and Ratnasooriya, W.D., 2005, Antidiabetic activities of *Piper betle* leaves, J. Ethnopharmacol. 102(2): 239-245.
- [5] Gong, Y., Lin, Z., Zhang, L., Qin, X., Liu, X. and Zhang, L., 2012, Bioactive compounds from *Piper betle* L. and their

- pharmacological activities, *Fitoterapia*. 83(2): 250-257.
- [6] Pradhan, D., Suri, K.A., Pradhan, D.K. and Biswasroy, P., 2013, Golden heart of the nature: *Piper betle* L., *J. Pharmacogn. Phytochem.* 1(6): 147-167.
- [7] Thongsom, S., Noipha, K., Thanonkaew, A. and Klompong, V., 2024, Quality and antibacterial activity of paper soap containing essential oil from Wan Sao Long (*Amomum biflorum* Jack), *Thammasat J. Sci. Technol.* 32(2): 42-54. (in Thai)
- [8] Gong, Y., Liu, X., He, W., Xu, H., Yuan, F. and Gao, Y., 2012, Investigation on the antioxidant activity and chemical composition of *Piper betle* extracts, *J. Med. Plants Res.* 6(31): 4759-4765.
- [9] Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W., 1999, Determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chem.* 64(4): 555-559.
- [10] 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.
- [11] Arnao, M.B., 2001, Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case, *Trends Food Sci. Technol.* 11(11): 419-421.
- [12] Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R., 1982, Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.* 126(1): 131-138.
- [13] Thanonkaew, A., Thongruang, W., Kampean, M., Juntachote, T., Panomjan, N. and Klompong, V., 2025, Product development of crispy betel (*Piper betle* L.) leaf for health and its chemical constituents, *The Proceeding of the 27th Food Innovation Asia Conference 2025*, pp. 467-474.
- [14] Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P. and Cullen, P.J., 2009, Application of SEM for evaluating bacterial cell morphology after exposure to plant antimicrobials, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10(3): 363-368.
- [15] Kai, K., Somwong, P. and Siripongvutikorn, S., 2020, Extraction efficiency and phytochemical properties of *Piper betle* leaves using ethanol extraction, *J. Food Sci. Agric. Technol.* 7(1): 45-52.
- [16] Chavan, P.S., Shamprasad, B.R. and Pawar, K.D., 2018, Phytochemical extraction of *Piper betle* leaves using soxhlet method and evaluation of antioxidant activity, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 51(2): 98-103.
- [17] Pradhan, D., Suri, K. and Pradhan, D.K., 2013, Phytochemical and antimicrobial activity of *Piper betle* leaf extract obtained through Soxhlet extraction, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 6(3): 34-38.
- [18] Gong, A.D., Li, H.P., Yuan, Q.S., Song, X.S., Yao, W., He, W.J. and Liao, Y.C., 2012, Antifungal activity of essential oils and

- their major components against *Alternaria alternata*, J. Appl. Microbiol. 113(3): 541-548.
- [19] Umar, M.I., Asmawi, M.Z., Sadikun, A., Majid, A.M.S.A. and Altaf, R., 2018, Phytochemical and pharmacological updates on betel leaf, J. Appl. Pharm. Sci. 8(10): 134-142.
- [20] Rugthaworn, P., Innok, P. and Wanachantararak, P., 2010, Antimicrobial activity of *Piper betle* Linn. extracts against pathogenic bacteria, Thai J. Pharm. Sci. 34(2): 71-78.
- [21] Gong, Y., Lin, Z., Zhang, L., Qin, X., Liu, X. and Zhang, L., 2012, Bioactive compounds from *Piper betle* L. and their pharmacological activities, Fitoterapia. 83(2): 250-257.
- [22] Umar, A., Ismail, S., Ameen, A. and Rasheed, R.A., 2018, Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in plant extracts, J. Med. Plants Res. 12(4): 89-95.
- [23] Suresh, P., Ramesh, P. and Kumar, V., 2019, Phytochemical analysis and antioxidant activity of betel leaf (*Piper betle* L.) extracts, J. Herbal Med. 15: 100-108.
- [24] Bordoloi, M., Deka, S. and Sharma, P., 2020, Comparative evaluation of phenolic and flavonoid content in *Piper betle* leaves extracted using different solvents, J. Food Sci. Technol. 57: 2345-2354.
- [25] Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W., 1999, Determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, Food Chem. 64(4): 555-559.
- [26] Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R., 1982, Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids, Anal. Biochem. 126(1): 131-138.
- [27] Griess, P., 1879, Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt Ueber einige Azoverbindungen, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 12(1): 426-428.
- [28] Klompong, V., Benjakul, S., 2015, Antioxidative and antimicrobial activities of the extracts from the seed coat of Bambara groundnut (*Voandzeia subterranea*), RSC Adv. 5: 9973-9985.
- [29] Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P. and Cullen, P.J., 2009, Application of SEM for evaluating bacterial cell morphology after exposure to plant antimicrobials, Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 10(3): 363-368.
- [30] Cowan, M.M., 1999, Plant products as antimicrobial agents, Clin. Microbiol. Rev. 12(4): 564-582.
- [31] Daglia, M., 2012, Polyphenols as antimicrobial agents, Curr. Opin. Biotechnol. 23(2): 174-181.
- [32] Cushnie, T.P.T. and Lamb, A.J., 2011, Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids, Int. J. Antimicrob. Agents 38(2): 99-107.