

## ผลของสารสกัดจากเปลือกมังคุด ไพลและน้ำมันไพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

### Antibacterial Activity of Peel Extracted from Mangosteen (*Garcinia Mangostana* Linn.) and Phlai (*Zingiber Montanum* Koenig) Root Extracted and Phlai Oil

วรรณิ สมัปปิโต<sup>1</sup>, ศุภชัย สมัปปิโต<sup>2</sup>, ลือชัย บุตุคูป<sup>3</sup>

Wannee Samappito<sup>1</sup>, Supachai Samappito<sup>2</sup>, Luchai Butkhup<sup>3</sup>

Received: 1 May 2016; Accepted: 15 September 2016

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียและปริมาณสารสำคัญในตัวอย่างเปลือกมังคุดและเหง้าไพลที่สกัดด้วยวิธีการแช่ในเอทานอล 95% และน้ำมันไพลที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำจากการทดลองพบว่าน้ำมันไพลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย 8 ชนิดที่ทดสอบ (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* และ *Escherichia coli*) เมื่อใช้วิธี broth microdilution assay โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ต่ำกว่า 12.50 µl/ml องค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์สำคัญของน้ำมันไพลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ Sabinene, Terpinen-4-ol, Terpinene และ Pinene การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันไพลมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ จึงสามารถนำน้ำมันไพลไปประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์กำจัดเชื้อที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อลดการใช้สารเคมี และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรไทยพื้นบ้านอีกทางหนึ่ง

**คำสำคัญ:** กิจกรรมการต้านแบคทีเรีย พืชสมุนไพร น้ำมันระเหย

#### Abstract

Antibacterial activity and the chemical composition of mangosteen peel and phlai root extracted by maceration in 95% ethanol and phlai oil extracted by using hydro-distillation were investigated in this study. The result showed that phlai oil was the most effective in inhibiting growth of 8 tested bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* and *Escherichia coli*), by broth microdilution assay with the MIC less than 12.50 µl/ml. Major chemical composition in the oil were Sabinene, Terpinen-4-ol, Terpinene and Pinene. The results of antibacterial testing suggest that the phlai oil could be used as that the active ingredient in value added eco-friendly disinfectant products based on Thai traditional herb, replacing some currently conventional chemical agents.

**Keywords:** antibacterial activity, medicinal plant, essential oil

<sup>1</sup> อาจารย์, ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

<sup>2</sup> รองศาสตราจารย์, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

<sup>3</sup> ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

<sup>1</sup> Corresponding author, Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44000, Thailand

<sup>2</sup> Associate professor, <sup>3</sup> Assistant professor, Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44000, Thailand

## บทนำ

โรคติดเชื้อนับเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำประกอบกับจำนวนของเชื้อโรคที่ต่ออายุปฏิชีวนะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นก็ยิ่งทำให้โอกาสที่จะรักษาโรคติดเชื้อเหล่านี้ให้หายอย่างรวดเร็วเป็นไปได้ยากยิ่งขึ้นการรักษาในปัจจุบันจะใช้ยาที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งเป็นสารเคมีมีผลทั้งทำให้เชื้อโรคตายและมีผลข้างเคียง (side effect) ต่อผู้ป่วยด้วย ดังนั้นนักวิจัยในปัจจุบันจึงได้เริ่มมีการค้นหาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งสมุนไพรมาใช้ในการรักษาเนื่องจากสมุนไพรเหล่านี้มีความหลากหลายทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพโอกาสที่ทำให้เชื้อโรคตายและผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยจึงมีน้อยกว่าการใช้ยาเคมีสังเคราะห์มากไปกว่านั้นคนไทยในสมัยโบราณอดีตก็นิยมใช้สมุนไพรกันเป็นจำนวนมากเพื่อรักษาโรคอยู่แล้วก่อนที่จะมีการนำยาสังเคราะห์แผนปัจจุบันมาใช้

พืชสมุนไพรมีความหลากหลายขององค์ประกอบทางพฤกษเคมี (phytochemicals) และฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) เนื่องจากสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่สมุนไพรสร้างขึ้นมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทุกส่วนของพืชไม่ว่าจะเป็นราก ลำต้น เปลือก ใบ ผลหรือน้ำมันระเหย (essential oil) ก็จะมีสรรพคุณแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่มีอยู่ในส่วนนั้นๆ การใช้เดี่ยวหรือใช้ร่วมกันก็จะช่วยเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์จากรายงานก่อนหน้านี้นี้พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุด (*Garcentia mangostana* Linn.) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง (*Staphylococcus aureus*) ทั้งสายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์ที่ดื้อยาเพนิซิลลิน สารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ คือ แมนโกสติน (mangostin) และอนุพันธ์ของแมนโกสตินซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเทียบเท่ายาปฏิชีวนะ<sup>2</sup> นอกจากนี้จากรายงานของ Habsah และคณะ<sup>3</sup> พบว่าสารสกัดเหง้าไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb) ด้วยไดคลอโรมีเทนแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (แบคทีเรียแกรมบวก) และ *Pseudomonas aeruginosa* (แบคทีเรียแกรมลบ) โดยมีค่า MIC เท่ากับ 250 และ 125 µg/แผ่นตามลำดับขณะที่ แสงจันทร์<sup>4</sup> พบว่าสาร Terpinene-4-ol ที่อยู่ในน้ำมันไพลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 2–5 mg/ml จาก

รายงานการวิจัยดังกล่าวข้างต้นทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์เภสัชวิทยาต้านการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและองค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์ของเปลือกมังคุด เหง้าไพลและน้ำมันไพล ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่หาได้ทั่วไปในท้องถิ่น เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาทางการ

แพทย์และลดการนำเข้าของสารปฏิชีวนะจากต่างประเทศ นอกจากนี้ยังเป็นการสนับสนุนการวิจัยและพัฒนาสมุนไพรไทยให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างคุ้มค่า และทัดเทียมกับต่างชาติ

## วัตถุประสงค์และวิธีการทดลอง

### การสกัดสารจากเปลือกมังคุดและเหง้าไพล

นำเปลือกมังคุดหรือเหง้าไพลที่บดไว้แล้ว 1 กิโลกรัม มาสกัดแบบการหมัก (Maceration) ด้วยเอทานอล 95 % ปริมาณ 4 ลิตรเป็นเวลา 7 วันจากนั้นนำมากรองเพื่อแยกกาก นำสารละลายที่ได้จากการกรองมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วย Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 - 47 °C ส่วนที่เหลือนำมาทำเป็นผงแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer นำผงที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาในอุณหภูมิ 4 °C รอการวิเคราะห์

### การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าไพล

นำตัวอย่างผงแห้งไพล 100-200 กรัมใส่ลงในฟลาส แก้วก้นกลมทนไฟ ขนาด 2 ลิตร แล้วเติมน้ำให้ท่วมตัวอย่าง แต่ไม่เกิน 3 ใน 4 ของความจุฟลาสประกอบเครื่องกลั่นด้วยไอน้ำ (hydro-distillation) และต่อท่อระบายน้ำหล่อเย็นในท่อควบแน่น เปิดเครื่องกลั่น ตั้งอุณหภูมิที่ 65-70°C เก็บน้ำมันไพลที่ได้ใส่ขวดสีชารอการวิเคราะห์

### การเตรียมเชื้อแบคทีเรียในการทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรีย 8 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* และ *Escherichia coli* ที่จะใช้ทดสอบ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียให้ได้ 10<sup>4</sup> CFU/ml ก่อนนำไปเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของตัวอย่าง

### การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion techniques<sup>5</sup>

การหาบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด เหง้าไพล และน้ำมันไพลที่ความเข้มข้น 1 mg/ml และ 200 µl/ml ตามลำดับ โดยใช้ 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลายทำการเปิด 5 µl ของสารสกัด ลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อขนาด 6 มิลลิเมตร รวมทั้งหมด 3 ตำแหน่งโดยตัวทำละลาย 10% DMSO เป็น control แล้ววางกระดาษกรองบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ นำ

ไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้งแบคทีเรีย (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร โดยจะใช้ Tetracycline (30 µg/ml) เป็นตัวมาตรฐานในการเปรียบเทียบทำการทดลอง แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของสารสกัดสมุนไพรร

การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรรที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (MIC) โดยทำการทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ด้วยวิธี broth microdilution assay ในภาตหลุมแบบ 96 หลุม ที่ปลอดเชื้อ แต่ละหลุมมีปริมาตรเท่ากับ 200 µl ซึ่งประกอบไปด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ปริมาตร 100 µl ทดสอบ 3 สภาวะ คือ

1. สภาวะที่ 1 เป็นสภาวะควบคุม ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียอายุ 18 ชั่วโมงมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4 log CFU/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นเป็นสองเท่า (2 x สูตรความเข้มข้นอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ) ปริมาตร 100 µl กับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 100 µl
2. สภาวะที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรร ประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นเป็นสองเท่าปริมาตร 100 µl เติมสารสกัดสมุนไพรรที่ความเข้มข้นต่างๆ 50 µl (10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312%, 0.156%, 0.078%, 0.039%, 0.019% w/v) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในปริมาตรทั้งหมดในแต่ละหลุม และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 µl
3. สภาวะที่ 3 เป็นตัวอย่าง Blank ประกอบด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 µl และเติมสมุนไพรรที่ความเข้มข้นเดียวกับที่ทดลองในสภาวะที่ 2 ปริมาตร 50 µl แต่ไม่เติมเชื้อ เพื่อชดเชยการรบกวนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อและสีของสารสกัดสมุนไพรร อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 µl

หลังจากเตรียมการทดลองที่สภาวะต่างๆ เรียบร้อยให้นำไมโครเพลทไปเพาะเชื้อที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไมโครเพลทไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบ vertical ความเร็ว 70 rpm เป็นเวลา 5 นาทีก่อนทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 630 nm (OD<sub>630</sub> nm) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงสำหรับไมโครเพลท เพื่อหาค่า MIC ที่เวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง), 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

วิธีการหาค่า MIC จากการทดสอบประสิทธิภาพสารยับยั้งด้วยวิธี broth microdilution assay เป็นการนำค่า

ดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 630 nm (OD<sub>630</sub> nm) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบชนิดหนึ่งจากสภาวะที่เลี้ยงเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับค่า OD<sub>630</sub> nm เฉลี่ยของการทดสอบ ชนิดนั้นที่ 0 ชั่วโมง ถ้าค่า OD<sub>630</sub> nm ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบของชนิดนั้นในสภาวะที่รีทเมนต์ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับหรือน้อยกว่าค่า OD<sub>630</sub> nm เฉลี่ยของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบชนิดเดียวกันที่ 0 ชั่วโมง ค่า OD<sub>630</sub> nm นั้นเป็นค่า MIC กล่าวคือไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบ หรือสารสกัดนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นที่ทดสอบนั้นๆ

วิธีการหาค่า OD<sub>630</sub> nm ของเชื้อจากสภาวะที่ 24 ชั่วโมง ทำโดยการนำค่า OD<sub>630</sub> nm ของเชื้อจากสภาวะดังกล่าวหักออกด้วยปัจจัยที่รบกวนค่า OD<sub>630</sub> nm ของเชื้อ ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

1. OD<sub>630</sub> nm สภาวะควบคุม - OD<sub>630</sub> nm สภาวะที่ 3 เป็นตัวอย่าง Blank ค่าที่ได้คือค่าดูดกลืนแสงของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมสารสกัดสมุนไพรร แต่กำจัดค่ารบกวนการดูดกลืนแสงของสีอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว
2. OD<sub>630</sub> nm สภาวะที่ 2 - OD<sub>630</sub> nm เป็นตัวอย่าง Blank ค่าที่ได้คือค่าดูดกลืนแสงของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมสารสกัดสมุนไพรร แต่กำจัดค่ารบกวนการดูดกลืนแสงของสีของสารสกัดสมุนไพรรแล้ว

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพล นำน้ำมันหอมระเหยจากไพลมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry (GC-MS) นำน้ำมันไพลมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 µm แล้วจึงนำตัวอย่างมา 1 ml เพื่อใช้ในการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้ อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 45°C และเพิ่มขึ้นในอัตรา 5°C ต่อ นาที จนถึง 100°C จากนั้นเพิ่มขึ้นในอัตรา 3°C ต่อ นาที จนถึง 150°C และคงอยู่ที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเพิ่มขึ้นในอัตรา 6°C ต่อ นาที จนถึง 200°C ซึ่งจะใช้เวลาทั้งหมด 37 นาที อุณหภูมิ injection port ที่ 280°C และ detector transfer line ที่ 250°C ใช้คอลัมน์ขนาด 30 m × 0.25 mm Rtx<sup>®</sup>-5MS (Crossbond 5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane) ซึ่งฉาบฟิล์มหนา 0.25 µm ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สพาที่อัตราไหล 51.6 cm ต่อวินาที ใช้โหมดการฉีดแบบ split และใช้อิเล็กทรอนิกส์ที่ความต่างศักย์ 70 eV ใช้สแกนโหมดอยู่ในช่วง 40-500 amu จำแนกชนิดของสารหอมระเหยด้วยการเทียบ Mass Spectra กับฐานข้อมูลของ Wiley 5.0 (Wiley, New York, NY, USA)

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุด สารสกัดจากเหง้าไพล และน้ำมันไพลที่ความเข้มข้น 1 mg/ml สำหรับสารสกัดจากเปลือกมังคุดและเหง้าไพล และน้ำมันไพล 100 µl/ml ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 8 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* และ *E. coli* พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุด สารสกัดจากเหง้าไพล และน้ำมันไพลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ (Table 1) สาเหตุที่แบคทีเรียแกรมลบมีความต้านทานต่อสารสกัดจากพืชสมุนไพรได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวกเนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบบมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) และ periplasmic space ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งสารไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกจะเป็นตัวกั้นการซึมผ่านของสารต่างๆ ได้ดีขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มีโครงสร้างเหล่านี้สารต่างๆ จึงซึมผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ สารสกัดจากเปลือกมังคุดยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus*, *S. epidermidis* และ *S. aureus* ได้ดีสอดคล้องกับการรายงานของสุคนธ์และคณะ<sup>1</sup> ซึ่งรายงานไว้ว่าสารสกัดเอทานอลและอะซิโตนจากเปลือกมังคุดมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* รายงานของ Chomnawang และคณะ<sup>7</sup> ที่พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวชนิด *S. epidermidis* และ *P. acnes* ได้ดีเนื่องจากเปลือกมังคุดมี

mangostin และอนุพันธ์ของ mangostin ที่เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ สารสกัดจากเหง้าไพลและน้ำมันไพลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุด ซึ่งทั้งสารสกัดจากเหง้าไพลและน้ำมันไพลมีประสิทธิภาพสูงมากในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* และ *B. cereus* ในบรรดาเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *B. cereus* มีความไวต่อสารสกัดจากพืชที่ใช้ทดสอบกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ

จากการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* สูงกว่าเชื้อแบคทีเรียอื่นเนื่องจากมีค่า MIC ต่ำสุด (3.13 µg/ml) (Table 2) ขณะที่สารสกัดจากเหง้าไพลมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* สูงกว่าเชื้อแบคทีเรียอื่นเนื่องจากมีค่า MIC ต่ำสุด (3.13 µg/ml) ขณะที่น้ำมันไพลมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* และ *B. cereus* สูงกว่าเชื้อแบคทีเรียอื่นเนื่องจากมีค่า MIC ต่ำสุดเท่ากับ 1.57 และ 3.13 µl/ml ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าส่วนของน้ำมันไพลมีฤทธิ์สูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียซึ่งน้ำมันจากสมุนไพรจะมีฤทธิ์สูงมากกว่าสารสกัดเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kamazeri และคณะ<sup>9</sup> ที่พบว่าน้ำมันของพืชตระกูลขิง (*Curcuma mangga*) ที่ปลูกในมาเลเซียมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และ *B. cereus* สูงโดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.2 และ 11.1 µl/ml ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำตัวอย่างน้ำมันไพลไปวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญต่อไป

**Table 1** Antibacterial activity of mangosteen peel and Phlai root ethanolic extracts and Phlai oil.

Microorganisms	Zone of inhibition (mm)			
	mangosteen peel	Phlai root	Phlai oil	Ref*
Gram positive				
<i>Staphylococcus aureus</i>	11.7± 0.5	10.4± 0.4	10.8± 0.7	16.2± 0.6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10.4± 0.8	14.1± 0.7	15.2± 0.5	18.3± 0.8
<i>Bacillus cereus</i>	12.6± 0.4	15.3± 0.5	16.2± 0.6	20.5± 0.7
<i>Bacillus subtilis</i>	9.5± 0.7	7.6± 0.3	9.3± 0.3	17.8± 0.5
Gram negative				
<i>Salmonella typhi</i>	7.7± 0.2	8.7± 0.2	8.6± 0.2	17.2 ± 0.9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.2± 0.4	7.5± 0.4	9.3± 0.4	19.5 ± 0.7
<i>Serratia marcescens</i>	8.4± 0.5	8.6± 0.3	9.7± 0.2	15.4 ± 0.5
<i>Escherichia coli</i>	9.6± 0.8	8.4± 0.6	10.5± 0.7	17.8 ± 0.4

Data expressed as mean ± standard deviation (SD) including the disc diameter (6 mm), All values were rounded to one decimal place,\* Positive control: tetracycline(30 µg/ml).

**Table 2** Minimum inhibitory concentration (MIC) of ethanolic extracts from mangosteen peel and Phlai root and Phlai oil.

Microorganisms	mangosteen peel (µg/ml)	Phlai parts	
		root(µg/ml)	oil(µl/ml)
Gram positive			
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.25	12.50	6.25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12.50	3.13	1.57
<i>Bacillus cereus</i>	3.13	6.25	3.13
<i>Bacillus subtilis</i>	6.25	25.00	12.50
Gram negative			
<i>Salmonella typhi</i>	12.50	12.50	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.50	12.50	6.25
<i>Serratia marcescens</i>	50.00	25.00	12.50
<i>Escherichia coli</i>	25.00	50.00	12.50

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพลจากการนำน้ำมันหอมระเหยจากไพล ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สำคัญด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry (GC-MS) จะได้โครมาโตแกรมของน้ำมันไพลดังแสดงใน (Figure 1) ซึ่งประกอบด้วยพีค 26 พีคใช้เวลาในการวิเคราะห์ 26 นาที และแมสสเปคตรัมของตัวอย่างเมื่อเทียบผลของแมสสเปคตรัมกับฐานข้อมูล NIST ทำให้สามารถระบุชื่อและสูตรโครงสร้างที่เป็นไปได้ของแต่ละองค์ประกอบในน้ำมันไพล รวมทั้งร้อยละของปริมาณผลิตภัณฑ์ ซึ่งได้จากการอินทิเกรตพื้นที่ใต้พีคของโครมาโตแกรมจากเครื่อง GC-MS พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าไพลมีองค์ประกอบของสารหอมระเหยที่สำคัญหลายชนิด ดังแสดงใน Table 3 โดยสามารถแบ่งสารหอมระเหยกลุ่มที่พบได้ 3 กลุ่ม ตามเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใต้พีครวมทั้งหมดได้แก่

1) สารหอมระเหยที่มีสัดส่วนมากที่สุดตั้งแต่ 10% ขึ้นไป ได้แก่ Sabinene มีสัดส่วนสูงที่สุดเท่ากับ 58.49% รองลงมาคือ Terpinen-4-ol มีสัดส่วนเท่ากับ 14.61% เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้นี้พบว่าทั้ง Sabinene และ Terpinen-4-ol มีสัดส่วนในช่วงเดียวกันกับรายงานของ Bua-in และ Paisoo ksantivatana<sup>10</sup> ได้รายงานสัดส่วน Sabinene และ Terpinen-4-ol ในน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าไพลที่เก็บมาจากภาคต่างๆ ในประเทศไทย พบว่า Sabinene และ Terpinen-4-ol มีสัดส่วนอยู่ในช่วง 38.99-47.54% และ 11.50-24.36% ตามลำดับ

2) สารหอมระเหยที่มีสัดส่วนปานกลางตั้งแต่ 1-10% ขึ้นไป ได้แก่  $\gamma$ -Terpinene (4.27%),  $\beta$ -Sesquiphellandrene (3.31%),  $\beta$ -Pinene (3.24%),  $\beta$ -Phellandrene (2.63%),

$\alpha$ -Terpinene (2.15%),  $\alpha$ -Pinene (1.97%),  $\beta$ -Myrcene (1.71%), Eucalyptol (1.26%) และ Linalool (1.24%)

3) สารหอมระเหยที่มีสัดส่วนต่ำ มีน้อยกว่า 1% ได้แก่ Linalool acetate (0.82%), Terpinolene (0.72%), Cymene (0.59%),  $\alpha$ -Thujene (0.57%),  $\alpha$ -Terpineol acetate (0.55%),  $\alpha$ -Terpineol (0.28%), Zingibene (0.24%),  $\gamma$ -Elemene (0.19%),  $\alpha$ -Thujene (0.09%),  $\gamma$ -Terpinene (0.07%), Campene (0.05%) และ *trans*-Piperitol (0.05%)

จากงานวิจัยของ Wungsintaweekul และคณะ<sup>11</sup> ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านอนุมูลอิสระ และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพลซึ่งปลูกในประเทศไทย พบว่า Terpinen-4-ol มีสัดส่วนสูงที่สุดเท่ากับ 40.65% รองลงมาคือ Sabinene (18.03%),  $\gamma$ -Terpinene (7.02%), *p*-Cymene (5.72%) และ  $\alpha$ -Terpinene (3.42%) จะพบว่ามีกลุ่มของสารหอมระเหยเป็นกลุ่มเดียวกับที่พบในงานวิจัยนี้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Bhuiyan และคณะ<sup>12</sup> ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพลที่ปลูกในประเทศบังคลาเทศ และจากการศึกษาพบว่า Triquinacene, 1,4-bis (methoxy) มีสัดส่วนสูงที่สุดเท่ากับ 26.47% รองลงมาคือ (Z)-Ocimene (21.97%), Terpinen-4-ol (18.45%),  $\gamma$ -Terpinene (3.86%),  $\beta$ -Phellandrene (3.49%), Cis-Sabinenehydrate (3.00%) และ  $\beta$ -Sesquiphellandrene (2.45%) อย่างไรก็ตามชนิดและปริมาณสารหอมระเหยในไพลที่ปลูกในประเทศมาเลเซียกลับไม่เหมือนกัน โดยจะเห็นได้จากงานวิจัยของ Kamazeri และคณะ<sup>9</sup> พบว่าไพลมีสารหอมระเหยที่มีสัดส่วนมากที่สุดคือ 2,6,9,9-Tetramethyl-2,6,10-cycloundecatrien-1-one มี

สัดส่วนสูงที่สุดเท่ากับ 60.77% รองลงมาคือ  $\alpha$ -Caryophyllene (23.92%), Caryophyllene oxide (4.79%), 1,5,5,8-Tetramethyl-12-oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-diene (3.32%) และ Caryophyllene (2.03%) ความแตกต่างกันของชนิดและปริมาณสารหอมระเหยในน้ำมันไพลนี้เป็นไปได้ว่าเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น พันธุ์ เทคนิคการเพาะปลูก สภาพอากาศ อายุการเก็บเกี่ยว และวิธีการสกัด เป็นต้น

จะเห็นได้ว่าสารประกอบหลักๆ ที่พบในน้ำมันไพล คือ Sabinene, Terpinen-4-ol, Terpinene และ Pinene เมื่อนำสารมาตรฐานเหล่านี้มาสร้างวิเคราะห์เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณพบที่สามารถเรียงลำดับการออกจากคอลัมน์ได้ดังนี้  $\alpha$ -Pinene (RT=5.550),  $\alpha$ -Terpinene (RT=7.625),  $\gamma$ -Terpinene (RT=8.767), Sabinene (RT=9.042) และ Terpinen-4-ol (RT=12.174) (Table 3 and 4)

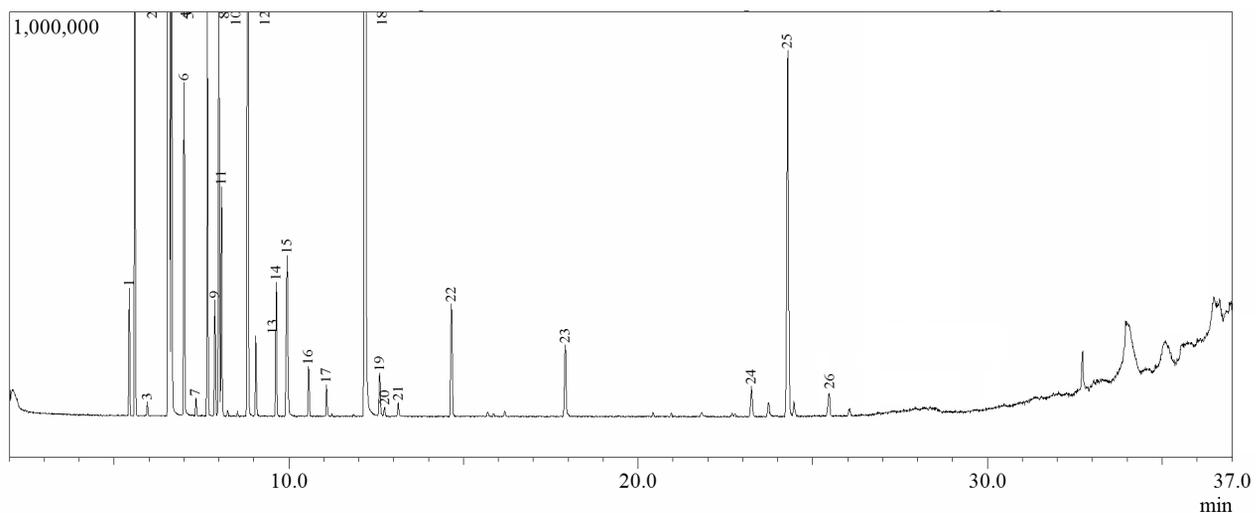


Figure 1 GC-MS chromatogram of Phlai oil

Table 3 Chemical profile of Phlai oil

Peak No.	Compounds	Rt (min.)	Area (%)	% similarity (NIST database)
1	$\alpha$ -Thujene	5.435	0.57	97
2	$\alpha$ -Pinene	5.597	1.97	98
3	Campene	5.953	0.05	88
4	Sabinene	6.566	58.49	96
5	$\beta$ -Pinene	6.645	3.24	97
6	$\beta$ -Myrcene	7.003	1.71	97
7	$\alpha$ -Thujene	7.345	0.09	96
8	$\alpha$ -Terpinene	7.671	2.15	95
9	Cymene	7.885	0.59	96
10	$\beta$ -Phellandrene	8.000	2.63	92
11	Eucalyptol	8.074	1.26	98
12	$\gamma$ -Terpinene	8.822	4.27	96
13	Sabinene	9.058	0.44	93
14	Terpinolene	9.642	0.72	96
15	Linalool	9.955	1.24	95

Peak No.	Compounds	Rt (min.)	Area (%)	% similarity (NIST database)
16	Sabinene	10.569	0.27	91
17	Sabinene	11.080	0.17	89
18	Terpinen-4-ol	12.183	14.61	93
19	$\alpha$ -Terpineol	12.600	0.28	93
20	<i>trans</i> -Piperitol	12.750	0.05	79
21	$\gamma$ -Terpinene	13.134	0.07	80
22	Linalool acetate	14.657	0.82	94
23	$\alpha$ -Terpineol acetate	17.914	0.55	90
24	Zingibene	23.244	0.24	89
25	$\beta$ -Sesquiphellandrene	24.282	3.31	91
26	$\gamma$ -Elemene	25.466	0.19	85

**Table 4** Chemical composition of Phlai oil

Compounds	Rt(min)	Calibration curve	R <sup>2</sup>	Content (g/L)	Percentage (%)
$\alpha$ -Pinene	5.550	$Y = 3 \times 10^8 X + 2 \times 10^6$	0.9999	0.88 ± 0.01	0.39
$\alpha$ -Terpinene	7.625	$Y = 2 \times 10^8 X + 3 \times 10^6$	0.9999	1.40 ± 0.02	0.62
$\gamma$ -Terpinene	8.767	$Y = 2 \times 10^8 X + 1 \times 10^6$	0.9970	3.08 ± 0.13	1.36
Sabinene	9.042	$Y = 4 \times 10^7 X + 12045$	0.9996	210.66 ± 2.14	92.68
Terpinen-4-ol	12.174	$Y = 2 \times 10^8 X - 1 \times 10^6$	0.9984	11.29 ± 1.16	4.96

Data express as mean±standard deviation (n = 3)

เมื่อวิเคราะห์น้ำมันไพลด้วยเครื่อง GC-MS โดยเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมของตัวอย่างกับและแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานและแมสสเปกตรัมจากฐานข้อมูลของ NIST ได้ผลดังแสดงไว้ใน (Table 4) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากไพลมีปริมาณ  $\alpha$ -Pinene,  $\alpha$ -Terpinene,  $\gamma$ -Terpinene, Sabinene และ Terpinen-4-ol เท่ากับ 0.88, 1.40, 3.08, 210.66 และ 11.29 g/L ตามลำดับโดยพบ Sabinene เป็นสารหอมระเหยที่พบมากที่สุดในน้ำมันไพล คิดเป็นสัดส่วน 92.68% รองลงมาคือ Terpinen-4-ol และ  $\gamma$ -Terpinene ในขณะที่พบ  $\alpha$ -Pinene ปริมาณต่ำที่สุด จากรายงานการวิจัยของ Obame และคณะ<sup>13</sup> รายงานไว้ว่าในผล African pear หรือ Safou ของแอฟริกา มีองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่สำคัญคือ sabinene (21.8%), terpinene-4-ol (19.8%) และ  $\alpha$ -pinene (17.5%) สารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูงอีกด้วย

### สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันไพลประกอบไปด้วยสารออกฤทธิ์สำคัญในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ Sabinene, Terpinen-4-ol, Terpinene และ Pinene มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *B. cereus* และ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารหรือมีส่วนในการทำให้อาหารเน่าเสียจึงมีความเป็นไปได้ในการนำน้ำมันไพลไปพัฒนาเป็นสารถนอมอาหารชนิดใหม่เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหารหรือใช้ในการรักษาโรคทางเดินอาหารที่เกิดจากแบคทีเรียเหล่านี้ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. epidermidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวจึงมีความเป็นไปได้ในการนำน้ำมันไพลไปพัฒนาเป็นเครื่องสำอางรักษาสิวได้

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่อำนวยความสะดวกในการเครื่องมือ และสถานที่ในการทดลอง งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

## เอกสารอ้างอิง

1. สุคนธ์ ต้นดีไพบูลย์ วุฒิเทียนชัย น่วมเศรษฐี เพชรลดดา เดชายืนยง.ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลไม้บางชนิด. *KKU Res J* 2012;17:880-94.
2. Tadtong S, Viriyaroj A, Vorarat S, Nimkulrat S, Suk-samram S. Antityrosinase and antibacterial activities of mangosteen pericarp extract. *J Health Res* 2009;23:99-102.
3. Habsah M, Amran M, Mackeen MM. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. *J Ethnopharmacol* 2000;72: 403-10.
4. แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ. การศึกษาผลของสมุนไพรบางชนิดในวงศ์ขิงกิเบอเรซี (Zingiberaceae) ต่อการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด. รวมบทความงานวิจัยการแพทย์แผนไทยและทิศทางการวิจัยในอนาคตสถาบันการแพทย์แผนไทย 2543;207.
5. นุศวดี พจนานุกิจ สมใจ ขจรชีพพันธังาม. การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อเกิดสิวของสารสกัดจากพืชสมุนไพร. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2553.
6. Shan B, Cai Y-Z, Brooks JD, Corke H. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int J Food Microbiol* 2007;117:112-9.
7. Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J Ethnopharmacol* 2005;101:330-3.
8. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตรเมตตา อังศ์สกุลลดดา นิลรัตน์ ประสิทธิ์ ธราวิจิตรกุล ศิริพรรณ บุญชู รัชชัยย์ เชื้อประไพศิลป์ พิเชษฐ์ วิริยะจิตรา. ฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกมังคุดต่อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin (MRSA) และ *Enterococcus* species. *วารสารสงขลานครินทร์*, 2537. 16:399-405.
9. Kamazeri TSAT, Samah OA, Taher M, Susanti D, Qaralleh H. Antimicrobial activity and essential oils of *Curcuma aeruginosa*, *Curcuma mangga*, and *Zingiber cassumunar* from Malaysia. *Asian Pac J Trop Med* 2012;5:202-9.
10. Bua-in S, Paisooksantivatana Y. Essential oil and antioxidant activity of cassumunar ginger (Zingiberaceae: *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr.) collected from various parts of Thailand. *Kasetsart J (Nat Sci)* 2009;43:467-75.
11. Wungsintaweekul J, Sitthithaworn W, Putalun W, Pfeifhoffer HW, Brantner A. Antimicrobial, antioxidant activities and chemical composition of selected Thai spices. *Songklanakarin J Sci Technol* 2010; 32:589-98.
12. Bhuiyan MNI, Chowdhury JU, Begum, J. Volatile constituents of essential oils isolated from leaf and rhizome of *Zingiber cassumunar* Roxb. *Bangladesh J Pharmacol* 2008; 3: 69-73.
13. Obame LC, Edou P, Bassolé IHN, Koudou J, Agnaniet H, EbaF, Traore AS. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oil of *Dacryodes edulis* (G. Don) H. J. Lam from Gabon. *Afr J Microbiol Res* 2008;2:148-52.