ภาคผนวก

ผลงานปีงบประมาณ 2550 (ตุลาคม 2549 – 30 กันยายน 2550)

การตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารระดับชาติ

ปวีณา วัดบัว, สินีนาฏ ศิริ, นิลุบล กิจอันเจริญ, วิรัช ว่องพัฒนากุล. **2550.** การใช้สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุก. *วารสารวิจัย มข.* 7(1): 27-35.

Wadbua P, Siri S, Kitancharoen N, and Phonimdaeng P. **2006.** Thai medicinal plant extracts possessing anti-bacterial activity against catfish pathogens, *Aeromonas sobria*. *Preceedings of the 32nd congress on science and technology of Thailand (STT. 32).*

การเผยแพร่ผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการระดับชาติ

Wadbua P, Siri S, Kitancharoen K, and Chantaranothai P. **2007.** The antibacterial activity of *Syzygium javanica* extract on catfish infected bacteria, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria*. 1st Biochemistry and Molecular Biology Conference. April 26-27, 2007. Chulalongkorn University, Bangkok.

Wadbua P, Siri S, Kitancharoen N, and Phonimdaeng P. **2006.** Thai medicinal plant extracts possessing anti-bacterial activity against catfish pathogens, *Aeromonas sobria*. The 32nd congress on science and technology of Thailand (STT. 32). October 10-12, 2006. Queen Sirikit National Conventional Center, Bangkok.

การใช้สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุก

The Use of Crude Extract of Punica Granatum Linn Pericarp to Inhibit Catfish Pathogenic Bacteria

ปวีณา วัดบัว (Paweena Wadbua)* ดร. สินีนาฏ ศิริ (Dr. Sineenat Siri)**
ดร. นิลุบล กิจอันเจริญ (Dr. Nilubol Kitancharoen)*** วิรัช ว่องพัฒนากุล (Wirut Wongphathanakul)****

บทคัดย่อ

ทับทิม (*Punica granatum* Linn) จัดเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคท้องเสียและโรคบิดในคน อีกทั้งยังมีรายงานถึงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนทั้งแกรมบวกและลบหลายชนิด แต่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในปลา ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วยน้ำในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุก 2 ชนิดคือ *Aeromonas caviae* และ *A. sobria* พบว่าค่าของ inhibition zone ต่อเชื้อ *A. caviae* และ *A. sobria* เป็น 15.7 ± 0.4 และ 18.5 ± 0.5 มม. ตามลำดับ และมีค่า minimal bactericidal concentration (MBC) ที่ 24 ช.ม. ของการบ่มเป็น 6.25 และ 12.50 มก./มล. ตามลำดับ จากการศึกษากลุ่มสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบเบื้องต้นพบว่าสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมเป็นสารในกลุ่ม tannins, sterol glycosides, และ phenolic compounds เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโดยใช้ไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) พบว่าสารสกัดมีค่า lethal concentration 50 (LC_{50}) ที่ 24 ช.ม. เฉลี่ย 15.80 มก./มล. ซึ่งสูงกว่าค่า MBC ต่อเชื้อ *A. caviae* และ *A. sobria* จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมน่าจะสามารถใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุกได้ ซึ่งอาจสามารถใช้แทนยาปฏิชีวนะในฟาร์มเลี้ยงปลาเพื่อลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย การตกค้างของยาในเนื้อปลา และการลดต้นทุนการเพาะเลี้ยง

ABSTRACT

Pomegranate (*Punica granatum* Linn) is a local medicinal plant of Thailand, which is used as a remedy for diarrhea and dysentery. Moreover, there have been a number of reports of its antibacterial activity against both of gram positive and gram negative human-pathogenic bacteria. However, none is reported on its activity against fish pathogenic bacteria. Therefore, the antibacterial activity of crude extract of pomegranate pericarp against 2 strains of pathogenic bacteria of catfish, *Aeromonas caviae*

* มหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

and *A. sobria*, was studied in this research. The pomegranate extract showed the inhibition zone against *A. caviae* and *A. sobria* of 15.7 ± 0.4 and 18.5 ± 0.5 mm, respectively. The minimal bactericidal concentration (MBC) values at 24 h of incubation were 6.25 and 12.50 mg/ml, respectively. In addition, the primary phytochemical study showed that the antibacterial compounds of crude pomegranate extract was classified to a group of tannins, sterol glycosides, and phenolic compounds. The in vivo cytotoxicity of the crude extract on brine shrimps (*Artemia salina*) was also investigated and the average of lethal concentration 50 (LC_{50}) value at 24 h of incubation was 15.80 mg/ml, which was higher than the MBC values against *A. caviae* and *A. sobria*. The results of this research suggested that the crude extract of pomegranate pericarp may be useful to inhibit catfish pathogenic bacteria and perhaps replace the uses of antibiotics in fish farming, thus probably reducing problems of antibiotic-resistant bacteria, left-over chemicals in fish flesh, and lower cost of fish farming.

คำสำคัญ : ทับทิม ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ความเป็นพิษต่อเซลล์ *Aeromonas caviae* *Aeromonas sobria*
Key Words : Pomegranate, Antibacterial activity, Cytotoxicity, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*

บทนำ

ทับทิม (*Punica granatum* Linn) เป็นไม้พุ่มขนาดกลาง ที่พบได้ในทั่วทุกภาคของประเทศไทย อีกทั้งยังจัดเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่ใช้กันมานาน โดยเปลือกผลของทับทิมนั้นมีสรรพคุณในการรักษาแผลพุพอง อาการท้องเสีย ท้องเดิน และอาการบิด (เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธิ์, 2541) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแกรมบวกและลบ เช่น *Bacillus subtilis* (Ahmad *et al.*, 1998), *Escherichia coli* (Ahmad *et al.*, 1998; ตรีชฎา และคณะ, 2548), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (Anesini and Perez, 1993; Ahmad *et al.*, 1998), methicillin-resistant *S. aureus* หรือ MRSA (Machado *et al.*, 2003; Voravuthikunchai and Kitpipit, 2003), และ *Vibrio cholerae* (Guevara *et al.*, 1994) ซึ่งรายงานวิจัยส่วนใหญ่นั้นได้รายงานถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากทับทิม ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนเท่านั้น แต่ยังไม่มีรายงานถึงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลา

ปัจจุบันโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลาสร้างความเสียหายต่อเกษตรกรผู้เลี้ยง รวมถึงเศรษฐกิจของประเทศไทยอย่างมาก โดยทั่วไปเมื่อเกษตรกรพบว่าปลาเป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียนั้น นิยมแก้ไขปัญหาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะดังกล่าวมักก่อให้เกิดปัญหาตามมาคือ การตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อปลาที่ส่งผลกระทบต่อการส่งออก และการตกค้างของยาปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังก่อให้เกิดปัญหาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย เช่นการดื้อต่อยาเตตร้าซัยคลิน และแอมพิซิลิน ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Aeromonas spp.* (Palu *et al.*, 2006) ทำให้โรคดังกล่าวยากแก่การควบคุมและการรักษา

ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุก 2 ชนิดคือ *Aeromonas caviae* และ *A. sobria* การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) และการวิเคราะห์เบื้องต้นถึงกลุ่มของสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การสกัดสารจากเปลือกผลทับทิม

นำเปลือกผลทับทิมสดมาทำการสกัดด้วยน้ำ (อัตราส่วนพืชต่อน้ำ 1:4) ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษ Whatman No. 1 ทำให้สารละลายแข็งด้วย shelf freezer และทำให้สารแห้งด้วยความเย็นภายใต้สภาวะสูญญากาศด้วยเครื่อง lyophilizer และเก็บสารที่ได้ใน desiccator โดยสารสกัดจะทำการละลายกลับด้วยน้ำ และกรองผ่าน 0.22 µM sterilized filters ก่อนนำไปใช้

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria* ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม

2.1 การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดเบื้องต้น

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยวิธี agar well diffusion assay ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Owais และคณะ (Owais *et al.*, 2003) โดยนำแบคทีเรียที่เลี้ยงใน Luria-Bertani (LB) broth (McFarland 0.5) มาเกลี่ยให้ทั่วบน LB agar ด้วย sterile cotton swab จากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.2 มม. เติมสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมความเข้มข้น 100 มก./มล. ปริมาณ 15 µl ลงในหลุม บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ช.ม. ตรวจวัดผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone

2.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

นำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมมาเจือจางแบบเจือจางลงทีละ 2 เท่า กับ Müller Hinton broth (MHB) ใน microwell plate ให้มีค่าความเข้มข้นระหว่าง 50-0 มก./มล.เติมเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* หรือ *A. sobria* (McFarland 0.5) ลงใน microwell plate (อัตราส่วน 1:1) บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ช.ม. จากนั้นนำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นมา streak ลงบน Müller Hinton agar (MHA) บ่มเลี้ยงเชื้อ อีกครั้งที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ช.ม. โดยในการทดลองจะทำการ streak เชื้อหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 24 ช.ม. จากนั้นวิเคราะห์ค่า minimal bactericidal concentration (MBC) โดยสังเกตค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ 99.99 % ที่ 2, 4, 8, 16, และ 24 ช.ม. ของการบ่ม (Zampini et al., 2005)

2.3 การยับยั้งการเจริญของเชื้อในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง

นำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมมาเจือจางแบบเจือจางลงทีละ 2 เท่า กับ Müller Hinton broth (MHB) ใน microwell plate ให้มีค่าความเข้มข้นระหว่าง 50-0 มก./มล. เติมเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* หรือ *A. sobria* (McFarland 0.5) ลงใน microwell plate (อัตราส่วน 1:1) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ทุก 2 ช.ม. เป็นเวลา 24 ช.ม. จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟเพื่อศึกษาลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดพืชสมุนไพรในช่วงเวลา 24 ช.ม.

3. การทดสอบกลุ่มสารเคมีเบื้องต้นในสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม ด้วยวิธี TLC phytochemical assay

นำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมมาขีดบนแผ่น TLC ที่เคลือบด้วย silica gel $60F_{254}$ เป็นระยะ 1 ช.ม. จากนั้นนำแผ่น TLC ใส่ในภาชนะปิดที่มีตัวทำละลาย (mobile phase) คือ chloroform : acetone : methanol : H_2O (1:7:4:5) เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 18 ช.ม. นำแผ่น TLC ออก และทิ้งให้แห้งในตู้ดูดควัน จากนั้นแบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยการบ่มกับเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* หรือ *A. sobria* เป็นเวลา 24 ช.ม. และสังเกตบริเวณ inhibition zone บนแผ่น TLC ส่วนที่ 2 นำไปพ่นด้วย Detecting agents เพื่อตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นในสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม โดยทำการทดสอบสารเคมีกลุ่ม tannins ด้วย vanillin-HCl (Ribereau-

Gayon, 1972), กลุ่ม sterol glycosides ด้วย 20% perchloric acid, กลุ่ม alkoloids ด้วย Iodine และ potassium iodide ใน glacial acetic acid, กลุ่ม coumarins ด้วย สารละลาย copper sulfate, anhydrous sodium carbonate และ sodium citrate (Stahl,1969), และกลุ่ม phenolic compounds ด้วย สารละลาย 5% Aluminium chloride ใน methanol (Wagner *et al.*, 1984) จากนั้นทำการเปรียบเทียบตำแหน่ง inhibition zone บนแผ่น TLC กับผลการวิเคราะห์กลุ่มสารเคมีในตำแหน่งเดียวกัน ทำให้ทราบว่าบริเวณ inhibition zone มีสารเคมีกลุ่มใด

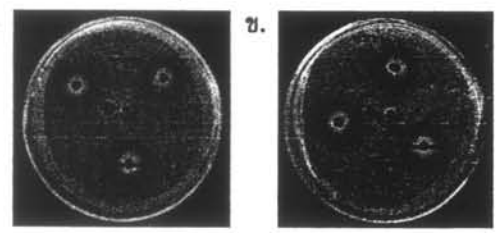
4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทดสอบกับไรน้ำเค็ม (Solis *et al.*, 1993)

ทำการฟักไข่ไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) ใน artificial sea water เป็นเวลา 48 ช.ม. จากนั้นนำ nauplii ที่ได้มาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม โดยทำการเจือจางสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมกับ artificial sea water แบบ เจือจางลงทีละ 2 เท่า ใน microwell plate โดยมีค่าความเข้มข้นระหว่าง 50-0 มก./มล. จากนั้นเติมสารละลายที่มี nauplii ของไรน้ำเค็มประมาณ 20 ตัว ลงในแต่ละหลุม ทำการตรวจนับจำนวน nauplii ด้วยกล้อง stereomicroscope ทุก ๆ 3 ช.ม. เป็นเวลา 24 ช.ม. และทำการคำนวณหาค่าความเข้มข้น ของสารที่ทำให้ nauplii ของไรน้ำเค็มตาย 50% (lethal concentration 50, LC_{50}) ที่ 24 ช.ม.

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

1. การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Aeromonas caviae และ *A. sobria* ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม

จากการศึกษาเบื้องต้นของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่สกัดด้วยน้ำ พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมปริมาณ 1.5 มก. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุกทั้ง 2 ชนิด คือ *A. caviae* และ *A. sobria* ได้ดี โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 15.7 ± 0.4 และ 18.5 ± 0.5 มม. ตามลำดับ (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นค่า inhibition zone ที่สูงกว่าค่าที่รายงานโดย ตรีชฎา และคณะ (2548) ที่พบว่าสารสกัดหยาบด้วยน้ำจากเปลือกผลทับทิมปริมาณ 2.5 มก. สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้ค่า inhibition zone ระหว่าง 6.05-7.15 มม. ซึ่งคาดว่าสารสกัดอาจให้ผลการยับยั้งที่แตกต่างกันตามชนิดของแบคทีเรีย แม้ว่าแบคทีเรียดังกล่าวต่างเป็นแบคทีเรียแกรมลบด้วยกันก็ตาม



รูปที่ 1 ลักษณะ inhibition zone ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมด้วยน้ำกลั่น (ก) ผลต่อเชื้อ *A. caviae* และ (ข) ผลต่อเชื้อ *A.sobria* ลูกศรคือน้ำกลั่นที่ใช้เป็น negative control

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมมาทดสอบหาค่า MBC พบว่าค่า MBC ของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria* ที่ 24 ช.ม. ของการบ่ม มีค่า 6.25 และ 12.50 มก./มล. ตามลำดับ โดย สารสกัด 6.25 มก./มล. สามารถฆ่าเชื้อ *A. caviae* ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 และสารสกัด 12.50 มก./มล.สามารถฆ่าเชื้อ *A. sobria* ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 (ตารางที่ 1) นอกจากนี้จากการทดลองพบว่ายาปฏิชีวนะ เตตร้าซัยคลินซึ่งใช้เป็น positive control ในการทดลองนี้ มีค่า MBC ต่อเชื้อ *A. caviae* และ *A. sobria* เท่ากับ 19.50 และ 312 ไมโครกรัม/ มล. ตามลำดับ ซึ่งค่า MBC ต่อเชื้อ *A. sobria* ที่มีค่าสูงมากนี้ทำให้คาดว่า *A. sobria* น่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรีย

ที่ดื้อต่อยาเตตร้าซัยคลิน แต่ *A. sobria* สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม

ในการทดลองนี้ไม่ได้ทดสอบผลของสารสกัดต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แต่มีรายงานโดย Voravuthikunchai และ Kitpipit (2003) ที่พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกผลทับทิมสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมธิซิลินจำนวน 35 สายพันธุ์ได้ โดยมีค่า MBC ระหว่าง 15.00-16.00 มก./มล. ดังนั้นสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมจึงเป็นสารสกัดชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรีย แกรมลบ และแกรมบวก และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ดื้อยาปฏิชีวนะบางชนิดได้

กราฟแสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* (Inhibition curve) ของสารสกัดหยาบด้วยน้ำจากเปลือกผลทับทิมแสดงในรูปที่ 2 พบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ (dose dependent response) นั่นคือเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดก็สูงขึ้นเช่นกัน

2. การทดสอบเบื้องต้นของกลุ่มสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม

จากการเปรียบเทียบตำแหน่ง inhibition zone บน แผ่น TLC กับผลการทดสอบสารเคมีในตำแหน่งดังกล่าวโดยใช้สารเคมีทดสอบสารในกลุ่ม tannins, sterol glycosides, alkoloids, coumarins และ phenolic compounds พบว่าสารเคมีในบริเวณดังกล่าวให้ผลบวกต่อสารในกลุ่ม sterol glycoside, tannins, และ phenolic compounds (ตารางที่ 2) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของตรีชฎา และคณะ (2548) ที่พบว่าสารสกัดเปลือกผลทับทิมมีสารในกลุ่มของ flavonoids, tannins, sterols, และ triterpenes ทั้งนี้ tannins และ steroids ที่พบในสารสกัดจากพืชหลายชนิดมีรายงานว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ (Bruyne *et al.*, 1999; Ramesh *et al.*, 2001) ดังนั้นการที่สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria* ได้นั้นน่าจะเนื่องจากสารสำคัญในกลุ่ม tannins, sterol glycosides, และ phenolic compounds

3. การทดสอบความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็ม

การใช้ไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) เป็นตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตในการทดสอบความเป็นพิษแบบ *in vivo* นั้น เป็นวิธีใหม่ที่สะดวกและให้ผลดีในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากธรรมชาติ จากการทดสอบความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมเริ่มทำให้ไรน้ำเค็มตายอย่างชัดเจน ในชั่วโมงที่ 18 แต่มีอัตราการตายที่ต่ำ (รูปที่ 3) จากการคำนวณค่า LC_{50} จากกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การตายของไรน้ำเค็มกับค่าความเข้มข้นของสารสกัด (รูปที่ 4) ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ช.ม. พบว่ามีค่าเฉลี่ยเป็น 15.80 มก./มล. ซึ่งค่าความเข้มข้นดังกล่าวมีค่าสูงกว่าค่า MBC ของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria* ซึ่งเท่ากับ 6.25 และ 12.5 มก./มล. ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมในความเข้มข้น MBC น่าจะสามารถใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งสองชนิดในปลาได้ เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มต่ำ

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดหยาบด้วยน้ำจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุก 2 ชนิด คือ *A. caviae* และ *A. sobria* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 15.7 ± 0.4 และ 18.5 ± 0.5 มม. ตามลำดับ และมีค่า MBC ต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria* ที่ 24 ช.ม. หลังการบ่ม เป็น 6.25 และ

12.50 มก./มล. ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์เบื้องต้นถึงกลุ่มของสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด พบว่าเป็นสารเคมีกลุ่ม sterol glycoside, tannins, และ phenolic compounds เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อไรน้ำเค็ม พบว่าสารสกัด มีค่า LC_{50} ที่ 24 ช.ม. เฉลี่ย 15.80 มก./มล. ซึ่งค่า LC_{50} มีค่าสูงกว่าค่า MBC ของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุกทั้ง 2 ชนิด จึงน่าจะสามารถใช้ในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคได้ดีเพราะมีความเป็นพิษต่ำ ดังนั้นการใช้สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมจึงน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการแก้ปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียในปลาดุกและอาจนำไปใช้แทนยาปฏิชีวนะ เช่น เตตร้าซัยคลิน เป็นต้น ที่อาจนำเป็นสู่การลดปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย ปัญหาสารตกค้างในเนื้อปลา รวมไปถึงเป็นการลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกร

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ใช้สารสกัดหยาบของเปลือกผลทับทิม ซึ่งการแยกบริสุทธิ์สารออกฤทธิ์และผลการทดลองในลูกปลาดุกกำลังอยู่ในขั้นดำเนินการ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ปี 2548

เอกสารอ้างอิง

เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธิ์. 2541. ทับทิม. นนทบุรี : ฐานเกษตรกรรม.

ตรีชฎา ศิริรักษ์ และคณะ. 2548. ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม (*Punica granatum*) ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคกลุ่ม Gram-negative bacilli. วารสารสงขลานครินทร์ วทท. 27 (ฉบับพิเศษ 1): 235-244.

Ahmad, I., et al. 1998. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. J. Ethnopharmacol. 62: 183-193.

Anesini, C., and Perez, C. 1993. Scanning of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol. 39: 119-128.

Bruyne, T.D., Pieters, L., Deelstra, H., and Vlietinck, A. 1999. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. Biochem. Syst. Ecol. 27: 445-459.

Guevara, J.M., Chumpitaz, J., and Valencia, E. 1994. The in vitro action of plants on Vibrio cholerae. Rev gastroenterol Peru. 14: 27-31.

Machado, T.B., et al. 2003. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Int J. Antimicrob Agents. 21: 279-284.

Owais, M., Sharad, K.S., Shehbaz, A.,and Saleemuddin, M. 2003. Antibacterial efficacy of *Withania somnifera* (ashwagandha) an indigenous medicinal plant against experimental marine salmonellosis. Phytomedicine. 12: 229-235.

Palu, A., et al. 2006. Antimicrobial resistance in food and clinical Aeromonas isolates. Food Microbiology. 23: 504-509.

Ramesh, N., et al. 2001. Phytochemical and antimicrobial studies on Drynaria quercifolia. Fitoterapia. 72: 934-936.

Ribereau-Gayon. 1972. Plant phenolics. Oliver and Boyd, Edinburga, 184.

Solis, P.N., et al. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). Planta Med. 59 (3): 250-252.

Stahl, E. 1969. Thin-Layer Chromatography. New York: Springer and Academic Press.

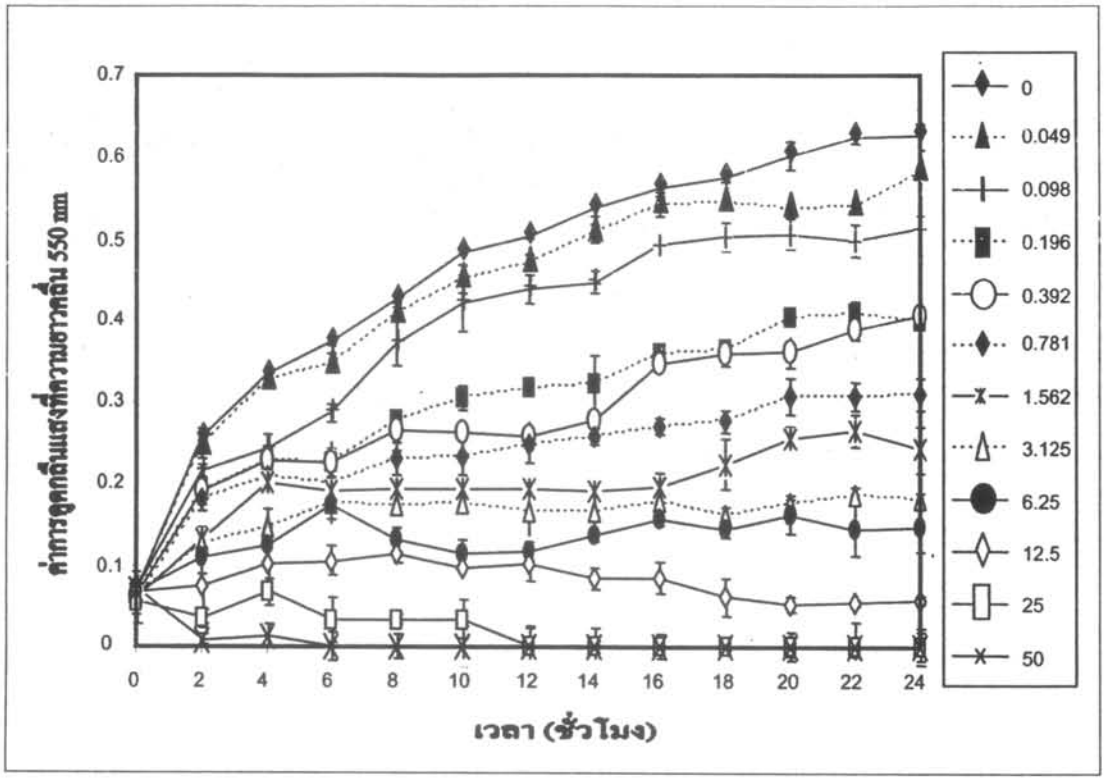
Voravuthikunchai, S.P., and Kitpipit, L. 2003. Activities of crude extract of Thai medicinal plants on methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J. Clin. Microbiol. Infect. 9 (suppl 1): 236.

Wagner, H., Bladt, S., and Zgainsky, EM. 1984. A thin Layer Chromatography. Berlin: Springer.

Zampini, I.C., Vattuone, M.A., and Isla, M.I. 2005. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. J. Ethnopharmacology 102: 450-456.

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้เมื่อศึกษาที่เวลา 2, 4, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมความเข้มข้น 0-50 มก./มล. (เจือจางลงทีละ 2 เท่า)

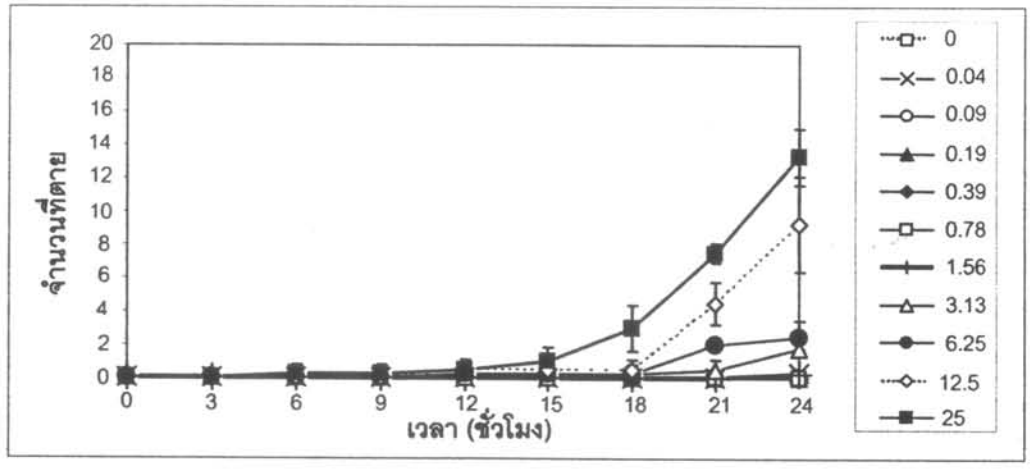
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิมที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (มก./มล.)	
	A. caviae	*A. sobria*
2	50	50
4	25	25
8	12.5	12.5
16	6.25	12.5
24	6.25	12.5



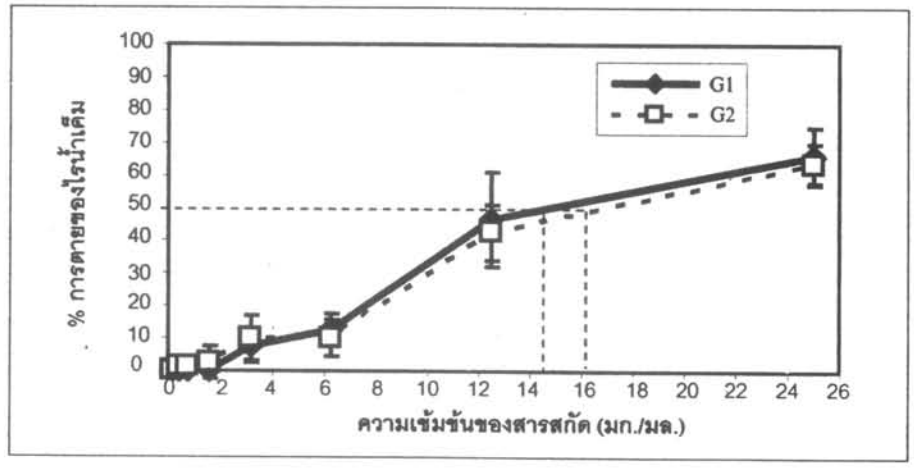
รูปที่ 2 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 0-50 มก./มล. ต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบกลุ่มสารเคมีของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

กลุ่มของสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ	ผลการทดสอบ
Tannins	+
Sterol glycosides	+
Alkoloids	-
Coumarins	-
Phenolic compounds	+



รูปที่ 3 จำนวนไรน้ำเค็มที่ตายเมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่ความเข้มข้น 0-25 มก./มล. โดยทำการตรวจนับทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4 เปอร์เซ็นต์การตายของไรน้ำเค็มเมื่อทดสอบกับสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกัน 2 ซ้ำ (G1 และ G2)

Proceedings of The
STT32 32nd Congress on Science and Technology of Thailand

O : Special Session

CONTENT

Home
About STT32
Invited Speakers
Contributed Papers
A: Math, Computing and IT
B: Biological Science
C: Chemistry
D: Physics
E: Materials Science
F: Agricultural Science
G: Food Science
H: Biomedical Science
I: Environment Science and Technology
J: Engineering and Technology
K: Science Communication and Education
M: Beauty and Cosmetics Science
N: Earth Sciences
O: Special Session
- Synchrotron Light and Applications
- Science and Technology of Thai Herbs
Author Index

No.	Title of Paper (Total = 28 Items)
O1_O0002	ATOMISTIC SIMULATION OF THE STRUCTURE of AMORPHOUS POLYSTYRENE
O1_O0003	MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIOn OF POLYETHYLENE OXIDE:POTASSIUM IODIDE ELECTROLYTES
O1_O0006	The structure of iron-STARCH.
O1_O0011	Angle-Resolved Photoemission Study of energy-band structure on Nickel (111)
O1_O0018	An Investigation of Clean p-type Gallium Nitride (0001) Surface Using Electron Spectroscopy Techniques at the Siam Photon Laboratory
O1_O0019	OXIDATION STATE INVESTIGATION OF SULFUR IN NATURAL AND SYNTESIS GLOVE BY X-RAY ABSORPTION SPECTROSCOPY (XAS)
O1_O0021	TRANSGENIC THALASSEMIA HEMOGLOBIN E FROM HUMANIZED MOUSE : X-RAY CRYSTALLOGRAPHIC AND FUNCTIONAL INVESTIGATION
O1_O0022	CRYSTAL STRUCTURE AND DIELECTRIC PROPERTIES OF A-SITE DOPED (Bi1-xYx)(MNb)O7 (M = Fe3+, In3+) Bi-PYROCHLORES
O2_O0001	In vitro permeation study of an extract of phyllanthus amarus using shed scale of Ophiophagus Hannah as a barrier
O2_O0004	The effect of medicinal plant extracts on cytoplasmic membrane of multidrug resistant bacteria by flow cytometry
O2_O0005	THAI MEDICINAL PLANT EXTRACTS POSSESSING ANTI-BACTERIAL ACTIVITY AGAINST CATFISH PATHOGENS, Aeromonas sobria
O2_O0007	FORMULATION OF ANTIFUNGAL CREAM FROM Impatiens balsamina Linn.
O2_O0008	The effects of crude extracted Kaemferia parviflora on human cholangiocarcinoma cells proliferation, metastasis and apoptosis
O2_O0009	Antimicrobial property of the essential oil and crude extract from Patchouli leaves (Pogostemon cablin)
O2_O0010	Determination of lipophilicity values of flavonoids using butanol-water system and calculation methods
O2_O0012	LACK OF GENOTOXIC ACTIVITY OF CURCUMA COMOSA EXTRACT ON MICRONUCLEUS FORMATION OF MOUSE BONE MARROW CELLS
O2_O0013	Acetylcholinesterase inhibitors From Feroniella lucida
O2_O0014	ANTIOXIDANT XANTHONES FROM Cratoxylum cochinchinense (Lour.) Blume
O2_O0015	ANTIRADICAL ACTIVITY OF VOLATILE OIL AND EXTRACT FROM THAI ZINGIBERACEOUS PLANTS.
O2_O0016	VERIFICATION OF THAI TRADITIONAL MEDICINE BY CHEMINFORMATICS
O2_O0017	Investigation on Antimicrobial Activity of Eclipta prostana Linn.
O2_O0020	HYDNOCARPUS ILICIFOLIA EXTRACTS FOR INHIBITION OF

FUSARIUM OXYSPORUM AND XANTHOMONAS CAMPESTRIS

O2_O0023 FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER STUDY OF QUERCETIN AND QUERCETRIN INTERACTION WITH BOVINE SERUM ALBUMIN IN PHYSIOLOGICAL SOLUTION: DETERMINATION OF BINDING CONSTRANTS AND BINDING SITES

O2_O0024 Screening of Thai Medicinal Plants for Antimalarial Activity

O2_O0025 IN VIVO IMMUNOMODULATING ACTIVITY OF WOOD EXTRACTS FROM CLAUSENA EXCAVATA BURM. F.

O2_O0026 Purification of polyphenols of Siamois? red wine and study of their efficacy of antiproliferative and apoptosis-inducing activity against erythromyelogenous leukemic and small cell lung carcinoma cell lines

O2_O0027 FREEZE-DRIED WHITE KWAO KRUA (PUERARIA MIRIFICA) POWDER PROCESSING

O2_O0028 APPLICATION OF MEDICINAL PLANT EXTRACTS FOR ANTI - PROPIONIBACTERIUM ACNES ACTIVITY

สารสกัดพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุก, *Aeromonas sobria*

THAI MEDICINAL PLANT EXTRACTS POSSESSING ANTI-BACTERIAL ACTIVITY AGAINST CATFISH PATHOGENS, *AEROMONAS SOBRIA*

ปวีณา วัดบัว[1], สินีนาฏ ศิริ[1], นิลุบล กิจอันเจริญ[2], และ ประสาท โพธิ์นิ่มแดง[3]

Paweena Wadbua[1], Sineenat Siri[1], Nilubol Kitancharoen[2], and Prasart Phonimdaeng[3]

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, Thailand.
E-mail:pawwad@hotmail.com, Fax: (6643) 342-911

[2] Department of Fishering, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, Thailand.

[3] Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, Thailand.

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุก (*Aeromonas sobria*) จากการทดสอบสารสกัด 82 ตัวอย่าง ที่สกัดด้วยน้ำและ 75% เอธานอล จากพืชสมุนไพรไทย 41 ชนิด พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากทับทิม (*Punica granatum*) ชมพู่ (*Eugenia javanica*) และมะคำไก่ (*Drypetes rexbughii*) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้สูงที่สุดตามลำดับ โดยมีค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ที่ 6.25, 12.50 และ 12.50 มก./มล. ตามลำดับ และมีค่า minimal bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดทั้งสามชนิดเท่ากันที่ 12.50 มก./มล. จากค่า MBC/MIC แสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย (bactericidal; ≤4) เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดทั้งสามด้วยวิธี TLC-bioautographic และ TLC-chemical assays พบว่าสารออกฤทธิ์ของสารสกัดทับทิมที่แยกบนแผ่น TLC เป็นสารในกลุ่ม phenolic/flavonoid compounds และ steroids ส่วนในชมพู่เป็นสารในกลุ่ม steroids และ proantrocyanidins และในมะคำไก่เป็นสารในกลุ่ม steroids.

Abstract: This research was to study the effect of Thai medicinal plant extracts against bacterial pathogens of catfish, *Aeromonas sobria*. Eighty-two samples both extracted in water and 75% ethanol derived from 41 species of Thai medicinal plants were tested by agar well diffusion assay. The water-extracted samples of pomegranate (*Punica granatum*), rose apple (*Eugenia javanica*), and Ma-kum-kai (*Drypetes rexbughii*) exhibited the highest antibacterial activities, orderly. Their minimal inhibitory concentration (MIC) values were 6.25, 12.50, and 12.50 mg/ml, respectively. The minimal bactericidal concentration (MBC) values of all three extracts were at 12.50 mg/ml. The MBC/MIC values of these plant extracts indicated that they were bactericidal (≤4). The primary analyses of their active chemicals were carried out by TLC-bioautographic and TLC-chemical assays. The antibacterial components of *P. granatum* extract separated on TLC plate were classified in phenolic/flavonoid and steroid groups. Active components of *E. javanica* extract were tested positively to steroids and proantrocyanidins, while steroids were the active components of *D. rexbughii* extract.

Introduction: The curative of bacterial-infected fish by antibiotics was commonly used and quiet effective in the past years. However, recently, there has been reported of increasing numbers of antibiotic resistant bacterial strains, resulting. in higher dose uses to control

diseases in fish farming (1). Thus, the antibacterial activity of some medicinal plants is one of the interested topics in searching for alternative compounds to control fish pathogens. In Thailand, many plants have been long used as the human medicines and later proved to possess antibacterial activity (2-4). We are hypothesized that these medicinal plants may also possess activity against bacterial pathogens of fish. Thus, the present study was conducted to screen 82 extracts derived from 41 Thai medicinal plant species for the antibacterial activity against the catfish pathogen, *Aeromonas sobria*. In addition, the primary study on their active components was carried out.

Methodology: Forty-one species of local medicinal plants were collected in Khon Kaen province of Thailand from March to May, 2006. Extracts were prepared from 25g of fresh sample per 100 ml of water or 75% ethanol. The extracts were lyophilized, resuspended in either water or DMSO to make a final concentration of 100 mg/ml, and filtered through a 0.22 µm filter. The antibacterial activity of 82 samples against *A. sobria* was screened by the modified agar well diffusion assay (5). Fifteen µl of 100 mg/ml plant extracts were filled into 3.2 mm diameter wells and inhibition zones were measured after incubated at 30^0C for 24 h. The plant extracts with inhibitory zones at least 14 mm in diameter were chosen for the further studies. MIC and MBC values of the plants extracts were determined by the standard broth dilution method (6), using the extracts of 0.049-50 mg/ml (2-fold serial dilution) and the incubation at 30^0C for 24h. The active components of the extracts were analyzed by TLC-bioautographic and TLC-chemical assays (7). The antibacterial zones on TLC plates were tested with reagents reacted to alkaloids, steroids, proantrocyanidins, phenolic/flavonoid compounds, coumarins/flavonoids, and cardiac glycoside.

Results, Discussion, and Conclusion: In the initial screening by agar well diffusion assay, 24 of 82 crude extracts from 41 plant species exhibited activity against *A. sobria.* The water-extracts derived from pomegranates (*Punica granatum*), rose apples (*Eugenia javanic*a), and Ma-kum-kais (*Drypetes rexbughii*) possessed the highest antibacterial activities, orderly. The MIC values of *P. granatum*-, *E. javanic*a-, and *D. rexbughii*-extracts against *A. sobia* were 6.25, 12.50, and 12.50 mg/ml, respectively. The MBC values of all three extracts were at 12.50 mg/ml. The MBC/MIC values of all extracts were less than 4, indicating their bactericidal activities. Tetracycline, a positive control, showed the same values of MIC and MBC at very high concentration of 312 µg/ml, suggesting that the isolated *A. sobria* was likely the tetracycline-resistant strain. To obtain the primary information on the active components, the extracts were analyzed by TLC-bioautographic and TLC-chemical assays. The antibacterial components of *P. granatum* extract were classified as steroids and phenolic/flavonoids. The active components of *E. javanic*a extract were steroids and proantrocyanidins. Steroids were the active components found in *D. rexbughi* extract. Steroid, tannin, phenolic, and flavonoid compounds have been identified as the antibacterial components of *P. granatum*, which our results were in a good agreement (8-10). Up to our knowledge, no report was found on the active components in *E. javanic*a and *D. rexbughi.* The results of this works suggested that these three plant species could be potential sources of antibacterial agents against catfish-infected bacteria.

References:

(1) Palu, A., Gomes, L., Miguel, M., Balassiano, I., Queiroz, M., Freitas-Almeida, A., and Oliver, S. (2006) *Food Microbiology*. 23, 504-509.

(2) Medicinal plant database, Mahidol university, from http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/index.html.

(3) Dung, T.T. (1996) *Selected Herb Extracts on Aeromonas Hydrophila Isolated from Hybrid Catfish (Clarias macrocephalusx C.gariepinus)*, from http://www.aquain formation.ait.ac.th/ aarmpage/Resources/Newsletterontent.asp?IssueNo=23&refer=17.
(4) Hleaungsakul, S. (1987) *Antibacterial activity of some of Thai medicinal plants*, Department of biology, Faculty of science, Srinakarinwirot university (Prasarnmit campus).
(5) Owais, M., Sharad, K. S., Shehbaz, A., and Saleemuddin, M. (2003) *Phytomedicine*. **12**, 229-235.
(6) National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997) *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria*, Pennsylvania, USA.
(7) Zampini, I. C., Vattuone, M. A., and Isla, M. I. (2005) *Journal of Ethnopharmacology*. **102**, 450-456.
(8) Machado, T. B., Leal, I. C. R., Ameral, A. C. F., Santos, K. R. N., Silva, M. G., and Kuster, R. M. (2002) *J. Braz. Chem. Soc.* **13**, 606-610.
(9) Sirirak, T., Supavita, T., Panthong K., and Voravuthikunchai, S. (2005) *J. Sci. Technol.* **27**, 535-544.
(10) Supayang, P., Voravuthikunchai, S., Treechada, S., Surasak, L., Thanomjit, S., Tersuya, I., Takeshi, H. (2005) *Journal of health science*. **51**, 590-596.

Keywords: Thai medicinal plants, antibacterial activity, phytochemical components, *Aeromonas sobria*

Organized by

Program
Abstracts and Proceedings

1st Biochemistry and Molecular Biology (BMB) Conference
Biochemistry and Molecular Biology
for the Integration of Life

April 26-27, 2007
Bangkok, Thailand

Sponsored by

NSTDA

P3-16

THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SYZYGIUM JAVANICA EXTRACT ON CATFISH INFECTED BACTERIA, *Aeromonas caviae* AND *Aeromonas sobria*

Paweena Wadbua[1], Sineenat Siri[1], Nilubol Kitancharoen[2], and Pranom Chantaranothai[1]

[1]Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen; [2]Faculty of Fisheries, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
Tel +66-43-342911; Fax +66-43-342911; E-mail: ssinee@kku.ac.th

Many Thai medicinal plants have been studied for their antibacterial activities against human pathogens. However, little has been done on fish pathogens. Thus, antibacterial activities of plant extracts against various fish pathogens were the focus of our research interest. Previously, we reported that the extract of guava (*Psidium guajava*) leaf, possessed antibacterial activity against 2 strains of catfish-infected bacteria, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria*. In this work, we showed that crude extract of rose apple (*Syzygium javanica*) leaf, which belonged to the same family of Myrtaceae, also possessed anti-*A. caviae* and anti-*A. sobria* activities. The inhibition zones of rose apple extract against *A. caviae* and *A. sobria* were 14.9±0.5 and 17.1±0.1 mm, respectively. The values of inhibition zone of rose apple and guava extracts against *A. caviae* were similar, but rose apple extract showed the greater value of inhibition zone against *A. sobria*. The minimal inhibitory concentration (MIC) values of rose apple extract against *A. caviae* and *A. sobria* were 3.13 and 6.25 mg/ml, respectively. The minimal bactericidal concentration (MBC) against both bacterial strains were equal at 12.50 mg/ml. In addition, thin layer chromatography (TLC) with phytochemical and bioautographic studies showed that the antibacterial zones of rose apple extract on TLC plate were positive to tannins and sterol glycosides. The in vivo cytotoxicity of rose apple extract on brine shrimp (*Artemia salina*) was also investigated and the average of lethal concentration 50 (LC_{50}) value evaluated at 24 h of incubation was 17.76 mg/ml, which was higher than the MIC and MBC values against both bacteria. Thus, these results suggested that the extract of rose apple leaf is bactericidal against *A. caviae* and *A. sobria* and perhaps may be used to control fish diseases caused by both bacterial strains in fish farming.

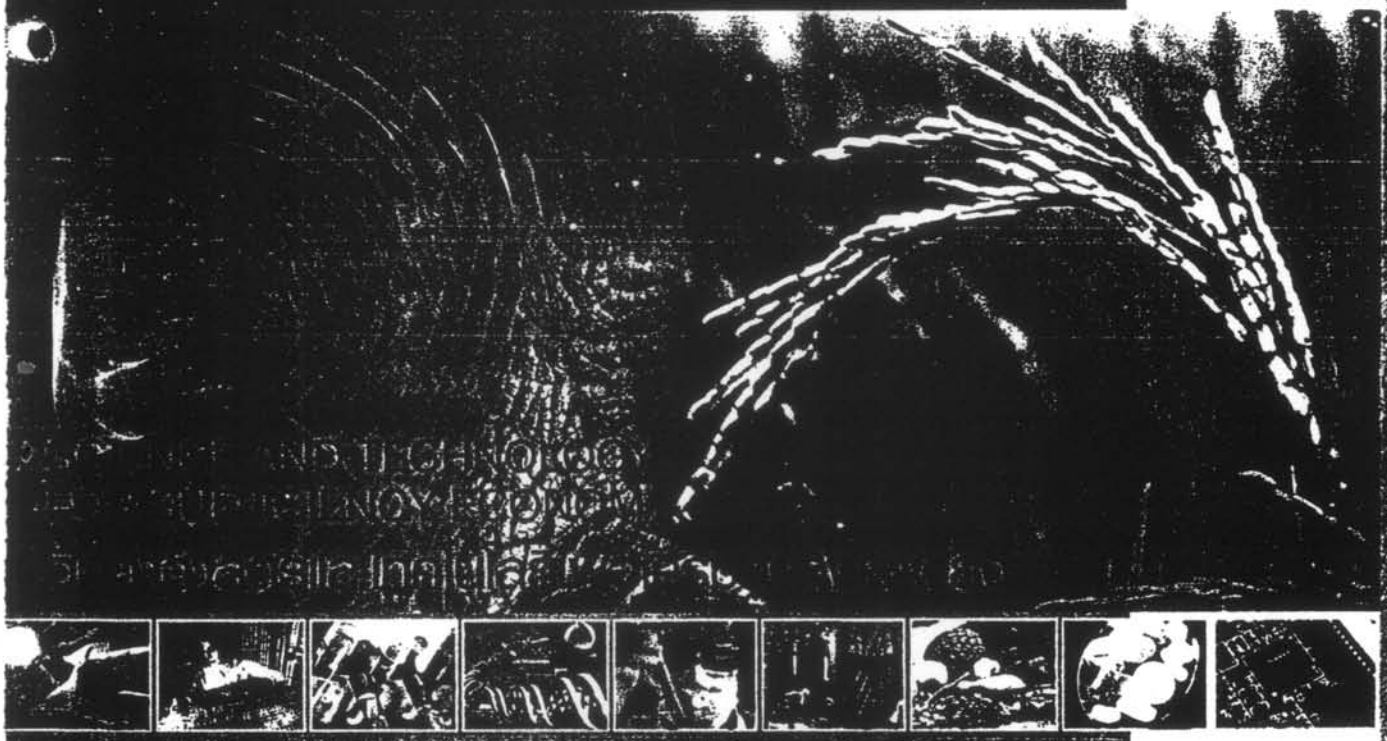
Supported by the research grant of Khon Kaen University.

Keywords: antibacterial activity, catfish, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*

Abstracts
บทคัดย่อ

32nd Congress on Science and Technology of Thailand (STT.32)

การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 32 (วทท.32)



To celebrate the 60th Anniversary of His Majesty the King's Accession to the Throne

เฉลิมฉลองการครองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี ของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว

October 10-12, 2006

Venue: QUEEN SIRIKIT NATIONAL CONVENTION CENTER (QSNCC)

10-12 ตุลาคม 2549 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์

WWW.STT32SCISOC.OR.TH

หอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยขอนแก่น

composite $Bi_2Fe_{0.5}In_{0.5}NbO_6$ (BFIN) intermediate was also synthesized to optimize associated dielectric properties.

O2_O0001 *In vitro* permeation study of an extract of *Phyllanthus amarus* using shed scale of *Ophiophagus Hannah* as a barrier

Aroonsri Priprem[1], Sarayut Radapong[2], and Srisomporn Preeprame[1]
[1] Faculty of Pharmaceutical sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.
[2] Graduate student in Master of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

Abstract: *In vitro* permeation study of *Phyllanthus amarus* extract using shed snake scale as a barrier membrane, side-by-side diffusion cells with a controlled temperature at 32°C and UV spectrophotometric analysis at a λmax of 277 nm. After 4 h, permeants were observed in the receptor. Qualitative analysis by TLC showed several band colors under UV light at 254 and 366 nm. HPTLC of the permeants at 4 h gave 2 out of 8 peaks at Rf values of 0.42 and 0.72 with an extent of permeation of 2.4 and 0.25%, repectively. It is concluded that the extract of *P. amarus* could permeate the barrier and each component permeated differently.

O2_O0004 The effect of medicinal plant extracts on cytoplasmic membrane of multidrug resistant bacteria by flow cytometry

Wisatre Kongcharoensuntorn[1], Chintana Chirathaworn[2], Wipaphorn Jaikua[1], Atinop Pongpanich[1]
[1] Department of Biology, Burapha University, Bangsaen, Chonburi, 20131, Thailand
[2] Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 10330

Abstract: The *Dracaena loureiri* Gapnep., *Myristica fragrans* Houtt. and *Mansonia gagei* Drumm. were investigated for their abilities to enhance bacterial permeability by flow cytometry. This experiment exhibited enhancement of herb extracts to disrupt the cytoplasmic membrane of living bacterial cells. The membrane - impermeant nucleic acid stain of ethidium bromide of *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* were tested by FACscan flow cytometry. The varied concentration of herb extracts were tested theirs ability to enhance permeability of multidrug resistant bacteria. The results indicated that herb extracts could promote intracellular accumulation of ethidium bromide in both strains of multidrug resistant bacteria. In the treatment of crude extracts to *Acinetobacter baumannii* the lowest concentration of *D. loureiri* Gapnep., *M. fragrans* Houtt. and *M. gagei* Drumm. that showed the brighter signal and uniformly fluorescent were 0.1, 0.05 and 5 mg/ml, respectively. Also, the treatment with 0.1 mg/ml of *D. loureiri* Gapnep or *M. fragrans* Houtt. enhanced bacterial permeability of ethidium bromide into cell membrane of MRSA.

O2_O0005 THAI MEDICINAL PLANT EXTRACTS POSSESSING ANTI-BACTERIAL ACTIVITY AGAINST CATFISH PATHOGENS, *AEROMONAS SOBRIA*

Paweena Wadbua[1], Sineenat Siri[1], Nilubol Kitancharoen[2], and Prasart Phonimdaeng[3]
[1] Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, Thailand.
E-mail:pawwad@hotmail.com, Fax: (6643) 342-911
[2] Department of Fishering, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, Thailand.
[3] Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, Thailand.

Abstract: This research was to study the effect of Thai medicinal plant extracts against bacterial pathogens of catfish, *Aeromonas sobria*. Eighty-two samples both extracted in water and 75% ethanol derived from 41 species of Thai medicinal plants were tested by agar well diffusion assay. The water-extracted samples of pomegranate (*Punica granatum*), rose apple (*Eugenia javanica*), and Ma-kum-kai (*Drypetes rexbughii*) exhibited the highest antibacterial activities, orderly. Their minimal inhibitory concentration (MIC) values were 6.25, 12.50, and 12.50 mg/ml, respectively. The minimal bactericidal concentration (MBC) values of all three extracts were at 12.50 mg/ml. The MBC/MIC values of these plant extracts indicated that they were bactericidal (≤4). The primary analyses of their active chemicals were carried out by TLC-bioautographic and TLC-chemical assays. The antibacterial components of *P. granatum* extract separated on TLC plate were classified in phenolic/flavonoid and steroid groups. Active components of *E. javanica* extract were tested positively to steroids and proantrocyanidins, while steroids were the active components of *D. rexbughii* extract.

O2_O0007 FORMULATION OF ANTIFUNGAL CREAM FROM *Impatiens balsamina* Linn.

Chanthira Kaewthong[1], Somsak Wongwan[2], Watcharee Netisingha[3], Suwanna Vejabhikul[3], Pongpant Netisingha[4]
[1] Pharmacy Section, Srimahaphot Hospital, Prachinburi,Thailand
[2] Pharmacy Section, Bang-rakam Hospital, Phitsanulok
[3] Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.
[4] Department of Pharmaceutical Care, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

Abstract: The purpose of this study was to prepare an antifungal cream from *Impatiens balsamina* Linn (Ib). The dried leaves were macerated in methanol and the extract was reextracted with chloroform. The final extract was tested by agar diffusion method for its antifungal activity against *Trichopyton rubrum* and *Trichopyton mentagrophytes* and the optimum concentration to be used in Ib cream which was found to be 20%. Three formulations of 20% Ib creams were then prepared using the selected bases and tested for antifungal activity against the 2 organisms mentioned in comparison with the 2% ketoconazole cream available in the market. It was found that the three Ib creams possessed higher antifungal activity than the proprietary preparation. The results suggested the potential of Ib cream to be further developed into an effective antifungal cream.