Research Article

Received: August 27, 2020; Accepted: April 1, 2021

ประสิทธิภาพสารสกัดกากหมากเม่า (*Antidesma* spp.) ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์ปีก

Efficacy of Mak Mao (*Antidesma* spp.) Residue Extract for Inhibiting Bacterial Pathogen in Poultry

สุขุมาภรณ์ ศรีเผด็จ* และอรรถพล ศรีโสภา

ภาควิชาเกษตรและทรัพยากร คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร ตำบลเชียงเครือ อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร 47000

Sukumaporn Sriphadet* and Attaphon Srisopa

Department of Agricultural and Resources, Faculty of Natural Resources and Agro-Industry, Kasetsart University, Chalermphrakiat Sakon Nakhon Province Campus, Chiang Khruea, Muang, Sakon Nakhon 47000

บทคัดย่อ

หมากเม่าเป็นผลไม้ที่เกิดขึ้นในแถบจังหวัดสกลนคร อุดรธานี กาฬสินธุ์ มุกดาหาร และนครพนม แถบเทือกเขาภูพาน จังหวัดสกลนคร ผลหมากเม่าสุกมีสีม่วงแดงเข้ม ซึ่งเป็นสีของรงควัตถุ anthocyanin และมีคุณค่าทางโภชนาการ มีกรดอะมิโนที่ร่างกายต้องการจำนวนมาก อีกทั้งยังมีแคลเซียม เหล็ก สังกะสี และวิตามินต่าง ๆ ที่ช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี และกากหมากเม่ายังมีรงควัตถุ anthocyanin และเยื่อใย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดกากหมากเม่าที่สำคัญในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในไก่ ได้แก่ *Escherichia coli, Bacillus cereus* และ *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial experiments in CRD จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าสารสกัดกากหมากเม่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง รวมถึงระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhimurium ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ *B. cereus* และ *E. coli* ตามลำดับ ซึ่งค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งเชื้อ คือ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : แบคทีเรียก่อโรค; สารสกัดหมากเม่า; สัตว์ปีก

Abstract

Mak Mao is a fruit found in Sakon Nakhon, Udon Thani, Kalasin, Mukdahan, and Nakhon Phanom, especially in the Phu Phan mountain range in Sakon Nakon province. The ripe fruit is dark

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** sukumaporn.s@ku.th

purple, which is the color of anthocyanin pigment and nutritional value due to the high amount of amino acids the body needs. It also contains calcium, iron, zinc, and vitamins that help anti-free radicals as well. Mak Mao residue also contains anthocyanin pigment, phenolic compound, and fiber. This study of the efficiency of Mak Mao residue extracts on the inhibition of pathogenic microorganisms includes *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, and *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium at the laboratory level. The experimental design is factorial experiments in CRD with three replications. It was found that the extracts of the Mak Mao residue extract showed the highest activity against *S.* Typhimurium, followed by *B. cereus* and *E. coli*, respectively. The minimum concentration or MIC of Mak Mao residue extracts toward *Salmonella* Typhimurium, *B. cereus*, and *E. coli* were 25 milligrams per milliliter.

Keywords: pathogenic microorganism; Mak Mao extract; poultry

1. บทนำ

หมากเม่า (*Antidesma* spp.) เป็นผลไม้พื้นเมืองในจังหวัดสกลนคร อุดรธานี กาฬสินธุ์ มุกดาหาร และนครพนม โดยเฉพาะบริเวณเทือกเขาภูพาน ผลหมากเม่าสุกเต็มที่มีรสเปรี้ยว ฝาด และหวานปนกัน น้ำคั้นจากผลหมากเม่าสุกเป็นสีม่วงแดงเข้ม ซึ่งเป็นสีของแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ที่เป็นรงควัตถุ (pigment) มีสารสีแดง ม่วง และน้ำเงิน จัดเป็นสารให้สี (coloring agent) ตามธรรมชาติในอาหาร แอนโทไซยานินมีสมบัติเป็นโภชนะเภสัช (nutraceutical) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ ช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและเส้นเลือดอุดตันในสมองด้วยการยับยั้งไม่ให้เลือดจับตัวเป็นก้อน ชะลอความเสื่อมของดวงตา ช่วยยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และทนทานต่อการเปลี่ยนสีในกระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร [1,2] อีกทั้งผลหมากเม่าสุกมีสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีแคลเซียม เหล็ก สังกะสี และวิตามินต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี [3] ปัจจุบันสินค้าและผลิตภัณฑ์จากหมากเม่ามีความนิยมเพิ่มสูงขึ้นจากกลุ่มคนรักษ์สุขภาพ จึงทำให้มีการปลูกหมากเม่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการนำผลหมากเม่ามาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์หลากหลายรูปแบบ ได้แก่ น้ำหมากเม่า ไวน์หมากเม่า แยมหมากเม่า สบู่และโลชั่นจากหมากเม่า เป็นต้น โดยเฉพาะน้ำหมากเม่าเป็นสินค้า GI ของจังหวัดจังหวัดสกลนคร [4] จนทำให้สินค้าจากหมากเม่าเป็นที่รู้จักไปทั่วประเทศ ซึ่งการผลิตสินค้าและผลิตภัณฑ์จากหมากเม่านั้น สิ่งที่เหลือจากกระบวนการผลิต คือ กากหมากเม่าที่ประกอบไปด้วยเมล็ด เส้นใย และรงควัตถุ anthocyanin จึงควรมีการนำสิ่งเหลือจากอุตสาหกรรมการแปรรูปหมากเม่ามาเพิ่มมูลค่า เนื่องจากหมากเม่าปลูกในระบบเกษตรอินทรีย์ จึงสามารถนำกากเม่ามาใช้ในระบบการผลิตไก่อินทรีย์ โดยแอนโทไซยานินสามารถออกฤทธิ์เพื่อฆ่าแบคทีเรีย การลดอาการอักเสบ การลดความเครียด ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากอาหาร [5] ซึ่งการเลี้ยงไก่ในประเทศไทยนั้นประสบกับโรคอหิวาต์ไก่ โดยจัดเป็นโรคร้ายแรงชนิดหนึ่งที่เกิดจากแบคทีเรีย ทำให้ไก่มีอาการหงอย ซึม เบื่ออาหาร กระหายน้ำ ท้องร่วง อุจาระมีสีเหลือง และอาจทำให้ถึงตายได้ [6] การใช้กากหมากเม่าซึ่งมีสมบัติโภชนะเภสัชย่อมส่งผลให้ไก่มี

สุขภาพแข็งแรงขึ้น จึงควรมีการนำกากหมากเม่ามาทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดกากหมากเม่าในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์ปีก ซึ่งสามารถนำมาเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับกากหมากเม่าได้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การสกัดสารสกัดหยาบ

นำกากหมากเม่าจากการแปรรูป 5 กิโลกรัม อบแห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นให้ละเอียด แช่เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % อัตราส่วน 1:1 (w/v) ปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ในที่มืด 7 วัน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 แล้วนำส่วนของเหลวไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที จนได้สารสกัดหยาบ (crude extract) เก็บในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกากหมากเม่า

นำกากหมากเม่าที่ปั่นให้ละเอียดมาวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินท์ วิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (drying method) โดยวิธี AOAC (2020) [7] วิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยใช้เครื่อง Soxhlet วิเคราะห์ปริมาณเส้นใย วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจลดาห์ล วิเคราะห์ปริมาณเถ้า (dry ashing) และวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต

2.3 การศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดกากหมากเม่าในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

2.3.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

โดยทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth (TSB) ที่ปรับค่า pH เป็น 7.3 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำเชื้อที่ต้องการทดสอบที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มาเขี่ยโคโลนีประมาณ 4-5 โคโลนี ใส่ในอาหารเหลว TSB เขย่าเพื่อให้เชื้อกระจายตัวออกจากกันแล้วนำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่า absorbance อยู่ที่ 0.3 (จำนวนเซลล์ 10^6 CFU/mL) [8]

2.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี agar disc diffusion

ทำตามแผนการทดลองแบบ factorial experiments in CRD ประกอบด้วยปัจจัยที่ 1 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และปัจจัยที่ 2 ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากกากหมากเม่า 5 ระดับ ได้แก่ 60, 70, 80, 90 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งการทดลองนี้ใช้ sodium chloride ปรับระดับความเข้มข้นของสารสกัดให้ได้ตามระดับที่กำหนด จึงใช้ sodium chloride เป็น control โดยนำแบคทีเรีย *Escherichia coli, Bacillus cereus* และ *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium ที่ได้จากการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มา swab บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) แล้วนำกระดาษกรอง Whatman® No.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (paper disc) ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วชุบสารสกัดกากหมากเม่าที่มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ 5 ระดับ ได้แก่ 60, 70, 80, 90 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ sodium chloride วางบนอาหารที่ปลูกแบคทีเรีย *E. coli, B. cereus* และ *S.* Typhimurium ด้วยวิธี spread plate เพื่อให้เชื้อทั่ว

ผิวอาหารและเจริญบนผิวอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ TSA โดยให้เชื้อที่เจริญเป็นคราบเต็มผิวหน้าอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งศึกษาตัวอย่างละ 10 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เชื้อไม่เจริญเติบโต (inhibition zone) โดยใช้หน่วยวัดเป็นเซนติเมตรด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ (Vernier caliper) [9]

2.3.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ

นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 2.3.2 มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดกากหมากเม่าที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (minimum inhibitory concentration, MIC) โดยเตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางเป็นลำดับส่วนจะได้ความเข้มข้นของสารสกัดดังนี้ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน positive control เป็นหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีสารสกัด เติมแบคทีเรียที่เตรียมไว้ใส่ทุกหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสด้วยเครื่อง incubator นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกผล MIC สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีแบคทีเรียเจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนั้นเป็นค่า MIC บันทึกหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเครื่องหมาย - หมายถึง แบคทีเรียไม่เจริญ มีตะกอน สารละลายใส และเครื่องหมาย + หมายถึง แบคทีเรียมีเจริญปานกลาง มีตะกอน และสารละลายขุ่น

2.3.4 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ

การหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหลวนั้น สามารถนำมาหาค่า minimal bactericidal concentration (MBC) โดยนำหลอดที่ทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อจะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเชื้อมีชีวิตจะพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

เมื่อนำกากหมากเม่าประกอบด้วยเมล็ดและเยื่อใยที่เหลือจากการทำน้ำหมากเม่ามาวิเคราะห์หาองค์ประกอบ พบว่ากากหมากเม่ามีปริมาณแอนโทไซยานินท์ 187.49 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีความชื้น 4.45 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 1.85 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 12.04 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใย 19.84 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า 4.39 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) โดยมีรายงานว่ากากหมากเม่ามีปริมาณแอนโทไซยานินท์ 99.00-372.39 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งผลสีดำมีแอนโทไซยานินท์สูง ส่งผลให้มีสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าผลสีแดง [10,11] หมากเม่าเป็นพืชที่มีปริมาณไขมันน้อย (1.35-2.80 เปอร์เซ็นต์) จึงเหมาะสมกับการนำมาเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ ส่วนปริมาณเยื่อใยกากหมากเม่า 14.39 -23.42 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจต่างกันในช่วงของระยะการเก็บเกี่ยวผลผลิต ผลไม้สุกจะพบเยื่อใยมากกว่าผลไม้ดิบ [11,12] อีกทั้งกากหมากเม่าจากน้ำคั้นสดมีโปรตีน 10.97 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกากหมากเม่าจากไวน์มีโปรตีน 11.61 เปอร์เซ็นต์ และกากหมากเม่ามีคุณค่าทางโภชนะการอยู่ในระดับพอใช้ โดยกากหมากเม่ามีโปรตีนรวม 10.7 เปอร์เซ็นต์ กากหมากเม่ามีโปรตีนค่อนข้างสูงสามารถเป็นส่วนประกอบในอาหารสัตว์ [12] เนื่องจากผลหมากเม่าเป็นผลมีเนื้อสด (fleshy fruit) มีปริมาณน้ำในผลมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณเถ้ามีสหสัมพันธ์เชิงลบกับความชื้นและขนาดผล ส่งผลให้พบปริมาณเถ้าน้อย (ประมาณ 4.30 เปอร์เซ็นต์) [13]

Table 1 Chemical compositions of Mak Mao residue from juice industry

Chemical compositions	Mak Mao residue
Anthocyanin (mg/L)	187.49
Moisture content (%)	4.45
Fat content (%)	1.85
Fiber content (%)	19.84
Protein content (%)	12.04
Ash content (%)	4.39
Carbohydrate content (%)	57.43

Table 2 Effectiveness of inhibition of pathogenic microorganisms

Pathogenic microorganisms	Inhibition zone (cm)
Escherichia coli	0.22[c]
Bacillus cereus	0.65[b]
Salmonella Typhimurium	0.70[a]
Mean	0.52
F-test	**
C.V.	12.94

Means in the same column followed by the same letter are not significantly different at $p \leq 0.05$ by DMRT; ** = significantly different at 0.01 level of probability.

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด ในสัตว์ปีก ได้แก่ *E. coli, B. cereus* และ *S.* Typhimurium ด้วยวิธี agar disk diffusion (ตารางที่ 2) พบว่าสารสกัดจากกากหมากเม่าสามารถยับยั้งแบคทีเรีย 3 ชนิด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับความเชื่อมัน 99 % โดยสารสกัดจากหมากเม่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhimurium มากที่สุด เกิด inhibition zone 0.70 เซนติเมตร เป็นแบคทีเรียก่อโรค Salmonellosis ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ (infection) ในระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดอาการลำไส้อักเสบ [14] รองลงมา คือ *B. cereus* เกิด inhibition zone 0.65 เซนติเมตร สามารถสร้างสารพิษที่ทนต่อความร้อนเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางในร่างกายมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ [14] และ *E. coli* เกิด inhibition zone 0.22 เซนติเมตร เป็นเชื้อที่กระตุ้นให้อาการของโรคท้องเสียรุนแรงมากขึ้น สารสกัดกากหมากเม่ามีสารประกอบฟีนอลิกหรือสารประกอบฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นกลุ่มสารออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคทั้งในกลุ่มแกรมลบและแกรมบวก [15,16] อีกทั้งสารสกัดกากหมากเม่ามีสรรพคุณที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค จึงสามารถใช้เป็นยารักษาโรคในคนและสัตว์ได้ [17] และหมากเม่ามีสารประกอบฟีนอลิกจึงสามารถใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารสัตว์ เพื่อส่งเสริมให้สัตว์ปีกมีสุขภาพที่แข็งแรงและลดการใช้ยาปฏิชีวนะ

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากหมากเม่าที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อนโรค พบว่าระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากหมากเม่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับ 99 % โดยระดับความเข้มข้นที่ 60-100 % สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด (ตารางที่ 3) สารสกัดจากหมากเม่าที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด ได้ดีที่สุด โดยมีฤทธิ์การยับยั้ง 0.93 เซนติเมตร รองลงมาที่ระดับ 90, 80, 70 และ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 0.84, 0.64, 0.36 และ 0.35 เซนติ เมตร ตามลำดับ ขณะที่ชุดควบคุมไม่เกิดการยับยั้งพบแบคทีเรียก่อโรค

เจริญอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เนื่องจากสารสกัดหมากเม่ามีสารกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกและ ฟลาโวนอยด์ โดยผลการวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลทั้งหมด และสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบในตัวอย่างของสารสกัด ซึ่งมีประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ และสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียได้ [8,18]

Table 3 Concentrations of Mak Mao extract inhibits pathogenic microorganisms

Concentrations of Mak Mao extract (mg/mL)	Inhibition zone (cm)
0	0.00^{e}
60	0.35^{d}
70	0.36^{d}
80	0.64^{c}
90	0.84^{b}
100	0.93^{a}
Mean	0.52
F-test	**
C.V.	12.94

Means in the same column followed by the same letter are not significantly different at $p \leq 0.05$ by DMRT; ** = significantly different at 0.01 level of probability.

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด ต่อระดับความเข้มข้นของสารสกัดหมากเม่าที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4) พบว่าศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียในแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับ 99 % ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด มีระดับการยับยั้งที่ 0.00-1.07 เซนติเมตร เมื่อสังเกตที่ระดับความเข้มข้นที่ 90 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค แต่ที่ระดับความเข้มข้น 60-80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า *E. coli* มีค่าต่างไปจาก *B. cereus* และ *S.* Typhimurium เนื่องจาก *B. cereus* และ *S.* Typhimurium มีความไวต่อสารสกัดหมากเม่ามากกว่า *E. coli* จึงทำให้มีค่าที่แตกต่างกันทางสถิติ เนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดในแต่ละระดับมีความเข้มข้นของสารกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์ที่ต่างกัน จึงมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด ซึ่งมีการยืนยันฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์ที่ใช้ป้องกันในการรักษาโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด ฤทธิ์ต้านทานมะเร็ง การต้านทานแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ อาการแพ้ เป็นต้น ซึ่งสมบัติเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และผลการทดลองข้างต้นนั้น สารสกัดจากกากหมากเม่ามีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *E. coli* และ *S.* Typhimurium ที่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ และ *B. cereus* ที่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก [19] อีกทั้งยังพบว่าสารสกัดรังไหมสามารถยับยั้งกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก โดยสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและต้านอนุมูลอิสระ คือ สารกลุ่มสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์ [20,21]

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) ของ *E. coli, B. cereus* และ *S.* Typhimurium ด้วยวิธี macro broth dilution technique พบว่าสารสกัดหมากเม่าที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 3 ชนิด (ตารางที่ 5) พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดหมากเม่า 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการตกตะกอนของสารสกัดและ

สารละลายด้านบนมีลักษณะใส แสดงว่า *E. coli, B. cereus* และ *S.* Typhimurium ไม่สามารถเจริญ เมื่อเปรียบเทียบกับที่ความเข้มข้นที่น้อยกว่า คือ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารละลายขุ่นทั้งหลอด แสดงว่าแบคทีเรีย 3 ชนิด เจริญได้ และเมื่อนำความเข้มข้นที่ระดับ 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดที่ทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดไป spread plate บนอาหาร TSA ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (MBC) ดังนั้นจึงสรุปว่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหมากเม่าในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Table 4 The efficacy of inhibition of pathogenic microorganisms at different concentrations of Mak Mao extract

Pathogenic microorganisms	Concentrations of Mak Mao extract (mg/mL)					
	0	60	70	80	90	100
Escherichia coli	0.00^{f}	0.00^{f}	0.00^{f}	0.00^{f}	0.60^{e}	0.73^{d}
Bacillus cereus	0.00^{f}	0.53^{e}	0.53^{e}	0.87^{c}	0.93^{bc}	1.03^{ab}
Salmonella Typhimurium	0.00^{f}	0.53^{e}	0.57^{e}	1.00^{ab}	1.03^{ab}	1.07^{a}

Table 5 Minimum MIC concentrations inhibiting the growth of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, and *Salmonella* Typhimurium

Mak Mao extract concentrations (mg/mL)	*Escherichia coli*	*Bacillus cereus*	*Salmonella* Typhimurium
100	-	-	-
50	-	-	-
25	-	-	-
12.5	+	+	+
6.25	+	+	+
3.12	+	+	+
1.56	+	+	+
0.78	+	+	+
0.39	+	+	+
0.19	+	+	+
0.09	+	+	+
0.0	+	+	+

- = No bacterial growth; + = the visible growth of a microorganism

4. สรุป

สารสกัดกากหมากเม่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli, B. cereus* และ *S.* Typhimurium โดยสารสกัดกากหมากเม่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhimurium ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ *B. cereus* และ *E. coli* ตามลำดับ โดยระดับความเข้มข้นของสารสกัดกากหมากเม่าที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค (MIC) คือ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.มก.) ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้

6. References

[1] Khoo, H.E., Azlan, A., Tang, S.T. and Lim, S.M., 2017, Anthocyanidins and antho cyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits, Food Nutr. Res. 61: 1-21.

[2] Miguel, M.G., 2011, Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities, J. Appl. Pharm. Sci. 1(6): 07-15.

[3] Pawa, K.K., Ingkaninan, K., Keartinun, S., Tammatee, S., Louisirirotchanakul, S. and Chaiprasert, A., 2003, Study of Makmao *Antidesma acidum* and 4 Thai Medicinal Herbs for Anti-HIV, Antifungal, Antibacterial and Immunomodulating Effects, Research Report, National Research Council of Thailand, 132 p. (in Thai)

[4] Department of Intellectual Property, 2019, Announcement of Geographical Indication Registration, Book Number 21 Notification Number 75, Available Source: https://ipthailand.go.th/images/gibook/GI_Book_111.pdf, March 17, 2021. (in Thai)

[5] Ltthara t, A., Hansakul, P., Sriwanthana, B., Sakpakdeejaroen, I. and Sakhunkhu, S., 2012, Development of Mao Extract for Use as Medicine and Health Supplement for Cancer and AIDS Patients, Research Report, National Research Council of Thailand, 265 p. (in Thai)

[6] Tarachai, P., 2017, Poultry Production, Faculty of Animal Science and Technology, Maejo University, Chiang Mai, 198 p. (in Thai)

[7] AOAC, 2000, Official Method of Analysis of AOAC International, 17th Ed., Association of Official Analytical Chemists, William Horwitz, Editor, Maryland, 2,200 p.

[8] Srisukong, A., Jantree, K. and Hanpakphum, S., 2016, The study of antibacterial in weed extracts, VRU Res. Develop. J. Sci. Technol. 15(3): 69-82. (in Thai)

[9] Suphanphuwong, D., Nonasa, U., Bureenok, S., Vasupen, K., Wongsuthavas, S., Paengkoum, P., Wachirapakorn, C., Wanapat, M. and Yuangklang, C., 2012, Effects of Mao pomace supplementation

on feed intake and nutrients digestibility in goat, Khon Kaen Agric. J. 40(suppl. 2): 222-229. (in Thai)

[10] Jorjong, S., Butkhup, L. and Samappito, S., 2015, Phytochemicals and antioxidant capacities of Mao-Luang (*Antidesma thwaitesianum* Müll. Arg.) cultivars from Northeastern Thailand, Food Chem. 181: 248-255.

[11] Sriphadet, S. and Phothiset, S., 2021, A comparison of yield component and chemical composition in Mao, Burapha Sci. J. 26(1): 628-641. (in Thai)

[12] Lokaewmanee, K., Traithailen, U. and Audomwong, N., 2016, Effects of Mao from juice industry supplementation on production performance and some hematological values of laying hens, Khon Kaen Agric. J. 44(1): 413-418. (in Thai)

[13] Suphanphuwong, D., Non-Asa, U., Bureenok, S., Vasupen, K., Wongsuthavas, S., Paengkoum, P., Wachirapakorn, C., Wanapat, M. and Yuangklang, C., 2012, Effects of Mao pomace supplementation on feed intake and nutrients digestibility in goat, Khon Kaen Agric. J. 40(2): 222-229. (in Thai)

[14] Sirilaophaisan, S., Gunun, P., Sintala, K., Punyakaew, P. and Kimprasit, T., 2016, Effects of dietary Mao pomace supple mentation on egg production performance, egg quality, and hematology of laying hens, J. agric. 32(2): 273-281. (in Thai)

[15] Maktrong, N., Thanutchapisut, S. and Tantipaibulvut, S., 2018, Antioxidant and antibacterial activity against food-borne pathogens of dyes extracted from turmeric, butterfly-pea flower and pandan leaves, Agric. Sci. J. 49(2): 13-16. (in Thai)

[16] Senful, M., Yildiz, E., Gungor, N., Cetin, B., Eder, Z. and Ercisli, S., 2009, Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some 170 medicinal plants, Pak. Pharm. Sci. 22: 102-106.

[17] Sotthisawad, K. and Withayagiat, U., 2010, Efficiency of Hand Washing Gel Produced from Mao Luang (*Antidesma thwaite sianum* Muell. Arg.) to Disinfection of Pathogenic Microorganism, Research Report, Kasetsart University, 96 p. (in Thai)

[18] Iawsipo, P., Choksawangkarn, W., Promdan, C. and Nilkasam, P., 2017, Antibacterial and antioxidant activities of *Cerbera manghas* and *C. odollam* leaf extracts, Burapha Sci. J. 5(1): 131-140. (in Thai)

[19] Assatarakul, K. and Himasuttidach, N., 2017, Antioxidant and antibacterial activities of onion extract and applications in mixed fruit and vegetable juice, J. Food Technol. Siam Univ. 12(1): 71-83. (in Thai)

[20] Boonyuen, S., Nanakorn, P. and Sakkayawong, N., 2016, Decomposition antioxidant, antimicrobial activities, total phenolic content and total flavonoid

content of *Delonix regia* (Boj. ex Hook.) Raf. extracts, Thai J. Sci. Technol. 5(1): 21-28. (in Thai)

[21] Pongnaratorn, P., Kuacharan, P., Kotsuno, V., Pakdee, N., Sriraj, P., Sattayasai, J., 2017, *In vitro* antimicrobial activity of *Antidesma bunius* extracts on oral pathogenic bacteria, Thai J. Pharm. Sci. 41(4): 144-149. (in Thai)