ISSN 3027-6357 (Print)
ISSN 3027-6365 (Online)

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : *http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj*
ปีที่ 32 ฉบับที่ 3 (พฤษภาคม-มิถุนายน 2567) หน้า [25-39]

ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยจากตำรับยาแผนไทยในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Efficiency of Thai Herbal Extracts from Thai Traditional Medicine Recipe Against Human Pathogenic Microorganisms and Antioxidant Activity

ภัทราวดี รงค์หิน[1], ฟอยด์ แก้วเสถียร[1], พฤทธิ์ภร ศุภพล[2*]

[1] หลักสูตรการศึกษาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ สงขลา 90000

[2] สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมดิจิทัล มหาวิทยาลัยทักษิณ

Pattrawadee Ronghin[1], Foy Kaewsathian[1], Preuttiporn Supaphon[2*]

[1] Bachelor of Education Program in Biology, Faculty of Education, Thaksin University, Songkla 90000

[2] Department of Basic Science and Mathematic, Faculty of Science and Digital Innovation, Thaksin University, Songkla 90000

Received 25 October 2023; Received in revised 20 December 2023; Accepted 2 February 2024

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพของสารสกัดในการยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระจากสมุนไพรไทย 5 ชนิด ในตำรับยาแผนไทย นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ปริมาณฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Folin Ciocalteu และ colorimetric aluminum chloride ตามลำดับ โดยสกัดสารจากพืชสมุนไพร 5 ชนิด (ข้าวเย็นเหนือ ข้าวเย็นใต้ หนอนตายหยาก นมแมว และพุทธรักษา) ด้วยเอทานอลและเอทิลอะซิเตท จากนั้นประเมินฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจำนวน 10 สารสกัด ด้วยวิธี colorimetric broth microdilution, และ DPPH radical scavenging assays ตามลำดับ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ทดสอบจุลินทรีย์ 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC25923, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) SK1, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Candida albicans* ATCC90028, *Candida albicans* NCPF3153, *Cryptococcus neoformans* ATCC90112, *Cryptococcus neoformans* ATCC90113, *Microsporum gypseum* และ *Taralomyces marneffei* ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดเอทานอลจากนมแมวมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *P. aeruginosa* และ *M. gypseum* ได้ดีที่สุด MIC 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วยสารสกัดเอทานอลจากข้าวเย็นเหนือมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* MIC 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดเอทานอล

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** preuttiporn@tsu.ac.th

Science32-N3.indd 25 20/6/2567 BE 13:33

จากข้าวเย็นเหนือมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ได้ดีที่สุดให้ค่า IC_{50} 3.08 ± 0.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ทดสอบหาปริมาณฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์รวมพบว่าสารสกัดเอทานอลจากข้าวเย็นเหนือมีปริมาณฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์สูงที่สุด 403.53 ± 0.83 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด และ 21.23±0.16 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากสมุนไพรไทยในตำรับยาแผนไทยเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ที่ดีสำหรับใช้ประโยชน์ในอนาคต

คำสำคัญ: สารสกัด; สมุนไพรไทย; จุลินทรีย์ก่อโรค; อนุมูลอิสระ

Abstract

This research aims to evaluate the potential of extracts for antimicrobial and antioxidant activities from five medicinal plants used in a Thai traditional medicine recipe. Furthermore, the total phenolic and total flavonoids content were analyzed using the Folin Ciocalteu method and colorimetric aluminum chloride method, respectively. The five plants (*Smilax corbularia*, *Smilax glabra, Stemona tuberosa*, *Melodorum siamense*, *Canna indica*) were extracted with ethanol and ethyl acetate. Ten extracts were evaluated for their antimicrobial and antioxidant activities using a colorimetric broth microdilution test and DPPH radical scavenging assays, respectively. Ten human pathogenic microorganisms were used in the antimicrobial test: *Staphylococcus aureus* ATCC25923, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) SK1, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Candida albicans* ATCC90028, *Candida albicans* NCPF3153, *Cryptococcus neoformans* ATCC90112, *Cryptococcus neoformans* ATCC90113, *Microsporum gypseum* and *Taralomyces marneffei*. The ethanol extract from *M. siamense* was the most active against *P. aeruginosa* and *M. gypseum* with minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.4 mg/ml, followed by the ethanol extract from *S. corbularia* against *S. aureus* with an MIC of 0.8 mg/ml. The ethanol extract from *S. corbularia* had the strongest antioxidant activity (DPPH) with an IC_{50} of 3.08 ± 0.49 µg/ml. In addition, these active extracts were tested for total phenolic and total flavonoids content. They were found to contain high amount of total phenolics at 403.53 ± 0.83 mg of gallic acid equivalent/g extract and total flavonoids at 21.23±0.16 mg QE/g of extract. These results indicate that extracts from Thai herbals are promising as they are a good source of many active metabolites for future applications.

Keywords: Extract; Thai medicinal plant; Pathogenic microorganism; Free radical

Science32-N3.indd 26 20/6/2567 BE 13:33

1. บทนำ

ปัญหาสุขภาพเป็นปัญหาที่สำคัญทั่วโลก โดยนอกจากจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อสังคมในวงกว้าง ปัจจุบันการรักษาโดยการแพทย์แผนปัจจุบันได้รับความนิยมและพัฒนามากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการรักษายังประสบปัญหาของผลข้างเคียงจากยาและค่าใช้จ่ายที่ราคาที่สูง ปัญหาสุขภาพที่สำคัญได้แก่ โรคติดเชื้อจุลินทรีย์และโรคมะเร็ง มีรายงานพบผู้ป่วยโรคติดเชื้อจุลินทรีย์จำนวนมาก โดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล โดยทั่วไปพบการติดเชื้อของผู้ป่วยในหลายระบบด้วยกัน เช่น ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสาวะ และบริเวณแผลผ่าตัด เป็นต้น โดยเชื้อสาเหตุ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumanii*, *Escherichia coli* และ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* เป็นต้น [1-2] ประกอบกับจุลินทรีย์ก่อโรคมีการปรับตัวและดื้อยาเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์บางชนิดดื้อยาหลายชนิดด้วยกัน จึงอาจจำเป็นต้องใช้หลากหลายวิธีร่วมด้วยหรืออาจต้องปรับขนาดของยาให้สูงขึ้นในการรักษา นอกจากโรคติดเชื้อแล้ว โรคมะเร็งยังเป็นปัญหาที่สำคัญ โดยพบว่ามีผู้ป่วยมะเร็งมากกว่า 12 ล้านคนทั่วโลกในปี ค.ศ. 2008 ซึ่งมีผู้เสียชีวิตกว่า 7.6 ล้านคน มะเร็งที่พบมากที่สุด คือ มะเร็งปอด 12.7 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ มะเร็งเต้านม 10.9 เปอร์เซ็นต์ และมะเร็งลำไส้ 9.8 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาในปี ค.ศ. 2013 มีผู้ป่วยมะเร็งสูงกว่า 15 ล้านคนทั่วโลก และเสียชีวิตถึง 8 ล้านคน จากสถาณการณ์ผู้ป่วยมะเร็งเห็นได้ว่ามีแนวโน้มของผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตเพิ่มมากขึ้น และล่าสุดเฉพาะประชากรในสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 2017 มีผู้ป่วยมะเร็งจำนวน 1,688,780 คน โดยมี 600,920 คนเสียชีวิต ซึ่งมีการคาดการณ์ว่าประชากรมีแนวโน้มเป็นมะเร็งเพิ่มสูงขึ้นไปอีกทุกปี โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา ทำให้ใช้เงินกว่า 2.6 ล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐฯ ในการพัฒนายาเพื่อใช้ในการรักษา และคาดการณ์ว่าในปี ค.ศ. 2020 มีการใช้เงินเพื่อพัฒนายาต้านมะเร็งสูงถึง 150 ล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐฯ [3-4] โดย dela Cruz และคณะ ในปี ค.ศ. 2020 [5] คาดการณ์ว่าในปี ค.ศ. 2025 แนวโน้มของจำนวนผู้ป่วยมะเร็งจะเพิ่มถึง 19.3 ล้านคน จึงอาจมีการจำเป็นอย่างเร่งด่วนในการค้นหาสารออกฤทธิ์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาหรือค้นหาสารที่สามารถยับยั้งมะเร็งได้ และนอกจากนี้อาจมีการใช้เงินจำนวนมหาศาลเพื่อเร่งแก้ไขปัญหาดังกล่าว ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงพยายามมองหาแหล่งของสารต้านมะเร็งจากพืช โดยสารที่มีการค้นพบว่ามีศักยภาพในการรักษาโรคมะเร็ง คือ taxol และ camptothecin taxol หรือ paclitaxel ถูกพบครั้งแรกจากต้น pacific yew tree (*Taxus brevifolia*) [6] นอกจากนี้โรคติดเชื้อจุลินทรีย์และมะเร็งมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการตายของผู้ป่วย โดยรายงานของ Elhadi และ Msherghi ในปี ค.ศ. 2021 [7] รายงานว่า โรคติดเชื้อจุลินทรีย์เป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของผู้ป่วยมะเร็ง โดยผู้ป่วยมะเร็งจำนวน 151,440 คน เสียชีวิตชีวิตจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ในสหรัฐอเมริกา โดยสาเหตุการเสียชีวิตเกิดจากโรคเยื้อหุ้มสมองอักเสบ ไข้หวัดใหญ่ และภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นต้น จากข้อมูลข้างต้นนักวิจัยทั่วโลกจึงพยายามหาแหล่งของยาใหม่ โดยเฉพาะแหล่งที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในช่วงปี ค.ศ. 1981-2002 รวมเป็นระยะเวลา 22 ปี พบยาต้านแบคทีเรียจำนวนทั้งหมด 90 สาร มาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 9 สาร ยาต้านราจำนวนทั้งหมด 24 สาร มาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 1 สาร ยาต้านการอักเสบ จำนวนทั้งหมด 50 สาร มาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 1 สาร ยาต้านมะเร็งจำนวนทั้งหมด 79 สาร มาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 9 สาร เป็นต้น [8] นอกจากงานวิจัยที่กล่าวมา อุตสาหกรรมยาก็พยายามมองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่จากแหล่งต่าง ๆ เพื่อพัฒนาการผลิตและค้นหายาใหม่ทดแทนยาเดิมเนื่องจากยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ มีผลข้างเคียงของการใช้ [9] นอกจากนี้พบว่าการรักษาทั้งกลุ่มโรคติดเชื้อและโรคไม่ติดเชื้อมีการใช้ยาที่เป็นสารสังเคราะห์ โดยมีการ

Science32-N3.indd 27 20/6/2567 BE 13:33

สังเคราะห์สารจำนวนมากถึงกว่า 10,000 สาร และเริ่มถึงจุดที่ปรับโครงสร้างหรือสังเคราะห์สารใหม่ ๆ ได้ยากขึ้น

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมสมบูรณ์ด้วยพืชพรรณหลากหลายชนิดและมีพืชสมุนไพรจำนวนมาก มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคต่าง ๆ มายาวนาน ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน และนอกจากนี้ได้มีการนำสมุนไพรในตำรับต่าง ๆ ซึ่งเป็นตำรับที่สืบทอดกันมาจากรุ่นสู่รุ่นมาร่วมใช้ในการรักษา หรือบรรเทาอาการต่าง ๆ ให้แก่ผู้ป่วย โดยมีวิธีในการนำมาใช้ที่หลากหลาย ทั้งวิธีการทานแบบสด การดองเหล้า หรือวิธีการต้มและดื่ม สมุนไพรเหล่านี้พบได้ทั่วไปในท้องถิ่น และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย โดยสมุนไพรที่นำมาฟีใช้ในงานวิจัยนี้เป็นตำรับยาแก้โรคมะเร็งในมดลูกในหนังสือตำรับยาชาวบ้าน (ขนานแท้) ของหลวงปู่ศุขวัดมะขามเฒ่า และกรมหลวงชุมพรเขตอุดมศักดิ์ [10] ประกอบด้วยสมุนไพรทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวเย็นเหนือ ข้าวเย็นใต้ หนอนตายหยาก นมแมว และพุทธรักษาสีขาว โดยตำรับดังกล่าวเป็นตำรับซึ่งมีสรรพคุณสำหรับรักษามะเร็ง ในปัจจุบันจึงได้มีการเผยแพร่และนำตำรับยาเหล่านี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาศาสตร์การแพทย์แผนไทยและพัฒนาต่อยอดควบคู่กับการรักษาของแพทย์ในปัจจุบัน มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรที่หลากหลาย โดยพบทั้ง สารประกอบฟีโนลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ซาโปนิน และอัลคาลอยด์ เป็นต้น โดยสารดังกล่าวมีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระได้ [11-12] ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity) และฤทธิ์การต้านอนุอิสระ (Antioxidant activity) ของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับยารักษามะเร็งมดลูก เพื่อเป็นประโยชน์และสามารถเพิ่มฐานข้อมูลทางการแพทย์สำหรับบุคคลทั่วไปรวมถึงเพื่อเป็นฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการเพิ่มคุณค่าของพืชพื้นบ้านไทยแต่ละชนิด หรืออาจนำไปสู่การวิจัยและใช้ประโยชน์ในอนาคต

2. วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำพืชสดแต่ละชนิด ได้แก่ หัวข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia*) หัวข้าวเย็นใต้ (*Smilax glabra*) ต้นหนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa*) รากนมแมว (*Melodorum siamense*) และหัวพุทธรักษา (*Canna indica*) มาล้างทำความสะอาดและตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน หรือจนกว่าตัวอย่างจะแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างพืชแต่ละชนิดมาแช่ในตัวทำละลายเอทานอลและเอทิลอะซิเตทให้ท่วม ในสัดส่วน 1:1 เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรอกตัวอย่างพืชออก นำของเหลวหรือส่วนของตัวทำละลาย ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนได้ของเหลวหนืดหรือสารสกัดหยาบ โดยพืช 1 ชนิดจะได้ของสารสกัดหยาบจำนวน 2 สาร จากตัวทำละลายเอทานอล 1 สาร และเอทิลอะซิเตท 1 สาร จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายมาละลายด้วย dimethylsulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเก็บเป็น stock ของสารสกัดหยาบ จากนั้นเจือจางต่อด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับจุลินทรีย์ทดสอบต่อไป

2.2 วิธีการเตรียมยาปฏิชีวนะมาตรฐาน

เตรียมยาปฏิชีวนะสำหรับจุลินทรีย์ทดสอบ โดยละลายยา vancomycin และ gentamicin ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้น 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนยา amphotericin B เตรียมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยยา vancomycin จะใช้เป็นยามาตรฐานสำหรับแบคทีเรียแกรมบวก gentamicin สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ และยา amphotericin B ใช้เป็นยามาตรฐานสำหรับยีสต์และราฝอย จากนั้นเก็บยาทั้งหมดในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับนำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของยาในการยับยั้งจุลินทรีย์

Science32-N3.indd 28 20/6/2567 BE 13:33

2.3 การเตรียมเชื้อทดสอบ

จุลินทรีย์ทดสอบในงานวิจัยนี้ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) SK1 แบคทีเรียแกรมลบ 2 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 ยีสต์ 4 สายพันธุ์ คือ *Candida albicans* ATCC90028, *Candida albicans* NCPF3153, *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 และ *Cryptococcus neoformans* ATCC90113 และราฝอย 2 สายพันธุ์ คือ *Microsporum gypseum* และ *Taralomyces marneffei*

2.3.1 แบคทีเรีย

streak แบคทีเรียทดสอบลงบนอาหาร nutrient agar (NA) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นโคโลนีของแบคทีเรียขึ้นบนจานอาหาร จากนั้นทำการเตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเขี่ยแบคทีเรีย 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร nutrient broth (NB) ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ 0.5 McFarland standard (เชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml) และเจือจางต่อที่อัตราส่วน 1:200 ด้วยอาหาร Mueller-Hinton Broth (MHB)

2.3.2 ยีสต์

streak ยีสต์ทดสอบลงบนอาหาร sabouraud's dextrose agar (SDA) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สำหรับ *C. albicans* และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับ *Cr. neoformans* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นโคโลนีของยีสต์ขึ้นบนจานอาหาร จากนั้นทำการเตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเขี่ยยีสต์ 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร sabouraud's dextrose broth (SDB) ปรับความขุ่นของเชื้อด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ 2 McFarland standard และเจือจางต่อที่อัตราส่วน 1:20 ด้วยอาหาร SDB

2.3.2 ราฝอย

เลี้ยงราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลาประมาณ 3-5 วัน หรือจนกว่าจะสามารถสร้างโคนิเดียที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใส่ glass bead ที่ปราศจากเชื้อประมาณ 10 เม็ด ลงในจานเพาะเชื้อ หมุนจานไปมาเพื่อให้โคนิเดียหลุดออกจากเส้นใย เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายโคนิเดีย (conidial suspension) ในจานเพาะเชื้อ นำไปใส่ในหลอดทดลองเพื่อนับจำนวนสปอร์ ด้วย Hemacytometer แล้วจึงปรับความเข้มข้นของโคนิเดียด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.85% ให้ได้ความเข้มข้นของของ โคนิเดียเท่ากับ 4×10^4 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

2.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี colorimetric broth microdilution tests

2.4.1 ทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [13-16]

นำสารสกัดหยาบมาเจือจางกับอาหารให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในหลุมทดสอบ จำนวน 3 หลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ของ sterile 96-well microtiter plates จากนั้นดูดเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ใส่ใน sterile 96-well microtiter plates ที่มีสารสกัดและอาหารอยู่ หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ จากนั้นนำจานไปบ่มในตู้บ่ม ดังนี้ สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ *C. albicans* บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สำหรับ *Cr. neoformans* และราฝอย บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 ชั่วโมง และ 60 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบกำหนดเวลา หยดสี resazurin indicater (0.018%) ลงในหลุมทดสอบหลุมละ 30 ไมโครลิตร สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ยกเว้นรา จากนั้นนำจานไปบ่มต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาอ่านผลการทดสอบโดยสังเกตสีของ resazurin หากยังคงเห็นเป็นสีน้ำเงินให้ผลเป็นบวกแสดงว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อทดสอบได้ และหาก

Science32-N3.indd 29 20/6/2567 BE 13:33

เปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือใสไม่มีสี แสดงว่าให้ผลเป็นลบ คือ สารสกัดไม่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อทดสอบได้ สำหรับราฝอยเมื่อครบกำหนดเวลาให้อ่านผลการทดสอบการยับยั้งเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์เตอริโอซูม โดยอ่านผลผลประสิทธิภาพารยับยังเส้นใยราที่ 80 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารสกัด

2.4.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (The minimum inhibitory concentrations; MICs) และการหาค่าความเข้มขั้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบ (The minimum bactericidal concentration; MBCs หรือ minimum fungicidal concentration; MFCs)

นำสารสกัดที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบหาค่า MIC และ MBC หรือ MFC ในช่วงความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัด 12.8-0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบหาค่า MIC เตรียมสารสกัดให้ได้ความเข้มข้น 25.6-0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางแบบ 2-fold dilution กับอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB สำหรับแบคทีเรีย และอาหารเหลว SDB สำหรับยีสต์และราฝอยใน sterile 96-well microtiter plates จากนั้นดูดเชื้อทดสอบที่เจือจางกับอาหารเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 1:200 สำหรับแบคทีเรีย 1:20 สำหรับยีสต์ และราฝอยที่เตรียมความเข้มข้นของโคนิเดีย 4×10^4 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ใส่ใน sterile 96-well microtiter plates ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ จากนั้นนำจานไปบ่มที่สภาวะเดียวกับการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัด หยดสีรีซาซูรินสำหรับแบคทีเรียและยีสต์ จากนั้นอ่านผลการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบเบื้องต้น

การทดสอบหาค่า MBC หรือ MFC นำผลที่ระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ทุกความเข้มข้นในการทดสอบ MIC มา streak บนอาหาร NA สำหรับแบคทีเรีย และ streak บนอาหาร SDA สำหรับยีสต์และราฝอย จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่สภาวะเดียวกับการทดสอบข้างต้น อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียเป็นค่า MBC และอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อยีสต์และราเป็นค่า MFC

2.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยวิธี 2, 2 diphenyl - 1- picrylhydrazyl radical scavenging activity (DPPH) ดัดแปลงจาก [17]

2.5.1 การศึกษาฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

นำสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน DMSO ดูดใส่ในหลอด microcentrifuge tube ปริมาตร 1,024 ไมโครลิตร และเอทานอล ปริมาตร 976 ไมโครลิตร ในหลอดที่ 1 จากนั้นเติมเอทานอลปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 2-9 ทำการเจือจางสารสกัดแบบ 2-fold dilution ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 512-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำหลอดบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้วิตามินซี (ascorbic acid) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) และใช้ DMSO เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) จากนั้นคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ เพื่อหาค่า IC_{50} ของการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ radical scavenging activity} = [A_0(A_1-A_2)/A_0] \times 100$$

เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลและDPPH (Blank)

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่มีสารสกัดและDPPH (positive control)

A_2 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดและเอทานอล (negative control)

Science32-N3.indd 30 20/6/2567 BE 13:33

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด
ดัดแปลงจาก [17]

เตรียมสารสกัดให้ได้ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายด้วย DMSO จากนั้นดูดสารสกัดปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2,500 ไมโครลิตร ที่ผสมกับสาร Folin-Ciocalteu ในอัตราส่วน 1:9 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและวางทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิคในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด (mg of gallic acid equivalent/g extract)

2.7 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด
ดัดแปลงจาก [17]

เตรียมสารสกัดให้ได้รัดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายด้วย DMSO จากนั้นผสมสารสกัดปริมาตร 250 ไมโครลิตร และสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที เมื่อครบกำหนดเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 775 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัด (mg of quercetin equivalent/g extract)

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบโดยวิธี colorimetric broth microdilution

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด ประกอบด้วย เอทานอล (ethanol) และเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 10 สายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ ยีสต์ 4 สายพันธุ์ และรา 2 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดทั้งหมด 20 สาร ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ยกเว้นยีสต์ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. albicans* ATCC90028 และ *C. albicans* NCPF3153 นอกจากนี้ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าจุลินทรีย์ของสารสกัดทั้ง 20 สารสกัด พบว่าสารสกัดจากพืช 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวเย็นเหนือ ข้าวเย็นใต้ และหนอนตายหยาก ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ได้ดีที่สุด โดยยับยั้ง *Cr. neoformans* ATCC90112 และ *Cr. neoformans* ATCC90113 ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากพืชอีก 2 ชนิด ได้แก่ พุทธรักษา และรากนมแมว จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากพุทธรักษาที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและราได้ดีที่สุด โดยยับยั้ง *S. aureus* ATCC25923 และ MRSA ค่า MIC เท่ากับ 0.2 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือสามารถยับยั้งรา *M. gypseum* MIC เท่ากับ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยับยั้ง *T. marneffei* MIC เท่ากับ 6.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งมีฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* และ *M. gypseum* ได้ดีที่สุด ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดพุทธรักษาที่สกัดด้วยเอทานอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายสายพันธุ์ โดยสามารถยับยั้ง *S. aureus* และ MRSA ได้ดีที่สุด ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.2 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 1)

Science32-N3.indd 31 20/6/2567 BE 13:33

Table 1 Antimicrobial activity of crude extracts from five herbal plants at final concentration range 12.8-0.025 mg/ml

Plants	Solvents	MIC / MBC or MFC (mg/ml)									
		SA	MRSA	EC	PA	CA28	CA53	CN12	CN13	MG	TM
S. corbularia	EtOH	0.8/-	**1.6/-**	**3.2/-**	1.6/-	-	-	6.4/-	12.8/-	**0.4/-**	12.8/-
	EtOAc	0.8/-	**1.6/-**	**3.2/-**	1.6/-	-	-	**0.05/-**	**0.05/-**	3.2/-	**6.4/-**
S. glabra	EtOH	12.8/-	-	-	6.4/-	-	-	-	-	1.6/-	**6.4/-**
	EtOAc	6.4/-	12.8/-	12.8/-	12.8/-			**0.05/-**	**0.05/-**	3.2/6.4	**6.4/-**
S. tuberosa	EtOH	-	-	12.8/-	-	-	-	-		3.2/-	**6.4/-**
	EtOAc	6.4/-	12.8/-	-	12.8/-	-	-	**0.05/-**	**0.05/-**	3.2/6.4	**6.4/12.8**
M. siamense	EtOH	3.2/-	3.2/-	-	**0.4/-**	-	-	1.6/-	3.2/-	**0.4/-**	12.8/-
	EtOAc	12.8/-	**1.6/-**	12.8/-	**1.6/-**	-	-	6.4/-	6.4/-	1.6/-	**6.4/-**
C. indica	EtOH	12.8/-	12.8/-	-	-	-	-	-	-	1.6/12.8	12.8/-
	EtOAc	**0.2/-**	**1.6/-**	12.8/-	1.6/-	-	-	-	-	**0.4/-**	**6.4/-**
Antibiotics											
Vancomycin		0.5/1	1/2								
Gentamicin				0.25/1	0.25/1						
Amphotericin B						0.5/1	0.5/1	0.25/0.5	0.25/0.5	2/4	1/2

Remark – No activity at tested concentration range; SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) SK1, EC = *Escherichia coli* ATCC25922, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, CA28 = *Candida albicans* ATCC90028, CA53 = *Candida albicans* NCPF3153, CA12 = *Cryptococcus neoformans* ATCC90112, CA13 = *Cryptococcus neoformans* ATCC90113, MG = *Microsporum gypseum*, TM = *Taralomyces marneffei*

Science32-N3.indd 32 20/6/2567 BE 13:33

3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี 2, 2 diphenyl - 1- picrylhydrazyl radical scavenging activity (DPPH)

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดเอทานอลจากข้าวเย็นเหนือมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 3.08±0.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่กรดแอสคอร์บิกมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.53±0.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 2) นอกจากนี้ในการตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ของสารสกัดพบว่าปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์สูงที่สุดเท่ากับ 403.53±0.83 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด และ21.23±0.16 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัด ในสารสกัดจากข้าวเย็นเหนือ

จากสถาณการณ์สุขภาพในปัจจุบันเห็นได้ว่าประชากรทั่วโลกประสบปัญหาด้านสุขภาพทั้งโรคติดเชื้อและโรคไม่ติดเชื้อ ซึ่งมีปัจจัยเกี่ยวข้องหลายประการด้วยกัน ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพร โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นทางเลือกที่น่าสนในปัจจุบัน โดยในการศึกษานี้สนใจศึกษาพืชสมุนไพรไทยทั้งหมด 5 ชนิด ซึ่งเป็นสมุนไพรในตำรับยารักษามะเร็ง และจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าสมุนไพรบางชนิดยังมีการศึกษาไม่มากนัก จากผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบทั้งหมด 20 สารสกัด ที่สกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ เอทานอลและเอทิลอะซิเตท ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรีย ยีสต์ และราฝอย พบว่าสารสกัดจากข้าวเย็นเหนือทั้งที่สกัดด้วยเอทานอลและเอทิลอะซิเตทมีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด โดยยับยั้ง

Table 2 Antioxidant activity, total phenolic content and total flavonoid content of crude extract from five medicinal plants.

Tests	*S. corbularia*	*S. glabra*	*S. tuberosa*	*M. siamense*	*C. indica*	Control Ascorbic acid µg/ml
TPC µg gallic acid/g sample	**403.53±0.83**	85.39±0.90	15.39±1.16	206.80±1.31	76.43±1.23	-
TFC µg quercertin/ g sample	**21.23±0.16**	15.68±0.31	8.78±0.20	20.52±0.76	16.73±0.84	-
DPPH IC_{50} (mean±SD) µg/ml	**3.08±0.49**	47.92±0.33	200.07±0.49	16.73±0.84	63.75±0.54	3.53±0.56

Remark TPC; total phenolic content, **TFC**; total flavonoid content

Science32-N3.indd 33 20/6/2567 BE 13:33

จุลินทรีย์ได้ 8 สายพันธุ์ คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารสกัดจากพืชอื่น ๆ ทั้ง 4 ชนิด ในการศึกษานี้ที่สกัดด้วยเอทานอลยับยั้งจุลินทรีย์ได้ 30-70 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจากเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งได้ในช่วง 60-80 เปอร์เซ็นต์ จากข้อมูลข้างต้นเมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งและฆ่าจุลินทรีย์ของสารสกัด ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจากข้าวเย็นเหนือที่สกัดด้วยเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *M. gypseum* ได้ดีที่สุด ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดจากข้าวเย็นเหนือที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งยีสต์ *Cr. neoformans* ATCC90112 และ *Cr. neoformans* ATCC90113 ได้ดีที่สุด ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นอกจากนี้ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าเฉพาะสารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับ 80-90 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจาดเอทานอลที่สกัดจากข้าวเย็นเหนือมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 3.08±0.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์ ที่ตรวจพบในสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด โดยพบปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์สูงสุดในข้าวเย็นเหนือ เท่ากับ 403.53±0.83 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด และ 21.23±0.16 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Skukriya et al. ในปี ค.ศ. 2023 [18] รายงานฤทธิ์ของสารสกัดจากข้าวเย็นเหนือที่สกัดด้วยเอทานอล พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 54.63±0.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกพบว่ามีปริมาณเท่ากับ 184.41± 5.92 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าผลการศึกษาต่างจากรายงานก่อนหน้านี้ของ Jeeno และคณะ ในปี ค.ศ. 2022 [19] ศึกษาศักยภาพของพืช 2 ชนิด ได้แก่ ข้าวเย็นเหนือและข้าวเย็นใต้ โดยพบว่าข้าวเย็นใต้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ DPPH และ ABTS ได้ดีกว่าสารสกัดจากข้าวเย็นเหนือ โดยให้ค่าการยับยั้งเท่ากับ 71.94±1.46% (IC_{50} เท่ากับ 167.96) และ 59.84±4.80% (IC_{50} เท่ากับ 2540.34) ตามลำดับ นอกจากนี้ตรวจพบสารประกอบฟีโนลิกจากสารสกัดจากข้าวเย็นใต้ที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอลและน้ำ เท่ากับ 0.017±0.001, 0.015±0.001 และ 0.016±0.001 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ขณะที่ตรวจพบปริมาณฟาโวนอยด์เท่ากับ 0.043±0.002, 0.033±0.002, and 0.006±0.003 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และสารสกัดจากข้าวเย็นใต้มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกให้ค่า MIC 62.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ MBC เท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดจากข้าวเย็นเหนือมีศักยภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS เท่ากับ 72.24±0.64% (IC_{50} เท่ากับ 583.06) และ 39.87±2.37% (IC_{50} เท่ากับ 1662.37) ตรวจพบสารประกอบฟีโนลิก จากสารสกัดจากข้าวเย็นใต้ที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอลและน้ำ เท่ากับ 0.006±0.000, 0.007±0.002 และ 0.002 ±0.001 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ขณะที่ตรวจพบปริมาณฟาโวนอยด์เท่ากับ 0.012±0.001, 0.008±0.000, และ 0.008±0.000 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และสารสกัดจากข้าวเย็นเหนือที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกให้ค่า MIC 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ MBC เท่ากับ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Xu และคณะ ในปี ค.ศ. 2013 [20] ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของไรโซมข้าวเย็นใต้และฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ซึ่งจากการศึกษาตรวจพบสารฟีโนลิกใหม่ทั้งหมด 6 สาร ได้แก่ smiglabrone A, smiglabrone B, smilachromanone, smiglastibene, smiglactone และ smiglabrol โดยพบว่า smiglabrone A มีฤทธิ์ยับยั้ง *C. albicans* SC5314 ได้ดีที่สุด ให้ค่า

Science32-N3.indd 34 20/6/2567 BE 13:33

MIC เท่ากับ 0.146 mM นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa* PA01, *K. Pneumonia*, MRSA, *S. aureus* ATCC6538 และ *Enterococcus faecalis* ส่วนสาร smilachromanone และ smiglastibene มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC6538 ได้ดีที่สุด ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.303 และ 0.205 mM ตามลำดับ

ส่วนสารสกัดพืชอื่น ๆ อีก 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากหนอนตายหยาก สารสกัดพุทธรักษา และสารสกัดจากนมแมว มีรายงานไม่มากนัก พบเพียงบางรายงานเกี่ยวกับพืชเหล่านี้ ดังนี้ Lalmuansangi และคณะ ในปี ค.ศ. 2020 [21] ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยเมทานอล ตรวจพบสารประกอบฟีโนลิกเท่ากับ 715±2.42 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด และสารประกอบฟลาโวนอยด์เท่ากับ 3864.25±7.54 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 7.36±0.081 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อมาในปี ค.ศ. 2018 Rutnakornpituk และคณะ [22] ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์จากส่วนใบ ลำต้นและราก พบว่าปริมาณสารประกอบฟีโนลิกสูงสุดใน ราก ลำต้น และใบ เท่ากับ 15.58±0.67, 8.75±0.33 และ 6.21±0.15 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และตรวจพบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงสุดในราก ลำต้น และใบ เท่ากับ 22.12±0.89, 13.26±0.45 และ 5.92±0.75 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัด และผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดจากราก ลำต้น และใบที่สกัดด้วยเมทานอล พบว่าให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 118.7±1.12, 167.8±1.33 และ 282.0±0.85 ppm และ Singh และคณะ ในปี ค.ศ. 2016 [23] ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพุทธรักษาโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิดได้แก่ ปิโตเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เอทานอล และน้ำ ในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากใบพุทธรักษาที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียและราจำนวน 10 สายพันธุ์ (*Micrococcus luteus, S. aureus, P. aeruginosa, Klebsiella pneumonia, E. coli, Streptococcus mutans, Aspergillus niger, A. flavus, Fusarium solani* และ *Nigrospora oryzae*) ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสในช่วง 10±0.01 – 19±0.02 มิลลิเมตร ซึ่งในปี ค.ศ. 2015 Al-Snafi [24] รายงานองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพุทธรักษาซึ่งมีการนำส่วนต่าง ๆ ของพุทธรักษามาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ได้แก่ ใบ ดอก และราก เป็นต้น โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งสารสกัดจากใบและดอกของพุทธรักษาที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *S. aureus* ได้ดี และล่าสุดในปี ค.ศ. 2021 Hosur และ Handral [25] รายงานศักยภาพของพุทธรักษาซึ่งนำมาใช้ทางการแพทย์ซึ่งมีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย ยับยั้งเชื้อรา และต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยตรวจพบสารพฤกษเคมีหลายชนิด ได้แก่ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซน์ คาร์โบไฮเดรต กรดไขมัน โปรตีน ฟีโนลิก แทนนิน และซาโปนิน เป็นต้น

จากข้อมูลผลการศึกษาเห็นได้ว่าสารสกัดจากพืชชนิดเดียวกันอาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันได้ ขึ้นกับหลายปัจจัยทั้งแหล่งที่ปลูกพืช ฤดูกาล สภาพแวดล้อมบริเวณเพาะปลูก และอายุของพืช เป็นต้น ซึ่ง Jirakiattikul และคณะ ในปี ค.ศ. 2018 [26] ศึกษาผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของหัวข้าวเย็นเหนือในสภาพปลอดเชื้อ จากผลการศึกษาพบว่าระเวลาที่เพาะเลี้ยงข้าวเย็นเหนือเป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์สูงที่สุด ขณะเดียวกันมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 15.75±0.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบปริมาณ

Science32-N3.indd 35 20/6/2567 BE 13:33

ฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์เท่ากับ 4.92±5.88 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อกรัมสารสกัด107.56±7.19 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ โดยสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันหรือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ สารประกอบฟีโนลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโธไซยานิน แคโรทีนอยด์ เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ส่วนใหญ่จะมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีนตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป โดยหมู่ functional group เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้น หรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุมูล H• แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น [27] นอกจากนี้จากรายงานรวบรวมงานวิจัยและการใช้ตำรับยาสมุนไพรรักษาโรคผิวหนังของภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทยพบว่าข้าวเย็นเหนือเป็นสมุนไพรที่มีความถี่ในการนำมาใช้รักษาโรคผิวหนังมากที่สุด FR เท่ากับ 4.2 [28]

4. สรุป

จากการศึกษาศักยภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยทั้ง 5 ชนิด ในการยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งหาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์ พบว่าสารสกัดมีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี โดยสารสกัดจากข้าวเย็นเหนือที่สกัดด้วยเอทานอลและเทิลอะซิเตทมีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และราฝอย รวมทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ให้ค่า MIC ในช่วง 0.05-12.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีเพียงสารสกัดเอทานอลที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ในระดับ 80-90 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดจากข้าวเย็นเหนือสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดให้ค่า IC_{50} 3.08±0.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณสารพฤกษเคมีที่ตรวจพบทั้งปริมาณฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบสูงที่สุดในสารสกัดหยาบจากข้างเย็นเหนือ จากข้อมูลงานวิจัยนี้เห็นได้ว่าสารสกัดสมุนไพรไทยที่ศึกษา โดยเฉพาะข้าวเย็นเหนือมีศักยภาพสูงสุดทั้งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี จึงอาจใช้เป็นแหล่งข้อมูลและเป็นแหล่งทางเลือกเพื่อนำไปศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยเฉพาะกลุ่มที่ดื้อยาและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น ๆ ในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล และ ศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อาจารย์ผู้มอบความรู้และให้การสนับสนุนตลอดมา

6. References

[1] Indrawattana, N. and Vanaporn, M. 2015. Nosocomial infection. Journal of Medicine and Health Sciences. 22(1): 81-92. (in Thai)

[2] Chungsamanukool, P. 2022. Incidence, Risk factors, mortality rate, and impact of multidrug-resistant gram-negative bloodstream infections in Photharam hospital. Medical Journal. 41(1): 579-592. (in Thai)

[3] Virani, S., Bilheem, S., Chansaard, W., Chitapanarux, I., Daoprasert, K., Khuanchana, S., Leklob, A.,, Pongnikorn, D., Rozek, L.S., Siriarechakul, S., Suwanrungruang, K., Tassanasunthorn wang, S., Vatanasapt, P. and Sriplung, H. 2017. National and Subnational-population-based incidence of cancers with the highest burdens. Cancers. 9(108): 1-27. http:// doi: 10.3390/cancer9080108.

[4] Chanvatik, S., Kosiyaporn, H., Lekagul, A., Kaewkhankhaeng, W., Vongmongkol, V., Thonyahan, A. and Tangcharoensathien,

Science32-N3.indd 36 20/6/2567 BE 13:33

V. 2019. Knowledge and use of antibiotics in Thailand: A 2017 national household survey. PLOS ONE. 14(8): e0220990.

[5] dela Cruz, T.E.E., Notarte, K.I.R., Apurillo, C.C.S., Tarman, K. and Bungihan, M.E. 2020. Biomning fungal endophytes from tropical plants amd seaweeds for drug discovery. Biodiversity and Biomedicine. pp. 51-52.

[6] Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. Journal of Natural Product. 67: 257-268.

[7] El-Hady, H.H.A., Daboor, S.M. and Ghoniemy, A.E. 2007. Nutritive and antimicrobial profiles of some seagrasses from Bardawil lake, Egypt. Egyptian Journal of Aquatic Research. 33: 103-110.

[8] Newman, D.J., Cragg, G.M. and Snader, K.M., 2003, Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002, Journal of Natural Products. 66: 1022-1037.

[9] Won, K.J., Lin, H.Y., Jung, S., Cho, S.M., Shin, H.C., Bae, Y.M., Lee, S.H., Kim, H.J., Joen, B.H., and Kim, B. 2012. Antifungal miconazole induces cardiotoxicity via inhibition of APE/REF-1-related pathway in rat neonatal cardiomyocytes. Toxicological Sciences. 126: 289-305.

[10] Pim Wattanapanich, 1993. Folk medicine textbook (authentic) of Luang Pu Suk Wat Makham Thao and Krom Luang Chumphon Khet Udomsak. Trisin Printing. Bangkok. 112 pages. (in Thai)

[11] Medini, F., Fellah, H., Ksouri, R. and Abdelly. 2014. Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organ extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. Journal of Taiban University for Science. 8(3): 216-224.

[12] Kovac, J., Slobodnikova, L., Trajcikova, E., Rendekova, K., Mucaji, P., Sychrova, A. and Fialova, S.B. 2023. Therapeutic potential of flavonoids and tannins in management of Oral infectious disease- A review. Molecules. 28(1): 158. doi: 10.3390/molecules28010158

[13] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002a. Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

[14] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002b. Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27- A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

[15] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002c. Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

Science32-N3.indd 37 20/6/2567 BE 13:33

[16] Sarker, S.D., Nahar, L., and Kumarasamy, Y. 2007. Microtiterplate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. Methods. 42: 321-324.

[17] Ghafar, M.F.A., Prasad, K.N. Weng, K.K. and Ismail, A. 2010. Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from citrus species. African Journal of Biotechnology. 9(3): 326-330.

[18] Syukriya, A.J., Bankeeree, W., Prasongsuk, S. and Yanatatsaneejit, P. 2023. In vitro antioxidant and anticancer activities of *Smilax corbularia* extract combined with *Phellinus linteus* extract against breat cancer cell lines. Biomedical Reports. 19: 63; DOI: 10.3892/br.2023.1645

[19] Jeeno, P., Tongban, S., Yana, P., Wongta, A., Sutan, K., Yadoung, S. and Hongsibsong, S. 2022. Tentative identification of phytochemicals from *Smilax glabra* and *Smilax corbularia* extracts by LC-QTOF/MS and their bioactive potential. Plants. 11(16); 2089; https://doi.org/10.3390/plants11162089

[20] Xu, S. Shang, M.Y., Liu, G.X., Xu, F., Wang, X., Shou, C.C. and Cai, S.Q. 2013. Chemical constituents from rhizomes of *Smilax glabra* and their antimicrobial activity. Molecules. 18; 5265-5287. doi:10.3390/molecules18055265

[21] Lalmuansangi, C., Lalremruati, M and Zothansiama. 2020. Assessment of free radicals scavenging activities and antioxidative potential of the tuber extracts of *Stemona tuberosa* Lour. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy. 14(3): 347-358.

[22] Rutnakornpituk, B., Boonthip, C., Kerdpan, J., Fakfeang, N. and Kholam, W. 2018. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents and analyses of active compounds in *Stemona collinsae* Craib crude extracts. International Journal of Science. 15(1); 25-36.

[23] Singh, R. Bachheti, R.K., Saini, CK. And Singh, U. 2016. In vitro antioxidant activity of *Canna indica* extracts using different solvent system. Asian Journal of Pharmaceutical and clinical Reaearch. *Asian J Pharm Clin Res* 9(6): 53-56.

[24] Al-Snafi, A. E. 2015. Bioactive components and pharmacological effects of *Canna indica* -anoverview. International Journal of Pharmacology and Toxicology. 5(2); 71-75.

[25] Hosur, H. and Handral, M. 2021. A review on *Canna indica* and its pharmacological studies. World Journal of Pharmaceutical Research. 10(4); 2003-2012.

[26] Jirakiattikul, Y., Autaijamsripon, J. and Rithichai, P. 2018. Effect of culture periods on antioxidant contents of in

Science32-N3.indd 38 20/6/2567 BE 13:33

vitro Smilax corbularia shoots. Thai Science and Technology Journal. 27(6): 1066-1077. (in Thai)

[27] Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escria, A. and Saura-Calixto. J., 2000, Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols, Nutr Res, 20: 941-953.

[28] Chantarapon, P., Bunpean, A., Sangjan, T. and Puksuk, N. 2023. A systematic review of herbal medicinal formulas for skin disease treatment with Thai traditioncal medicine wisdom. Journal of Thai Traditional and Alternative Medicine. 21(1): 175-185. (in Thai)

Science32-N3.indd 39 20/6/2567 BE 13:33