การศึกษาผลของตัวทำละลายในการสกัดสมุนไพรที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย

The effect of solvent on antimicrobial activity of medicinal plant extraction

จารวี สุขประเสริฐ [1*] และ สุบงกช ทรัพย์แตง[1**]

บทคัดย่อ

การสกัดสมุนไพรจำนวน 7 ชนิด คือ กระเจี๊ยบแดง กำลังวัวเถลิง กำลังเสือโคร่ง กำลังหนุมาน เจตมูลเพลิงแดง ทับทิม และฝาง โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำ และ 95 % เอทธานอล มาศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) และ *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ซึ่งได้ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียโดยวิธี agar well diffusion พบว่าสมุนไพรที่สกัดด้วย 95 % เอทธานอล ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าน้ำ ยกเว้นกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยน้ำให้ผลการยับยั้งที่ดีกว่า โดยเฉพาะสารสกัดเอทธานอลของทับทิมสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ดีที่สุด โดยมีขนาดบริเวณใสในการยับยั้ง *E. coli, P. aeruginosa* และ *S. aureus* เท่ากับ 13.02 ± 0.87, 8.14 ± 0.80 และ 20.90 ± 0.05 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ (MIC) พบว่ามีค่า 32, 32 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) เท่ากับ 128, 64 และ 32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Abstract

Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E.coli*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) of aqueous and ethanol extracts of *Hibicus sabdariffa* Linn., *Anaxagorea luzonensis* A. Gray, *Betula alnoides* Buch.- Ham Ex G. Don, *Dracaena conferta* Ridl. *Plumbago rosea* Linn., *Punica granatum* Linn. and *Caesalpnia sappan* Linn. were investigated. The antimicrobial activity of aqueous and ethanol extracts was determined by agar well diffusion method. The results showed that ethanol extracts were more active than the aqueous extracts except for the aqueous extract of *Hibicus sabdariffa* Linn. that the aqueous extract was more active. The ethanol extract of *Punica granatum* Linn. has shown highest antimicrobial activity compared to other extracts. The ethanol extract of *Punica granatum* Linn. was found to inhibit *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* with the inhibition zone of 13.02 ± 0.87, 8.14 ± 0.80 and 20.90 ± 0.05 mm, respectively. Futhermore, the extract of *Punica granatum* Linn. were tested for the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) using three tested organisms and showed the MICs of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* were 32, 32 and 8 mg/ml, respectively. The same plant extracts were also tested for the Minimum Bactericidal Concentration (MBC), which were 128, 64 and 8 mg/ml, respectively.

คำสำคัญ : การยับยั้งแบคทีเรีย, การสกัดสมุนไพร, ตัวทำละลาย,

Keywords : Antimicrobial activity, Medicinal plant Extraction, Solvent

[1] สำนักเทคโนโลยีชุมชน กรมวิทยาศาสตร์บริการ

* E-mail address : jaravee@dss.go.th

** Corresponding author E-mail : subongkoch@dss.go.th

1. บทนำ (Introduction)

ปัจจุบันทั่วโลกให้ความสำคัญกับพืชสมุนไพรอย่างมาก ทั้งด้านอุตสาหกรรมยา อาหาร และเครื่องสำอาง เนื่องจากเริ่มตื่นตัวถึงอันตรายจากฤทธิ์ข้างเคียงและความเป็นพิษของสารสังเคราะห์หรือยาแผนปัจจุบันมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางสาธารณสุขเป็นอย่างมาก เช่นแพทย์ต้องเปลี่ยนแผนการรักษาจากยาต้านจุลชีพชนิดเดิมที่มีราคาถูกเป็นยาต้านจุลชีพชนิดใหม่ ซึ่งบางครั้งอาจต้องสั่งนำเข้าจากต่างประเทศส่งผลให้ประเทศชาติต้องสูญเสียงบประมาณจำนวนมาก ดังนั้นการใช้สมุนไพรเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ทั้งนี้เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่เป็นป่าเขตร้อน มีความหลากหลายของทรัพยากรทางชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชสมุนไพรที่มีอยู่มากมายในทั่วทุกภาคของไทย ซึ่งพืชบางชนิดแต่เดิมแพทย์แผนโบราณของไทยได้มีการนำมาใช้ในการรักษาโรคมาเป็นเวลานานแล้ว แต่ที่ยังไม่เป็นที่นิยมเพราะยังขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ จากเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกพืชสมุนไพรจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ กระเจี๊ยบแดง กำลังวัวเถลิง กำลังหนุมาน กำลังเสือโคร่ง เปลือกทับทิม ฝาง และเจตมูลเพลิงแดง มาทำการศึกษาวิจัยเนื่องจากมีประวัติการใช้รับประทาน เป็นยารักษาโรคและสามารถหาซื้อได้ตามร้านขายยาแผนโบราณโดยนำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางสาธารณสุขดังนี้

Escherichia coli (*E. coli*) เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นทั่วไป บางสายพันธุ์เป็นสาเหตุสำคัญที่สามารถก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้ ซึ่งจากการเฝ้าระวังของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข รายงานว่า พบโรคอุจจาระร่วงในประเทศแถบร้อนปีละประมาณ 1 ล้านราย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *E. coli* O104 : H4 ดังที่เป็นข่าวเมื่อปีพ.ศ. 2554 พบว่าเป็น *E. coli* สายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารพิษชนิดรุนแรงที่เป็นเชื้อโรคในกลุ่ม Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ที่สามารถผลิตสารพิษชิกาท็อกซิน (Shiga toxin) ซึ่งทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง และอาจเกิดปัญหาแทรกซ้อนทางไต [1]

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อฉวยโอกาสในโรงพยาบาล สามารถสร้างสารพิษและเอนไซม์ได้หลายชนิด ซึ่งมีส่วนสำคัญในการก่อโรค เชื้อชนิดนี้สามารถติดเชื้อได้ทั้งภายในและภายนอก โรคติดเชื้อที่เกิดจาก *P. aeruginosa* ได้แก่ โรคติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนล่าง จะมีตั้งแต่ไม่แสดงอาการจนถึงอาการรุนแรง การติดเชื้อทางผิวหนังสามารถเกิดได้กับผู้ที่มีแผลไฟไหม้ เชื้อจะไปเพิ่มจำนวนที่แผลทำให้เนื้อเยื่อตายและเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดตามมา นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดโรคที่อวัยวะอื่น ๆ เช่น ติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ หู ตา รวมทั้งกล้ามเนื้อหัวใจ [2]

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อบนผิวหนัง โดยเฉพาะโรค ฝีหนอง นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อฉวยโอกาสก่อโรคในผู้ป่วยที่มีร่างกายอ่อนแอหรือติดต่อพบบาดแผลถลอก แผลจากการผ่าตัด เชื้อจะบุกรุกเข้าไปในเนื้อเยื่อชั้นในและเข้าสู่กระแสเลือดแพร่กระจายออกไปตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายและทำให้เกิดโรค [3] นอกจากนี้ *S. aureus* ยังเป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษ [4]

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสกัดสารสำคัญโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดเปรียบเทียบประสิทธิภาพต่อการยับยั้งแบคทีเรีย คือน้ำและเอทธานอล โดยทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion จากนั้นจึงหาค่า MIC (Minimum inhibitory concentration) และค่า MBC (Minimum bactericidal concentration) ตามลำดับ ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับปัจจัยของตัวทำละลายที่มีต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสมุนไพรแต่ละชนิด ซึ่งจะสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในเรื่องของการพัฒนาสารสกัดให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นและนำสารสกัดไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งในด้านการพัฒนาเป็นยาเพื่อใช้แทนยาต้านจุลชีพ ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น สบู่เหลวล้างมือ ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดที่ฆ่าเชื้อและลดปริมาณเชื้อในผักและผลไม้ เป็นต้น ซึ่งจะเป็นการลดปัญหาการดื้อต่อยาต้านจุลชีพที่ผลิตจากสารสังเคราะห์ อีกทั้งยังสามารถช่วยแก้ปัญหาเศรษฐกิจของประเทศได้อีกทางหนึ่งด้วยกล่าวคือ เมื่อสมุนไพรได้รับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ประชาชนนิยมใช้อย่างแพร่หลาย จะทำให้สมุนไพรชนิดนั้นสามารถพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจได้

2. วิธีการวิจัย (Experimental)

2.1 การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาทดลองครั้งนี้แสดงข้อมูลในตารางที่ 1 กระเจี๊ยบแดง กำลังวัวเถลิง กำลังเสือโคร่ง กำลังหนุมาน เจตมูลเพลิงแดง และฝาง ผู้วิจัยได้ซื้อจากร้านขายยาแผนโบราณในเขตกรุงเทพฯ และจังหวัดลพบุรีในรูปของสมุนไพรแห้งและนำมาบดเป็นผงละเอียด สำหรับทับทิมเก็บผลสดระหว่างเดือนมิถุนายนและกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จากเขตพื้นที่จังหวัดลพบุรี นำมาล้างให้สะอาด แยกส่วนเมล็ดออกจากเปลือกผล นำเปลือกมาหั่นให้มีขนาดเล็กและ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการบดเป็นผงให้ละเอียด

Table 1 Information of some Thai medicinal plant species selected for antimicrobial activity

Medicinal plants	Plant species	Family	Part used
Sorrel (กระเจี๊ยบแดง)	*Hibicus sabdariffa* Linn.	Malvaceae	calyx
Kamlang wua thaloeng (กำลังวัวเถลิง)	*Anaxagorea luzonensis* A. Gray	Annonaceae	wood
Birch (กำลังเสือโคร่ง)	*Betula alnoides* Buch.- Ham.Ex G.Don	Betulaceae	wood
Dracaena conferta Ridl. (กำลังหนุมาน)	*Dracaena conferta* Ridl.	Dracaenaceae	wood
Rose – Coloured Leadwor (เจตมูลเพลิงแดง)	*Plumbago rosea* Linn.	Plumbaginaceae	root
Pomegranate (ทับทิม)	*Punica granatum* Linn.	Punicaceae	peel
Sappan – wood (ฝาง)	*Caesalpinia sappan* Linn.	Caesalpiniaceae	heartwood

2.2 ขั้นตอนการสกัดส่วนสกัดหยาบ

งานวิจัยนี้ได้สกัดสารจากสมุนไพรโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ น้ำ และ 95 % เอทธานอล

2.2.1. การสกัดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

ชั่งผงสมุนไพร จำนวน 100 กรัม เติมน้ำปริมาตร 500 มิลลิลิตร (อัตราส่วนผงสมุนไพรต่อน้ำ 1 ต่อ 5) ยกขึ้นตั้งไฟ รอจนเดือดจับเวลา 10 นาที ยกลงแล้วทิ้งให้เย็นจึงกรองด้วยผ้าขาวบาง เก็บสารสกัด หลังจากนั้นนำกากมาเติมน้ำอีก 500 มิลลิลิตร นำไปต้มต่อตามวิธีการเดิมซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยเก็บสารสกัดทั้ง 3 ครั้งที่ได้มารวมกัน นำสารสกัดไประเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 – 50 องศาเซลเซียส หลังจากน้ำระเหยออกจะได้สารที่มีลักษณะข้นเหนียว สารที่ได้เรียกว่า " สารสกัดหยาบ" (crude extract) ชั่งน้ำหนักนำมาคำนวณหา % yield ดังสูตร และเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย

% yield = weight of extract recovered / weight of fresh dry plant

2.2.2. การสกัดโดยใช้ 95% เอทธานอล เป็นตัวทำละลาย

ชั่งผงสมุนไพรจำนวน 100 กรัม เติม 95% เอทธานอล ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 นาที เป็นเวลา 7 วัน นำมากรองด้วยกระดาษ whatman เบอร์ 4 เพื่อแยกส่วนตัวอย่างพืชออก ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยวิธีการเดิมเก็บสารสกัดทั้ง 3 ครั้งที่ได้มารวมกัน นำสารสกัดไประเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 – 50 องศาเซลเซียส หลังจากระเหยแอลกอฮอล์ออกจะได้สารที่มีลักษณะข้นเหนียว สารที่ได้เรียกว่า " สารสกัดหยาบ" (crude extract) ชั่งน้ำหนักนำมาคำนวณหา % yield ดังสูตร และเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย

% yield = weight of extract recovered / weight of fresh dry plant

2.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion [5,6]

2.3.1. การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดที่จะทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 128, 64, 32, 16 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำส่วนสารสกัดหยาบมาละลายด้วย 1% DMSO (Dimethyl sulfoxide) และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง ผ่านเยื่อกรองที่มีขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร

2.3.2. แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบแบ่งเป็น แบคทีเรียแกรมบวก 1 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และแบคทีเรียแกมลบ 2 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781

2.3.3. การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย

จุ่มไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (cotton swab) จุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่ปรับความขุ่นให้ได้ใกล้เคียงกับ McFarland standard No. 0.5 บิดสำลีกับผนังหลอดอาหารให้หมาด และป้ายสำลีถี่ ๆ บนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 เซนติเมตร โดยในการป้ายให้ป้ายแบบ 3 ระนาบ แต่ละระนาบทำมุมกันประมาณ 60 องศา หลังจากนั้นใช้ที่เจาะจุกค็อก เบอร์ 2 (cork borer No. 2) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรเจาะอาหารแข็งจานละ 2 หลุม หลังจากนั้นหยอดสารสกัดที่ต้องการทดสอบลงในหลุม ๆ ละ 20 ไมโครลิตร โดยใช้ยาปฏิชีวนะคลอแรม ฟินิคอล ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น positive control และ 1 % DMSO เป็น negative control จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ (inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียร์ หน่วยเป็นมิลลิเมตร ทำการทดลองซ้ำสองซ้ำ และรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.4 หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth microdilution assay (2 fold serial dilution) [6]

2.4.1. การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

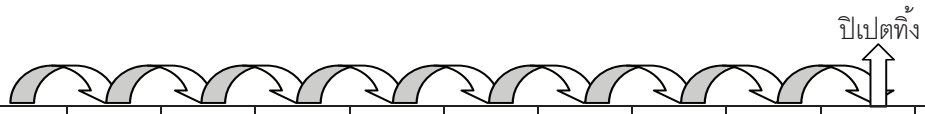
เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller Hinton broth (MHB) 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำเชื้อมาปรับปริมาณโดยเทียบความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (เชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml) หลังจากนั้นเจือจางด้วยอาหารเหลวในอัตราส่วน 1 : 100 จะได้เชื้อประมาณ 10^6 CFU/ml ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทดสอบ

2.4.2. การเตรียมสารสกัดสำหรับทดสอบ

เลือกสารสกัดที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีจากผลการทดลองในข้อ 2.3 มาทดสอบ หาค่า MIC และ MBC โดยชั่งสารสกัดสมุนไพรให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำส่วนสารสกัดหยาบมาละลายด้วย 1% DMSO (Dimethyl sulfoxide) และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเยื่อกรองที่มีขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร หลังจากนั้นทำการเจือจางสารสกัดด้วยอาหารเหลวให้ ความเข้มข้นลดลงหลุมละ 2 เท่า (2-fold serial dilution)

2.4.3. การหยอดสารละลายลงใน 96-well microtiterplate

ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MHB (ความเข้มข้น 2 เท่า) ใส่ลงในหลุมที่ 2 – 11 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตสารสกัดที่เตรียมใส่ลงในหลุมที่ 1 และหลุมที่ 2 หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วผสมสารทดสอบให้เข้ากันในหลุมที่ 2 จากนั้นปิเปตสารละลายในหลุมที่ 2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปใส่ในหลุมที่ 3 และทำเช่นเดียวกันจนถึงหลุมที่ 11 ในหลุมที่ 11 ให้ปิเปตสารผสมทิ้ง 100 ไมโครลิตร เติมสารแขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมไว้ใส่ลงในทุกหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร โดยในแถวที่ E 1 -11 และ F 1-11 ทำ positive control โดยใช้ยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอลที่ระดับความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ทำการเจือจางลดลงหลุมละ 2 เท่าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วงระดับความเข้มข้นครอบคลุมความเข้มข้นของ สารสกัดที่ทดสอบ คือ 128 – 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนแถว G 1-11 และ H 1-11 เป็น negative control โดยใช้ 1% DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางลดลงหลุมละ 2 เท่าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วงระดับความเข้มข้นครอบคลุมความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบคือ 128 – 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



แถว	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สกัด สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	
B	สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	
C	สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	
D	สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	MHB + สาร สกัด	
E	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	
F	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PC	
G	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	

Figure 1 แสดงแผนผังการหลอดสารละลายลงใน 96-wel l microtiterplate

หมายเหตุ PC แทน positive control

NC แทน negative control

2.4.4. การบันทึกผล

บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยสังเกตหลุมสุดท้ายที่ใสและไม่มีตะกอนของเชื้อที่ก้นหลุม ถือว่าความเข้มข้นที่หลอดนั้นเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration , MIC) จากนั้นปิเปตเชื้อจากหลอดที่ใสทุกหลอด ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร ลงบน Mueller Hinton Agar (MHA) แล้ว spread ด้วยแท่งแก้วงอ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผลโดยถ้าเชื้อเจริญบนอาหารมากกว่า 5 โคโลนี ถือว่าความเข้มข้นนั้นไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ แต่ถ้าเชื้อเจริญบนอาหารน้อยกว่า 5 โคโลนี ถือว่าความเข้มข้นนั้นสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ เป็นค่า MBC

3. ผลและวิจารณ์ (Results and Discussion)

3.1 การสกัดสมุนไพร

การวิจัยนี้ได้ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากสมุนไพรจำนวน 7 ชนิด คือ กระเจี๊ยบแดง กำลังวัวเถลิง กำลังเสือโคร่ง กำลังหนุมาน เจตมูลเพลิงแดง เปลือกทับทิม และ ฝาง โดยใช้น้ำ และ 95 % เอทธานอลเป็นตัวทำละลาย และทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) ได้ปริมาณของสารสกัด ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งแสดงร้อยละของสารสกัดที่ได้เมื่อเทียบกับน้ำหนักผงแห้งของผงสมุนไพร

Table 2 Percent yield of medicinal plant extracts

Medicinal Plants	Yield of aqueous extracts (%)	Yield of ethanol extracts (%)
Sorrel (กระเจี๊ยบแดง)	65.25	14.43
Kamlang wua thaloeng (กำลังวัวเถลิง)	7.55	19.02
Birch (กำลังเสือโคร่ง)	15.69	31.46
Dracaena conferta Ridl. (กำลังหนุมาน)	11.26	11.04
Rose – Coloured Leadwor (เจตมูลเพลิงแดง)	38.78	6.44
Pomegranate (ทับทิม)	46.63	52.33
Sappan – wood (ฝาง)	6.80	15.76

จากผลการสกัดพืชสมุนไพรด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันคือ น้ำ และ 95 % เอทธานอล พบว่า ในการสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณสารที่ได้ โดยในการสกัดด้วยน้ำ พบว่ากระเจี๊ยบแดงมีปริมาณ สารสกัดสูงสุดคือร้อยละ 65.25 รองลงมาคือ ทับทิม เจตมูลเพลิงแดง กำลังเสือโคร่ง กำลังหนุมาน กำลังวัวเถลิง และฝาง มีปริมาณสารสกัดร้อยละ 46.63, 38.78, 15.69, 11.26, 7.55 และ 6.80 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยใช้ 95 % เอทธานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่า ทับทิมมีปริมาณสารสกัดสูงสุดคือร้อยละ 52.33 รองลงมา คือ กำลังเสือโคร่ง กำลังวัวเถลิง ฝาง กระเจี๊ยบแดง กำลังหนุมาน และ เจตมูลเพลิงแดง มีปริมาณสารสกัดร้อยละ 31.46, 19.02, 15.76, 14.43, 11.04 และ 6.44 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากสาระสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในพืชสมุนไพร มีความสามารถในการละลายใน ตัวทำละลายได้แตกต่างกัน ทั้งนี้การเลือกตัวทำละลายควรพิจารณาถึงความสามารถในการละลายสารสำคัญมากที่สุด นอกจากนี้ควรพิจารณาถึงความคงตัวดี หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป และควรคำนึงถึงสภาพของพืชสมุนไพรที่ทำการสกัด [7]

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 7 ชนิด คือ กระเจี๊ยบแดง กำลังวัวเถลิง กำลังเสือโคร่ง กำลังหนุมาน เจตมูลเพลิงแดง เปลือกทับทิม และฝาง ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ และ 95% เอทธานอล เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli, P. aeruginosa* และ *S. aureus* โดยใช้วิธี agar well diffusion และพิจารณาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียจากขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้น (inhibition zone) ดังแสดงผลในตารางที่ 3

Table 3 Antimicrobial activity of aqueous and ethanol extracts of medicinal plants

Medicinal Plants	Solvent	Diameter of inhibition zone (mm. ± SD)		
		E. coli	*P. aeruginosa*	*S. aureus*
Sorrel (กระเจี๊ยบแดง)	water	11.40 ± 0.42	10.02± 0.43	NI
	95% ethanol	NI	NI	NI
Kamlang wua thaloeng (กำลังวัวเถลิง)	water	NI	NI	11.12 ± 1.53
	95% ethanol	NI	NI	11.86 ± 0.38
Brich (กำลังเสือโคร่ง)	water	NI	NI	13.90 ± 0.11
	95% ethanol	NI	NI	18.08± 0.93
Dracaena conferta Ridl. (กำลังหนุมาน)	water	NI	NI	15.25 ± 1.39
	95% ethanol	NI	NI	18.21 ± 0.59
Rose – Coloured Lead-wor (เจตมูลเพลิงแดง)	water	NI	NI	NI
	95% ethanol	NI	NI	20.42 ± 0.91
Pomegranate (ทับทิม)	water	12.50 ± 0.66	NI	19.72± 0.89
	95% ethanol	13.02± 0.87	8.14± 0.80	20.90± 0.05
Sappan – wood (ฝาง)	water	NI	NI	20.79± 1.62
	95% ethanol	9.15± 0.28	NI	22.26± 0.39
Chloramphenicol 1mg/ml (Positive control)	95% ethanol	21.47± 0.39	21.6± 0.69	27.6± 0.07
1 % DMSO (Negative control)	water	NI	NI	NI

หมายเหตุ NI แทน No Inhibition (ไม่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย)

จากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 128, 64, 36, 16 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี positive control คือ คลอแรมฟินิคอลความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ Negative control คือ 1% DMSO พบว่าคลอแรมฟินิคอลสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli, P. aeruginosa* และ *S. aureus* ได้ โดยมีค่าขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นคือ 21.47 ± 0.39, 21.60 ± 0.69 และ 27.6 ± 0.07 มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับ 1% DMSO พบว่า ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่นำมาทำการทดสอบ และสำหรับสารสกัดสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้น 64, 36, 16 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ สารสกัดสมุนไพรมีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ที่ระดับความเข้มข้นที่ 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

สารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ คือ สารสกัดเอทธานอลของทับทิมที่ความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อได้มากที่สุด มีค่าขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้นเท่ากับ 13.02 ± 0.87 มิลลิเมตร รองลงมาคือ สารสกัดน้ำของทับทิม สารสกัดน้ำของกระเจี๊ยบแดง และสารสกัดเอทธานอลของฝาง ที่ความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นคือ 12.50 ± 0.66, 11.40 ± 0.42 และ 9.15 ± 0.28 มิลลิเมตร ตามลำดับ

สารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ คือ สารสกัดน้ำของกระเจี๊ยบแดงยับยั้งได้มากที่สุดและสารสกัดเอทธานอลของทับทิมที่ความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งได้รองลงมามีค่าขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นคือ 10.02 ± 0.43 และ 8.14 ± 0.80 มิลลิเมตร ตามลำดับ

สารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เกือบทุกชนิดสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ยกเว้นสารสกัดกระเจี๊ยบแดง และสารสกัดน้ำของเจตมูลเพลิงแดง จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าในกลุ่มของสารสกัดเอทธานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีกว่า โดยสารสกัดเอทธานอลของฝาง ที่ความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งเชื้อได้มากที่สุดมีค่าขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น คือ 22.26 ± 0.39 มิลลิเมตร รองลงมาคือสารสกัดเอทธานอลของทับทิม เจตมูลเพลิงแดง กำลังหนุมาน กำลังเสือโคร่ง และกำลังวัวเถลิงที่ความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น คือ 22.26 ± 0.39, 20.90 ± 0.05, 20.42 ± 0.91, 18.21 ± 0.59, 18.08 ± 0.59 และ 11.86 ± 0.59 มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับสารสกัดด้วยน้ำพบว่าสารสกัดฝางที่ความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด มีค่าขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น คือ 20.79 ± 1.62 มิลลิเมตร รองลงมาคือ สารสกัดทับทิม กำลังหนุมาน กำลังเสือโคร่ง และกำลังวัวเถลิงที่ความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้น คือ 20.79 ± 1.62, 19.72 ± 0.89, 15.25 ± 1.39, 13.90 ± 0.11 และ 11.12 ± 1.53 มิลลิเมตร ตามลำดับ

กรณีของสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทธานอลของกำลังวัวเถลิง กำลังเสือโคร่ง กำลังหนุมาน และ เจตมูลเพลิงแดงพบว่าไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* แต่สารสกัดน้ำและสารสกัดเอทธานอล ของกำลังวัวเถลิง กำลังเสือโคร่ง กำลังหนุมาน และเจตมูลเพลิงแดง ที่ความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ ยกเว้นสารสกัดเจตมูลเพลิงแดงที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เฉพาะสารสกัดที่สกัดด้วยเอทธานอล ที่ความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นใกล้เคียงกับ positive control คือ 20.42 ± 0.91 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดน้ำของกำลังวัวเถลิง กำลังเสือโคร่ง กำลังหนุมานที่ความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า กำลังหนุมาน ที่ความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นกว้างมากที่สุด รองลงมาคือ กำลังเสือโคร่ง และกำลังวัวเถลิง ที่ความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นเท่ากับ 15.25 ± 1.39, 13.90 ± 0.11 และ 11.12 ± 1.53 มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับสารสกัดเอทธานอลของกำลังวัวเถลิง กำลังหนุมาน และกำลังเสือโคร่งที่ความเข้มข้น 128 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น เท่ากับ 11.86 ± 0.38, 18.08 ± 0.93 และ 18.21 ± 0.59 มิลลิเมตร ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาจากผลการยับยั้งแบคทีเรียในภาพรวมจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิมที่สกัดด้วย 95 % เอทธานอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดฝางที่สกัดด้วย 95 % เอทธานอล ซึ่งทั้งสารสกัดทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ดังนั้น จึงนำสารสกัดเปลือกทับทิมที่สกัดด้วย 95 % เอทธานอล และสารสกัดฝาง 95 % เอทธานอล ไปทำการศึกษาต่อ เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum Inhibition Concentration ; MIC) และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

อย่างไรก็ตามจากผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 7 ชนิด จะเห็นได้ว่าสารสกัด จะมีผลยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยของ Parekh และคณะ (2005) ได้ทดสอบการยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำและเมทธานอล พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีส่วนประกอบทางเคมีและโครงสร้างของผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีสารประกอบพวก phospholipid lipopolysaccharide และ lipoprotein c และชั้นของ peptidoglycan จึงส่งผลให้สารสกัดสมุนไพรเข้าไปทำลายหรือรบกวนการทำงานบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ยากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก [8]

3.3 หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration , MIC) และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) โดยวิธี Broth microdilution assay (2 fold serial dilution)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* , *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ของสารสกัดทับทิมและสารสกัดฝางที่สกัดด้วย 95 % เอทธานอล เปรียบเทียบกับคลอแรมฟินิคอล ซึ่งเป็น positive control และ 1 % DMSO ซึ่งเป็น negative control โดยวิธี broth micro dilution assay พบว่าสารคลอแรมฟินิคอล มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อน้อยกว่า 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดจากเปลือกทับทิมมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* , *P. aeruginosa* และ *S. aureus* เท่ากับ 32, 32 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดฝางมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* , *P. aeruginosa* และ *S. aureus* เท่ากับ 16 , 64 และ 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารละลาย 1 % DMSO ซึ่งเป็น negative control ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแสดงผลในตารางที่ 3

ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* , *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ของสารสกัดทับทิมและสารสกัดฝางที่สกัดด้วย 95 % เอทธานอล เปรียบเทียบกับคลอแรมฟินิคอล ซึ่งเป็น positive control และ1 % DMSO ซึ่งเป็น negative control โดยวิธี broth micro dilution assay พบว่า สารคลอแรมฟินิคอลมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้มีค่าน้อยกว่า 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดจากเปลือกทับทิมมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* , *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ได้มีค่าเท่ากับ 128, 64 และ 32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดฝางมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* เท่ากับ 128 และ 64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ไม่มีผลในการฆ่าเชื้อ *P. aeruginosa* ได้อาจเนื่องจากในฝางนั้นไม่มีสารออกฤทธิ์ที่มีผลในการฆ่าเชื้อ *P. aeruginosa* ได้หรือมีสารออกฤทธิ์แต่อาจละลายได้ดีในตัวทำละลายอื่นที่ไม่ใช่ 95 % เอทธานอล ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vudhivanich และ Supanuntorn (2002) พบว่า พืชชนิดเดียวกันที่สกัดด้วยเอทธานอลที่มีความเข้มข้นต่างกันให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อต่างกัน และสารละลาย 1 % DMSO ซึ่งเป็น negative control ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แสดงผลในตารางที่ 4

Table 4 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of test herbal extract for microorganisms

สารสกัดพืชสมุนไพร	MIC (mg/ml)			MBC (mg/ml)		
	E. coli	*P. aerugi-nosa*	*S. aureus*	*E. coli*	*P. aerugi-nosa*	*S. aureus*
เปลือกทับทิม	32	32	8	128	64	32
ฝาง	16	64	16	128	-	32
คลอแรมฟินิคอล	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125
1 % DMSO	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - แทน ไม่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

4. สรุป (Conclusion)

ในการศึกษาผลของตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด คือ น้ำ และ 95 % เอทธานอลในการสกัดสมุนไพรจำนวน 7 ชนิด คือ กระเจี๊ยบแดง กำลังวัวเถลิง กำลังเสือโคร่ง กำลังหนุมาน เจตมูลเพลิงแดง เปลือกทับทิม และฝาง มาทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพต่อการยับยั้งแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ โดยเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และเป็นแบคทีเรียแกรมลบ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในเบื้องต้นได้ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียโดยวิธี agar well diffusion พบว่าสมุนไพรที่สกัด ด้วย 95 % เอทธานอลให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าน้ำ และสารสกัดส่วนใหญ่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และในการทดลองครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิมที่สกัดด้วย 95 % เอทธานอลสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดชนิดอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบโดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่าขนาดบริเวณใสในการยับยั้งเชื้อ *E. coli, P. aeruginosa* และ *S. aureus* เท่ากับ 13.02 ± 0.87, 8.14 ± 0.80 และ 20.90 ± 0.05 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อพบว่ามีค่า 32, 32 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อคือ 128, 64 และ 32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งผลจากการศึกษาทดลองครั้งนี้สามารถนำสารสกัดจากเปลือกทับทิมและฝาง ไปพัฒนาต่อยอดใช้ประโยชน์ในด้านการผลิตยาทดแทนยาต้านจุลชีพสังเคราะห์ ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ต่อไปในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์บริการ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินการวิจัย ขอบคุณสำนักเทคโนโลยีชุมชนที่เอื้อเฟื้อสถานที่ ขอบคุณ นางสุวรรณี แทนธานี และ ผู้ช่วยนักวิจัย นางสาวประวิณา สีมาทรัพย์ ที่ให้ความร่วมมือในการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี

6. เอกสารอ้างอิง (References)

[1] กฤษณ์ ถิรพันธุ์เมธี, 2553 , " อันตรายจากแบคทีเรียจำเพาะที่ไม่ควรพบในผลิตภัณฑ์สมุนไพร" ในการควบคุมคุณภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพรและเภสัชภัณฑ์, จาตุรงค์ ประเทืองเดชกุล (บรรณาธิการ), พิมพ์ครั้งที่ 1 ,ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ., หน้า 79 – 81.

[2] ธีรพัฒน์ เวชชประสิทธิ์. เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* รอบรู้วิทย์. 2554. [ออนไลน์]. [อ้างถึงวันที่ 24 เมษายน 2555]. เข้าถึงได้จาก http://magazine.ipst.ac.th/index.php/new-magazine/.../38-new3magazine?

[3] ธีรพรรณ ภูมิภมร และอุไม บิลหมัด. การดื้อยาของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ในภาคใต้ ระหว่างปี พ.ศ. 2549 – 2551 . วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 2011, 6 (1), 1 - 8 .

[4] นิติพงษ์ ศรีวิวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์. การดื้อยาปฏิชีวนะของ *Staphylococcus aureus* และแนวทางการควบคุม. สงขลานครินทร์เวชสาร. 2552, 27 (4), 347 - 358 .

[5] รัตนา อินทรานุปกรณ์. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. 2550. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, หน้า 83 - 85.

[6] วิสาตรี คงเจริญสุนทร จินตนา จิรถาวร และวิภาพร ใจเกื้อ . การศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ดื้อยาโดยวิธี Flow cytometry. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 2550, 12 (2), 7- 9.

[7] Jeeraporn, S., Nattapon K., Weerawan, N. and Monthon L. " Anti- *Candida albicans* activity of active substances derived from Morinda citrifolia fruit" . Journal of Medical Technology and Physical Therapy. 2011, 23 (1), 8 -18.

[8] Parekh J., Jadeja D. and Chanda S. " Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity" Turk . J. Biol., 2005, 29, 203-210.

[9] Vudhivanich, S. and S. Supanuntorn. 2002. " Potential of Thai herbal extract for growth inhibition of Ralstonia solanacearum, the causal agent of bacterial wilt of tomato. the first International Conference on Tropical and Subtropical Plant Diseases. November 5-8, 2002. Chiang Mai, Thailand. P.161