

การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 4 ประจำปี 2558
เรื่อง การวิจัยและนวัตกรรมเพื่อพัฒนาท้องถิ่นสู่ประชาคมอาเซียน
ผลงานวิจัยภาคบรรยาย วันที่ 5 สิงหาคม 2558
ณ สำนักงานอธิการบดี มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากสารสกัดพืชสมุนไพร Anti-pathogenic Bacterial Activities from Herbal Extracts

ซูไบด๊ะ หะยิวาเงาะ^{1*} และอัจมาน อาแด²
Zubaidah Hajiwangoh^{1*} and Ajman adae²

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากสารสกัดพืชสมุนไพรจำนวน 5 ชนิด คือ มะม่วงหิมพานต์ มะขาม มะยม มะกรูด และขี้เหล็ก ที่สกัดด้วย เฮกเซน อะซิโตนและเมทานอล โดยศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี Disc diffusion และ Tube dilution ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ถึง 4 ชนิด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสอยู่ในช่วง 6.10 - 14.90 มิลลิเมตร เมื่อนำไปทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) พบว่า สารสกัดจากใบขี้เหล็กด้วยอะซิโตนมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากใบมะม่วงหิมพานต์และใบมะกรูด สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และร้อยละ 80 ของสารสกัดยังสามารถยับยั้งเชื้อ MRSA ซึ่งเป็นเชื้อที่ดื้อยาได้ จากข้อมูลที่ได้บ่งชี้ว่า สารสกัดจากพืชเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนายารักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค สารสกัด สมุนไพร

Abstract

This research aimed to investigate anti-pathogenic bacterial activities of five herbal extracts including cashew nut (*Anacardium occidentale* L.), tamarind (*Tamarindus indica* L.), star gooseberry (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels), Kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) and cassia (*Cassia siamea* Lamk). They were extracted with hexane, acetone and methanol, and screened for their inhibitory effect against *Staphylococcus aureus*, Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by disc diffusion and tube dilution methods. The results showed that the extracts inhibited all tested pathogenic bacteria with inhibition zone ranging from 6.10 - 14.90 mm. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracts were then determined. It was found that acetone extract of cassia leaves exhibited the most effective inhibition against *S. aureus* and MRSA with MIC values of 0.03 mg/ml. and extracts of cashew nut leaves and kaffir lime leaves showed the highest antibacterial activities against *P. aeruginosa* with MIC values of 0.03 mg/ml. Moreover 80% of the extracts exhibited antibacterial activities against MRSA which was an antibiotic resistant bacteria. On the basis of these data presented, these plant extracts may be useful for the development of therapeutic treatments of bacterial infection in the future.

Keywords : anti-pathogenic bacterial, extracts, herbal

* อาจารย์หลักสูตรจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

† อาจารย์หลักสูตรเคมี คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

* Corresponding author: e-mail : zubaidah.h@yru.ac.th

บทนำ

ปัจจุบันเกิดปัญหาแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ซึ่งเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลกระทบต่อทั่วโลก และมีความซับซ้อนมากขึ้นทุกขณะ ส่งผลกระทบต่อทั้งสุขภาพและเศรษฐกิจ (Luvia, 2006) ปัญหาการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุของโรคติดต่อที่มีแนวโน้มสูงขึ้น ทำให้การใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมรักษาการติดเชื้อไม่ได้ผลเท่าที่ควร และบางครั้งไม่สามารถหายที่เหมาะสมได้ ส่งผลต่อค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มขึ้น ไข้เวลารักษานานขึ้น และทำให้โรคติดต่อที่เคยควบคุมได้กลับมาระบาดมากขึ้น นับตั้งแต่การค้นพบยาปฏิชีวนะชนิดแรกคือ Penicillin อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยจากการติดเชื้อมากขึ้น แต่การดื้อยาปฏิชีวนะก็เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว อย่างเช่น *S.aureus* ซึ่งมีการดื้อยา Methicillin และยาในกลุ่มเบต้าแลคแตม จึงเรียกเชื้อนี้ว่า Methicillin-resistant *S. aureus* หรือ MRSA และปัจจุบัน MRSA ไม่ได้ดื้อยา Methicillin และยาในกลุ่มเบต้าแลคแตมเท่านั้น แต่ยังดื้อยาปฏิชีวนะอื่น ๆ อีกด้วย เช่น ยาในกลุ่ม Aminoglycosides, Fluoroquinolones และ Tetracycline (Kim, Yu, Jeong *et al.*, 2004; Zuo, Wang, Zhao *et al.*, 2008) และยาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อ MRSA คือ Vancomycin ซึ่งเป็นยาที่มีราคาแพง และยังพบว่าปัจจุบันเชื้อมีความไวต่อยา Vancomycin ลดลง จะเห็นได้ว่าเชื้อมีอัตราการดื้อยาเร็วกว่าอัตราที่เราสามารถพัฒนายาใหม่ ๆ ขึ้นมาได้ทัน การพัฒนายาด้านจุลชีพที่ได้ผลดี มีความปลอดภัยสูงกำลังพัฒนาไม่ทันกับการปรับตัวของเชื้อโรคดื้อยา จึงมีความจำเป็นที่จะต้องค้นคว้าหายาด้านจุลินทรีย์ตัวใหม่อยู่ตลอดเวลา (Luvia, 2006; Sarker, Nahar and Kumarasamy, 2007)

นักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจในการค้นคว้ากลวิธีใหม่ ๆ ในการรักษาโรคติดเชื้อ เพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะ ซึ่งผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความน่าสนใจ โดยเฉพาะสมุนไพรไทยที่มีการใช้รักษาโรคมานาน และมีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรนั้นมีผลข้างเคียงในการรักษาน้อยมากเมื่อเทียบกับยาที่สังเคราะห์ขึ้นจากสารเคมี (วันดี ฤทธิพันธ์, 2541; Quave, Plano, Pantuso *et al.*, 2008) ประกอบกับผู้คนเริ่มหันมาใส่ใจในการดูแลสุขภาพของตนเองมากขึ้น โดยเฉพาะการใช้วิธีที่เป็นธรรมชาติ การใช้สมุนไพรเป็นยารักษาโรคจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความนิยมมากขึ้น มีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรเป็นแหล่งของสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ สำหรับประเทศไทยซึ่งมีพืชสมุนไพรเป็นจำนวนมากและมีความหลากหลาย ก็มีการศึกษาค้นคว้าหาสารต้านจุลินทรีย์จากพืชสมุนไพร ดังจะเห็นได้จากการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากมังคุด ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดวัณโรค (Suksamram, Suwannapoch, Phakhodee *et al.*, 2003) และยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิวอักเสบเป็นหนอง ได้แก่ *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* (Chomnawang, Surassmo, Nukoolkarn *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์อีกหลายชนิด เช่น *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อยา (MRSA) (เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร, วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม, เมตตา องค์กรกุล และคณะ, ม.ป.ป.)

พืชสมุนไพรและพืชผักพื้นบ้านไทยหลายชนิด ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นอาหาร เครื่องเทศ บางชนิดนอกจากเป็นอาหารแล้วก็มีสรรพคุณทางยาด้วยเช่น มะม่วงหิมพานต์ มะขาม มะยม มะกรูด และขี้เหล็ก เป็นต้น โดยมีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย เช่น ลดความดันโลหิต ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดการอักเสบ รักษาบาดแผล รักษาโรคผิวหนัง (จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก, 2552; สุทธิ ภิษัชเวช, 2551) ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในท้องถิ่น จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ มะม่วงหิมพานต์ มะขาม มะยม มะกรูด และขี้เหล็ก ซึ่งเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาและสามารถหาได้ง่ายในพื้นที่ และศึกษาประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียก่อโรคของสมุนไพรแต่ละชนิด เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไป

วิธีการวิจัย

การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

นำสมุนไพร ได้แก่ มะม่วงหิมพานต์ (ส่วนใบ), มะขาม (ส่วนใบ), มะยม (ส่วนใบ), มะกรูด (ส่วนใบ) และขี้เหล็ก (ส่วนใบ) สกัดสารด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน อะซิโตน และเมทานอล ตามลำดับ โดยนำสมุนไพรตัดเป็นชิ้นเล็กแล้วนำไปตากให้แห้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนำสมุนไพรจำนวน 50 กรัม ใส่ในถุงผ้าขาวแล้วนำไปแช่ในสารละลายเฮกเซนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ปิดภาชนะให้สนิทเพื่อป้องกันการระเหยของสารละลาย กรองส่วนที่เป็นกากออกแล้วนำของเหลวที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนพร้อมลดความดัน (rotary evaporator) นำกากสมุนไพรไปแช่ในสารละลายอะซิโตนเพื่อสกัดสารต่อด้วยวิธีเดียวกัน และทำเช่นเดียวกันกับสารละลายเมทานอล

วิธีเตรียมเชื้อในการทดสอบ

แบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ MRSA และแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด บนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ใช้ห่วง เชื้อเชื้อ (loop) 2 หรือ 3 โคโลนี ใส่ในหลอด 0.85 % NaCl ปรับให้เชื้อมีความขุ่นเท่ากับความขุ่นของ McFarland standard NO.0.5 จะได้เชื้อในหลอดประมาณ 1×10^8 CFU/ml.

การเตรียมสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

ละลายสารสกัดใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารสกัดปริมาณ 10 ไมโครลิตร หยดลงแผ่น disc ปลอดเชื้อ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) ที่วางบนแผ่นตะแกรง จะให้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อ disc หลังหยดสารสกัดให้นำไปทดสอบทันที และใช้แผ่น disc ที่หยด DMSO เป็นชุดควบคุม

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดโดยวิธี Disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นได้ดัดแปลงวิธีจาก Lorion (1996) โดยใช้สำลีพันปลายที่ปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อที่เตรียมไว้แล้วบิดข้างๆ หลอดพอหมัด ป้ายลงบนอาหาร Mueller hinton agar (MHA) ให้เชื้อกระจายทั่วผิวของอาหารเพาะเชื้อ ปล่อยให้ผิวอาหารเพาะเชื้อแห้งแล้ววางแผ่น disc ที่หยดสารสกัดสมุนไพร นำจานเพาะเชื้อที่วางแผ่นยาแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง โดยเชื้อแต่ละชนิดจะทำการทดสอบ 2 ซ้ำ อ่านผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน

ทำเช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารสกัดจากพืชสมุนไพร โดยใช้แผ่นยาด้านจุลินทรีย์มาตรฐานแทนการวาง disc ที่หยดสารสกัดสมุนไพร

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) โดยวิธี Tube dilution

เตรียมสารสกัดในสารละลาย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วเจือจางสารสกัดในหลอดทดลองแบบ 2-fold serial dilution ด้วยอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) จนได้ความเข้มข้นระหว่าง 2.00-0.004 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วใส่เชื้อแบคทีเรียทดสอบที่มีปริมาณเชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/ml. ลงไป (ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ในแต่ละหลอด จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเป็น 1-0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำหลอดทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สังเกตดูความขุ่นใสของแต่ละหลอด อ่านค่า MIC โดยสังเกตความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่เจริญ ซึ่งหลอดจะมีลักษณะใส มีชุดควบคุม คือ หลอดที่ไม่ใส่เชื้อ (negative control) และหลอดที่ใส่เชื้อ (positive control) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Lorion, 1996)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาด้านจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

สำหรับการหาค่า MIC ของยาด้านจุลินทรีย์ วิธีการทำ รวมถึงขั้นตอนต่างๆ ทำวิธีเดียวกันกับการหาค่า MIC ของสารสกัด โดย *S. aureus* และ MRSA ทดสอบกับยา Penicillin G และ Vancomycin ส่วน *E. coli* และ *P. aeruginosa* ทดสอบกับยา Ampicillin และ Tetracycline

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคเบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี Disc diffusion

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* และ MRSA และแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* และ *P. aeruginosa* พบว่า สารสกัดจากสมุนไพร 5 ชนิด จำนวน 15 สารสกัด สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทุกชนิด (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1) โดยสารสกัดจากใบมะกรูดสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้เกือบทุกชนิด ยกเว้นสารสกัดด้วยเมทานอลที่ไม่สามารถยับยั้ง MRSA ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากใบมะขามสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้เกือบทุกชนิด

เช่นกัน ยกเว้นสารสกัดด้วยเฮกเซนไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ สำหรับสารสกัดที่สามารถทำให้เกิดวงใสกว้างที่สุด คือ สารสกัดจากใบมะม่วงหิมพานต์ที่สกัดด้วยเมทานอล สามารถยับยั้ง MRSA ได้ดีที่สุด โดยทำให้เกิดวงใสกว้าง 14.90 มิลลิเมตร และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ทุกชนิด

ตารางที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี disc diffusion

สารสกัดความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)											
	EC			PA			SA			MRSA		
	H	A	M	H	A	M	H	A	M	H	A	M
มะม่วงหิมพานต์ (ใบ)	-	7.25	7.90	-	8.30	9.80	12.80	7.95	9.90	7.90	8.30	14.90
ฝั่มะขาม (ใบ)	6.90	7.10	11.95	6.10	6.90	10.25	-	7.60	7.90	8.00	7.50	10.90
มะยม (ใบ)	8.00	-	-	-	6.40	-	8.00	-	6.90	8.00	7.40	-
มะกรูด (ใบ)	8.75	7.20	7.90	6.90	7.90	7.20	6.35	7.90	7.00	8.90	7.00	-
ซีอิ๊วขาว (ใบ)	-	7.90	-	-	-	6.10	9.10	7.90	8.10	6.90	7.90	-

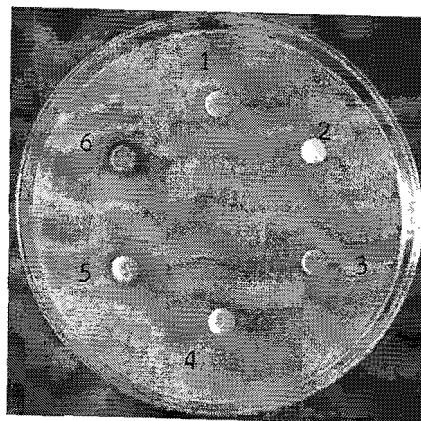
หมายเหตุ

EC = *Escherichia coli*, PA = *Pseudomonas aeruginosa*, SA = *Staphylococcus aureus*, MRSA = Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

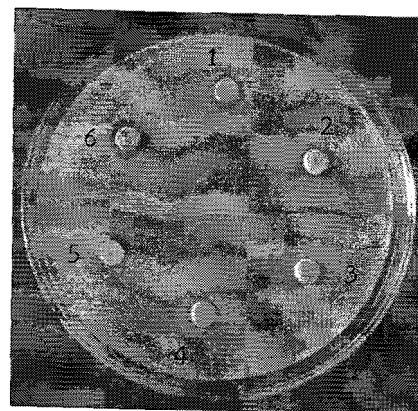
H = สมุนไพรที่สกัดด้วย Hexene, A = สมุนไพรที่สกัดด้วย Acetone และ M = สมุนไพรที่สกัดด้วย Methanol

- = ไม่เกิดวงใส ใช้แผ่น disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร

สารสกัดจากพืชสมุนไพรที่นำมาทดสอบ ส่วนใหญ่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ เมื่อเปรียบเทียบแล้ว พบว่า มีเพียงสารสกัดจำนวน 5 สารสกัดเท่านั้นที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ ในขณะที่มีสารสกัดจำนวน 10 สารสกัดที่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ ซึ่งมีรายงานวิจัยที่ศึกษาพบว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Chowdhury, Alam, Rahman *et al.*, 2009) เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบ มีชั้น outer membrane ที่ประกอบด้วย lipoprotein และ lipopolysaccharide ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน (selective permeable) จึงเป็นส่วนสำคัญที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของสารในเซลล์ (Chandara, Baluja and Chanda, 2005; Wong, 2006) และชั้น outer membrane ยังอาจช่วยป้องกันไม่ให้สารสกัดสัมผัสกับผนังเซลล์หรือลดจำนวนของสารสกัดที่จะสัมผัสเซลล์ (Agedah, Bawo and Nyananya, 2010)



P. aeruginosa



MRSA

หมายเหตุ

P.aeruginosa : 1. มะกรูด 2. DMSO 3. ซีอิ๊วขาว 4. มะยม 5. มะขาม 6. มะม่วงหิมพานต์

MRSA : 1. มะขาม 2. มะยม 3. DMSO 4. ซีอิ๊วขาว 5. มะม่วงหิมพานต์ 6. มะกรูด

ภาพที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพร

การวิจัยครั้งนี้พบว่า สารสกัดจากใบมะกรูด มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ค่อนข้างกว้าง ซึ่งมีรายงานการวิจัยพบว่า สารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตทของผลมะกรูดสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ได้ (Chanthaphon, Chantachum and Hongpattarater, 2008) และพบว่าสารสกัดจากผลมะกรูดด้วยเมทานอล ไดคลอโรมีเทน คาร์บอน เททระคลอไรด์และสารสกัดด้วยน้ำ สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้เช่นเดียวกัน (Chowdhury, Alam, Rahman *et al.*, 2009)

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบมะขาม กับผลการวิจัยของ Doughari (2006) ที่ได้ศึกษา สารสกัดจากส่วนใบและเปลือกลำต้นของมะขามด้วยน้ำ อะซิโตน และเอทานอล พบว่ามีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย ค่อนข้างกว้างเช่นเดียวกัน สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด รวมถึง *E.coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* โดยพบว่าสารสกัดจากเปลือกลำต้นสามารถยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าสารสกัดจากส่วนใบ และมีรายงานการศึกษา สารสกัดจากใบของมะม่วงหิมพานต์ พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ โดยสารสกัดจากใบด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้น 32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *E. coli* มี inhibition zone กว้างเท่ากันคือ 16 มิลลิเมตร (Ayepola and Ishola, 2009) ในขณะที่ผลการวิจัยในครั้งนี้พบว่าเมื่อใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นเพียง 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากใบมะม่วงหิมพานต์ที่สกัดด้วยเมทานอลมี inhibition zone ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* กว้าง 9.90 และ 7.90 มิลลิเมตรตามลำดับ

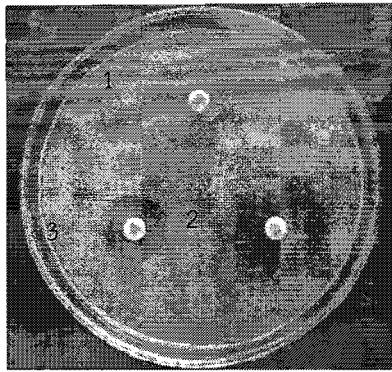
การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน

การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาต้านจุลินทรีย์พบว่า เชื้อส่วนใหญ่มีความไวต่อยาต้านจุลินทรีย์ โดย *S.aureus* และ *E.coli* ไวต่อยาทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ MRSA ไวต่อยาเพียงชนิดเดียวเท่านั้น คือ Vancomycin และ *P.aeruginosa* ไวต่อยา Netilmycin, Tetracycline และ Amikacin (ตารางที่ 2, ภาพที่ 2)

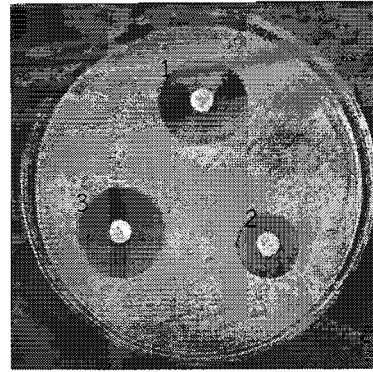
ตารางที่ 2 การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน ด้วยวิธี Disc diffusion

แผ่นยาด้านจุลินทรีย์มาตรฐาน	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)			
	<i>S.aureus</i>	MRSA	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Penicillin (10 Unit)	29.40 (S)	NC (R)	-	-
Netilmycin (30 µg)	-	-	-	22.70 (S)
Oxacillin (1 µg)	15.85 (S)	NC (R)	-	-
Tetracycline (30 µg)	-	-	25.70 (S)	15.95 (S)
Vancomycin (30 µg)	20.50 (S)	18.10 (S)	-	-
Sulfamethoxazole (25 µg)	31.00 (S)	NC (R)	25.10 (S)	NC (R)
Amikacin (30 µg)	-	-	26.75 (S)	26.90 (S)
Amoxycillin (30 µg)	-	-	24.00 (S)	-
Ampicillin (10 µg)	-	-	22.85 (S)	NC (R)

หมายเหตุ
 S : susceptible (ไวต่อยา) R : resistant (ดื้อต่อยา) NC : ไม่เกิด clear zone - : ไม่ได้ทำการทดสอบ



E.coli



S.aureus

หมายเหตุ

E.coli : 1. Amoxycillin 2. Amikacin 3. Ampicillin

S.aureus : 1. Penicillin 2. Oxacillin 3. Sulfamethozole

ภาพที่ 2 การทดสอบความไวต่อของยาต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Disk diffusion

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลินทรีย์และสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibition concentration : MIC) ด้วยวิธี Tube dilution

สารสกัดที่ทำให้เกิดวงใสจากการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นด้วยวิธี Disc diffusion จะถูกนำมาหาค่า MIC ด้วยวิธี Tube dilution โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 1–0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดทุกชนิดสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ (ตารางที่ 3) โดยสารสกัดจากใบชี้เหล็กด้วยอะซิโตนสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีมาก มีค่า MIC ต่ำสุดต่อเชื้อ *S. aureus* และ MRSA เท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดจากใบมะม่วงหิมพานต์สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดี มีค่า MIC ต่ำสุดต่อเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* เท่ากับ 0.06 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับสารสกัดจากใบมะกรูดสามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้รีซีค่า MIC เท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดที่สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรีย แกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ มีค่า MIC ต่ำ คือ สารสกัดจากใบมะยมและใบมะยม มีค่า MIC ต่อแบคทีเรีย แกรมบวกต่ำสุดคือ 0.03 มิลลิกรัม และรีซีแบคทีเรียแกรมลบ คือ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 3 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ ด้วยวิธี Tube dilution

สารสกัด	MIC (mg/ml)											
	EC			PA			SA			MRSA		
	H	A	M	H	A	M	H	A	M	H	A	M
มะม่วงหิมพานต์(ใบ)	-	0.13	0.06	-	0.03	0.06	0.25	0.25	0.5	0.13	0.13	0.5
มะขาม (ใบ)	0.06	0.25	1	0.13	0.13	0.25	-	0.25	0.03	0.25	0.06	0.06
มะยม (ใบ)	0.13	-	-	-	0.06	-	0.06	-	0.03	0.13	0.13	-
มะกรูด (ใบ)	1	1	0.13	>1	1	0.03	>1	1	0.03	1	1	-
ชี้เหล็ก (ใบ)	-	0.13	-	-	-	0.25	0.06	0.03	0.5	0.06	0.03	-

หมายเหตุ

EC = *Escherichia coli*, PA = *Pseudomonas aeruginosa*, SA = *Staphylococcus aureus*, MRSA = Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

H = สมุนไพรที่สกัดด้วย Hexane, A = สมุนไพรที่สกัดด้วย Acetone และ M = สมุนไพรที่สกัดด้วย Methanol

ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากใบมะม่วงหิมพานต์ สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้ ซึ่งมีผลการทดลองที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dahake, Joshi and Joshi (2009) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก

ไบโม่ฆ่วงหิมพอนต์ด้วยเอทานอล ที่มีค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* เท่ากับ 31.25 ไมโครกรัม และนอกจากนี้ มีรายงานผลการวิจัย พบว่า สารสกัดของไบโม่ฆ่วงหิมพอนต์ด้วยเอทานอล สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *E. coli* มีค่า MIC เท่ากับ 0.31 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Chabi, Sina, Adoukonou *et. al*, 2014)

นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากใบขี้เหล็กด้วยอะซิโตน สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ได้ดีมาก มีค่า MIC 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่า MIC ที่ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Nanosombat and Teckchuen (2009) ซึ่งใช้สารสกัดจากใบขี้เหล็กที่สกัดด้วยเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 166.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *S. aureus* ได้

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายแต่ละชนิดพบว่า สมุนไพรที่สกัดด้วยอะซิโตนมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียดีกว่าสมุนไพรที่สกัดด้วยเมทานอลและเฮกเซน โดยสมุนไพรที่สกัดด้วยอะซิโตนสามารถยับยั้งเชื้อได้ 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 85) สมุนไพรที่สกัดด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งเชื้อได้ 14 ตัวอย่าง (ร้อยละ 70) สมุนไพรที่สกัดด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งเชื้อได้ 12 ตัวอย่าง (ร้อยละ 60) เนื่องจากตัวทำละลายแต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการละลายสารได้แตกต่างกัน ดังนั้นสารสกัดจากตัวทำละลายแต่ละชนิดจึงมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามค่า MIC ของสารสกัดก็ยังคงสูงกว่าค่า MIC ของยาด้านจุลินทรีย์ (ตารางที่ 4) แต่เนื่องจากสารสกัดดังกล่าวเป็นสารสกัดหยาบเท่านั้น ดังนั้นสารสกัดหลายๆ ชนิด เช่น สารสกัดจากใบขี้เหล็กซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี สารสกัดจากไบโม่ฆ่วงหิมพอนต์สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดี และสารสกัดจากไบโม่ฆามที่มีฤทธิ์ค่อนข้างกว้างสามารถยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้ดี จึงมีความน่าสนใจในการนำไปศึกษาต่อเพื่อให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

ตารางที่ 4 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาด้านจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ด้วยวิธี Tube dilution

แบคทีเรีย	MIC			
	Penicillin G (unit/ml)	Vancomycin (ug/ml)	Ampicillin (ug/ml)	Tetracycline (ug/ml)
<i>S. aureus</i>	0.015	0.125	-	-
MRSA	8	0.125	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	0.5	0.5
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	8	0.125

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ใช้ในท้องถิ่น จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ มะม่วงหิมพานต์ มะขาม มะยม มะกรูด และขี้เหล็ก พบว่า สารสกัดทุกชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบได้ และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ MRSA คือ สารสกัดจากใบขี้เหล็กที่สกัดด้วยอะซิโตน มีค่า MIC ต่อเชื้อดังกล่าว เท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดจากไบโม่ฆ่วงหิมพอนต์และไบโม่ฆกรูดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดี มีค่า MIC ต่อ *P. aeruginosa* เท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดที่สามารถยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ดี คือ สารสกัดจากไบโม่ฆาม มีค่า MIC ต่อแบคทีเรียแกรมบวกต่ำคือ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และต่อแบคทีเรียแกรมลบ คือ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดสมุนไพรเหล่านี้จึงมีความน่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อเกี่ยวกับชนิดของสารเคมีที่อยู่ในสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ เพื่อนำไปประยุกต์เป็นยาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก. (2552). สมุนไพรบำบัดเบาหวาน 150 ชนิด. กรุงเทพฯ : เซเว่น พรินติ้งกรุป.

- วันดี กฤษณพันธ์. (2541). สมุนไพรน้ำจืด. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุรภี ภิษัชเวช. (2551). คู่มือบำบัดและรักษาโรคด้วยสมุนไพรใกล้ตัว. นนทบุรี : อุทยานความรู้.
- เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร, วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม, เมตตา องค์สกุล และโสภา คำมี. (ม.ป.ป.).ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดแซนโทนจากมังคุด. สืบค้นเมื่อ 20 กรกฎาคม 2557, จาก http://www.operationbim.com/reseach02_th.html.
- Agedah, C.E., Bawo, D.D.S and Nyananya, B.B. (2010). Identification of antimicrobial properties of cashew, *Anacardium occidentale* L. (Family Anacardiaceae). *J. Appl. Sci. Environ. Manages.* 14 (3), 25-27.
- Ayepola, O.O and Ishola, R.O. (2009). Evaluation of antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* (Linn.). *Adv. In Med. Dent. Sci.* 3 (1), 1-3.
- Chabi, S.K., Sina, H., Adoukonou-Sagbadja, H., Ahoton, L.E., Roko, G.O., Saidou, A., Adeoti, K., Ahanchede, A and Baba-Moussa, L. (2014). Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* L. leaves and barks extracts on pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research.* 8 (25), 2458-2467.
- Chandarana, H., Baluja, S and Chanda, S.V. (2005). Comparison of antibacterial activities of selected species of Zingiberaceae family and some synthetic compounds. *Turkish Journal of Biology.* 29, 83-97.
- Chanthaphon, S., Chanthachum, S and Hongpattarakere, T. (2008). Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus spp.* Against food-related microorganisms. *Sonklanakarinn J. Sci. Technol.* 30 (Suppl. 1), 125-131.
- Chomnawang, M.T., Surassmo, S., Nukoolkarn, V.S and Gritsanapan, W. (2005). Antimicrobial effects of thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J. Ethnopharmacol.* 101 (1-3), 330-333.
- Chowdhury, A., Alam, Md.A., Rahman, M.S., Hussain, Md.A and Rashid, M.A. (2009). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of *Citrus hystrix* DC. Fruits. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.* 8 (2), 177-180.
- Dabake, A.P., Joshi, V.D and Joshi, A.B. (2009). Antibacterial screening of different extract of *Anacardium occidentale* Linn. Leaves. *Int. J. Chem. Tech. Res.* 1 (4), 856-858.
- Doughari, J.H. (2006). Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn. *Trop. J. Pharm. Res.* 5 (2), 595-603.
- Kim, K., Yu, H., Jeong, S., et al. (2004). Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 91 (1), 81-87.
- Lorian, V. (1996). *Antibiotics in laboratory medicine* (3rd ed). Baltimore : Williams & Wilkins.
- Luvia, V. (2006). Overview of antibiotic resistance. *Songkla. Med. J.* 24 (5), 453-455.
- Nanosombat, S and Teckchuen, N. (2009). Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *J. Med. Plant. Res.* 3 (5), 443-449.
- Quave, C.L., Plano, L.R.W., Pantuso, T and Benette, B.D. (2008). Effects of extracts from Italian medical plants on Planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 118 (3), 418-428.
- Sarker, S.D., Nahar, L and Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 42 (4), 321-324.
- Suksamran, S., Suwannapoch, N., Phakhodee, W., Thanuhiranlert, J., Ratananukul, P., Chimnoi, N and Suksamran, A. (2003). Antimicrobial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo).* 51 (7), 857-859.