ว.วิทย. มข. 47(4) 691-698 (2562) KKU Sci. J. 47(4) 691-698 (2019)

การประเมินคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียของสมุนไพรบางชนิดในจังหวัดเพชรบูรณ์

Evaluation of Antioxadation and Antibacterial Properties of Some Thai Medicinal Plants in Phetchabun Province

สุรางค์รัตน์ พันแสง[1*] และพวงผกา แก้วกรม[1]

[1]สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ต.สะเดียง อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์ 67000

[*]Corresponding Author, E-mail: surangrat_aejung@hotmail.com

Received: 17 January 2019 | Revised: 2 August 2019 | Accepted: 22 October 2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านเชื้อแบคทีเรียของสมุนไพรบางชนิด ได้แก่ กุ่มน้ำ (*Crateva religiosa* Ham.) ผักตบไทย (*Monochoria hastata* (L.) Solms.) ผักแพว (*Polygonum odoratum* Lour.) ผักกูด (*Diplazium esculentum* (Retz.) Sw.) และควายเก้าแม่ (*Hiptage candicans* Hook.f.) การศึกษาปริมาณพฤกษเคมี พบว่า สารสกัดหยาบจากลำต้นควายเก้าแม่มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงที่สุด โดยมีสารฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 11.47±0.22 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 มิลลิกรัมสารสกัด และมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 8.05±0.02 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชินต่อ 100 กรัมสารสกัด นอกจากนี้สารดังกล่าวยังมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระDPPH (IC_{50} เท่ากับ 0.25±0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ค่า ABTS (IC_{50} เท่ากับ 0.12±0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

ABSTRACT

The objectives of this research were to evaluate anti-free radical and investigate antibacterial activities of some Thai medicinal plants. Five Thai medicinal plants were investigated *i.e.* *Crateva religiosa* Ham., *Monochoria hastata* (L.) Solms., *Polygonum odoratum* Lour., *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. and *Hiptage candicans* Hook.f.. The highest content of total phenolics and flavonoids were found in the crude extract of *Hiptage candicans* Hook.f. The concentration of total phenolics and flavonoids in this plant were 11.47±0.22 mg GAE/100 mg and 8.05±0.02 mg CE/100 mg, respectively. Moreover, crude extract of *Hiptage candicans* Hook.f. had a high effective on free radical scavenging activities of DPPH (The IC_{50} value were 0.25±0.00 mg/ml). ABTS assays; the IC_{50} value were 0.12±0.03 mg/ml, which had not effected on antibacterial.

คำสำคัญ: สารต้านอนุมูลอิสระ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก
Keywords: Anti-free radical, Flavonoids, Phenolics

บทนำ

ในสภาพปกติร่างกายจะมีระบบควบคุมป้องกันอนุมูลอิสระที่เรียกว่า “ระบบป้องกันแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant defense system)” แต่ถ้าร่างกายไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับปกติได้ เรียกว่า “ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress)” โดยอนุมูลอิสระที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นก่อให้เกิดความเสียหายและเป็นอันตรายต่อร่างกายและนำไปสู่การก่อการกลายพันธุ์ ดังนั้นการใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารแอนตี้ออกซิแดนท์จะช่วยยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ได้ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารต้านออกซิเดชันในพืชที่สำคัญ โมเลกุลของสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) วิตามิน (vitamin) พอลิแซคคคาไรด์ (polysaccharides) เปปไทด์ (peptides) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) และแอลคาลอยด์ (alkaloids) (วัชราภรณ์และพิชิต, 2017) สารต้านอนุมูลอิสระมีอยู่เป็นจำนวนมากทั้งที่มีอยู่ในธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ขึ้น มีรายงานการวิจัยที่พบว่าพญาดาบหัก ใบจิก ผักหวาน เสม็ดแดง และชำมะเลียง มีสารประกอบโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ และพบสารฟลาโวนอยด์และแทนนินในเสม็ดแดง รวมทั้งฟลาโวน ฟลาโวนอลและแซนโทนในพืชทุกชนิด ส่วนใบจิกมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงสุด (กรรณิการ์ และคณะ, 2556) ดังนั้นการหาสารจากธรรมชาติมาใช้บำบัดรักษาหรือลดความเสี่ยงของการเกิดโรคนั้นจึงมีความสำคัญมาก แต่ปัจจุบันยังขาดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์มารองรับการนำพืชกินได้มาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนั้นโครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรในท้องถิ่นโดยมุ่งเน้นหาปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical scavenging activity) คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2, 2’–azobis (3-ethylbenzthiazoline-6 sulfonic acid) และการตรวจสอบคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร

1.1 การเตรียมวัตถุดิบ นำชิ้นส่วนสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกกุ่มน้ำ (*Crateva religiosa* Ham.) ดอกผักตบไทย (*Monochoria hastata* (L.) Solms.) ยอดผักแพว (*Polygonum odoratum* Lour.) ยอดผักกูด (*Diplazium esculentum* (Retz.) Sw.) และลำต้นควายเก้าแม่ (*Hiptage candicans* Hook. f.) ทำการเก็บตัวอย่างสมุนไพรจากอำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์ ระหว่างเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม 2560 นำมาหั่นให้มีขนาดเล็กและผึ่งลมให้แห้ง บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด และเก็บไว้ในถุงพลาสติก

1.2 วิธีการสกัดสารจากสมุนไพรนำสมุนไพรแห้งทั้ง 5 ชนิดมาทำการสกัดเย็นโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล จำนวน 3 ซ้ำ โดยนำสมุนไพรแห้งใส่ลงในโถหมักตัวอย่างละ 100 กรัม เติมตัวทำละลายเอทานอล 1,000 มิลลิลิตร (ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10) แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน แยกสารละลายที่สกัดได้มากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดมาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และนำมาทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่อง Vacuum Dryer นำสารสกัดที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. ศึกษาคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพร

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ดัดแปลงวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ตามวิธีของ Wolfe et al. (2003) โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานและรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 100 มิลลิกรัมกรัม (mg GAE/100 mg of crude extract)

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (flavonoid content) โดยวิธี Colorimetric assay วิเคราะห์ตามวิธีของ Wolfe et al. (2003) ใช้เคทเทคินเป็นสารมาตรฐาน และรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของเคทเทคินต่อสารสกัด 100 มิลลิกรัม Total flavonoid content (mg CE/100 mg of crude extract)

2.3 การตรวจสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical scavenging activity) วิธีของ Karagozler et al. (2008) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer รุ่น UV-9200 (Rayleigh, China) คำนวณค่า % radical scavenging activity ดังสมการ

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [(A_{control} - A_{sample}) \times 100] / A_{control}$$

โดยที่ $A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

นำค่า % radical scavenging activity ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาค่า IC_{50}

2.4 การตรวจสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2,2'–azobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS radical scavenging activity) โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Re et al. (1999) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer คำนวณค่า % Inhibition ABTS ดังสมการ

$$\text{\% Inhibition ABTS} = [(A_0 - A_1) \times 100] / A_0$$

โดยที่ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

นำค่า % Inhibition ABTS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาค่า IC_{50}

2.5 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียด้วย วิธี disc diffusion method ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus epidermidis* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ลงบนอาหารทดสอบ Muller-Hinton agar (Merck, Germany) โดยใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารแขวนลอยของเชื้อที่ต้องการทดสอบ เตรียมเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No.5 และกระจายสารแขวนลอยของเชื้อให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ให้ส่วนผิวหน้าของอาหารแห้งจากนั้นวางแผ่น paper disc ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ที่หยดสารทดสอบความเข้มข้น 200,000 ppm ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสที่เกิดขึ้น บันทึกหน่วยเป็นมิลลิเมตร ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ

การตรวจหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี micro dilution test และยืนยันผลการทดสอบด้วยวิธี Resazurin Microtiter Assay Plate Method (Rahman et al., 2004) โดยหลุมที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น Positive control และหลุมที่ใส่เฉพาะแบคทีเรียเป็น Negative control บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผล โดยตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียของสารทดสอบโดยตรวจดูการเจริญของแบคทีเรีย เติมสารละลาย resazurin ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) โดยการสังเกตหลุมสุดท้ายที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย resazurin ซึ่งแสดงถึงไม่มีการเติบโตของเชื้อ รายงานประสิทธิภาพของของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

การตรวจหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ปิเปตอาหารผสมทดสอบและเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละหลุม จำนวน 10 ไมโครลิตรไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Tryptone soy agar บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจผลโดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ รายงานประสิทธิภาพของของสารสกัดหยาบที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์ปริมาณฟินอลิกทั้งหมด

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสมุนไพร ได้แก่ กุ่มน้ำ ผักตบไทย ผักแพว ควายเก้าแม่และผักกูด คำนวณได้จาก linear regression equation ของกราฟสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Y=0.0581x-0.0293, R2=0.9977) พบว่าสารสกัดสมุนไพร 5 ตัวอย่างมีปริมาณฟินอลิกแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยสารสกัดจากชิ้นส่วนลำต้นควายเก้าแม่มีปริมาณฟินอลิกทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 11.47±0.22 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อ 100 มิลลิกรัมสารสกัด รองลงมา คือ สารสกัดของผักแพว ผักกูด กุ่มน้ำ และผักตบไทยตามลำดับ

2. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสมุนไพร ได้แก่ กุ่มน้ำ ผักตบไทย ผักแพว ควายเก้าแม่และผักกูด คำนวณได้จาก linear regression equation ของกราฟสารมาตรฐานเคทเทคิน (Y=0.1411x-0.1375, R2=0.9999) พบว่า สารสกัดสมุนไพร 5 ตัวอย่างมีปริมาณฟลาโวนอยด์แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยสารสกัดจากชิ้นส่วนลำต้นควายเก้าแม่ มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 8.05±0.02 มิลลิกรัมสมมูลของเคทเทคินต่อ 100 มิลลิกรัมสารสกัด รองลงมา คือ สารสกัดของผักแพว ผักกูด กุ่มน้ำ และผักตบไทยตามลำดับ

3. การตรวจสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS

การตรวจสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากผลการศึกษาสารสกัดสมุนไพร 5 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยพบว่า สารสกัดของควายเก้าแม่ และผักแพว มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT

การตรวจสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ABTS จากผลการศึกษาสารสกัดสมุนไพร 5 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยพบว่าสารสกัดของควายเก้าแม่ ผักแพว และผักกูด มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT

4. การตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย

ผลจากการตรวจสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพร 5 ชนิด ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *B.cereus* TISTR 1395 และ *S.epidermidis* TISTR 518 แบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *E.coli* TISTR 074 และ *P.aeruginosa* TISTR 1287 พบว่า สารสกัดของกุ่มน้ำ ผักตบไทย ผักแพว และผักกูด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกโดยสารสกัดของผักกูดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ผักแพว กุ่มน้ำ และผักตบไทย นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบทุกชนิดไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ (ตารางที่ 3)

เมื่อทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ของสารสกัดหยาบของกุ่มน้ำ ผักตบไทย ผักแพว และผักกูด โดยสารสกัดหยาบของผักกูดมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งและการฆ่า *B.cereus* เท่ากับ 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณฟินอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์

ชนิดพืช	ชิ้นส่วน	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/100mg of crude extract)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg CE/100mg of crude extract)
กุ่มน้ำ	เปลือก	2.12±0.12c	1.12±0.00c
ควายเก้าแม่	ลำต้น	11.47±0.22a	8.05±0.02a
ผักตบไทย	ดอก	1.97±0.04cd	1.04±0.00c
ผักแพว	ยอด	5.24±0.16b	1.86±0.00b
ผักกูด	ยอด	2.29±0.09c	1.16±0.00c

* ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)

ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS

ชนิดพืช	ชิ้นส่วน	DPPH IC_{50} (mg/ml)	ABTS IC_{50} (mg/ml)
กุ่มน้ำ	เปลือก	5.79±0.00	0.84±0.00
ควายเก้าแม่	ลำต้น	0.25±0.00	0.12±0.02
ผักตบไทย	ดอก	10.53±0.00	1.01±0.00
ผักแพว	ยอด	0.56±0.00	0.30±0.02
ผักกูด	ยอด	2.82±0.00	0.44±0.01
BHT	-	0.32±0.01	0.02±0.01

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งของสารสกัดจากสมุนไพรต่อแบคทีเรียทดสอบ

ชนิดพืช	ชิ้นส่วน	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
		B.cereus	*S.epidermidis*	*E.coli*	*P.aeruginosa*
กุ่มน้ำ	เปลือก	7.50±0.58	NI	NI	NI
ควายเก้าแม่	ลำต้น	NI	NI	NI	NI
ผักตบไทย	ดอก	6.25±0.58	NI	NI	NI
ผักแพว	ยอด	10.25±0.95	NI	NI	NI
ผักกูด	ยอด	11.75±0.95	NI	NI	NI

หมายเหตุ NI คือ ไม่มี inhibition zone

ตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้ง (MIC) และทำลาย (MBC) แบคทีเรีย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ชนิดพืช	ชิ้นส่วน	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
กุ่มน้ำ	เปลือก	100	200
ควายเก้าแม่	ลำต้น	-	-
ผักตบไทย	ดอก	80	160
ผักแพว	ยอด	50	50
ผักกูด	ยอด	40	80

วิจารณ์ผลการวิจัย

ปริมาณสารสำคัญฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์กับการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งพืชสมุนไพรที่ทำการศึกษามีปริมาณของสารสำคัญดังกล่าวสูงในลำต้นควายเก้าแม่ (*Hiptage candicans* Hook. f.) ส่วนผักแพว ผักกูด กุ่มน้ำ และผักตบไทยก็ยังตรวจพบว่ามีสารสำคัญดังกล่าวเช่นกัน ซึ่งมีรายงานการวิจัยหลายฉบับที่ระบุว่าพืชบางชนิดมีสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบในพฤกษเคมีที่สำคัญ เช่น การวิเคราะห์สารสำคัญใน *Hiptage benghalensis*, *Antigonon leptopus*, *Macroptillium atropureum* และ *Dioscorea bulbifera* พบว่า *Hiptage benghalensis* ประกอบไปด้วยสาร Alkaloids, Carbohydrates, Flavonoids, Reducing sugars, Saponins และ Steroids โดยมีปริมาณสารฟีนอลิก 25.56±0.160 mg GAE/g DW ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ 93.29±4.215 mg Quercetin/g DW (Licayan et al., 2016) นอกจากนี้ ผักกูดขาว (*Diplazium esculentum*) ประกอบด้วยสารสเตอรอยด์ (steroids) ไตรเตอร์ฟีนอล (triterpenoids) ฟีนอล (phenol) ฟลาโวนด์ (flavones) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และ แอนทราควิโนน (anthraquinones) (Anderson et. al., 2003; Jayanta et.al. 2017) กุ่มน้ำ (*Crateva religiosa*) สารพฤกษเคมีในส่วนของลำต้นประกอบไปด้วย Alkaloids, Flavonoids, Saponins และ Phenols เท่ากับ 1.90±0.17 1.18±0.24 1.28±0.25 และ 1.06±0.17 g/100g DW ตามลำดับ (Wagay et al., 2017) ส่วนกุ่มชนิด *Crateva nurvala* ในส่วนของลำต้นเมื่อสกัดด้วยเมทานอล ประกอบไปด้วย Terpenoid Steroid และ Terpenoids Phenols Flavonoids Alkaloids Tannins และ Saponins เมื่อสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ประกอบไปด้วย Terpenoid, Steroid และ Terpenoids และ Alkaloids (Hade et al., 2016)

สารสกัดของควายเก้าแม่ และผักแพว มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Licayan et.al. (2016) ซึ่งรายงานไว้ว่าพืชสกุล *Hiptage* คือ *H. benghalensis* (84.64%) มีกิจกรรมต้านออกซิเดชันดีที่สุด รองลงมาคือ *A. leptopus* (68.21%), *M. atropureum* (26.62%) และ *D. bulbifera* (19.04%) ซึ่งการต้านอนุมูลอิสระนี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด โดยสารสกัดที่มีปริมาณฟีนอลิกสูงจะมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็น free radical terminators ที่มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย aromatic ring แทนที่ด้วย hydroxyl group ที่สามารถใช้จับกับอนุมูลอิสระได้ ดังนั้นเมื่อสารสกัดจากสมุนไพรมีปริมาณฟีนอลิกสูง ส่งผลให้สมุนไพรชนิดนั้นมีแนวโน้มในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงด้วย ยังมีรายงานการค้นพบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ รายงานการวิจัยของ Kaushik et al., (2012) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักกูด (*Diplazium esculentum*) โดยวิธี FRAP พบว่า สารสกัดน้ำของผักกูด 7.6 mM/dry wt มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และโพลีฟีนอลเป็นสารประกอบที่สำคัญของพืชที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Wichi, 1988) ในขณะที่ผลการวิจัยของ Semwal et al., (2013) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของพืชในกลุ่มเทอริโดไฟต์ (Pteridophytes) จำนวน 5 ชนิด พบว่าผักกูด (*Diplazium esculentum*) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด (IC_{50} เท่ากับ 0.32±0.12 mg/ml) ซึ่งดีกว่า *Adiantum lunulatum Pteris vittata Equisetum romosissimum* และ *Ampelopteris prolifera* หรือการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของผักกูด (*Diplazium esculentum*) โดยวิธี DPPH ABTS metal chelating และ superoxide พบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.8 4.6 1.09 และ 2.24 mg/ml ตามลำดับ (Jayanta et al., 2017) การค้นพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ *Polygonum odoratum* โดยวิธี DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 190.19±0.424 µg/ml (Somananda et al., 2014) และการพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ *Monochoria vaginalis* วิธี ABTS พบว่า ส่วนของใบและรากของมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 5,060.4±1,488.1 และ 2,472.2±462.5 µmol/g (Chandran et al., 2011)

สารสำคัญที่พบในพืชหลายชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและ/หรือแบคทีเรียแกรมลบได้ แต่มีประสิทธิภาพแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นส่วนของสมุนไพร นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารพฤกษเคมีออกมาจากพืช การสกัดเป็นขั้นตอนที่มีสำคัญ ที่จะทำให้ได้มาซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชและส่วนต่าง ๆ ของพืช ปริมาณ องค์ประกอบและความบริสุทธิ์ของสารออกฤทธิ์ที่ได้มาจากสารสกัดขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะทางเคมี จำนวนตัวอย่าง สภาวะและวิธีการสกัด เช่น ชนิดของตัวทำละลาย เวลา อุณหภูมิ และสิ่งรบกวนต่างๆ ในการสกัด (วัชราภรณ์ และพิชิต, 2560)

จากผลการวิจัยจะเห็นได้ว่าผักกูด ผักแพว และกุ่มน้ำ สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *B.cereus* TISTR 1395 ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานของ Akter et. al., (2014) รายงานว่าผักกูด (*Diplazium esculentum*) ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งเชื้อ *Sarcina lutea* (18.67 mm) ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Samonella typhimurium* (16.33mm) *Bacillus subtilis* (15.33 mm) *Klebsiella pneumonia* (15.33 mm) *Shigella boydii* (14.67 mm) *Escherichia coli* (12.33 mm) *Staphylococcus aureus* (11.33 mm) และ *Vibrio cholera* (10.67 mm) ตามลำดับ โดยมีค่าต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อระหว่าง 1.6-12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และรายงานวิจัยของ Amit et al., (2011) ทำการสกัด *Diplazium esculentum* (leaves, rhizome และ roots) สกัดด้วยน้ำและแอลกอฮอล์ พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อได้ 4 ชนิด ได้แก่ *E.coli Salmonella arizonae Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* แต่ในทางตรงกันข้าม Punnanee et al., (2012) นำใบของ *Diplazium esculentum* สกัดด้วย 75% เอทานอล ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus Listeria monocytogenes Staphylococcus aureus* และ *Vibrio cholera* ได้

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกุ่มน้ำ (*Crateva religiosa*) ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ Gowsalya and Saravanababu (2013) ทำการสกัด *Crateva religiosa* ด้วยคลอโรฟอร์ม เอทานอล และเฮกเซน สามารถยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecalis E.coli* และ *Staphylococcus aureus* Sahoo et al., (2008) ทำการสกัด *Crateva religiosa*

ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เอทานอล พบว่าสามารถยับยั้ง *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Cryptococus marinus* และ *Aspergillus niger* เช่นเดียวกับผลการวิจัยของ Wagay et al., (2017) ที่ได้ทำการศึกษาสารสกัด *Crateva religiosa* ในส่วนของลำต้นสกัดโดยใช้ 50% แอลกอฮอล์ พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (*Sarcina maxima*, *Serratia marcescens* และ *Pseudomonas aeruginosa*) และเชื้อรา (*Aspergillus niger* และ *A. flavus*) ได้

เช่นเดียวกับผักตบไทยที่มีผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *B.cereus* ได้ ในขณะที่ผลการวิจัยของ Mlsra et al., (2018) พบว่าผักตบ (*Monochoria hastate*) ที่สกัดด้วย 50% เมทานอล และเอทิลอะซิเตท มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus mutans* และ *E.coli*

ส่วนผักแพวก็มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* ได้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของNanasombat and Teckchuen (2009) ที่ระบุไว้ว่า ผักแพว (*Polygonum odoratum*) สกัดด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus E.coli Listeria monocytogenes Pseudomonas fluorescens Staphylococcus aureus* และ *Yersinia enterocolitica*

จากผลการวิจัยจะเห็นว่า สารสกัดหยาบจากกุ่มน้ำ ผักตบไทย ผักแพว และผักกูด สามารถยับยั้ง *B.cereus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก และให้ผลแตกต่างจากรายงานผลการวิจัย Akter et al., (2014), Amit et al., (2011) Gowsalya and Saravanababu (2013) และ Wagay et al., (2017) สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ แต่สารสกัดสมุนไพรส่วนใหญ่ให้ผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีชั้นของเพปติโดกลัยแคน (peptidoglycan) ล้อมรอบเยื่อหุ้มเซลล์ แต่โครงสร้างของแบคทีเรียแกรมลบมีความซับซ้อนกว่า โดยมีชั้นเพปติโดกลัยแคนบางๆ อยู่รอบเยื่อหุ้มเซลล์ และมีเมมเบรนห่อหุ้มรอบผนังเซลล์อีกชั้นหนึ่ง (Parekh et al., 2005) ส่งผลให้สารสกัดพืชบางชนิดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ อีกทั้งตัวทำละลายแต่ละชนิดมีผลต่อสารพฤกษเคมีที่มีอยู่ในพืช เช่น เอทานอลสามารถละลายสารพฤกษเคมีในกลุ่มสเตอรอยด์ เทอร์ฟีนอยด์ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ พอลิฟีนอล และแทนนินได้ดี อะซิโตนสามารถละลายสารกลุ่มพฤกษเคมีในกลุ่มฟีนอล และฟลาโวนอยด์ได้ดี แต่ถ้าเป็นปิโตรเลียมอีเทอร์ ละลายสารพฤกษเคมีในกลุ่มเทอร์ฟีนอยด์ คูมาริน กรดไขมัน แอลคาลอยด์ และแคโรทีนอยด์ได้ดี (Mendonea-Filho, 2012)

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาสารสกัดหยาบของสมุนไพรจำนวน 5 ชนิด ด้วยตัวทำละลายเอทานอลโดยวิธีสกัดเย็น พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสมุนไพรนั้นสารสกัดจากลำต้นควายเก้าแม่มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงที่สุด ส่วนผักกูด ผักแพว กุ่มน้ำ และผักตบไทยมีปริมาณสารสำคัญดังกล่าวใกล้เคียงกัน นอกจากนี้สมุนไพรควายเก้าแม่ยังมีมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดที่มีประสิทธิภาพต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ได้แก่ สารสกัดจากผักกูด ผักแพว กุ่มน้ำ และผักตบไทย ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย จากเงินงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ประจำปีงบประมาณ 2560 สัญญาเลขที่ PCRU_2560_N013 งานศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ได้ให้ความสนับสนุนในด้านปฏิบัติการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ เทพมงคล, กรกนก รุ่งเรืองบูรณะกุล และชัชวิน เพชรเลิศ. (2556). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชกินได้บางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131.

วัชราภรณ์ ประภาสะโนบล และพิชิต สุดตา. (2560). ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์ของสารสกัดลำต้นนกกระลิงแดง. ว.วิทย. มข. 45(3): 531-542.

Akter S., Hossain Md. M., Ara I. and Akhtar P. (2014). Investigation of *In vitro* Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic activity of *Diplazium esculentum* (RETZ). SW. IJAPBC. 3(3): 723-733.

Amit S., Sunil K., Bhatt S.P. and Arvind N. (2011). Antibacterial activity of *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. PHCOG J. 3(21): 77-79.

Anderson D.K., Hall E.D., Kumar R., Fong V., Endrinil LMS and Sani H.A. (2003). Determination of total antioxidant activity in three types of local vegetables shoots and the cytotoxic effect of their ethanol extracts against different cancer cell lines. Asia Pac J. Clin Nutr. 12(3): 292-29.

Chandran R., Thangaraj P., Shanmugam S., Thankarajan S. and Karuppusamy A., (2011). Antioxidant and anti-inflammatory potential of *Monochoria vaginalis* (Burm.F.) C. Presl.: awild edible plant. J Food Biochem. 1-11.

Gowsalya P. and Saravanababu. (2013). Phytochemical and antimicrobial Activity of Selected Microorganism of Bark Extract of the Plant *Crataeva religiosa*. IJPBA. 1(6): 179-181.

Hade, S. N., Joshi, P. A., Pilley, H. H., Wadegaonkar, V. P., and Wadegaonkar. P. A. (2016). Evaluation of *Crateva nurvala* extracts as antioxidant, antiproteolytic and cytotoxic against hepato-carcinoma and mouse melanoma cell lines. J App Pharm Sci. 6(09): 189-196.

Jayanta, C., Sukanta, M., Swarnendu, R. and Usha, C. (2017). Antioxidant activity and Phytochemical screening of two edible wetland Pteridophytes *Diplazium esculentum* (Retz) SW. and *Marsilea minuta* L.-A comparative study. World Journal of Pharmaceutical and Medical Research 3(9): 195-203.

Karagozler, A. A., B. Erdag, Y. C. Emek and D. A. Uygun, (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechashastata*. Food Chemistry 111: 400-407.

Kaushik A., Jijta C., Kaushik J. J., Zeray R., Ambesajir A. and Beyene L. (2012). FRAP(Ferric reducing ability of plasma) assay and effect of *Diplazium esculentum* (Retz) Sw. (a green vegetable of North India) on central nervous system. INDIAN J NAT PROD RESOUR. 3(2): 228-231.

Licayan, R. I., Del Rosario, R. M., Palmes, N. D. and Canencia, O. P. (2016). Phytochemical Profiles, Total Flavonoids, Total Phenolic Content and Antioxidant Activities Via Free Radical Scavenging Activities (FRSA) of Philippine Herbal Vines. Pak. J. Nutr. 15(2): 164-169.

Mendonea-Filho, R. R. (2012). Bioactive Phytocompounds: New Approaches in the Phytosciences, Modern Phyto-medicine: Turning Medicinal Plants into Drugs. Strauss GmbH, Morlenbach. 1-21.

Mlsra, D., Mandal, M., Ghosh, N. N. and Mandal, V. (2018). Pharmacognostic Standardization of an Ethnomedicinal Aquatic Herb, *Monochoria hastate* (L.) Solms for its Antibacterial potentiality. Pharmacogn J. 10(3): 533-540.

Nanasombat, S. and Teckchuen, N., (2009). Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. J. Med. Plant. Res. 3(5): 443-449

Parekh, J., Jadeja, D. and Chanda, S. (2005). Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antimicrobial activity. Turk J Biol. 29: 203-210.

Punnanee S., Saranrat, J. and Waris, S. (2012). Antibacterial Activity of Selected Thai Indigenous Plants Against Food-Borne Pathogenic Bacteria. IPCBEE. 39: 126-130.

Rahman, M., Kuhn, I., Rahman, M., OlssonLiljequist, B. and Mollby, R. (2004). Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 70: 2398-2403.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorization assay. Free Radical Biology & Medicine 26: 1231-1237.

Sahoo, S. Mishra, S. K., Panda, P.K., Tripathy, S., Mishra, S.R., Ellaiah, P. and Dash, S. K. (2008). Antimycotic potential of *Crataeva religiosa* Hook and forst against some selected fungal pathogens. Drug research. 65(2): 245-247.

Semwal, A., Farswan, M. S., Upreti, K., Bhatt, S. P. and Upadhyaya, K. (2013). Evaluation of Antioxidant Activity of Some Pteridophytes. International Journal of Herbal Medicine. 1(1): 2-5.

Somanananda, K. A., Shantibala devi, G. A. and Chattopadhyay, S. (2014). Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of *Polygonum odoratum* Lour. IJBAB. 2(1): 94-97.

Wagay, N. A., Khan. N. A. and Rothe. S. P. (2017). Profiling of secondary metabolites and antimicrobial activity of *Crateva religiosa* G. Forst. Bark- A rare medicinal plant of Maharashtra India. Int. J. Biosci. 10(5): 343-354.

Wichi H.P. (1988). Enhanced tum from the perspective effect on fore stomach and oesophageal squamous epithelium. Food Chem Toxicol. 26: 717-723.

Wolfe, K., Wu, X. and Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. J Agric Food Chem. 51: 609-614.

❑❑❑❑❑