การหากลุ่มสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพของ *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. โดยวิธี Bioassay Guided Fractionation

Bioassay Guiede Fractionation of *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr.: To Investigate the Group of Chemical Compounds that have Antimicrobial Activity

ธีระวัฒน์ บุญโสม[1]
Teerawat Boonsom[1]
[1] คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย
[1] School of Pharmacy, Eastern Asia University
Received: October 21, 2019
Revised: November 10, 2019
Accepted: November 15, 2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดด้วยเมทานอลจากต้นคนทาและเพื่อศึกษากลุ่มของสารเคมีที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ โดยทดสอบกับเชื้อจุลชีพ 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli* และ *Candida albicans* ด้วยวิธี disc diffusion ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลจากต้นคนทามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสเท่ากับ 7.01 และ 6.89 มิลลิเมตร ตามลำดับ และนำสารสกัดด้วยเมทานอลจากต้นคนทาไปศึกษาต่อด้วยวิธี TLC-bioautography เพื่อศึกษากลุ่มสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถแบ่งสารสกัดหยาบได้ 2 ส่วน แบ่งเป็นสารสกัดแยกส่วนที่ 1 และสารสกัดแยกส่วนที่ 2 เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion สารสกัดแยกส่วนที่ 1 มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส เท่ากับ 11.45 และ 8.96 มิลลิเมตรตามลำดับ ส่วนสารสกัดแยกส่วนที่ 2 ให้ฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. subtilis* โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส เท่ากับ 10.77 มิลลิเมตร และในการทดสอบหากลุ่มของสารสำคัญพบว่ามีสารสำคัญเป็นสารกลุ่มแทนนิน กลุ่มฟลาโวนอยด์ กลุ่มอัลคาลอยด์ กลุ่มแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ กลุ่มไตรเทอร์ปินอยด์ และกลุ่มสเตียรอยด์

คำสำคัญ: ต้นคนทา, ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ, ทีแอลซี ไบโอออโตกราฟี

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial activity of crude methanolic extract from the *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. species and to investigate the group of chemical compounds that have antimicrobial activity. The methanolic extracts were investigated for antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli* and *Candida albicans* by disc diffusion method. The methanolic extract of *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. species exhibited antimicrobial activity against *S. aureus* and *B. subtilis* with clear zone diameter of 7.01 mm. and 6.89 mm., respectively. The H. perforata methanolic extract was selected for further investigation of active constituents by TLC-bioautography. The extract was also fragmented by Column Chromatography into two fractions, fraction 1 and 2. Fraction 1 showed antimicrobial activity against *S. aureus* and B. subtilis with clear zone diameter of 11.45 mm. and 8.96 mm. respectively. Fraction 2 was active against only *B. subtilis* with clear zone diameter of 10.77 mm. In the phytochemical constituents testing, it was found that *H. perforata* (Blanco) Merr. contained mainly tannins, flavonoids, alkaloids, anthraquinone glycoside, triterpenoids and steroids.

Keywords: *Harisonia perforata* (Blanco) Merr., antimicrobial activity, TLC-bioautography

บทนำ

เนื่องจากปัญหาของโรคติดเชื้อ (infectious disease) เป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านการแพทย์และสาธารณสุขที่เกิดขึ้นทั้งในเด็กและผู้ใหญ่อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน และส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย พบว่าในปัจจุบันปัญหาโรคติดเชื้อที่เกิดขึ้นอย่างกว้างขวางนั้น มีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ การใช้ปฏิชีวนะที่มากเกินความจำเป็นในปัจจุบัน การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย ระดับความชุกของเชื้อแบคทีเรียในแต่ละพื้นที่ เป็นต้น และจากการศึกษาข้อมูลพบว่าโรคติดเชื้อเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี แม้ว่าจะมีรายงานอัตราการเสียชีวิตจากโรคติดเชื้อว่าในแต่ละปีจะมีอัตราการเสียชีวิตลดลงแต่ก็ถือว่าปัญหาที่เกิดขึ้นมีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขเนื่องจากส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมโดยการแพร่กระจายเชื้อโรคได้ ดังนั้นจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากที่ต้องเร่งจัดการกับปัญหาที่เกิดขึ้น (Luvira, 2006)

เชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคและพบบ่อยได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรีย มีคุณสมบัติย้อมติดสีแกรมบวก มีลักษณะกลม ขนาด 0.5–1.0 ไมครอน เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น แต่อาจจะพบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ สามารถพบได้ที่ผิวหนัง โพรงจมูก ทางเดินอาหาร เยื่อบุทางเดินหายใจ และบาดแผลที่เป็นฝี หนอง รวมถึงในดิน ฝุ่นละออง เชื้อ *S. aureus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อ แม้ในปริมาณน้อยกว่า 1 ไมโครกรัม โดยสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน เช่น ฝี หนองและการได้รับสารพิษจากเชื้อเฉียบพลัน (Siriwong & Chukeatirote, 2009)

เชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรีย รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ย้อมติดสีแกรมบวก (gram positive bacteria) โดยเชื้อชนิดนี้จะพบได้ในดิน เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้ควบคุมและป้องกันโรคพืชจากแบคทีเรียชนิดอื่นและจากเชื้อราได้ ผลิตเอนไซม์ เช่น amylase เพื่อย่อยสลายโมเลกุลของ starch ในการผลิตเป็น starch hydrolysate ผลิต protease เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีน ให้เป็น peptone และ peptide หรือ protein hydrolysate

เชื้อ *Escherichia coli* หรือ *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacteria) มีรูปร่างเป็นท่อน แบคทีเรียชนิดนี้ ไม่สร้างสปอร์ และเป็น facultative anaerobe คือสามารถเจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สามารถก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วง โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะและติดเชื้อในกระแสเลือด (Public health statistics, Ministry of public health, 2015)

เชื้อ *Candida albicans* เป็นยีสต์มีขนาด ตั้งแต่ 3-7 ไมครอน และเพิ่มจำนวนด้วยการแตกหน่อ (budding) โดยความสามารถในการแตกหน่อขึ้นกับปัจจัยสิ่งแวดล้อม อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นต้น ซึ่งเป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ตามเยื่อบุ จะก่อโรค Candidiasis ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อฉวยโอกาส โดยเฉพาะในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น เบาหวาน ติดเชื้อ HIV ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน โดยจะเกิดการติดเชื้อได้ตามเยื่อบุในปาก ช่องคลอด ทางเดินอาหาร สามารถเกิดโรคได้ในเยื่อบุหัวใจ ในเลือด และสมองได้ พบว่า *C. albicans* จัดเป็นสายพันธุ์ candidas ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงที่สุด

ประเทศไทยเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายของทรัพยากรทางธรรมชาติ ทั้งป่าไม้ แร่ธาตุ สมุนไพร โดยมีการเรียนรู้ที่จะใช้สมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ จากภูมิปัญญาท้องถิ่นที่มีมาช้านานและพบว่ามีการนำสมุนไพรในท้องถิ่นมาใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวกับการรักษาโรค งานวิจัยที่เกี่ยวกับการคิดค้นยาใหม่งานวิจัยที่เกี่ยวกับการศึกษาสารสำคัญต่าง ๆ จากสมุนไพร เป็นต้น โดยจากการศึกษาพบว่าพืชเป็นแหล่งสำคัญสำหรับการสร้างสาร secondary metabolites ซึ่งจะมีในสิ่งมีชีวิตบางจำพวกเท่านั้น เป็นสารที่ไม่จำเป็นต่อการดำรงชีพแต่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารนั้น ๆ โดยเป็นสารที่ใช้ในขบวนการป้องกันตัวเองจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ เช่น น้ำมันหอมระเหย สารปฏิชีวนะ หรือสารที่มีฤทธิ์ทางยา ซึ่งถือเป็นสารสำคัญที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาค้นคว้าวิจัยเพื่อเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไปได้

ต้นคนทา ชื่อวิทยาศาสตร์ *Harrisonia perforata* (Blanco) merr. ชื่อวงศ์ Rutaceae ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่หรือไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ลำต้นมีหนามแข็ง รากอ่อนและต้น รสขม เฝื่อนฝาด เย็น มีสรรพคุณแก้ท้องร่วง บิด ลดความร้อนในร่างกาย ลดไข้พิษแก้ร้อนในกระหายน้ำได้ (Smittinand, 2014) โดยจากการศึกษาข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่าได้มีการนำเปลือกและรากคนทา มาใช้ประโยชน์โดยทำเป็นยาแก้ไข้ แก้โรคลำไส้และโรคท้องร่วง และในการตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่าต้นคนทามีฤทธิ์ทำลายเชื้อจุลชีพ โดยต้นคนทาจะมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่นเชื้อ *Streptococcus mutans* และเชื้อ *Mycobacterium smegmatis* ได้ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ในต้นคนทา เช่น การศึกษา anti-inflammatory activity จากรากต้นคนทา การค้นพบสารสำคัญชนิดใหม่จากส่วนผลของต้นคนทา เป็นต้น

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและกลุ่มของสารทางเคมีโดยวิธี bioassay guided fractionation เป็นการศึกษาให้เห็นว่ามีการแยก pattern ของสารสำคัญร่วมกับการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพไปพร้อม ๆ กัน จากนั้นจึงทำการศึกษาแยกกลุ่มสารที่มีฤทธิ์เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป ซึ่งมีข้อดีคือสามารถติดตามและแยกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการได้รวดเร็วกว่าวิธีดั้งเดิมในทางเภสัชเวท ซึ่งใช้วิธีการแยกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ก่อนจะนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจะใช้เวลาค่อนข้างนานและอาจจะไม่ได้สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพตามต้องการ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดด้วยเมทานอลจากต้นคนทา

2. เพื่อศึกษากลุ่มของสารเคมีที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่แยกได้จากต้นคนทา

แนวคิด ทฤษฎี งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ศึกษาสาระสำคัญต่าง ๆ

มีการศึกษาสารที่แยกได้จากกิ่งคนทา พบสาร chromones จำนวน 6 ตัว คือ peucenin-7-methyl ether, *O*-methylalloptaeoxylin, perforatic acid, eugenin, saikochromone A และ greveichromenol ร่วมกับ พบ chromones ใหม่ อีก 5 ตัว คือ (1) 5-hydroxy-7-methoxy-2-methyl-8-(2,3-epoxy-3-methylbutyl)

chromone, (2) 5-hydroxy-7- ethoxy-2-methyl-8-(1-hydroxy-3-methyl-3-butenyl)chromone (3)5-hydroxy-7-methoxy-2-methyl-8-(2-hydroxy-3-methyl-3-butenyl) chromone, (4) nor-2-methyl-alloptaeoxylin methyl ether และ (5) 2-hydroxymethyl-alloptaeoxylin เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการ antimycobacterial และ antiplasmodial ซึ่งจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารทั้ง 11 ตัว พบว่า สาร chromones ที่มีฤทธิ์ antimycobacterial มีดังนี้ (1) peucenin-7-methyl ether, (2) *O*-methylalloptaeoxylin, (3) eugenin, (4) greveichromenol, (5) 5-hydroxy-7-methoxy-2-methyl-8-(2,3-epoxy-3-methylbutyl) chromone, (6) 5-hydroxy-7-ethoxy-2-methyl-8-(1-hydroxy-3-methyl-3-butenyl)chromone, (7)5-hydroxy-7-methoxy-2-methyl-8-(2-hydroxy-3-methyl-3-butenyl) chromone, (8) nor-2-methyl-alloptaeoxylin methyl ether และ (9) 2-hydroxymethyl-alloptaeoxylin และสาร chromones ที่มีฤทธิ์ antiplasmodial มีเพียงตัวเดียว คือ *O*-methylalloptaeoxylin (Tuntiwachwuttikul et al., 2006)

มีการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนของผลและรากคนทา โดยการแยกสารสกัดหยาบด้วย ethyl acetate ของส่วนของผลและรากคนทาโดยใช้เทคนิคทาง chromatography พบว่าได้สาร harperamone, limonoids, harperfolide และ harperforatin รวมทั้งสารที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ 6 ชนิด คือ harrisonin, obacunone, (+) -vouacapenic acid, harrisonol A, peucenin-7-methyl ether และ braylin I จากรายงานการวิจัยพบว่า braylin I และ (+)-vouacapenic acid แยกได้จากพืชสกุล Harrisonia เป็นครั้งแรก (Choodej, Sommit & Pudhom, 2013)

มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากส่วนของผลคนทา พบว่ามีสารกลุ่ม limonoid เป็นสารสำคัญ (Yan et al., 2011)

2. ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

มีการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพ(antimicrobial activity) ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* และเชื้อ *Actinobacillus actinomycetemcomitans* โดยใช้สารสกัดด้วย hexane methylene chloride ethanol และน้ำ ของต้นคนทา ด้วยวิธี agar diffusion method จากผลการทดลองที่ได้ คือ สารสกัดทั้งหมด ยกเว้นสารสกัดด้วยน้ำ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptococcus mutans* และเชื้อ *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ซึ่งมีการเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน คือ ยา chlorhexidine ด้วย (Sirichitra, 1993)

มีการศึกษาผลการยับยั้งการยึดเกาะของ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 และ TPF-1 ด้วยสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ โดยใช้สารสกัดเอทานอลจากกิ่งของต้นคนทา งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเอทานอลจากกิ่งต้นคนทาให้ผลยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ได้ (Limsong, Benjavongkulchai & Kuvatanasuchati, 2004)

มีการศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* พบว่าสารสกัดจากสีฟันคนทาที่สกัดด้วย 95% ethanol สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.06 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MBC เท่ากับ 0.49 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Phalanisong, 2008)

3. ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ

มีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากคนทา ซึ่งเป็นส่วนประกอบจากรากทั้ง 5 ของตำรับยาไทยแผนโบราณเบญจโลกวิเชียร ที่ใช้ในการลดอาการไข้ โดยทำการศึกษาในเซลล์ macrophage (J774A.1) ที่ถูกกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide--LPS และในหนูแรทที่ทำให้เกิดการอักเสบที่อุ้งเท้าโดยการฉีด carrageenan ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากคนทา ความเข้มข้น 12.5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการหลั่งสารสื่อการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) TNF-α และ IL-1β ได้อย่างมีนัยสำคัญและขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้ โดยสารสกัดจากรากคนทาความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถ

ยับยั้งการแสดงออกของยีน TNF-α และ IL-1β ได้สูงสุดถึง 49.83% และ 47.27% ตามลำดับ สำหรับ IL-6 สารสกัดด้วยเอทานอลจากรากคนทา ความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งการแสดงออกของยีนสูงสุด 32.16% นอกจากนี้สารสกัดด้วยเอทานอลจากรากคนทา ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยังยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการอักเสบได้ 88.11% และ 93.68% ตามลำดับ โดยไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ศึกษา การฉีดสิ่งสกัดจากรากคนทาเข้าทางช่องท้องหนูแรท ในขนาด 50, 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดการอักเสบแบบเฉียบพลันที่เวลา 2 ชั่วโมงภายหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดอุ้งเท้าอักเสบได้ 28.48%, 31.18%, 47.85% และ 65.05% ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้บ่งชี้ว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากรากคนทามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Somsil, 2012)

มีการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนของผลและรากคนทา โดยการแยกสารสกัดหยาบด้วย ethyl acetate ของส่วนของผลและรากคนทา จากนั้นได้นำสารที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยวัดการยับยั้งการผลิต nitric oxide ในเซลล์ macrophage J774.A1 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย lipopolysaccharide (LPS) ผลที่ได้ คือ harperfolide แสดงฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC50 เท่ากับ 6.51 μM นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาการยับยั้งการผลิต nitric oxide โดยวัดจากการกดการแสดงออกของโปรตีน iNOS ด้วยเทคนิค Western blot จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ macrophage J774.A1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และได้รับสาร harperfolide ส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน iNOS ลดลง แสดงให้เห็นว่าสาร harperfolide สามารถควบคุมการแสดงออกของโปรตีน iNOS ได้ตั้งแต่ระดับการถอดรหัส (Choodej, Sommit & Pudhom, 2013)

4. ความเป็นพิษ (toxicity)

มีการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเรื้อรัง (acute and subchronic toxicity)ในหนู ของสารสกัดด้วยน้ำจากต้นคนทา ซึ่งใช้ส่วนของเปลือก จากผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำเป็นสารสกัด ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเรื้อรังในหนู (Sireeratawong, 2009) มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากส่วนของผลคนทา มีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง (in vitro cytotoxicity) ซึ่งทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HL-60 (human leukaemia) และ A-549 (human lung adenocarcinoma) cell lines โดยวิธี methyl-thiazol-tetrozolium (MTT) และ sulforhodamine B (SRB) ซึ่งจากการทดสอบสารกลุ่ม limonoids ที่ได้จากผลคนทาทั้ง 8 ตัวนั้น พบว่ามีสาร limonoid เพียงตัวเดียว คือ Harrpernoid B ที่แสดงผลเป็น weak activity ต่อการทดลองครั้งนี้ (Yan et al., 2011)

กรอบแนวคิดในการวิจัย

นำสารสกัดหยาบของต้นคนฑามาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli* and *Candida albicans* หลังจากนั้นนำไปหาสารที่คาดว่าจะออกฤทธิ์โดยวิธี TLC-bioautography และทดสอบกลุ่มของสารเคมีเบื้องต้นที่คาดว่าจะพบในต้นคนฑา

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่าง คือ สมุนไพรคนทา จำนวน 1 แหล่งที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ จากการสุ่มเก็บตัวอย่างวิจัยที่ จังหวัดกาญจนบุรี โดยการเก็บและระบุของชนิดของพืชสมุนไพรได้รับความอนุเคราะห์จากผู้เชี่ยวชาญด้านพฤกษศาสตร์ ดร.ปราโมทย์ ไตรบุญ

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เป็นวิธีการทดลองที่มีขั้นตอน กระบวนการที่น่าเชื่อถือและใช้กันอย่างแพร่หลายและสามารถวัดผลทางวิทยาศาสตร์ได้อย่างน่าเชื่อถือ

การเก็บรวบรวมข้อมูล

การเก็บข้อมูลโดยใช้การบันทึกผลทางด้านวิทยาศาสตร์ตามขั้นตอนที่ได้ดำเนินการ เริ่มจากการ

ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ วัดผลด้วยค่าสถิติโดยเลือกใช้ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ส่วนการทดสอบกลุ่มของสารเคมีเบื้องต้นวัดจากการเปลี่ยนแปลงของสีและตะกอนที่เกิดขึ้น

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการวิจัยวัดผลด้วยค่าสถิติโดยเลือกใช้ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

1. การศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพและศึกษาเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2. การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บพืชสมุนไพรคนฑาที่ขึ้นอยู่ตามธรรมชาติ โดยสามารถเก็บตัวอย่างได้ที่จังหวักกาญจนบุรี

3. การเตรียมพืชสมุนไพร

คัดเลือกพืชสมุนไพรที่เก็บมาเป็นพืชตัวอย่าง จากนั้นนำมาทำความสะอาดและหั่นเพื่อลดขนาด แล้วนำมาตากแห้งหรืออบแห้งจนพืชแห้งสนิท และทำการบดพืชด้วยเครื่องบดเพื่อลดขนาดอีกครั้ง

4. การหมักพืชสมุนไพร

นำพืชสมุนไพรที่ผ่านการลดขนาดแล้ว มาแช่ในตัวทำละลายคือ เมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมไว้ โดยบรรจุภายในภาชนะปิด ใช้เวลาในการหมักพืชสมุนไพรประมาณ 3-7 วันและทำซ้ำจำนวน 3 รอบ

5. การสกัดพืชสมุนไพร

นำพืชสมุนไพรที่หมักไว้ตามระยะเวลาที่กำหนดมากรองเพื่อเอาสารละลายไปทำการระเหยแห้งโดยผ่านเครื่อง rotary evaporator แล้วเก็บส่วนผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) ไว้ในถ้วยระเหย เก็บในตู้อบ

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยวิธี disc diffusion ของสารสกัดสมุนไพร

Disc diffusion techniques เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพมาก เนื่องจากสามารถปฏิบัติได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว รวมทั้งสามารถให้ผลการทดสอบที่แน่นอนและถูกต้อง ซึ่งการทดสอบด้วยเทคนิคนี้จะอาศัยหลักการแพร่ที่ว่า เมื่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เติมลงบนกระดาษกรอง (filter paper disc) ซึ่งวางบนอยู่บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการตรวจสอบไว้ มีการแพร่จากจุดเริ่มต้นไปในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ๆ เมื่อระยะทางที่สารแพร่ออกไปเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นก็จะลดลง ทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสาร ณ จุดต่าง ๆ กันรอบแผ่นกระดาษกรอง ในขณะเดียวกันเชื้อจุลินทรีย์บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ณ ความเข้มข้นของสารที่จุดใด ๆ (ที่ไกลจากกระดาษกรอง) ก็จะเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นจนเห็นได้ชัด ซึ่งแตกต่างจากบริเวณที่ใกล้กับกระดาษกรองซึ่งมีความเข้มข้นของสารมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้ ทำให้ไม่มีการเจริญของเชื้อให้เห็นจึงเกิดเป็นโซนใส (inhibition zone) ขึ้น

7. การทดสอบหาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดโดยวิธี TLC-bioautography

หลังจากทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ แล้วสามารถระบุได้ว่าสมุนไพรชนิดใดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ จากนั้นก็นำสารสกัดของพืชสมุนไพรชนิดที่สามารถต้านเชื้อจุลชีพได้ มาทำการทดสอบเพื่อหาสารออกฤทธิ์โดยผ่านกระบวนการแยกสารด้วยวิธี TLC-bioautography

8. การแยกสารด้วยวิธี column chromatography

เมื่อผ่านกระบวนการทดสอบเพื่อหาสาร ออกฤทธิ์โดยผ่านกระบวนการแยกสารด้วยวิธี TLC-bioautography แล้ว จากนั้นก็นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพมาผ่านกระบวนการแยกสารด้วยวิธี column chromatography โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมอุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกสารด้วยวิธี column chromatography ให้พร้อม

2. ชั่งน้ำหนักซิลิกาเจล 150 มิลลิกรัม

3. บรรจุซิลิกาเจลลงไปในคอลัมน์ตามปริมาณที่กำหนดโดยดูตามความเหมาะสม แล้วเติมสารละลายที่เป็น mobile phase โดยมีส่วนผสมระหว่าง hexane:

ethylacetate (70:30) ลงไปในคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้นานประมาณ 24 ชั่วโมงเพื่อให้ซิลิกาเจลจับกันได้แน่น

4. จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาบดผสมให้เข้ากับซิลิกาเจลด้วยโกร่งกระเบื้อง เมื่อผสมเข้ากันดีจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว บรรจุลงในคอลัมน์โดยโปรยบนผิวหน้าของซิลิกาเจลที่บรรจุไว้ก่อนแล้ว โดยค่อยๆโปรยให้ผิวหน้าเรียบเสมอกัน

5. เปิดจุก stopcock เพื่อปล่อยสารละลายที่เป็น mobile phase ออกมาจากคอลัมน์จนกระทั่งถึงช่วงของสารตัวอย่างที่ต้องการจึงเริ่มเก็บสารตัวอย่างในแต่ละส่วน ๆ (fraction) ไว้ใน beaker

6. จากนั้นนำแต่ละ fraction ที่แยกแล้วมาหยดบนแผ่น TLC เพื่อดูการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างแต่ละ fraction โดยใช้ hexane:ethylacetate:methanol อัตราส่วน 70:25:5 เป็น mobile phase

7. รวมแต่ละ fraction ที่เคลื่อนที่บนแผ่น TLC แล้วสามารถเคลื่อนที่ได้ระยะเดียวกันเข้าด้วยกัน แล้วนำมาระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator จนแห้ง

8. จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี TLC-bioautography ตามขั้นตอนเดิม

9. การศึกษากลุ่มของสารเคมี (phytochemical constituents)

1. การตรวจสอบสารกลุ่ม Alkaloids

เตรียมสารละลายของสารสกัดตัวอย่างโดยละลายใน dil.H_2SO_4 อยู่ใน test plate จากนั้น ทำการทดสอบโดยหยด reagents 1-2 หยดลงในสารละลายที่เตรียมไว้ แล้วสังเกตตะกอนและสีที่เกิดขึ้น โดยทำการทดสอบด้วย reagents ต่าง ๆ

4 reagents ดังนี้

- Dragendorff's reagent
(positive = ตะกอนสีส้ม)
- Mayer'sreagent
(positive = ตะกอนขาวขุ่น)
- Wagner's reagent
(positive = ตะกอนสีเหลืองอ่อน)
- Hager's reagent
(positive = ตะกอนสีเหลือง)

2. การตรวจสอบสารกลุ่ม Tannins

นำสารสกัดตัวอย่างมาต้มในน้ำให้เดือดประมาณ 4-5 นาทีและกรอง จากนั้นแบ่งสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดทดลอง 8 หลอด หลอดละ 1-2 มิลลิลิตร

หลอดที่ 1 เติม gelatin solution 2-3 หยด (positive = ตกตะกอน)

หลอดที่ 2 เติม lead acetate solution 2-3 หยด (positive = ตกตะกอน)

หลอดที่ 3 เติม 2% quinine HCl solution 1 หยด (positive = ตกตะกอน)

หลอดที่ 4 เติม 1% ferric chloride 2-3 หยด (positive = สารละลายหรือตะกอนสีเขียวหรือสีน้ำเงิน)

หลอดที่ 5 เติม bromine water 5-6 หยด (positive = ตกตะกอน)

หลอดที่ 6 Formaldehyde-HCl test: เติม 40% formalin 3 หยดและ 10% HCl 6 หยดต้มใน water bath 1-2 นาที (positive = ตกตะกอนสีแดง)

หลอดที่ 7 Vanillin-HCl test: ระเหยสารตัวอย่างใน evaporating dish บน water bath จนแห้งแล้วเติม Vanillin reagent 1 มิลลิกรัมและ conc.HCl 1 หยด (positive = เกิดสีแดง)

หลอดที่ 8 เติม Lime-water 5 มิลลิลิตร (positive = ตกตะกอน)

3. การตรวจสอบสารกลุ่ม Flavonoids

3.1 Shinoda test

ละลายสารสกัดตัวอย่างด้วย ethanol 1-2 หยดจากนั้นเติมผงหรือแผ่น magnesium 4-5 แผ่น และหยด 5N HCl 2-3 หยด จะเกิดปฏิกิริยามีฟองฟู่ (positive = สารกลุ่ม flavonone และ dihydroflavonol จะทำให้เกิดสีแดงหรือสีชมพู)

3.2 Pew test

ละลายสารสกัดตัวอย่างด้วย ethanol 1-2

หยดจากนั้นเติมผงสังกะสี 0.5 กรัมและหยด 2N HCl 2 หยดเขย่าให้เข้ากันแล้วเติม conc.HCl 10 หยด (positive = dihydroflavonol จะทำให้เกิดสีแดงส่วนสาร flavonoid อื่น ๆ จะเกิดสีชมพูอ่อนหรือไม่เกิดสี

3.3 Ferric chloride test

ละลายสารสกัดตัวอย่างด้วยน้ำหรือ ethanol 2-3 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 2.5% $FeCl_3$ 2-3 หยด (positive = flavonoid จะทำให้เกิดสีเขียวหรือสีน้ำเงิน)

4. การตรวจสอบสารกลุ่ม Anthraquinone *O*-glycosides ด้วย Borntrager's test

นำสารสกัดตัวอย่างมาเติมน้ำและเติม 6N HCl ต้มนาน 5 นาที จากนั้นกรองและเทใส่หลอดทดลอง ทำการสกัดส่วนที่กรองได้ด้วย CH_2Cl_2 โดยเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นเก็บชั้น CH_2Cl_2 นำมาเติม ammonia T.S. และเขย่า สังเกตสีในชั้นด่าง (positive=ชั้นด่างมีสีชมพูถึงแดง)

5. การตรวจสอบสารกลุ่ม Triterpenoids และ Steroids ด้วย Liebermann-Burchard test

ละลายสารสกัดตัวอย่างด้วย 30% ethanol ใส่ในหลอดทดลอง ทำการสกัดด้วย CH_2Cl_2 จากนั้นดูดชั้น CH_2Cl_2 ใส่ในถ้วยกระเบื้อง และนำไปประเหยให้แห้งบน water bath ทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นหยด acetic anhydride ลงไป 2-3 หยดผสมให้เข้า แล้วค่อยๆหยด conc. H_2SO_4 ลงไปด้านข้างถ้วย 1-2 หยด ให้ไหลช้า ๆ ลงมารวมกันกับสารละลายในถ้วย สังเกตสีที่เกิดขึ้น (positive=สารกลุ่ม Triterpenoids จะได้สีแดงหรือสีม่วงแดง และสารกลุ่ม Steroids จะได้สีเขียวหรือสีน้ำเงิน)

6. การตรวจสอบสารกลุ่ม Saponin glycoside

6.1 Foam test นำสารสกัดตัวอย่างใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำอุ่นและเขย่าแรงๆประมาณ 3 นาที สังเกตลักษณะและวัดความสูงของฟอง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 20 นาทีและวัดความสูงอีกครั้ง หลังจากนั้นเติม dilute HCl ลงไป นำไปต้มใน water bath นาน 30 นาที นำมาเขย่าแรงๆแล้วสังเกตการเกิดฟองอีกครั้ง (positive = เกิดฟองหกเหลี่ยมที่คงทน แต่เมื่อเติม dilute HCl จะสูญเสียคุณสมบัติในการทำให้เกิดฟอง)

6.2 Liebermann-Burchard test

ละลายสารสกัดตัวอย่างด้วย 30% ethanol ใส่ในหลอดทดลอง ทำการสกัดด้วย CH_2Cl_2 จากนั้นดูดชั้น CH_2Cl_2 ใส่ในถ้วยกระเบื้อง และนำไปประเหยให้แห้งบน water bath ทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นหยด acetic anhydride ลงไป 2-3 หยดผสมให้เข้า แล้วค่อย ๆ หยด conc. H_2SO_4 ลงไปด้านข้างถ้วย 1-2 หยด ให้ไหลช้า ๆ ลงมารวมกันกับสารละลายในถ้วย สังเกตสีที่เกิดขึ้น (positive = สารกลุ่ม Triterpenoids จะได้สีแดงหรือสีม่วงแดง และสารกลุ่ม Steroids จะได้สีเขียวหรือสีน้ำเงิน)

7. การตรวจสอบสารกลุ่ม Cardiac glycoside

7.1 การตรวจสอบ Steroid nucleus โดย Liebermann-Burchard test

ละลายสารสกัดตัวอย่างด้วย 30% ethanol ใส่ในหลอดทดลอง ทำการสกัดด้วย CH_2Cl_2 จากนั้นดูดชั้น CH_2Cl_2 ใส่ในถ้วยกระเบื้อง และนำไปประเหยให้แห้งบน water bath ทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นหยด acetic anhydride ลงไป 2-3 หยดผสมให้เข้า แล้วค่อย ๆ หยด conc. H_2SO_4 ลงไปด้านข้างถ้วย 1-2 หยด ให้ไหลช้า ๆ ลงมารวมกันกับสารละลายในถ้วย สังเกตสีที่เกิดขึ้น (positive = สารกลุ่ม Triterpenoids จะได้สีแดงหรือสีม่วงแดง และสารกลุ่ม Steroids จะได้สีเขียวหรือสีน้ำเงิน)

7.2 การตรวจสอบ Unsaturated Lactone Ring

7.2.1 Kedde test

ละลายสารสกัดตัวอย่างด้วย 30% ethanol จากนั้นเติม Kedde reagent I และ II อย่างละ 2-3 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้นทันที (positive = เกิดสีม่วงแดง)

7.2.2 Raymond test

ละลายสารสกัดตัวอย่างด้วย 30% ethanol จากนั้นเติม Raymond reagent I และ II อย่างละ 2-3 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น (positive = เกิดสีม่วงทันทีแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน)

7.2.3 การตรวจสอบ Deoxy sugar โดย Keller-Kiliani test

นำสารสกัดตัวอย่างซึ่งละลาย ด้วย 30% ethanol มาเติม $FeCl_3$ reagent ผสมให้เข้ากัน แล้วเท

ลงในหลอดทดลอง จากนั้นค่อย ๆ ริน conc.H_2SO_4 ลงไปด้านข้างหลอดทดลองจนเห็นแยกชั้นอยู่ด้านล่าง สังเกตสีที่เกิดขึ้น (positive=เกิดวงแหวนสีน้ำตาลเขียว และหลังจากตั้งทิ้งไว้จะพบว่าสารละลายชั้นบนเปลี่ยนเป็นสีเขียว)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ในงานวิจัยครั้งนี้ ได้ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพและกลุ่มของสารเคมีที่มีในสมุนไพรไทย โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

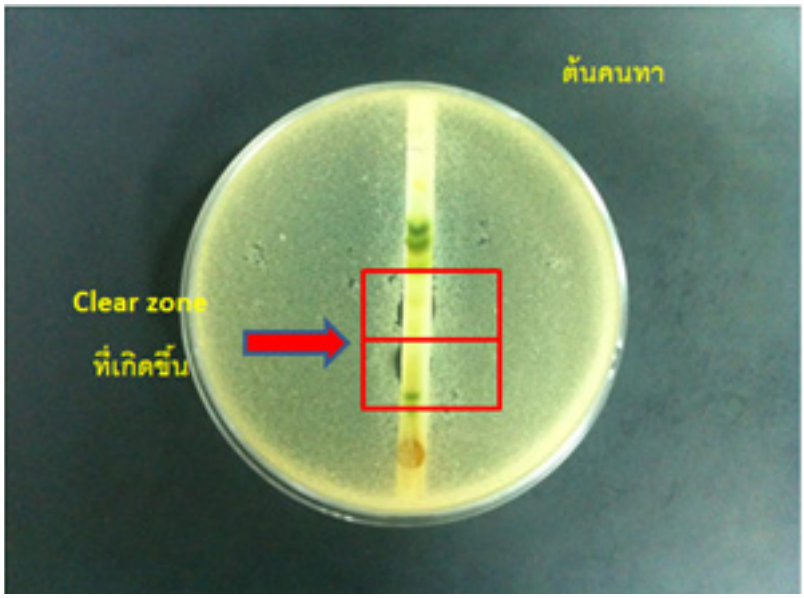
1. การสกัดพืชสมุนไพร

นำส่วนใบของต้นคนทามาสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้คือ 13.68 กรัม และได้ % yield เท่ากับ 8.65

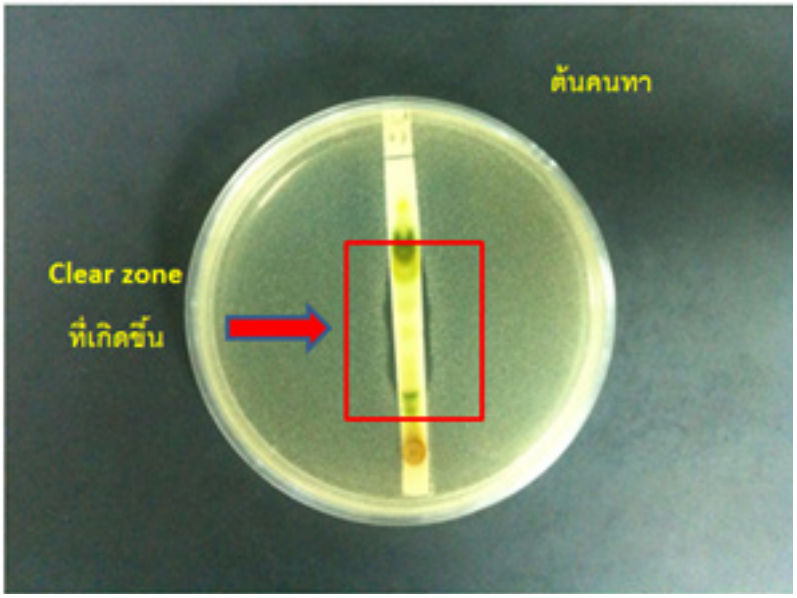
2. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบของคนทา

นำสารสกัดหยาบของคนทามาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 90028, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดจากต้นคนทามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งมีขนาดของโซนใสเท่ากับ 6.89 มิลลิเมตร และเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้มีขนาดของโซนใสเท่ากับ 7.01 มิลลิเมตร และไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* และเชื้อ *Candida albicans*

ผลการทดสอบเพื่อหาสารที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดจากสมุนไพรโดยวิธี TLC-bioautography



ภาพ 1 การเกิดโซนใสของต้นคนทา ด้วยปริมาณสาร 1 มิลลิกรัมต่อเชื้อ *Bacillus subtilis*



ภาพ 2 การเกิดโซนใสของต้นคนทา ปริมาณสาร 1 มิลลิกรัมต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ตาราง 1

ผลการทดสอบเพื่อหาสารที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดโดยวิธี TLC-bioautography

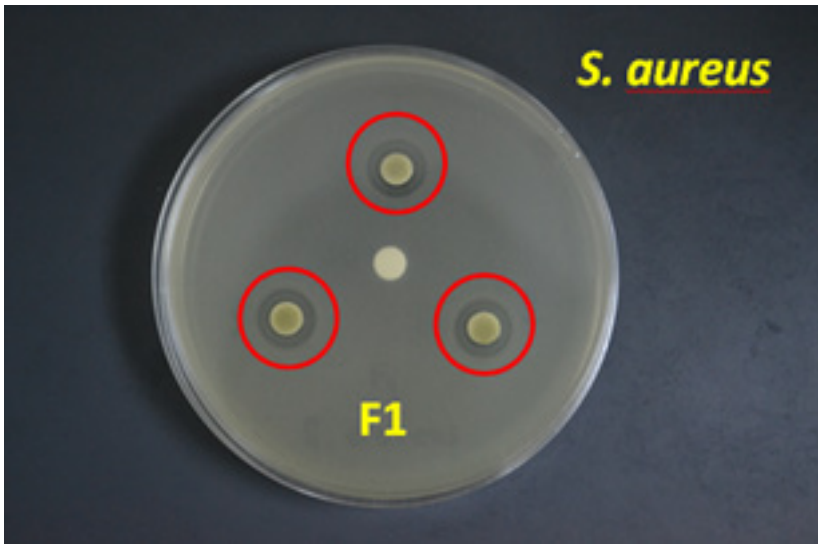
สารสกัดที่ใช้ทดสอบ (1 มิลลิกรัม)	**ขนาดของโซนใส (มิลลิเมตร)**	
	S. aureus ACCC 25923	*B. subtilis* ATCC 6633
ต้นคนทา	8.33	7.53

จากผลการทดสอบด้วยวิธี TLC-bioautography เพื่อหาสารที่ออกฤทธิ์จากสารสกัด พบว่าสารสกัดจากต้นคนทาที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *Bacillus subtilis* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยการแสดงขนาดโซนใสเท่ากับ 7.53 มิลลิเมตร และเท่ากับ 8.33 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากลักษณะการเกิดโซนใสของสารสกัดจากต้นคนทา ต่อเชื้อจุลชีพทั้ง 2 เชื้อ พบว่ามีโซนใสมากกว่า 1 จุด ซึ่งอาจเกิดขนาดโซนใสขึ้นใกล้ ๆ กันแล้วเกิดการซ้อนทับกันของโซนใส ทำให้มองเห็นเป็นโซนใสขนาดยาว และสามารถต้านเชื้อ *S. aureus* ได้ ซึ่งจากการศึกษาข้อมูล เชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้ ซึ่งสารสกัดจากต้นคนทาเป็นพืชสมุนไพรเพียงชนิดเดียวที่สามารถต้านเชื้อชนิดนี้ได้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกต้นคนทามาใช้ในงานวิจัยโดยการนำไปทดสอบแยกส่วนประกอบของสารโดยวิธี Column Chromatography ในขั้นตอนต่อไป

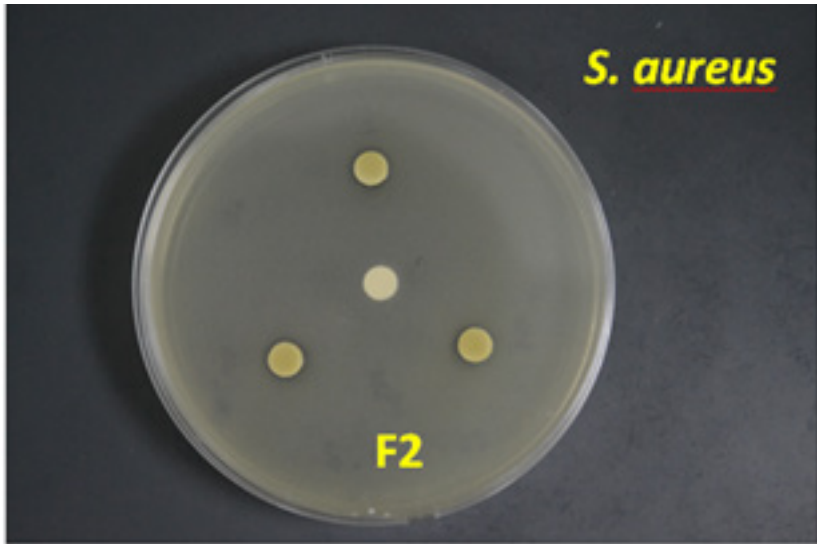
3. ผลการแยกส่วนประกอบของสารโดยวิธี Column Chromatography

เมื่อทำการทดสอบเพื่อหาสารที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดจากสมุนไพรโดยวิธี TLC-bioautography แล้ว ผู้วิจัยนำสารสกัดจากคนทา มาผ่านวิธี Column Chromatography โดยใช้ Mobile phase เป็น Hexane:ethylacetate ในอัตราส่วน 70:30 แล้วเก็บแยกส่วนของสารสกัดจากต้นคนทาที่ผ่านคอลัมน์ ได้ 60 fraction รวมทั้งหมด 60 flask จากนั้นทำการ spot สารแต่ละ fraction บนแผ่น TLC แล้วนำไปส่องภายใต้ UV แล้วรวม fraction ที่อยู่ในระนาบเดียวกันเข้าด้วยกัน ได้ 2 fraction คือ fraction F1 (flask ที่1-6) และ fraction F2 (flask ที่ 7-60) จากนั้นนำสารทั้ง 2 fraction ไปทำการระเหยแห้งเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

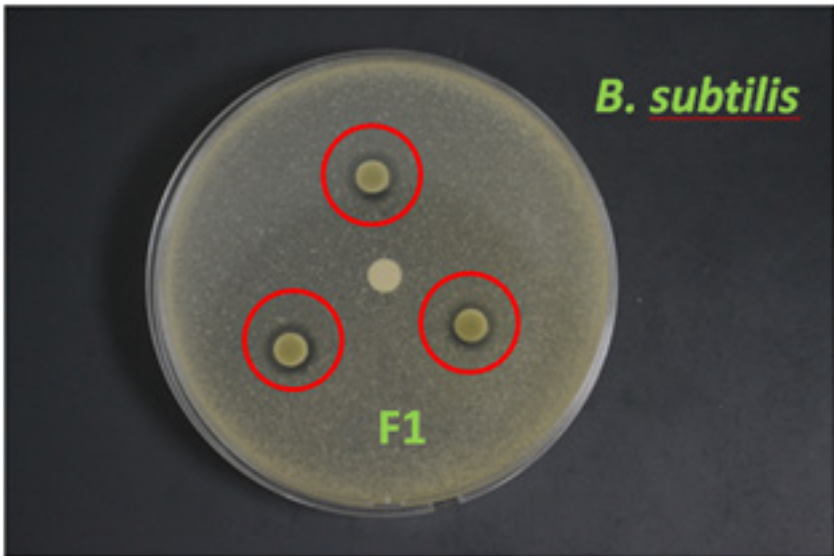
ผู้วิจัยนำ fraction F1 และ fraction F2 ที่ได้ มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. subtilis* ATCC 6633 โดยวิธี disc diffusion ได้ผลการทดสอบ ดังนี้



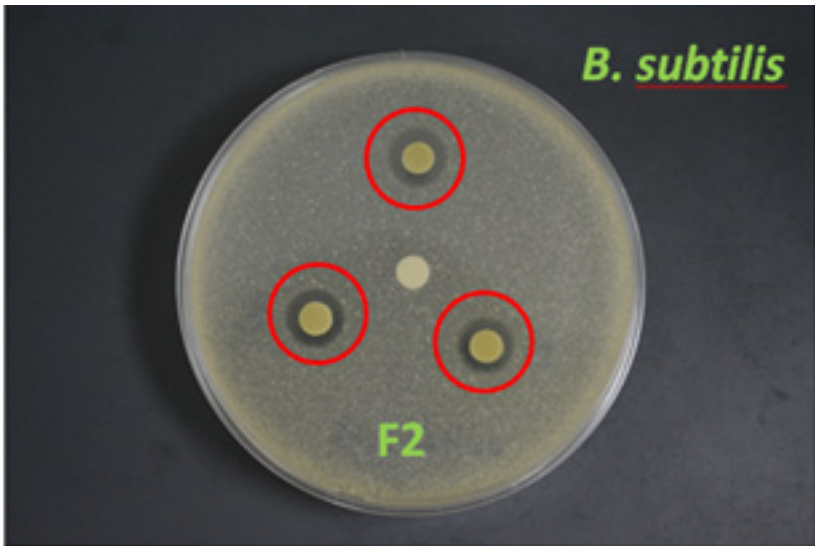
ภาพ 3 การเกิดโซนใสของ fraction F1 ด้วยปริมาณสารสกัด 1 มิลลิกรัมต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus*



ภาพ 4 การเกิดโซนใสของ fraction F2 ด้วยปริมาณสารสกัด 1 มิลลิกรัม ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus*



ภาพ 5 การเกิดโซนใสของ fraction F1 ด้วยปริมาณสารสกัด 1 มิลลิกรัม ต่อเชื้อ *Bacillus subtilis*



ภาพ 6 การเกิดโซนใสของ fraction F2 ด้วยปริมาณสารสกัด 1 มิลลิกรัม ต่อเชื้อ *Bacillus subtilis*

ตาราง 2

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดแยกส่วนด้วยวิธี disc diffusion

สารสกัดที่ใช้ทดสอบ (1 มิลลิกรัม)	ขนาดของโซนใส (มิลลิเมตร)	
	S. aureus ACCC 25923	*B. subtilis* ATCC 6633
fraction F1	11.45	8.96
fraction F2	ไม่เกิดโซนใส	10.77

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วย fraction F1 และ fraction F2 พบว่า fraction F1 สามารถให้ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพได้ทั้ง 2 เชื้อ คือเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเชื้อ *Bacillus subtilis* แสดงผลด้วยขนาดของโซนใสเท่ากับ 11.45 มิลลิเมตรและ 8.96 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในส่วนของ fraction F2 ให้ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพได้เพียงชนิดเดียว คือเชื้อ *Bacillus subtilis* ขนาดโซนใสเท่ากับ 10.77 มิลลิเมตร ดังนั้น หากเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพระหว่าง fraction F1 และ fraction F2 สามารถสรุปได้ว่าสารสกัด fraction F1 มีฤทธิ์ดีกว่า เพราะสามารถต้านเชื้อได้มากกว่า 1 ชนิด ซึ่งจะนำไปทดสอบเพื่อหากลุ่มสารเคมีในขั้นต่อไป

ตาราง 3

สรุปกลุ่มของสารเคมีของต้นคนทา Fraction F1 และ Fraction F2 ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ

สารสกัดที่ใช้ทดสอบ	**กลุ่มสารเคมี**						
	Alkaloids	Tannins	Flavonoids	Anthraquinone *O*-glycosides	Triterpenoids และ Steroids	Saponin glycoside	Cardiac glycoside
สารสกัดจากต้นคนทา	+	+++	++	+	++	-	-
F1	+	-	++	-	++	-	-
F2	+	-	+	-	+++	-	-

4. ผลการศึกษากลุ่มของสารเคมี (phytochemical constituents)

จากตารางสรุปผลจากกลุ่มของสารเคมีของต้นคนทา Fraction F1 และ Fraction F2 ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ

สามารถสรุปได้ดังนี้ สารสกัดจากต้นคนทา มีสารกลุ่ม Alkaloids กลุ่ม Tannins กลุ่ม Flavonoids กลุ่ม Anthraquinone O-glycosides กลุ่ม Triterpenoids และ Steroids โดยจากผลการทดสอบกลุ่มของสารเคมีจากสารสกัดต้นคนทานั้น มีสาร Tannin เป็น strong positive test ซึ่งจากการศึกษาข้อมูลของกลุ่มสาร tannin พบว่าสามารถให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ จึงคาดว่าสารกลุ่ม Tannin จึงน่าจะมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพในงานวิจัยนี้และเมื่อนำมาแยกเป็น Fraction F1 และ Fraction F2 แล้วพบว่าแต่ละ Fraction มีกลุ่มสารเคมีที่ไม่แตกต่างกัน คือ มีสารกลุ่ม Alkaloids กลุ่ม Flavonoids กลุ่ม Triterpenoids และ Steroids โดยกลุ่มสารเคมีส่วนใหญ่ที่ไม่พบในการทดสอบ Fraction ต่าง ๆ คือ กลุ่ม Anthraquinone *O*-glycosides กลุ่ม Saponin glycoside กลุ่ม Cardiac glycoside

ข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาจากงานวิจัยนี้ให้ข้อมูลว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากต้นคนทามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. aureus* และเชื้อ *B. subtilis* ได้ ซึ่งควรทำการศึกษาต่อไปเพื่อหาปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

สรุป

สารสกัดหยาบของคนฑามาทดสอบกับเชื้อจุลชีพ 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* และ *Candida albicans* ด้วยวิธี disc diffusion ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลจากต้นคนทามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสเท่ากับ 7.01 และ 6.89 มิลลิเมตร ตามลำดับ และนำสารสกัดด้วยเมทานอลจากต้นคนทาไปศึกษาต่อด้วยวิธี TLC-bioautography เพื่อ

ศึกษากลุ่มสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถแบ่งสารสกัดหยาบได้ 2 ส่วน แบ่งเป็นสารสกัดแยกส่วนที่ 1 และสารสกัดแยกส่วนที่ 2 เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion สารสกัดแยก

ส่วนที่ 1 มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส เท่ากับ 11.45 และ 8.96 มิลลิเมตรตามลำดับ ส่วนสารสกัดแยกส่วนที่ 2 ให้ฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. subtilis* โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส เท่ากับ 10.77 มิลลิเมตร และในการทดสอบหากลุ่มของสารสำคัญพบว่ามีสารสำคัญเป็นสารกลุ่มแทนนิน กลุ่มฟลาโวนอยด์ กลุ่มอัลคาลอยด์ กลุ่มแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ กลุ่มไตรเทอร์ปินอยด์ และกลุ่มสเตียรอยด์

Reference

Choodej, S., Sommit, D., & Pudhom, K. (2013). Rearranged limonoids and chromones from *Harrisonia perforata* and their anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter, 23*(13), 3895-3900.

Limsong, J., Benjavongkulchai, E., & Kuvatanasuchati, J. (2004). Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. *Journal of Ethnopharmacology. 92*(2-3), 281-289.

Luvira, V. (2006). Overveiw of antibiotic resistance. *Songklanagarind Medical Journal, 24*(5), 453-459. (in Thai)

Phalanisong, P. (2008). *Effect of some Thai medicinal plant extract on growth of Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis*. Retrieved from http://archive.lib.cmu.ac.th. (in Thai)

Public health statistics, Ministry of public health. (2015). *Ministry of Public Health 2015*.

Retrieved from http://bps.ops.moph.go.th. (in Thai)

Siriwong, N., Chukeatirote, E (2009). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and controlling. *Songklanakarind Medical Journal, 27*(4), 347-358. (in Thai)

Sireeratawong, S., Lertprasertsuke, N., Srisawat, U., Thuppia, A., Ngamjariyawat, A., Suwanlikhid, N., & Jaijoy, K. (2009). Acute and subchronic toxicity study of the water extract from *Harrisonia perforata* Merr. in rats. Songklanakarin *Journal of Science and Technology, 31*(1), 63-71. (in Thai)

Sirichitra, V. (1993). The testing of crude extract *Harrisonia perforata* against *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of the Dental Association of Thailand, 43*(6), 336-340. (in Thai)

Smittinand, T. (2014). *Thai plant names (botanical names-vernacular names).* Retrieved from http://www.qsbg.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?Botanic_ID=1000. (in Thai)

Somsil, P., & Ruangrungsi, N., Limpanasitikul, W., & Itthipanichpong, C. (2012). In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Harrisonia perforata* root extract. *Pharmacognosy Journal, 4*(32), 38-44.

Tuntiwachwuttikul, P., Phansa, P., Pootaeng-On, Y., & Taylor, WC. (2006). Chromones from the branches of *Harrisonia perforata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 54(*1), 44–47. DOI: 10.1248/cpb.54.44.

Yan,X.H.,Di, Y.T., Fang, X., Yang, S.Y., He, H.P., Li, S.L., Lu, Y., & Hao, X. J., (2011). Chemical constituents from fruits of *Harrisonia perforata*. *Phytochemistry, 72*(6), 508-513.