



การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของโพรพอลิส นมผึ้ง และฟ้าทะลายโจร

กิริติญา เอี่ยมถาวร, ยິงมณี ตระกูลพัฑ*
 บทคัดย่อ

การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโพรพอลิส นมผึ้ง และฟ้าทะลายโจร

กิริติญา เอี่ยมถาวร, ยິงมณี ตระกูลพัฑ*

บทนำ : แบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารเมื่อปนเปื้อนในอาหารก่อให้เกิดอาการท้องร่วง คลื่นไส้ อาเจียน ลำไส้อักเสบ การใช้ยาสังเคราะห์ในการรักษาโรคอาจทำให้เกิดเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ ดังนั้นการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรค **วัสดุและวิธีการ :** การวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษายับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคบริเวณระบบทางเดินอาหาร และการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโพรพอลิส นมผึ้ง และสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร โดยทดสอบผลยับยั้งต่อแบคทีเรียได้แก่ *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Enterobacter aerogenes* และ *Pseudomonas aeruginosa* ส่วนการต้านอนุมูลอิสระทดสอบโดยวิธี ABTS radical cation decolorization **ผลการศึกษา :** สารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรสามารถทำลายเชื้อ *Sal. typhi*, *Shi. flexneri*, *Ent. aerogenes*, *P. vulgaris*, *Ps. aeruginosa* และ *E. coli* ได้ดีโดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย(MBC) เท่ากับ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดโพรพอลิสมีผลการยับยั้งเชื้อ *Shi. flexneri* สูงที่สุดโดยมีค่า MBC เท่ากับ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นมผึ้งสามารถฆ่าเชื้อ *Shi. flexneri*, *K. pneumoniae* และ *Ent. aerogenes* ได้ดีที่สุดโดยมีค่า MBC เท่ากับ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อผสมสารทดสอบ พบว่าสารผสมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทุกชนิด สารสกัดฟ้าทะลายโจรผสมโพรพอลิสยับยั้ง *Ps. aeruginosa* ได้ดีที่สุด สารสกัดฟ้าทะลายโจรผสมนมผึ้ง สามารถยับยั้งเชื้อ *Ps. aeruginosa* และ *E. coli* ได้ดีที่สุด นมผึ้งผสมกับสารสกัดโพรพอลิส สารสกัดฟ้าทะลายโจรผสมกับโพรพอลิสและนมผึ้งมีค่า MBC เท่ากันเมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียทุกชนิด สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay พบว่า โพรพอลิส มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองมาคือ ฟ้าทะลายโจรและนมผึ้งโดยมีค่า Trolox equivalent เท่ากับ 13.41 ± 2.02 , 5.14 ± 0.60 and 1.03 ± 0.13 mg/g ของสารสกัดตามลำดับ **สรุปผล :** สารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรเมื่อนำมาทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรคบริเวณระบบทางเดินอาหาร พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทุกชนิดโดยมีค่าMBC ในช่วง 125-250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนโพรพอลิสสามารถยับยั้งเชื้อ *Shi. flexneri* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MBC เท่ากับ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนมผึ้งสามารถยับยั้งเชื้อ *Shi. flexneri*, *K. pneumoniae* และ *Ent. aerogenes* ได้ดีที่สุด มีค่าMBC เท่ากับ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารทดสอบมาผสมพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดีกว่าการใช้สารทดสอบที่แยกชนิดทดสอบ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay พบว่า โพรพอลิส มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองมาคือ ฟ้าทะลายโจรและนมผึ้ง

คำสำคัญ: ฟ้าทะลายโจร, โพรพอลิส, นมผึ้ง, การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย, การยับยั้งอนุมูลอิสระ

*ติดต่อผู้พิมพ์: โทร (66 53) 1948-50 ext 117 โทรสาร (66 53) 892259 E-mail: yingmanee.t@cmu.ac.th

*Corresponding author: Tel (66 53) 1948-50 ext 117. Fax (66 53) 892259. E-mail: yingmanee.t@cmu.ac.th



Abstract

Growth inhibition of pathogenic bacteria causing enteric diseases and anti-free radical activity of propolis, royal Jelly and *Andrographis paniculata*

Eiamthaworn K, Tragoolpua Y*

Introduction: Contamination of food by pathogenic bacteria causing enteric diseases results in diarrhea, nausea, vomiting and gastroenteritis. Using synthetic drugs for treatment the diseases may cause antibiotic resistant bacteria. Thus, application of natural extracts for treatment of pathogenic bacteria causing enteric diseases may be as an alternative choice for treatment of diseases. **Materials and Methods :** Antibacterial and anti-free radical activities of propolis extract, royal jelly and *Andrographis paniculata* extract were investigated in this study. Antibacteria activity was against tested *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*. Anti-free radical activity was also determined by ABTS radical cation decolorization assay. **Results :** The extract of *A. paniculata* showed highest activity on *Sal. typhi*, *Shi. flexneri*, *Ent. aerogenes*, *P. vulgaris*, *Ps. aeruginosa* and *E. coli* with minimal bactericidal concentration (MBC) of 125 mg/ml. The highest antibacterial activity of propolis was observed after tested against *Shi. flexneri* with MBC of 31.25 mg/ml. MBC of 31.25 mg/ml was observed after tested royal jelly with *Shi. flexneri*, *K. pneumonia* and *Ent. aerogenes*. The highest antibacterial activity on *Ps. aeruginosa* was shown after treatment with combination of *A. paniculata* extract and propolis extract. Moreover, *Ps. aeruginosa* and *E. coli* were inhibited with highest activity after treatment with the combination of *A. paniculata* extract and royal jelly. Combination of propolis extract and royal jelly, and combination of *A. paniculata* extract, propolis extract and royal jelly showed similar MBC on all bacteria tested. After determination of anti-free radical activity by ABTS radical cation decolorization assay, propolis showed highest anti-free radical activity followed by *A. paniculata* extract and royal jelly with trolox equivalent of, 13.41 ± 2.02 , 5.14 ± 0.60 and 1.03 ± 0.13 mg/g of extract, respectively. **Conclusion:** All enteric bacteria tested were inhibited by the extract of *A. paniculata* with MBC ranged from 125-250 mg/ml. The highest antibacterial activity of propolis was shown on *Shi. flexneri* with MBC 31.25 mg/ml. The highest inhibition by royal jelly was observed on *Shi. flexneri*, *K. pneumonia* and *Ent. aerogenes* with MBC of 31.25 mg/ml. Moreover, inhibitory effects of combination of materials on bacteria were higher than non-combined materials. Moreover, the highest anti-free radical activity was observed from propolis extract followed by *A. paniculata* extract and royal jelly using ABTS radical cation decolorization assay.

Keyword : *Andrographis paniculata*, propolis, royal jelly, anti-bacterial, anti-free radical

บทนำ

แบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารสามารถพบได้ทั่วไปทั้งในดิน น้ำ เช่น เชื้อ *Escherichia*, *Salmonella* และ *Shigella* หากเชื้อเหล่านี้มีการปนเปื้อนในอาหาร ซึ่งทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร บางครั้งเชื้อจะรุกล้ำเข้าไปทำลายเยื่อบุลำไส้ ทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย มีไข้ และปวดศีรษะ นอกจากนี้เชื้อบางชนิดสามารถผลิต enterotoxin ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษในลำไส้ โดยยาสังเคราะห์ที่ใช้ในการรักษาสามารถรักษาอาการติดเชื้อได้ผลดี แต่ยาสังเคราะห์เหล่านี้ อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ป่วยหรือก่อให้เกิดการดื้อต่อยาของเชืวดังกล่าวได้ ดังนั้น การนำสาร

สกัดจากธรรมชาติที่ไม่มีผลข้างเคียงและปลอดภัยต่อผู้ป่วยมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร แทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรค การศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาสารจากธรรมชาติได้แก่ โพรพอลิส นมผึ้ง และฟ้าทะลายโจร

โพรพอลิส (propolis) เป็นยางเหนียวจากส่วนต่างๆ ของต้นไม้ โดยผึ้งจะนำยางไม้กลับไปทำรังและผสมกับเอนไซม์ในตัวผึ้งเพื่อซ่อมแซมรัง อุดรอยรั่ว ตลอดจนรักษาความสะอาด และป้องกันเชื้อโรคภายในรัง โพรพอลิสมีคุณสมบัติในการเป็นสารปฏิชีวนะทางธรรมชาติที่ดี (Sibel and Semiramis, 2005)



นอกจากนี้โพรพอลิส ยังมีความสามารถในการต้านเซลล์มะเร็ง ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการติดเชื้อจุลินทรีย์ (Takeshi and Reiji, 2004) ส่วนนมผึ้ง หรือ รอยัลเจลลี่ คืออาหารของผึ้งอ่อนและผึ้งนางพญาซึ่งผลิตจากต่อมไฮโปฟาริงค์ ที่อยู่ติดกับต่อมน้ำลายบริเวณส่วนหัวของผึ้งงาน นมผึ้งอุดมไปด้วยสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย (Liawruangratha et al., 2006) เช่น โปรตีน น้ำตาล ไขมัน วิตามิน และกรดอะมิโนอิสระ (Takeshi and Reiji, 2004) นอกจากนี้นมผึ้งยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Escherichia coli*, *Micrococcus pyogenes* (Barker et al., 1959) เป็นต้น ส่วนฟ้าทะลายโจร เป็นพืชล้มลุกในวงศ์ Acanthaceae มีสรรพคุณ ลดไข้ ไอ แก้เจ็บคอ คออักเสบ และขับเสมหะ และสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการท้องเสีย ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Vibrio cholera* (Putiyanun, 2003) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร ของโพรพอลิส นมผึ้ง และฟ้าทะลายโจรเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับรักษาโรคระบบทางเดินอาหารต่อไป

นอกจากนี้ยังพบว่าโพรพอลิส นมผึ้ง ฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (Akowuah et al., 2005; Buratti et al., 2006) ซึ่งอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออกและมีอิเล็กตรอนเดี่ยวเหลืออยู่บนอนุมูล อิเล็กตรอนเดี่ยวนี้ทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรต่ำและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูง จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบๆ โดยดึงหรือให้อิเล็กตรอนแก่โมเลกุลข้างเคียงให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Sangpreecha, 2004) ซึ่งอนุมูลอิสระเกิดได้เองตามธรรมชาติในร่างกายและได้รับจากสิ่งแวดล้อมภายนอก อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย เช่น hydroxyl, super oxide และ peroxy และจากสภาวะทางอารมณ์ เช่น ความเครียด ส่วนอนุมูลอิสระที่ได้รับจากภายนอกในร่างกายได้แก่ รังสี ควันบุหรี่ มลภาวะต่างๆ (Weecharangsan and Opanasopit, 2004) ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น จะส่งผลต่อร่างกายทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ โรคหัวใจ โรคข้ออักเสบ เป็นต้น (Kuda et al., 2005) โดยปกติร่างกายของคนเราสามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมา เช่น superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione และสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน จะสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูล (Vajragupta et al., 2006)

วัสดุและวิธีการ

1. โพรพอลิสและนมผึ้ง

สารสกัดโพรพอลิส และนมผึ้ง ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทบีโปรดักส์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด โดยนำสารสกัดโพรพอลิส นมผึ้งมาละลายใน dimethyl sulfoxide ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 500 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การสกัดสมุนไพร

ซึ่งสมุนไพรฟ้าทะลายโจรแล้วนำไปใส่ขวดที่มีฝาปิดและเติม 95% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:10 นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นนำสารสกัดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จนตัวทำละลายแห้ง จนได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นมาก นำสารสกัดที่ได้ทำแห้งด้วยเครื่อง lyophilizer แล้วเก็บสารละลายที่ได้ในขวดที่มีฝาปิดสนิทซึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาละลายใน dimethyl sulfoxide ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. แบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

เชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4. การทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดโพรพอลิส นมผึ้ง และสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารโดยวิธี Broth dilution

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C และปรับความขุ่นเท่ากับค่ามาตรฐาน McFarland No. 0.5 °C เจือจางสารสกัดสมุนไพร 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน TSB แบบ two-fold dilution โดยให้มีปริมาตรเป็น 0.5 ml เติมเชื้อทดสอบลงในหลอดที่ 1 – 8 ปริมาตรหลอดละ 0.5 ml ส่วนหลอดที่ 9 ให้เติมเชื้อลงไป 1 ml เพื่อเป็นหลอดควบคุมเชื้อทดสอบและเปรียบเทียบกับชุดควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

5. การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สารทดสอบสามารถฆ่าแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่ทดสอบ

นำหลอดทดสอบจากการทดลอง 4 ที่ไม่สามารถเห็นการเจริญของเชื้อทดสอบ streak plate บนอาหาร TSA โดยใช้หัวถ่ายเชื้อมาตรฐานขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 mm ซึ่งสามารถบรรจุของเหลวได้ 0.01 ml จุ่มลงในหลอดทดสอบ



ดังกล่าว ลากเป็นเส้นบนจานอาหาร TSA จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูการเติบโตของเชื้อทดสอบบนรอย streak นับจำนวนโคโลนีที่โดยค่า Minimum Bactericidal Concentration, MBC คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ 99.99%

6. การทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สารทดสอบผสมที่สามารถยับยั้ง และฆ่าเชื้อทดสอบ

นำสารสกัดฟ้าทะลายโจร โพรพอลิส และนมผึ้งมาผสม โดยนำสารสกัดฟ้าทะลายโจรผสมโพรพอลิส สารสกัดฟ้าทะลายโจรผสมนมผึ้ง โพรพอลิสผสมนมผึ้ง สารสกัดฟ้าทะลายโจรผสมกับโพรพอลิสและนมผึ้ง โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดฟ้าทะลายโจร โพรพอลิส และนมผึ้งเท่ากับ 500, 200 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย และหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สารทดสอบผสมที่สามารถยับยั้ง และฆ่าเชื้อทดสอบ

7. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation ของสารสกัดโพรพอลิส นมผึ้ง และสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (Re et al., 1999)

เตรียมสาร ABTS [2,2' - azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] 0.0360 g โดยละลายใน 95 % ethanol ปริมาตร 10 ml จะได้สารละลาย ABTS ที่มีความเข้มข้น 7 mM และ เตรียมสาร potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) 0.3784 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml จะได้สารละลาย $K_2S_2O_8$ ที่มีความเข้มข้น 140 mM จากนั้นผสมสารละลาย 7 mM ABTS 10 ml และ 140 mM $K_2S_2O_8$ 176 μ l ในขวดสีชา และทิ้งไว้ในที่มืด 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ ABTS radical cation stock solution หลังจากนั้นทำการเจือจาง ABTS radical cation stock solution ด้วย 95 % ethanol ให้ค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.700 ± 0.020 เติมน้ำกลั่น ABTS radical cation ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดทดลองจากนั้นเติมสารทดสอบที่ละลายใน dimethyl sulfoxide ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 μ l ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาทีจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm โดยใช้ 95 % ethanol เป็น blank จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50% (IC_{50}) และค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโพรพอลิส นมผึ้ง และสารสกัดฟ้าทะลายโจร ดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{734 \text{ control}} - A_{734 \text{ test sample}}) / A_{734 \text{ control}}] \times 100$$

$$\text{Anti-free radical activity, TEAC (mg/g ของสารสกัด)} = \text{ค่า } IC_{50} \text{ ของ trolox (mg/ml)} \times 1000$$

$$\text{ค่า } IC_{50} \text{ ของสารทดสอบ (mg/ml)}$$

ผลการศึกษา

การทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดโพรพอลิส นมผึ้ง และสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารโดยวิธี Broth dilution

เมื่อนำสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมาทดสอบกับ *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) เท่ากับ 31.25, 62.5, 62.5, 62.5, 31.25, 62.5 และ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบทุกชนิด (MBC) เท่ากับ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นค่า MBC ต่อเชื้อ *K. pneumonia* เท่ากับ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1)

เมื่อทำการทดสอบสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Shi.*

flexneri, *Ent. aerogenes*, *P. vulgaris* และ *E.coli* ได้ดีโดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถฆ่าเชื้อ *S. flexneri* ได้ดีที่สุดโดยมีค่า MBC เท่ากับ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1)

ส่วนนมผึ้งที่ความเข้มข้นของสารละลาย 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถนมผึ้งสามารถฆ่าเชื้อ *Shi. flexneri*, *K. Pneumonia* และ *Ent. aerogenes* ได้ดีที่สุดโดยมีค่า MBC เท่ากับ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1)

สารผสมของฟ้าทะลายโจรและโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 31.25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Ps. aeruginosa* ได้ดีที่สุด สารผสมของฟ้าทะลายโจรและนมผึ้งสามารถยับยั้งเชื้อ *Ps. aeruginosa* และ *E. coli* ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 31.25 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารผสมของโพรพอลิส และนมผึ้ง สารผสมของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร โพรพอลิส และนมผึ้ง สามารถยับยั้งเชื้อทุกชนิดไม่แตกต่างกันโดยสามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ความเข้มข้น 62.5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2)



ตารางที่ 1 การทดสอบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคระบบทางเดินอาหารโดยวิธี Broth dilution ของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร สารสกัดโพรพอลิส และนมผึ้ง

เชื้อทดสอบ	MIC และ MBC (mg/ml)					
	ฟ้าทะลายโจร		โพรพอลิส		นมผึ้ง	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Sal. typhi</i>	31.25	125	250	250	31.25	62.5
<i>Shi. flexneri</i>	62.5	125	31.25	31.25	31.25	31.25
<i>K. pneumonia</i>	62.5	250	125	250	31.25	31.25
<i>Ent. aerogenes.</i>	62.5	125	31.25	62.5	31.25	31.25
<i>P. vulgaris</i>	31.25	125	31.25	125	62.5	125
<i>Ps. aeruginosa</i>	62.5	125	62.5	62.5	31.25	62.5
<i>E. coli</i>	31.25	125	31.25	125	31.25	62.5

ตารางที่ 2 การทดสอบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคระบบทางเดินอาหารโดยวิธี Broth dilution ของสารผสมระหว่างสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร สารสกัดโพรพอลิส และนมผึ้ง

เชื้อทดสอบ	ฟ้าทะลายโจร/โพรพอลิส		ฟ้าทะลายโจร/นมผึ้ง		นมผึ้ง/โพรพอลิส		ฟ้าทะลายโจร / โพรพอลิส / นมผึ้ง	
เชื้อทดสอบ	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Sal. typhi</i>	62.5/25	62.5/25	31.25/12.5	62.5/50	12.5/25	25/50	62.5/25/50	62.5/25/50
<i>Shi. flexneri</i>	62.5/25	62.5/25	31.25/12.5	62.5/50	12.5/25	25/50	62.5/25/50	62.5/25/50
<i>K.pneumonia</i>	62.5/25	62.5/25	31.25/12.5	62.5/50	12.5/25	25/50	62.5/25/50	62.5/25/50
<i>Ent.aerogenes</i>	62.5/25	62.5/25	31.25/12.5	62.5/50	25/50	25/50	62.5/25/50	62.5/25/50
<i>P. vulgaris</i>	62.5/25	62.5/25	31.25/12.5	62.5/50	12.5/25	25/50	62.5/25/50	62.5/25/50
<i>Ps.aeruginosa</i>	31.25/12.5	31.25/12.5	15.6/6.25	31.25/25	12.5/25	25/50	62.5/25/50	62.5/25/50
<i>E.coli</i>	62.5/25	62.5/25	31.25/12.5	31.25/25	25/50	25/50	62.5/25/50	62.5/25/50

เมื่อนำสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร นมผึ้ง และสารสกัดโพรพอลิส มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay พบว่ามีค่า IC₅₀ เท่ากับ 49.17, 19.11 และ 243.23 mg/ml ตามลำดับ เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ trolox กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระได้ค่า IC₅₀ ของ trolox เท่ากับ 0.25 mg/ml

จากนั้นนำค่า IC₅₀ ของสารทดสอบแต่ละชนิดที่ได้มาคำนวณค่าการต้านอนุมูลอิสระเพื่อหาประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร นมผึ้ง และสารสกัดโพรพอลิส มีค่าการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 5.14, 1.03 และ 5.14 TEAC mg/g ของสารสกัด (ตารางที่ 3)

ตาราง 3 ค่า IC₅₀ และค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร สารสกัดโพรพอลิส และนมผึ้ง เมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay mg/g ของสารสกัด

สารทดสอบ	IC ₅₀ (mg/ml)	TEAC (mg/g extract)
ฟ้าทะลายโจร	49.17 ± 6.13	5.14 ± 0.60
โพรพอลิส	19.11 ± 2.47	13.41 ± 2.02
นมผึ้ง	243.23 ± 28.08	1.03 ± 0.13



อภิปรายผลการศึกษา

การทดสอบยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบริเวณระบบทางเดินอาหาร สารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรเมื่อนำมาทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรคบริเวณระบบทางเดินอาหาร พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทุกชนิด โดยจากรายงานการวิจัยอื่นพบว่าสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการท้องเสียได้เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *Vibrio cholerae* ซึ่งสารสำคัญในการออกฤทธิ์ คือ andrographolide และ deoxyandrographolide ส่วนการทดลองทางคลินิกพบว่าเมื่อใช้ฟ้าทะลายโจรในการรักษาอาการท้องเสีย โดยใช้ผงฟ้าทะลายโจรบรรจุแคปซูลขนาด 500 mg ทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 2 วัน รักษาอาการท้องเสียดีกว่า tetracycline (Putiyanun, 2003)

สารสกัดโพรพอลิสสามารถยับยั้งเชื้อทุกชนิด โดยยับยั้ง *Shi. flexneri* ได้ดีที่สุด นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าโพรพอลิสมีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* (Dobrowolsski et al., 1991; Sibel and Semiramis, 2005) โพรพอลิสมีคุณสมบัติในการต้านไวรัส (Amoros et al., 1994) ต้านการอักเสบ (Strehl et al., 1994; Wang et al., 1993) ต้านมะเร็ง (Ikeno et al., 1991; Kimoto et al., 2001; Matsuno, 1995) ต้านเชื้อรา (Murad et al., 2002) โดยพบสารสำคัญ เช่น flavonoids, aromatic acid, diterpenic acid และ phenolic compounds ในโพรพอลิส (Sibel and Semiramis, 2005) ซึ่งสารเหล่านี้จะมีความแตกต่างกันตามชนิดของพืชจึงทำให้โพรพอลิสมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิด ดังนั้นจึงมีการนำโพรพอลิสไปใช้เป็นอาหารเสริม และใช้ในการป้องกันโรค เช่น ต้านปฏิกิริยาการอักเสบ และต้านโรคเบาหวาน

นมผึ้งสามารถยับยั้งเชื้อทุกตัว โดยยับยั้ง *Shi. flexneri*, *K. pneumonia* และ *Ent. aerogenes* ได้ดีที่สุด โดยฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียจะมาจากสาร 2 ชนิดที่พบในนมผึ้ง ได้แก่ 10-hydroxy-2-decenoic acid ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Escherichia coli*, *Micrococcus pyogenes* (Barker et al., 1959) *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*. และสารรอยัลไลซีน (royalisin) ซึ่งเป็นสารประเภทโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียบางชนิด เช่น

Bifidobacterium, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc cremoris*, *Clostridium* และ *Corynebacterium* (Chantawannkul, 2002; Fujiwara et al., 1990) นอกจากนี้นมผึ้งสามารถยับยั้งโรคหัวใจและโรคมะเร็ง (Banskota et al., 2001; Burdock, 1998)

เมื่อนำสารสกัดฟ้าทะลายโจรมาผสมโพรพอลิส สารสกัดฟ้าทะลายโจรผสมนมผึ้ง โพรพอลิสผสมนมผึ้ง สารสกัดฟ้าทะลายโจรผสมกับโพรพอลิสและนมผึ้ง พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดีกว่าการใช้สารทดสอบที่แยกชนิดทดสอบทั้งนี้อาจเนื่องมาจากฤทธิ์ที่เสริมกันของสารเมื่อผสมกัน

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay พบว่า พบว่า โพรพอลิสมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองมาคือ ฟ้าทะลายโจรและนมผึ้ง นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาศักยภาพต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (Rafat et al., 2010) โดยทำการสกัดใบ ลำต้น และผล เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระพบว่าในส่วนของผลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุด 88.13% รองลงมาคือส่วนของใบ 86.87% และส่วนของลำต้น 80.48 % โดยฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของฟ้าทะลายโจรจะมีค่าต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณ phenolic compounds ที่พบในแต่ละส่วนของพืช โดยการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ total contents of phenolics และ anti-free radical พบว่า phenolic compounds มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ (Kamiloglu et al., 2009) นอกจากนี้พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโพรพอลิส และนมผึ้งขึ้นอยู่กับปริมาณ phenolic compound ที่พบ (Buratti et al., 2006)

สรุปผลการศึกษา

การทดสอบยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบริเวณระบบทางเดินอาหาร สารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรเมื่อนำมาทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรคบริเวณระบบทางเดินอาหาร พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทุกชนิด โดยมีค่า MBC ในช่วง 125-250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนโพรพอลิสสามารถยับยั้งเชื้อ *Shi. flexneri* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MBC เท่ากับ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนมผึ้งสามารถยับยั้งเชื้อ *Shi. flexneri*, *K. pneumonia* และ *Ent. aerogenes* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MBC เท่ากับ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารทดสอบมาผสมคือ สารสกัดฟ้าทะลายโจรมาผสมโพรพอลิส สารสกัดฟ้าทะลายโจรผสมนมผึ้ง โพรพอลิสผสมนมผึ้ง และสารสกัดฟ้าทะลายโจรผสมกับโพรพอลิสและนมผึ้ง มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ



แบบที่เรียกว่าการใช้สารทดสอบที่แยกชนิดทดสอบ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay พบว่า โพรพอลิส มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองมาคือ พืชทะเลลายโจรและนมผึ้งโดยมีค่าเท่ากับ 13.41, 5.14 และ 1.03 TEAC mg/g ของสารสกัดตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนวิจัยมหาวิทยาลัย สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัยและบริษัท บีโปรดัคส์ อินดัสตรี ที่ให้ความอนุเคราะห์สารสกัดโพรพอลิส นมผึ้ง สมุนไพรพืชทะเลลายโจร และสนับสนุนทุนในการทำวิจัย

References

- Akouwah GA, Zhari I, Norhayati I, Mariam A. HPLC and HPTLC densitometric determination of Andrographolides and antioxidant potential of *Andrographis paniculata*. *J Food Compos Anal* 2005; 19: 118-126.
- Amoros M, Lurton E, Boustie J, Girre L, Sauvager F, Cormier M.. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methylbut-2-enylcaecate. *J Nat Prod* 1994; 64: 235 - 240.
- Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research- of propolis. *Phytother Res* 2001; 15: 561- 571.
- Barker SA, Foster AB, Lamb DC, Jackman LM.. Biological origin and configuration of 10-Hydroxy-delta 2-decenoic acid. *Nature* 1959; 184: 634.
- Buratti S, Benedetti S, Cosio MS. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. *Talanta* 2006; 71: 1387-1392.
- Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 1998; 36: 347-363.
- Chantawannkul P. Research report: Production of new product, yogurt using honey and royal jelly, Faculty of Science, Chiang Mai University; 2002.
- Dobrowolsski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SAH, Dandiya PC. Antibacterial antifungal antiamebic anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 1991; 35: 77-82.
- Fujiwara S, Imai J, Fujiwara M, Yaeshima T, Kawashima T, Kobayashi K A potent antibacterial protein in royal jelly purification and determination of primary structure of royalisin. *J Biol Chem* 1990; 265(19): 11333-11337.
- Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res* 1999; 25:347-351.
- Kamiloglu O, Ercisli S, Sengul M, Toplu C, Serce S. Total phenolics and antioxidant activity of jujube (*Zizyphus jujube* Mill). Genotypes selected from Turkey. *Afr J Biotechnol* 2009; 8(2): 303-307.
- Kimoto T, Aga M, Hino K, Koya-Miyata S, Yamamoto Y, Micallef MJ.. Apoptosis of human leukemia cells induced by artemisinin C an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer Res* 2001; 21: 221-228
- Kuda T, Tsunekawa M, Goto H, Araki Y. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *J Food Compos Anal* 2005; 18: 623-633.
- Liawruangratha B, Winijkul D, Nathakarnkijkul S, Sirithunyalug B, Piyamongkol S, Putiyanun S. Research report: Determination of Chloramphenicol residue in honey and royal jelly, Chiang Mai University; 2006.
- Matsuno T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. *Z Naturforsch C* 1995; 50: 93-97.
- Murad JM, Calvi SA, Soares AMVC, Bankova V, Sforcin JM. Effect of propolis from Brazil and Bulgaria in fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Ethnopharmacol* 2002; 79: 331-334.
- Putiyanun S. Basic knowledge of Thai traditional medicine: Medicinal plants and traditional medicine, *Andrographis paniculata*, Toul Printing, Chiang Mai; 2003. 408-414.



- Rafat A, Philip K, Muniandy S. Antioxidant potential and content of phenolic compounds in ethanolic extracts of selected parts of *Andrographis paniculata*. *JMPR* 2010 ; 4(3): 197-202.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 1231-1237.
- Sangpreecha P. Study of antioxidant property of *Basella rubra*, Master Thesis in Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University; 2004.
- Sibel S, Semiramis K. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybee in the same region. *J Ethnopharmacol* 2005; 99: 69-73.
- Strehl E, Volpert R, Elstner EF. Biochemical activities of propolis extracts. III. Inhibition of dihydrofolate reductase. *Z Naturforsch C* 1999; 49: 39-43.
- Takeshi N, Reiji, I. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chem* 2004; 8: 181-186.
- Vajragupta O, Boonchoong P, Boonyasat J, Utsintong M., Radical Scavenging agents, P.S Print, Nonthaburi; 2006.
- Wang L, Mineshita S, Ga I, Shigematsu T, Matsuno T. Antiinflammatory effect of propolis. *Jpn Journal of Pharmacol Ther* 1993; 24: 223-224.
- Weecharangsan W, Opanasopit P. An overview of free radicals and in vitro antioxidant activity tests in plant extracts. *SWU J Pharm Sci* 2004; 9 (1): 73-80.