

ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน ด้านออกซิเดชัน และต้านจุลชีพของสารสกัดผักพื้นบ้าน และสมุนไพรอีสาน

Immunomodulating, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Northeastern Thai Edible Plant and Medicinal Plant Extracts

ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา^{1*}, เอกชัย ดำเกลี้ยง², พยุงศักดิ์ สุรินตะ², วสันต์ ดีล้ำ²

Chutinun Prasitpuriprecha^{1*}, Aekachai Damklang², Payoongsak Surintha², Wasun Deelum²

Received: 27 March 2009 Accepted: 6 July 2009

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดด้วยเอทานอลของผักพื้นบ้านจำนวน 4 ชนิด คือ ย่านาง (*Tiliacora triandra*) ตั้ว (*Cratoxylum formosum*) เม็ก (*Kanchanaburi gratum*) แพร (*Polygonum odoratum*) และสมุนไพรอีสาน จำนวน 1 ชนิด คือ สาบเสือ (*Eupatorium odoratum*) การทดสอบฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันทำโดยวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟไซต์จากม้ามหนู ทั้งในสภาวะที่มีตัวกระตุ้น และไม่มีตัวกระตุ้น ด้วยวิธี MTT assay ผลการวิจัยพบว่า เม็ก ตั้ว แพร และย่านาง มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยเม็ก และตั้วมีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวน T- lymphocytes และ B-lymphocytes ที่ความเข้มข้น 12.5 - 50 µg/mL ส่วนแพรและย่านางมีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวน T-lymphocytes ที่ความเข้มข้น 12.5 - 100 µg/mL และ 12.5 - 25 µg/mL ตามลำดับ สำหรับสาบเสือนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยวิธี DPPH พบว่า เม็ก ตั้ว และแพร มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยมีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (EC₅₀) เท่ากับ 8.17±0.17, 9.9±0.14 และ 58.03±1.02 µg/mL ตามลำดับ และการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารต่อจุลชีพทดสอบ 8 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acne*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albican* และ *Aspergillus niger* ด้วยวิธี agar disc diffusion พบว่าสารสกัดทุกชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ส่วน ตั้ว เม็ก แพร และสาบเสือ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *P. acne* และ *P. aeruginosa* โดยสารสกัดเม็กที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพดีที่สุด มีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. acne* และ *P. aeruginosa* เท่ากับ 1.56, 3.13, 1.56 และ 3.13 mg/mL ตามลำดับ

คำสำคัญ: ผักพื้นบ้านอีสาน สมุนไพร ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านจุลชีพ
วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2552; 5(2): 99-107

¹ ป.ร.ด. ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ² นิสิตเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี

¹ Ph.D., Assistant Professor, ² B.Sc. (Pharm) student, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubonratchathani University, Ubonratchathani

* Corresponding author: Chutinun Prasitpuriprecha, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubonratchathani University, Ubonratchathani 34190 E-mail: chutinunpr@yahoo.com

Abstract

The aim of this study was to investigate the immunological, antioxidant and antimicrobial activities of the ethanolic extracts of four Northeastern Thai edible plants; *Tiliacora triandra*, *Cratoxylum formosum*, *Kanchanaburi gratum*, *Polygonum odoratum* and one medicinal plant; *Eupatorium odoratum*. The immunomodulating activity of these extracts was evaluated using mouse splenocyte proliferation by the colorimetric MTT assay. The results showed that *C. formosum*, *K. gratum*, *P. odoratum* and *T. triandra* extracts had immunostimulating activity. *K. gratum* and *C. formosum* extracts could stimulate T- and B-lymphocytes at concentration of 12.5–50 µg/mL. *P. odoratum* and *T. triandra* extracts stimulated only T-lymphocytes at concentration of 12.5–100 µg/mL and 12.5–25 µg/mL, respectively, while *E. odoratum* extract displayed cytotoxic effect. These extracts were also examined for antioxidant activity using the DPPH assay. The ethanolic extracts of *K. gratum*, *C. formosum* and *P. odoratum* exhibited strong antioxidant activity with the EC₅₀ values of 8.17±0.17, 9.9±0.14 and 58.03±1.02 µg/mL, respectively. The antimicrobial activity of these extracts was investigated against the organisms *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Propionibacterium acne*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* by the disc diffusion method. Results showed that all were active against *S. aureus*. Moreover, *C. formosum*, *K. gratum*, *P. odoratum* and *E. odoratum* extracts had some activity against *B. subtilis*, *P. acne* and *P. aeruginosa*. *K. gratum* had the most potent activity with MICs of 1.5625, 3.125, 1.5625 and 3.125 mg/mL against *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. acne* and *P. aeruginosa*, respectively.

Keywords: Northeastern Thai edible plants, medicinal plant, immunomodulating activity, antioxidant activity, antimicrobial activity

IJPS 2009; 5(2): 99-107

บทนำ

โรคติดเชื้อและโรคทางระบบภูมิคุ้มกัน ยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศ ปกติร่างกายจะมีระบบภูมิคุ้มกัน (Immune System) ทำหน้าที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมและเชื้อโรค หากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำงานอย่างสมดุล จะสามารถทำลายเชื้อโรคที่บุกรุกร่างกายให้หมดไป โดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายหรือรบกวนการทำงานของร่างกาย หากระบบภูมิคุ้มกันทำงานบกพร่องจะทำให้ร่างกายอ่อนแอและติดเชื้อได้ง่าย แนวทางในการรักษาใช้หลักการปรับภูมิคุ้มกัน (Immunomodulation) (Masih, 2000) ทำโดยใช้สารปรับภูมิคุ้มกัน (Immunomodulators) รักษาโรคที่เกิดจากความผิดปกติทางภูมิคุ้มกัน เช่น โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง โรคติดเชื้อ มะเร็ง เป็นต้น (Patwardhan et al., 1990) สารปรับภูมิคุ้มกันที่ใช้ในปัจจุบัน เป็นสารเคมีที่ได้จากการสังเคราะห์ หรือกึ่งสังเคราะห์ จึงมีราคาแพง และก่อให้เกิดอาการอันไม่พึงประสงค์ (Daisio and LoBuglio, 1996)

เนื่องจากร่างกายได้รับอนุมูลอิสระจากสิ่งแวดล้อม เช่น รังสี คาร์บอนพรี สารเคมี มลพิษในอากาศ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว ยาบางชนิด นอกจากนี้ยังเกิดจากกระบวนการต่างๆ ภายในร่างกายได้ เช่น การเผาผลาญอาหาร และการหายใจ ปกติร่างกายมีระบบกำจัดอนุมูลอิสระในรูปของเอนไซม์ เช่น Catalase, Glutathione peroxidase, Superoxide dismutase (Jacob et al., 1999) แต่หากร่างกายได้รับอนุมูลอิสระปริมาณมากเกินไป ร่างกายจะไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ อนุมูลอิสระมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุล จะทำลายสมดุลต่างๆ ในร่างกาย โดยการทำลายองค์ประกอบหลักของเซลล์ เช่น เซลล์เมมเบรน ดีเอ็นเอ และโปรตีน ทำให้เซลล์ตาย หรือไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ เป็นสาเหตุของการเกิดการกลายพันธุ์และมะเร็ง และก่อให้เกิดสภาวะทางพยาธิสภาพในโรคสำคัญบางโรคได้แก่ โรคหัวใจ ไขมันอุดตันในเส้นเลือด ไชข้ออักเสบ ต้อกระจก เป็นต้น (David et al., 2000)

ผักพื้นบ้านและสมุนไพรจำนวนมากมีสรรพคุณที่เป็นประโยชน์ในทางเภสัชวิทยาหลายประการ เช่น ด้านการอักเสบ สมานแผล ฆ่าเชื้อ ด้านออกซิเดชัน ด้านมะเร็ง ด้านการกลายพันธุ์และบำรุงสุขภาพ (กัญจน, 2541) ชาวบ้านในภาคอีสานนำผักพื้นบ้านมาประกอบอาหาร ถือได้ว่าการทดสอบในด้านความปลอดภัยและผลข้างเคียงระดับหนึ่ง ดังนั้นการใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจึงน่าจะมีความปลอดภัยสูงกว่าการใช้สารสังเคราะห์ทางเคมี การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ เป็นแนวทางในการส่งเสริมให้ประชาชนบริโภคผักพื้นบ้านเพื่อให้มีสุขภาพที่ดีอย่างปลอดภัย หรืออาจใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางในการวิจัยเชิงลึกเพื่อพัฒนายาใหม่เป็นประโยชน์ทั้งในวงการแพทย์และวงการอุตสาหกรรมยาต่อไป การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน ด้านออกซิเดชัน และต้านเชื้อจุลินทรีย์ของพืชผักพื้นบ้านและสมุนไพรอีสานบางชนิด

วิธีดำเนินการวิจัย

1. พืชผักพื้นบ้านและสมุนไพรอีสาน ได้แก่ ย่านาง (*Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels.); วงศ์ Menispermaceae ตั้ว (*Cratoxylum formosum* (Jack) Dyer); วงศ์ Guttiferae เม็ก (*Kanchanaburi gratum* (Wight) S.W. Mitra); วงศ์ Hypericaceae แพร (*Polygonum odoratum* Louv.); วงศ์ Polygonaceae และสาบเสือ (*Eupatorium odoratum* Linn.); วงศ์ Asteraceae ซึ่งได้จากตลาดสดวารินเจริญศรี อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี และสาบเสือเก็บจากบริเวณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ในช่วงเดือนมิถุนายน 2551 พืชทั้งหมดได้จัดทำเป็น herbarium และพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชโดยคณาจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

2. การเตรียมสารสกัดพืช

ซึ่งพืชแห้งที่บดละเอียด 150 g หมักด้วย 95% เอทานอล ปริมาตร 200 mL ในภาชนะที่บดแสง เขย่าเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 24 hrs กรองด้วยผ้าขาวบาง และเก็บสารละลายให้แห้งที่อุณหภูมิ 4°C หมักกากที่เหลือด้วยวิธีเดิม นำสารสกัดทั้ง 2 ส่วนมารวมกัน แล้วระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิไม่เกิน 40°C เก็บสารสกัดหยาบ (crude extract)

ให้แห้งที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อไป

3. การทดสอบฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน

3.1 การเตรียมเซลล์ลิมโฟไซต์จากม้ามหนู

ใช้หนูเพศผู้พันธุ์ BALB/c อายุ 6-8 อาทิตย์ น้ำหนักประมาณ 20-25 g จากสำนักสัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยมหิดล ผ่าตัดแยกม้ามหนู แล้วเตรียมให้เป็นเซลล์เดี่ยวในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 completed medium ที่มี 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco, USA) นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 1,000 rpm 10 mins กำจัดเม็ดเลือดแดงด้วย ACK lysing buffer แล้วล้างเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วย completed medium 2 ครั้ง นับจำนวนเซลล์และปรับให้มีปริมาณ 4×10^6 cells/mL และตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยเทคนิคการย้อมด้วย trypan blue (Brousseau et al., 1998)

3.2 การเตรียมสารสกัด

ละลายสารสกัดใน RPMI-1640 completed medium กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.22 μ m เจือจางแบบครึ่งละ 2 เท่าให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 800-12.5 μ g/mL

3.3 การเตรียมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (mitogen)

ละลายสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 2 ชนิด คือ Phytohemagglutinin (PHA) (Gibco, USA) ที่มีความจำเพาะในการกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด T-lymphocytes (Nakamura et al., 1986) และ Pokeweed mitogen (PWM) (Sigma, USA) ที่สามารถกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด B-lymphocytes (Schreck et al., 1982) ใน RPMI-1640 completed medium ให้ได้ความเข้มข้นของ PHA เท่ากับ 1:100 และ PWM เท่ากับ 1 μ g/mL

3.4 การวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟไซต์ ด้วยวิธี MTT assay (Mosmann, 1983)

เติมสารสกัด 50 μ L สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (PHA 1:100 or PWM 1 μ g/mL) 50 μ L และเซลล์ลิมโฟไซต์ 100 μ L ลงใน flat-bottom 96-well plate (TPP, Switzerland) นำเพลทไปบ่มใน 5% CO₂ incubator (Shel lab, 2323, USA) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 hrs เติมสารละลาย MTT (3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ที่มีความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 50 μ L นำไปบ่มต่อเป็นเวลา

5 hrs ปั่นเฟลทด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge (Hettich/ Universal32R, Germany) ที่อุณหภูมิ 25°C ความเร็วรอบ 4,000 rpm 15 mins ดูด supernatant ที่เติมสารละลาย 0.04 N HCl ใน isopropanol ปริมาณ 100 μ L เขย่าเพื่อละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้น วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วย ELISA microplate reader (Biotek, ELX 808, USA) ที่ความยาวคลื่น 562 nm ฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟไซต์ แสดงเป็นค่า Lymphocytes proliferation index (P.I.) เมื่อ control คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากสารสกัดและสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

$$P.I. = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย absorbance ของสารสกัด}}{\text{ค่าเฉลี่ย absorbance ของ control}}$$

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี

DPPH assay (McCune and Johns, 2002)

เตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 1 μ g/mL ผสมสารละลาย 0.1 mM DPPH (Sigma, USA) ใน methanol ปริมาตร 1.6 mL กับ สารสกัดที่ปรับความเข้มข้นให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเท่ากับ 1-100 μ g/mL ปริมาตร 0.4 mL เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง พั่นแสง เป็นเวลา 20 mins วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer (Jenway 6305, USA) ที่ความยาวคลื่น 517 nm ใช้ Ascorbic acid (vitamin C) (Fluka, USA), vitamin E (Sigma, USA) และ Trolox[®] (vitamin E analog) (Sigma, USA) เป็น positive control และใช้ DPPH ใน methanol เป็น blank นำค่า absorbance มาคำนวณร้อยละของการยับยั้งการเกิด DPPH radical (percentage inhibition of the DPPH radical) ซึ่งคำนวณจาก

$$\% \text{inhibition} = [(\text{OD DPPH} - \text{OD sample}) / \text{OD DPPH}] \times 100$$

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัด แสดงเป็นค่า 50% Efficient concentration (EC_{50}) หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้ง DPPH radical ได้ร้อยละ 50 โดยคำนวณจากกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับ ความเข้มข้นของสารสกัด (Godjevac et al., 2004)

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

5.1 จุลชีพทดสอบ

แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25927, *Bacillus subtilis* DMST 6633
แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* DMST 4741, *Salmonella typhimurium* DMST 0562, *Propionibacterium acne* DMST 14916, *Pseudomonas aeruginosa* DMST 27853

เชื้อรา ได้แก่ *Candida albican* DMST 5851, *Aspergillus niger* DMST 21145

เชื้อจุลชีพได้จากกรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

5.2 การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบ

5.2.1 เชื้อแบคทีเรีย

เพาะเชื้อแบคทีเรียบน Mueller Hinton agar (MHA) (Difco, USA) ที่อุณหภูมิ 37°C 24 hrs ยกเว้น *P. acne* เพาะเลี้ยงใน Thioglycollate agar (Difco, USA) สภาวะปราศจากออกซิเจนโดยใช้ anaerobic jar (Oxoid, UK) จากนั้นถ่ายเชื้อลงบน Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 hrs ปรับเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc Farland No.0.5 ที่ความยาวคลื่น 625 nm

5.2.2 เชื้อรา

เพาะเชื้อราบน Sabouraud dextrose agar (SDA) (Difco, USA) ที่อุณหภูมิห้อง 5-10 วัน จนถึงระยะสปอร์ เต็ม 0.9% sterile normal saline 5 mL เพื่อล้างเชื้อ แยกเอาเส้นใยออก กรองผ่านสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับเชื้อราให้มีความเข้มข้นเท่ากับ สารละลายมาตรฐาน Mc Farland No. 0.5 ที่ความยาวคลื่น 625 nm

5.3 ยาปฏิชีวนะมาตรฐาน

Tetracycline 30 μ g (Oxoid, UK), Ampicillin 10 μ g (Oxoid, UK), Amphotericin B 100 μ g (Bristol-Myers Squibb, France)

5.4 การเตรียมสารสกัด

ละลายสารสกัดด้วย 95% เอทานอล ให้มีความเข้มข้น 50 μ g/mL กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 μ m บีบส่วนสกัดปริมาตร 50 μ L ลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm ปลดปล่อยไว้ให้แห้ง แล้วจึงนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ ด้วยวิธี agar disc diffusion

5.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี agar disc diffusion method (Jorgensen et al., 1999)

ใช้สำลีพันก้านไม้ปราศจากเชื้อจุ่มในจุลินทรีย์ทดสอบ ป้ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA สำหรับเชื้อแบคทีเรีย หรือ อาหารเลี้ยงเชื้อ SDA สำหรับเชื้อรา วาง disc ของสารสกัดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มเพาะ โดยเชื้อแบคทีเรียบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C 24 hrs ส่วนเชื้อราบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 25°C 48 hrs อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณสีที่เกิดขึ้น ซึ่งต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 7 mm จึงถือว่ามียุทธิต้านจุลชีพ การทดสอบนี้มียาปฏิชีวนะมาตรฐานเป็น positive control และตัวทำลายของสารสกัดเป็น negative control

5.6 การหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) และ Minimal bactericidal concentration (MBC) ด้วยวิธี Microplate broth dilution assay

นำสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพจากข้อ 5.5 ไปหาค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อชนิดนั้น โดยปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB สำหรับเชื้อแบคทีเรีย หรือ SDB สำหรับเชื้อรา ลงใน microplate หลุมละ 95 μ L เติมสารสกัดที่เตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.098, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.50, 25.00 และ 50.00 μ g/mL ลงในเพลท หลุมละ 100 μ L ปิเปตเชื้อในข้อ 5.2 ลงในเพลท หลุมละ 5 μ L เขย่าด้วยเครื่อง plate shaker ที่ 300 rpm 20 sec นำไปบ่มเพาะเชื้อ นำไปบ่มเพาะเชื้อโดยเชื้อแบคทีเรียบ่มเพาะที่ 37°C เป็นเวลา 24 hrs สำหรับเชื้อราบ่มเพาะที่ 25°C 48 hrs อ่านผลหลุมแรกที่ไม่ใสแสดงเป็นค่า Minimal inhibition concentration (MIC)

ปิเปตสารละลายจากหลุมที่ใสทุกหลุมปริมาตร 5 μ L ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) (Merck, USA) และ streak นำไปบ่มเพาะ อ่านผล หากมีเชื้อขึ้นน้อยกว่า 5 colonies ถือว่าความเข้มข้นนั้นสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้เป็นค่า Minimal bactericidal concentration (MBC)

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

แสดงผลเป็นค่า mean+SEM และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ ANOVA ค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการศึกษาวิจัย

1. สารสกัดพืชผักพื้นบ้านและสมุนไพร

ผลการสกัดผักพื้นบ้านและสมุนไพร จำนวน 5 ชนิดด้วยเอทานอล ได้ %yield ดังตารางที่ 1

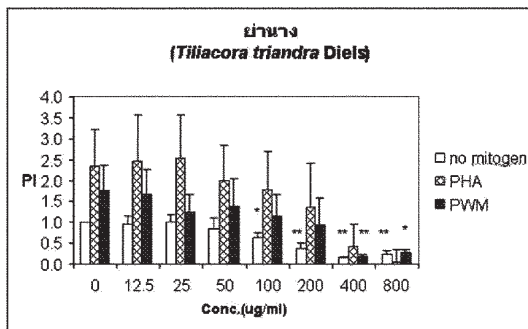
2. ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน

ผลของสารสกัดผักพื้นบ้านและสมุนไพรต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟไซต์ในสภาวะที่มีตัวกระตุ้นและไม่มีตัวกระตุ้น แสดงในรูปที่ 1-5 สารสกัดย่านางในสภาวะที่มี PHA เป็นตัวกระตุ้น ค่า Proliferation index (PI) จะเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ความเข้มข้น 12.5-25.0 μ g/mL แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในสภาวะที่ไม่มีตัวกระตุ้นและสภาวะที่มี PWM เป็นตัวกระตุ้น ค่า PI ลดลงอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ความเข้มข้น 100-800 μ g/mL (รูปที่ 1) สารสกัดตำลึงในสภาวะที่ไม่มีตัวกระตุ้นและสภาวะที่มี PHA เป็นตัวกระตุ้น ค่า PI เพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้น 12.5-25.0 μ g/mL แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้น ค่า PI ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 2) สารสกัดแมกในสภาวะที่ไม่มีตัวกระตุ้น และสภาวะที่มี PHA และ PWM เป็นตัวกระตุ้น ค่า PI เพิ่มขึ้นตั้งแต่ความเข้มข้น 12.5-50 μ g/mL แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้น ค่า PI จะลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3) สารสกัดแพวในสภาวะที่ไม่มีตัวกระตุ้น และสภาวะที่มี PHA เป็นตัวกระตุ้น ค่า PI เพิ่มขึ้นตั้งแต่ความเข้มข้น 12.5-100 μ g/mL แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้น ค่า PI จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4) ส่วนสารสกัดสาบเสือทั้งในสภาวะที่ไม่มีตัวกระตุ้น และมีตัวกระตุ้น ค่า PI จะลดลง โดยค่า PI ลดลงตั้งแต่ความเข้มข้น 50-800 μ g/mL อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5)

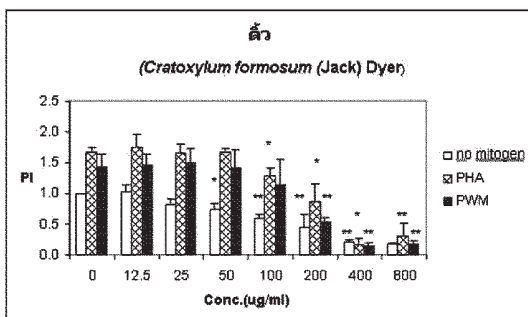
ตารางที่ 1 สารสกัดด้วยเอทานอลของผักพื้นบ้านและสมุนไพรอีสาน

พืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	ส่วนที่ใช้	% yield*
ย่านาง	<i>Tiliacora triandra</i> (Colebr.)Diels	Menispermaceae	ใบ และ ยอด	3.87
ตำลึง	<i>Cratoxylum formosum</i> (Jack)Dyer	Guttiferae	ใบ และ ยอด	7.42
เม็ก	<i>Kanchanaburi gratum</i> (Wight) S.W.Mitra	Hypericaceae	ใบ และ ยอด	5.33
แพว	<i>Polygonum odoratum</i> Louv.	Polygonaceae	ใบ และ ยอด	2.75
สาบเสือ	<i>Eupatorium odoratum</i> Linn.	Asteraceae	ใบ และ ยอด	2.94

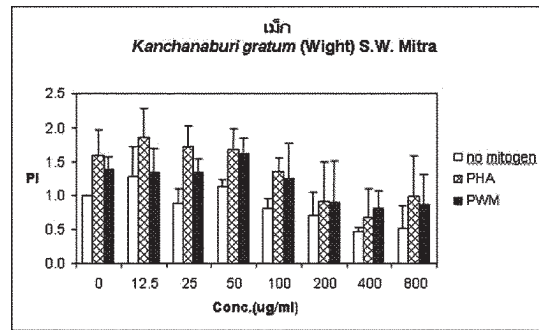
*คำนวณจากน้ำหนักของสารสกัดแห้งที่ได้เทียบกับน้ำหนักของสมุนไพรแห้ง (%w/w)



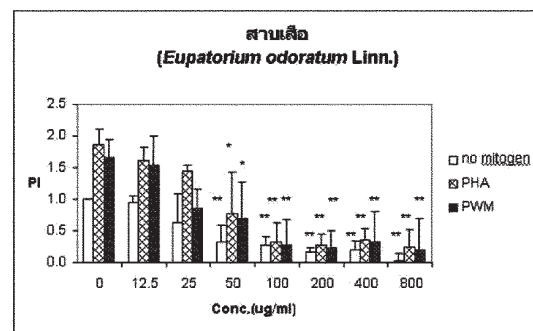
รูปที่ 1 ผลของสารสกัดย่านางต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟซัยท์ เมื่อมีสารกระตุ้น (PHA, PWM) และไม่มีสารกระตุ้น ด้วยวิธี MTT assay (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control)



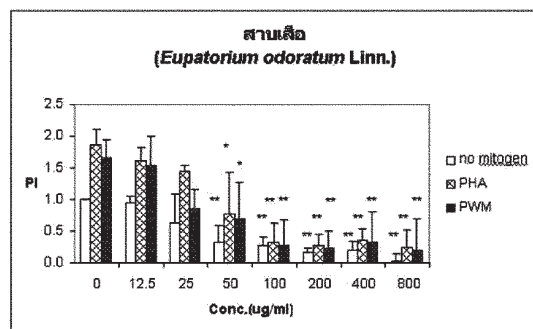
รูปที่ 2 ผลของสารสกัดตำลึงต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟซัยท์ เมื่อมีสารกระตุ้น (PHA, PWM) และไม่มีสารกระตุ้น ด้วยวิธี MTT assay (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control)



รูปที่ 3 ผลของสารสกัดเม็กต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟซัยท์ เมื่อมีสารกระตุ้น (PHA, PWM) และไม่มีสารกระตุ้น ด้วยวิธี MTT



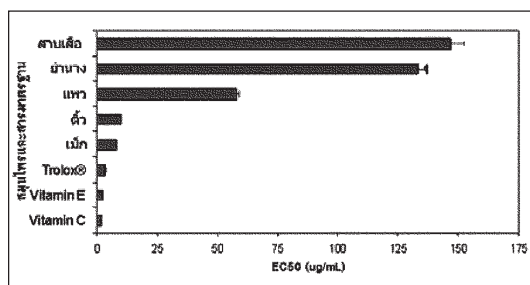
รูปที่ 4 ผลของสารสกัดแพวต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟซัยท์ เมื่อมีสารกระตุ้น (PHA, PWM) และไม่มีสารกระตุ้น ด้วยวิธี MTT assay (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control)



รูปที่ 5 ผลของสารสกัดสาบเสือต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟซัยท์ เมื่อมีสารกระตุ้น (PHA, PWM) และไม่มีสารกระตุ้น ด้วยวิธี MTT assay (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control)

3.ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดผักพื้นบ้านและสมุนไพรด้วยวิธี DPPH assay เรียงจากมากไปหาน้อยคือ เม็ก, ตำ, แพร, ย่านาง และ สาบเสือ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 8.17 ± 0.17 , 9.9 ± 0.14 , 58.03 ± 1.02 , 133.45 ± 2.90 และ 147 ± 6.80 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ค่า EC_{50} ของสารสกัดผักพื้นบ้านและสมุนไพร และสารมาตรฐานด้วยวิธี DPPH assay ($\mu\text{g/mL}$)

4.ฤทธิ์ต้านจุลชีพ

ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดพืชผักพื้นบ้านและสมุนไพรต่อเชื้อ *S.aureus*, *B.subtilis*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. acne*, *P. aeruginosa*, *C.albican* และ *A. niger* ด้วยวิธี agar disc diffusion แสดงในตารางที่ 2 และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดพืชผักพื้นบ้านและสมุนไพร ด้วยวิธี agar disc diffusion

สารสกัด	เชื้อจุลชีพ							
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. acne</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albican</i>	<i>A. niger</i>
ย่านาง	++	-	-	-	-	-	-	-
ตำ	++	+	-	-	++	+	-	-
เม็ก	+++	++	-	-	+++	++	-	-
แพร	+	+	-	-	++	+	-	-
สาบเสือ	+++	+++	-	-	++	++	-	-

หมายเหตุ: -, inhibition zone 0-6.99 mm, +; inhibition zone 7-9.99 mm
 ++; inhibition zone 10-14.99 mm, +++; inhibition zone ≥ 15 mm

ตารางที่ 3 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดพืชผักพื้นบ้านและสมุนไพร (mg/mL)

สารสกัด (mg/mL)	<i>S. aureus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>P. acnes</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
ย่านาง	25	50	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ตำ	12.5	25	12.5	25	12.5	25	12.5	25
เม็ก	1.563	12.5	3.125	12.5	1.563	6.25	3.125	12.5
แพร	25	50	50	>50	50	>50	50	>50
สาบเสือ	25	50	25	50	25	50	25	50

หมายเหตุ NT หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านออกซิเดชันและต้านจุลชีพของสารสกัดด้วยเอทานอลของผักพื้นบ้านและสมุนไพรอีสาน จำนวน 5 ชนิด คือ ตำ, เม็ก, ย่านาง, แพร และสาบเสือ พบว่า ตำและเม็กมีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ T- และ B-lymphocytes ที่ความเข้มข้นต่ำๆ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของศิริพร (2547) และพัชราภรณ์ (2550) แต่ทั้งเม็กและตำมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงมาก (EC_{50} เท่ากับ 8.17 ± 0.17 , 9.9 ± 0.14 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ) จิรญา และคณะ (2550) ได้ศึกษาวิจัยผลของผักเม็กต่อระบบต้านออกซิเดชันในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินอี พบว่าการดื่มตำตำเม็กกระยะสั้น มีผลเพิ่ม antioxidant ในพลาสมาได้ นอกจากนี้เม็กและตำมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. acne* และ *P. aeruginosa* ซึ่งอภิญญา (2547) ก็พบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดเอทานอลของตำ โดยปกติชาวบ้านนิยมบริโภคตำและเม็กเป็นอาหาร และใช้เป็นยาบำรุงร่างกาย บรรเทาอาการอักเสบของกล้ามเนื้อและข้อ (นันทวัน, 2547)

แพรและย่านาง มีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเฉพาะ T-lymphocytes ที่ความเข้มข้นต่ำๆ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยแพรมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. acne* และ *P. aeruginosa* ซึ่งหมอยาพื้นบ้านอีสานใช้น้ำตำจากแพรทำความสะอาดแผลเพื่อฆ่าเชื้อ (วงศ์สถิตย์, 2538) และใช้เป็นยาบำรุงเจริญอาหาร (นันทวัน, 2547) ในขณะที่ย่านางไม่พบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แต่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพเฉพาะ

S. aureus หมอยาพื้นบ้านใช้ยานางสำหรับแก้ไข้ (นันทวัน, 2547) มีรายงานการวิจัยพบว่าสารสกัดรากของยานางมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมในหลอดทดลอง (Pavanand et al., 1989)

ส่วนสบเสื่อ มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง ไม่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แต่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. acne* และ *P. aeruginosa* มีรายงานการวิจัยว่าสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และ acetone ของสบเสื่อมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *S. subtilis* (วงศ์สถิต, 2538) และมีฤทธิ์ในการห้ามเลือด (Wongkrajang et al., 1990) หมอยาพื้นบ้านใช้สบเสื่อในการรักษาแผลสด สมานแผล และรักษาแผลฝีหนอง (นันทวัน, 2547)

ผลการวิจัยสรุปได้ว่า เม็ก ตั้ว และแพว มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านจุลชีพ มีศักยภาพในการส่งเสริมการบริโภคในระดับครัวเรือนเพื่อเป็นอาหารเสริมสุขภาพเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะแนะนำให้ประชาชนนำไปบริโภค เพื่อป้องกันโรคที่อาจเกิดจากอนุมูลอิสระ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคไขข้ออักเสบ โรคไต โรคหลอดเลือด โรคไขข้ออักเสบ ต้อกระจก และโรคติดเชื้อต่างๆ (David et al., 2000) โดยเฉพาะเม็กที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพดีที่สุด (ค่า MIC และค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. acne* และ *P. aeruginosa* ต่ำที่สุด) จึงมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นยาต้านจุลชีพตัวใหม่ได้ ส่วนสบเสื่อแม้จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง แต่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพที่ให้ผลดี อาจนำมาพัฒนาเป็นตำรับยาฆ่าเชื้อสำหรับใช้ภายนอก หรือพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งในอนาคตได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน หมวดอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ 2549–2550

เอกสารอ้างอิง

กัญญา ตีพิเศษ, อร่าม คุ่มกลาง. *ผักพื้นบ้านภาคอีสาน*. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2541.
จิรัญญา บริมาศ, วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์, ยุพา คู่คงวิริยพันธุ์, และคณะ. *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ฉบับบัณฑิตศึกษา* 2550; 7(2)

นันทวัน บุญยะประภัตร, อรณัฐ โชคชัยเจริญพร. *สมุนไพรพื้นบ้าน*. กรุงเทพมหานคร: บริษัท ประชาชน จำกัด; 2547.

พัชรารัตน์ ชูเมฆ, วรวรรณ สายงาม. *การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันจากผักพื้นบ้าน เพื่อเตรียมตัวรับมือต่อสมุนไพร*. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี; 2550.

วงศ์สถิตย์ นิ้วกุล, พร้อมจิต ศรีลัมพ์, วิจิต เปาณิล และคณะ. *สยามเภสัชวิทยุ*. กรุงเทพฯ: บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์ พับลิชชิ่ง จำกัด; 2538.

วุฒิ วุฒิชรรณเวช. *สารานุกรมสมุนไพรไทยรวมหลักเภสัชกรรมไทย*. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ โอเดียนสโตร์; 2540.

ศิริพร พลแสน, อภินันท์ คำเพชรดี. *การศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของน้ำหมักชีวภาพจากตัวด้วยวิธีการวัดการเพิ่มจำนวนของ T-Lymphocytes*. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี; 2547.

อภิญา ถีสุงเนิน. *การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำหมักชีวภาพจากพืชผักพื้นบ้านอีกสารบางชนิด*. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี; 2547.

Brousseau P, Payette Y, Tryphonas H, et al. *Manual of immunological methods*. CRC press; 1998. 27–28.

David GB, Erik EA, Rohini S. Antioxidant enzyme expression and ROS damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer* 2000; 89: 124–134.

Diasio RB, LoBuglio AF. Immunomodulators: Immunosuppressive agents and Immunos-timulants. In: Goodman and Gilman's, Editors. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. McGraw–Hill: New York; 1996. 1291–1307.

Godjevac D, Vajs V, Menkovic N, Tesevic V, Janackovic P, Milosavljevic S. Flavonoids from flowers of *Cephalaria pastricensis* and their antiradical activity. *J Serb Chem Soc* 2004; 69(11): 883–886.

- Jacob V, Michael A. Nutritional antioxidants: mechanism of action, analyses of activities and medical applications, *Nutrition* 1999; 49: 1–7.
- Jorgensen J, Turnidge J, Washington J. Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion methods. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, Editors. *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. Washington DC: ASM Press; 1999. 1526–1543.
- Masihi N. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. *International Journal Antimicrobial Agents* 2000; 14: 181–191.
- McCune LM, Johns T. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. *J Ethnopharmacol* 2002; 82: 197–205.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65: 55–63.
- Nakamura A, Nagai K, Suzuki S, Ando K, Tamura G. A novel method of screening for immuno-modulating substances, establishment of an assay system and its application to culture broth of microorganisms. *Journal of Antibiotics* 1986; 8: 1148–1154.
- Patwardhan B, Kalbag D, Patki PS, Nagsampagi BA. Search of Immunomodulatory agents: a review. *Indian Drugs* 1990; 28(2): 348–358.
- Pavanand K, Webster HK, Yongvanitchit K, Dechatiwongse T. Antimalarial Activity of *Tiliacora triandra* Diels against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Phytotherapy Research* 1989; 3(5): 215–217.
- Schreck C, Lamberson H, Davey F. Characterization of the B lymphocytes response to pokeweed mitogens. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 1982; 12(6): 455–462.
- Wongkrajang Y, Maungklum S, Peungvicha P, Jaiarj P, Opartkiattikul N. *Eupatorium odoratum* Linn.: An enhancer of hemostasis. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science* 1990; 17: 9–13.