

ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ของสารสกัดมะหาด

คณางค์ รัตนานิคม^{*†}, นิคม ศรีกะชา[†], ยุภาพร ชันนาเลา^{*}

^{*}คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสุขภาพ มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ จังหวัดกาฬสินธุ์ 46000

[†]คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

^{*}ผู้รับผิดชอบบทความ: khakhanang_r@yahoo.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากแก่นมะหาด ที่สกัดโดยวิธีการหมักสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่พบเป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ อยู่บ่อยครั้งในมนุษย์ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% แสดงสมบัติในการยับยั้ง *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321, *Bacillus cereus* TISTR 747, *Bacillus licheniformis* TISTR 1455, *Escherichia coli* TISTR 117, *Staphylococcus aureus* TISTR 746 และ *Vibrio parahaemolyticus* TISTR 1596 โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเท่ากับ 19.89 ± 0.67 , 18.27 ± 0.69 , 14.92 ± 0.98 , 17.06 ± 0.66 , 14.84 ± 0.82 และ 19.00 ± 0.42 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารสกัดมะหาดเมื่อสกัดด้วยเฮกเซนและน้ำกลั่น เมื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ของสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จะมีค่าอยู่ในช่วง 3,125-25,000 ppm ข้อมูลในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดมะหาดจะมีผลอย่างมากต่อฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จะมีสมบัติในการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แต่อาจมีประสิทธิผลการยับยั้งแตกต่างกันออกไปในแต่ละชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

คำสำคัญ : มะหาด, การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย, แบคทีเรียก่อโรค, สารสกัดหยาบ

Antibacterial Activity of *Artocarpus lakoocha* Roxb. Crude Extract towards Common Human Pathogens

Khakhanang Ratananikom^{**}, Nikom Srikacha[†], Yupaporn Khannalao^{*}

^{*}Faculty of Science and Health Technology, Kalasin University, Kalasin 46000, Thailand

[†]Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

[‡]Corresponding author: khakhanang_r@yahoo.com

Abstract

This study aimed to investigate the antibacterial efficacy of *Artocarpus lakoocha* Roxb., heartwood crude extract by maceration, in different solvents against common human pathogens. It was found that *A. lakoocha* Roxb. crude extract in 95% ethanol showed strong antibacterial activity. The inhibition zone diameter towards *Acromonas hydrophila* TISTR 1321, *Bacillus cereus* TISTR 747, *Bacillus licheniformis* TISTR 1455, *Escherichia coli* TISTR 117, *Staphylococcus aureus* TISTR 746 and *Vibrio parahaemolyticus* TISTR 1596 were 19.89 ± 0.67 , 18.27 ± 0.69 , 14.92 ± 0.98 , 17.06 ± 0.66 , 14.84 ± 0.82 and 19.00 ± 0.42 millimeters, respectively. Yet, the antibacterial activity was not observed when using hexane and water as a solvent. Minimum Bactericidal Concentration, MBC of *A. lakoocha* Roxb. crude extract in 95% ethanol was in the range of 3,125–25,000 ppm. This data indicated that the extraction solvent plays a vital role in the antibacterial activity of *A. lakoocha* Roxb. crude extract. *A. lakoocha* Roxb. crude extract in 95% ethanol was able to destroy both gram positive and negative bacteria, but the efficacy might be different among pathogenic bacteria.

Key words: *Artocarpus lakoocha* Roxb., antibacterial activity, pathogenic bacterial, crude extract

บทนำ

ถึงแม้ว่าการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียจะมีประสิทธิผลสูงและเป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่ถูกต้องและเกินความจำเป็นมักจะนำมาซึ่งผลข้างเคียงเสมอ ทั้งในเรื่องปัญหาของการดกตัวของสารเคมีในร่างกาย รวมไปถึงการดื้อยาของแบคทีเรีย ซึ่งปัญหาเรื่องการดื้อยาของแบคทีเรียนี้ได้ทวีความรุนแรงและเป็นหนึ่งในปัญหาที่สำคัญทางการแพทย์ในปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากทำให้การรักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียเป็นไปได้ยากมากกว่าเดิมนำมาซึ่งการสูญเสียเงินในการรักษาที่มากขึ้น หรือใน

กรณีที่น่าเศร้าไปกว่านั้นก็คือ เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในที่สุด

ด้วยสาเหตุนี้เองที่ในปัจจุบันมีความพยายามในการศึกษาถึงแหล่งของสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคโดยเฉพาะจากพืชชนิดต่าง ๆ ทั้งนี้เนื่องจากพืชจะสามารถผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) เช่น tannins, saponins, flavonoids, alkaloids เป็นต้น นอกเหนือจากสารปฐมภูมิ (primary metabolite) ที่ใช้ในการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งสารเหล่านี้เองที่พบว่ามีสรรพคุณในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้^[1] ซึ่งข้อดีที่เด่นชัดของการใช้พืชในการควบคุมแบคทีเรียก่อ

โรคเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะ คือ มีความปลอดภัยสูงนำมาซึ่งการลดปัญหาเรื่องสารตกค้างต่าง ๆ ในร่างกายมนุษย์^[2] แต่อย่างไรก็ตามพบว่าพืชแต่ละชนิดจะมีประสิทธิผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกัน^[3]

มะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) เป็นพืชที่สามารถพบได้ทั่วไปหลายประเทศในทวีปเอเชีย เช่น อินเดีย บังกลาเทศ ภูฏาน เนปาล พม่า ศรีลังกา มาเลเซีย สิงคโปร์ เวียดนาม กัมพูชา ลาว และไทย โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามะหาดมีสรรพคุณหลายด้านทั้งด้านความสวยงามและเป็นยารักษาโรค โดยผลของมะหาดจะมีวิตามินหลายชนิด เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ และยังประกอบไปด้วยธาตุเหล็ก ทองแดง แมกนีเซียม และสังกะสี^[4] เมื่อทำการวิเคราะห์สารสกัดบริสุทธิ์ของมะหาดพบว่า มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ resveratrol ซึ่งมีคุณสมบัติต้านแบคทีเรียและเชื้อรา^[5] และ oxyresveratrol ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินที่เป็นสาเหตุของสีผิวหมองคล้ำ^[6] จากการศึกษาของ Teanpaisan และคณะ^[7] พบว่าสารสกัดมะหาดสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในช่องปาก คือ *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* และ *Tannerella forsythia* ได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kumar และคณะ^[8] ที่พบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas aeruginosa* ของสารสกัดจากเปลือกผลมะหาด ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดมะหาดมาบ้างก่อนหน้านี้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่ายังมีแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่ยังคงพบเป็นปัญหาในการก่อโรคแก่

มนุษย์ที่ยังไม่ได้รับการศึกษา ทั้งในกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการอักเสบติดเชื้อ แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษ และแบคทีเรียที่เป็นกลุ่มเชื้อฉวยโอกาส อีกทั้งยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับวิธีการสกัดหรือตัวทำละลายที่เหมาะสมในการใช้สกัดสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมะหาดออกมา ซึ่งข้อมูลดังกล่าวถือเป็นข้อมูลสำคัญเพื่อพัฒนาการใช้ประโยชน์ของมะหาดในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่อไป การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงประสิทธิผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ของสารสกัดมะหาดที่สกัดจากตัวทำละลายแต่ละชนิด

ระเบียบวิธีศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบในการศึกษานี้มี 10 ชนิด ประกอบด้วย *Escherichia coli* TISTR 117, *Salmonella typhimurium* TISTR 1469, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287, *Staphylococcus aureus* TISTR 746, *Bacillus licheniformis* TISTR 1455, *Proteus mirabilis* TISTR 100, *Bacillus cereus* TISTR 747 และ *Enterococcus faecalis* TISTR 927 โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient agar (NA) และ NA + 1% NaCl สำหรับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 และ *Vibrio parahaemolyticus* TISTR 1596 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดมะหาดต่อไป ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้รับความอนุเคราะห์มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

การเตรียมพืชและสารสกัดมะหาด

งานวิจัยนี้ใช้แก่นมะหาดจากบริษัทสมุนไพรรพพรจันทร์ จำกัด โดยแก่นมะหาดถูกนำมาล้างทำความสะอาด อบแห้งและบดให้ละเอียด หลังจากนั้นทำการเตรียมสารสกัดมะหาด 3 แบบ โดยการสกัดแก่นมะหาดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือน้ำกลั่น เอทานอล 95% และ เฮกเซน ในอัตราส่วน 1:4 นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการสกัดแก่นมะหาดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดจำนวน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองสารสกัดมะหาดที่ได้ด้วยผ้าขาวบางและทำการระเหยตัวทำละลายที่ใช้สกัดด้วยเครื่อง rotary evaporator บันทึกลักษณะทางกายภาพของสารสกัดที่ได้และคำนวณร้อยละของสารที่สกัดได้ [ร้อยละของสารสกัด = (น้ำหนักของสารสกัด/น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง) x 100] เก็บสารสกัดมะหาดที่ได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดมะหาดต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิด โดยวิธี agar-disc diffusion (ดัดแปลงจาก Ratananikom, 2014)^[9] เชื้อเชื้อทดสอบ 1 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของจำนวนเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU/ml จากนั้นดูดเชื้อทดสอบ 100 ไมโครลิตรมาเกลี่ยให้ทั่วหน้าอาหารแข็ง NA ทำการวางกระดาษวงกลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไปบนอาหารแข็ง เตรียมสารสกัดมะหาดให้มีความเข้มข้น 500,000

ppm โดยละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นหยดสารสกัดมะหาดลงบนกระดาษทรงกลม โดยให้แต่ละจุดมีปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งที่เกิดขึ้นด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ (vernier calipers) สำหรับชุดควบคุมเชิงบวกและลบใช้ ยาปฏิชีวนะ amoxicillin (30 ไมโครกรัม/disc) และ DMSO ตามลำดับ โดยทำการทดสอบเป็นจำนวน 5 ซ้ำ

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำที่สุด

การหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) ของสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ทำโดยใช้วิธี broth dilution assay คือ เตรียมสารสกัดมะหาดด้วยการเจือจางครึ่งละ 2 เท่า (two-fold dilution) ให้ได้สารสกัดมะหาดเข้มข้นในช่วง 781-25,000 ppm หลังจากนั้นเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU/ml เติมน้ำเชื้อลงในหลอดทดลองหลอดละ 100 ไมโครลิตร ผสมเชื้อทดสอบและสารสกัดมะหาดให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นให้สังเกตความขุ่นหรือใสของอาหารโดยค่า MIC คือ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้โดยเมื่อสังเกตอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะใสแสดงถึงไม่มีการเจริญของเชื้อ และทำการดูเชื้อในแต่ละหลอดมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง NA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง NA ต่อไป ในส่วนของค่า MBC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลาย

เชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งจะแสดงผลโดยจะไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง NA ทำการทดสอบเพื่อหาค่า MIC และ MBC เป็นจำนวน 3 ครั้ง

ผลการศึกษา

1. ผลการเตรียมสารสกัดมะหาด

จากการสกัดผงแก่นมะหาดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด คือ น้ำกลั่น, เอทานอล 95% และเฮกเซน ในอัตราส่วน 1:4 พบว่าสารสกัดมะหาดจะมีลักษณะทางกายภาพเป็นของแข็งสีเหลืองถึงน้ำตาล และมีร้อยละของสารสกัดอยู่ในช่วง 0.08-0.83 โดยพบว่าการสกัดมะหาดด้วยเอทานอล 95% จะทำให้ได้สารสกัดมะหาดปริมาณมากที่สุด รองลงมา คือ การใช้ น้ำกลั่นและเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดมะหาดด้วยวิธี agar-disc diffusion

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งของสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดต่อเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ (ตารางที่ 2) พบว่าสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้งแกรมบวกและแกรมลบบนอาหารแข็ง ขณะที่ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้ง

การเจริญของเชื้อทดสอบของสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเฮกเซน แต่เมื่อพิจารณาถึงขนาดโซนการยับยั้งของเชื้อทดสอบแต่ละชนิดของสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบจะแตกต่างกันออกไปตามแต่ละชนิดของเชื้อ โดยสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จะแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* TISTR 1321 ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดโซนการยับยั้งเท่ากับ 19.89 ± 0.67 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับการยับยั้งของเชื้อ *V. parahaemolyticus* TISTR 1596 ซึ่งมีขนาดโซนการยับยั้งเท่ากับ 19.00 ± 0.42 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดมะหาดยังแสดงฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ *B. cereus* TISTR 747, *E. coli* TISTR 117, *B. licheniformis* TISTR 1455 และ *S. aureus* TISTR 746 ได้ โดยมีขนาดโซนการยับยั้งเท่ากับ 18.27 ± 0.69 , 17.06 ± 0.66 , 14.92 ± 0.98 และ 14.84 ± 0.82 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จะไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *E. faecalis* TISTR 927, *P. mirabilis* TISTR 100, *P. aeruginosa* TISTR 1287 และ *S. Typhimurium* TISTR 1469 บนอาหารแข็ง และเมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ของการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% กับยาปฏิชีวนะ amoxicillin (30 µg/disc) พบว่าสาร

ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดมะหาดและร้อยละของสารสกัด

สารสกัดมะหาด	ลักษณะทางกายภาพ	ร้อยละของสารสกัด
สกัดด้วยน้ำกลั่น	ของแข็งสีน้ำตาล	0.43
สกัดด้วยเอทานอล 95%	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม	0.83
สกัดด้วยเฮกเซน	ของแข็งสีเหลือง	0.08

ตารางที่ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งของสารสกัดมะหาด จำแนกตามตัวทำละลายแต่ละชนิด

เชื้อทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	สกัดด้วย น้ำกลั่น	สกัดด้วย เอทานอล 95%	สกัดด้วย เฮกเซน	amoxicillin (30 µg/disc)	DMSO
<i>A. hydrophila</i> TISTR 1321	6.00 ± 0.00	19.89 ± 0.67	6.00 ± 0.00	11.50 ± 0.92	6.00 ± 0.00
<i>B. cereus</i> TISTR 747	6.00 ± 0.00	18.27 ± 0.69	6.00 ± 0.00	19.28 ± 0.88	6.00 ± 0.00
<i>B. licheniformis</i> TISTR 1455	6.00 ± 0.00	14.92 ± 0.98	6.00 ± 0.00	18.40 ± 0.70	6.00 ± 0.00
<i>E. coli</i> TISTR 117	6.00 ± 0.00	17.06 ± 0.66	6.00 ± 0.00	21.49 ± 0.64	6.00 ± 0.00
<i>E. faecalis</i> TISTR 927	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	29.51 ± 0.78	6.00 ± 0.00
<i>P. aeruginosa</i> TISTR 1287	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	21.49 ± 0.64	6.00 ± 0.00
<i>P. mirabilis</i> TISTR 100	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	13.36 ± 0.52	6.00 ± 0.00
<i>S. aureus</i> TISTR 746	6.00 ± 0.00	14.84 ± 0.82	6.00 ± 0.00	34.21 ± 0.82	6.00 ± 0.00
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 1469	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	8.29 ± 0.88	6.00 ± 0.00
<i>V. parahaemoliticus</i> TISTR 1596	6.00 ± 0.00	19.00 ± 0.42	6.00 ± 0.00	11.81 ± 0.61	6.00 ± 0.00

สกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% สามารถยับยั้ง *A. hydrophila* TISTR 1321 และ *V. parahaemoliticus* TISTR 1596 ได้ดีกว่ายา amoxicillin

3. ผลการทดสอบหาค่า MIC และ MBC

สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ได้ถูกนำมาประเมินฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบในอาหารเหลว NB โดยวิธี broth dilution assay เพื่อหาค่า MIC และ MBC ในทุกชนิดของเชื้อทดสอบจากการทดลองพบว่าไม่สามารถระบุค่า MIC ของสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ได้ในทุกเชื้อทดสอบเนื่องจากอิทธิพลของสีของสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ซึ่งมีสีน้ำตาลเข้ม ทำให้เมื่อผสมสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% กับเชื้อทดสอบจึงส่งผลทำให้มีสีน้ำตาลเข้ม จึงยากแก่การสังเกตความขุ่นและใสเพื่อระบุค่า MIC อย่างไรก็ตามสามารถทำการทดสอบเพื่อระบุค่า MBC ได้สำหรับทุกเชื้อทดสอบ พบว่าสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย

ตารางที่ 3 ค่า MBC ของสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ต่อเชื้อทดสอบ

เชื้อทดสอบ	MBC (ppm)
<i>A. hydrophila</i> TISTR 1321	3,125
<i>B. cereus</i> TISTR 747	12,500
<i>B. licheniformis</i> TISTR 1455	> 25,000
<i>E. coli</i> TISTR 117	3,125
<i>E. faecalis</i> TISTR 927	6,250
<i>P. aeruginosa</i> TISTR 1287	> 25,000
<i>P. mirabilis</i> TISTR 100	12,500
<i>S. aureus</i> TISTR 746	25,000
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 1469	6,250
<i>V. parahaemoliticus</i> TISTR 1596	> 25,000

เอทานอล 95% มีค่า MBC ที่แตกต่างกันระหว่างเชื้อทดสอบแต่ละชนิด โดยค่า MBC ที่ต่ำที่สุดมีค่าเท่ากับ 3,125 ppm สำหรับเชื้อ *A. hydrophila* TISTR 1321 และ *E. coli* TISTR 117 ส่วนค่า MBC ที่สูงที่สุดคือมากกว่า 25,000 ppm สำหรับเชื้อ *B. licheniformis*

TISTR 1455, *P. aeruginosa* TISTR 1287 และ *V. parahaemolyticus* TISTR 1596 (ตารางที่ 3)

อภิปรายผล

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 10 ชนิด ของสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ พบว่าสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันจะแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่แตกต่างกันแม้ว่าจะใช้เชื้อทดสอบชนิดเดียวกันก็ตามในการทดสอบ ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากอิทธิพลของตัวทำละลายที่ใช้สกัด ซึ่งจะละลายสารสำคัญต่าง ๆ ในมะหาดที่แตกต่างกันออกมา จึงมีผลต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้ กล่าวคือ การที่สารสำคัญในมะหาดจะสามารถละลายในตัวทำละลายใด ๆ ได้นั้น สารสำคัญในมะหาดและตัวทำละลายจะต้องมีคุณสมบัติที่เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกัน ตามกฎ like dissolves like^[10] ดังนั้นเมื่อใช้ตัวทำละลาย คือ น้ำกลั่น เอทานอล 95% และเฮกเซน ซึ่งมีสภาพขั้วที่แตกต่างกัน โดยเรียงลำดับจากมากไปหาน้อย คือ น้ำกลั่น เอทานอล 95% และเฮกเซน ตามลำดับในการสกัดนั้น ก็จะเป็นปัจจัยที่ทำให้ได้กลุ่มของสารออกฤทธิ์จากแก่นมะหาดที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบของสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดมีคุณสมบัติที่ต่างกันอย่างแน่นอน จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้เพื่อสกัดสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียออกมาจากแก่นมะหาด เนื่องจากมีประสิทธิผลการยับยั้งการเจริญสูงสุด ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติความมีขั้วของเอทานอลเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นและเฮกเซนสันนิษฐานได้ว่ากลุ่มของสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติในการต้าน

การเจริญของเชื้อแบคทีเรียในมะหาดนั้นจะเป็นสารที่มีคุณสมบัติทั้งมีขั้ว และอาจเป็นกลุ่มของสารหลายชนิดที่ทำงานร่วมกัน เนื่องจากขั้นตอนในการเตรียมสารสกัดแก่นมะหาดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีการทำบริสุทธิ์สารที่สกัดออกมา ดังนั้นจึงไม่สามารถระบุสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในมะหาดได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้เป็นการรายงานเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากมะหาดต่อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Pandey และ Bhatnagar^[11] ที่ทำการสกัดเปลือกต้นมะหาดด้วยตัวทำละลาย คือ พิโตรเลียมอีเทอร์, คลอโรฟอร์ม และเมทานอล และทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ พบว่ามีเพียงสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเมทานอลเท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารสำคัญในพืชจะมีผลอย่างมากต่อชนิดและปริมาณสารสำคัญที่ออกมา โดยเฉพาะสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย^[12]

เมื่อพิจารณาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. hydrophila* TISTR 1321 และ *V. parahaemolyticus* TISTR 1596 ของสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% บนอาหารแข็ง พบว่าสารสกัดดังกล่าวให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดบนอาหารแข็งดีกว่ายาปฏิชีวนะ amoxicillin ซึ่งถูกใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวกของการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตามพบว่ายา amoxicillin เป็นยาปฏิชีวนะที่มีจุดเด่นในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แต่เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ดังนั้นการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบจึงเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ต้องพิจารณา เนื่องจากหากมี

การใช้ยาปฏิชีวนะชนิดอื่นที่มีจุดเด่นในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น gentamicin เป็นตัวเปรียบเทียบ อาจส่งผลให้ผลการทดลองที่ได้ อาจมีความแตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar-disc diffusion และ broth dilution assay พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างผลการทดลองที่ได้จากทั้ง 2 วิธี คือ เมื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* TISTR 927, *S. Typhimurium* TISTR 1469, *P. mirabilis* TISTR 100 และ *P. aeruginosa* TISTR 1287 บนอาหารแข็ง NA ของสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จะไม่พบโซนการยับยั้งที่เกิดขึ้น แต่เมื่อทำการทดลองเพื่อหาค่า MBC ในอาหารเหลว NB โดยวิธี broth dilution assay พบว่าสามารถหาค่า MBC ได้เท่ากับ 6,250, 6,250, 12,500 และมากกว่า 25,000 ppm ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาก็แตกต่างกันระหว่าง 2 วิธีนี้ ได้มีความคล้ายคลึงกับรายงานของ Yousef และ Tawil^[13] เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ อย่างไรก็ตามพบว่าการศึกษาฤทธิ์หรือสมบัติในการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดต่าง ๆ นิยมที่จะใช้วิธี broth dilution assay มากกว่าเนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ค่อนข้างแม่นยำ ส่วนวิธีการทดสอบโดย agar-disc diffusion มักนิยมใช้ในการคัดเลือกสารสกัดที่น่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น ทั้งนี้เนื่องจากวิธี agar-disc diffusion จะมีจุดเด่นเรื่องของการใช้สารสกัดปริมาณน้อยในการทดสอบ^[14]

อีกประเด็นที่น่าสนใจเมื่อพิจารณาถึงเรื่องของประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคชนิด

ต่าง ๆ ของสารสกัดมะหาดที่ได้จากการทดลองนี้ พบว่าสารสกัดแก่นมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* TISTR 1321 และ *E. coli* TISTR 117 ดังค่า MBC (ตารางที่ 3) ในขณะที่ผลของการศึกษาของ Kumar และคณะ^[8] ระบุว่าสารสกัดผลมะหาดด้วยเมทานอลจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* สูงสุด อย่างไรก็ตามพบว่าความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจจะมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ ส่วนของมะหาดที่นำมาศึกษาในแต่ละการทดลองอาจมีความแตกต่างกัน โดยพบว่าพืชในแต่ละส่วนจะมีการสะสมชนิดและปริมาณของสารสำคัญที่ไม่เหมือนกัน ส่งผลให้สารสกัดของพืชในแต่ละส่วนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกัน และนอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์อาจมีความแตกต่างกันด้วย จึงส่งผลให้ผลที่ได้แตกต่างกันออกไป^[2,3]

ข้อสรุป

งานวิจัยนี้ได้รายงานฤทธิ์ของการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดมะหาดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด โดยพบว่าสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จะแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบสูงที่สุดในขณะที่การสกัดมะหาดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ คือ น้ำกลั่นและเฮกเซนจะไม่แสดงคุณสมบัติดังกล่าว และยังพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไปตามแต่ละชนิดของเชื้อทดสอบ ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียออกมาจากมะหาดและยังสะท้อนให้เห็นว่ามะหาดเป็นพืชที่มีศักยภาพในการใช้ศึกษาพัฒนาเพื่อใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อ

แบบที่เรียบง่าย ๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณรายจ่าย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และมหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์

References

1. Krishnaiah D, Devi T, Bono A, Sarbatly R. Studies on phytochemical constituents of six Malasian medicinal plants. *Journal of Medicinal Plant Research*. 2009;3(2):67-72.
2. Alabri THA, Musalami AHS, Hossain MA, Weli AM, Al-Riyami Q. Comparative study of phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial capacities of fresh and dry leaves crude plant extracts of *Datura metal* L. *Journal of King Saud University-Science*. 2014;26(3):237-43.
3. Krishnamurthy SR, Sarala P. Phytochemical studies of *Artocarpus gomezianus* Wall. ex Trecul. var. *lokoocha* Roxb. fruits collected from various altitudes of Central Western Ghats. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2013;4(4):398-411.
4. Hossain MF, Islam MA, Akhtar S, Numan SM. Nutritional value and medicinal uses of Monkey Jack fruit (*Artocarpus lakoocha*). *International Research Journal of Biological Sciences*. 2016;5(1):60-3.
5. Parkpoom T, Chantree K. A study of efficiency the mixed extract of *Pistia Stratics Helianthus embolic* Linn. in inhibit the microorganisms causing dermatitis. *SDU research Journal sciences and technology*. 2012;5(1):47-60. (in Thai).
6. Laovachirasuwan P, Phadungkit M, Namsawang T, Khumphuwang J, Chaemphudsa C. Oxyresveratrol content and tyrosinase inhibitory activity of *Artocarpus lakoocha* heartwood extract. *Journal of Science and Technology Mahasarakham University*. 2015;34(6):547-50 (in Thai).
7. Teanpaisan R, Senapomg S, Puripattanavong J. In vitro antimicrobial and antibiofilm activity of *Artocarpus Lakoocha* (Moraceae) extract against some oral pathogens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014;13(7):1149-55.
8. Shailendra Kumar MB, Rakesh Kumar MC, Bharath AC, Vinod Kumar HR, Prashith Kekuda TR, Nandini KC, Rakshitha MN, Raghavendra HL. Screening of selected biological activities of *Artocarpus lakoocha* Roxb. (Moraceae) fruit pericarp. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*. 2010;1(4):239-45.
9. Ratananikom K, Khannalao Y, Srirod S. Inhibitory effect of essential oils from local Thai medicinal plants against common human pathogens. *Khon Kaen Agriculture Journal*. 2014;42(4) Suppl:99-105.
10. Kenneth JW. *Macroscale and microscale organic experiments*. 2nd ed. Lexington: Massachusetts, D.C.; 1994.
11. Pandey A, Bhatnagar SP. Preliminary phytochemical screening and antimicrobial studies on *Artocarpus lakoocha* Roxb. *Ancient Science of Life*. 2009;28(4):21-4.
12. Cowan MM. Plant product as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999;12(4):564-82.
13. Yousef RT, Tawil GG. Antimicrobial activity of volatile oils. *Pharmazie*. 1980;35(11):698-701.
14. Rios JL, Recio MC, Villar A. Screening methods of natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*. 1988;23(2-3):127-49.