

การเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ และปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดจากใบรางจืดสดและแห้ง

ณัฐกาญจน์ จิตต์กระจ่าง*, สุมาลี ปานทอง*, สุพิชชา พลอยสมบูรณ์†, สิรินารถ ชูศรีโณม†,

ณัฐศิมา งามขำ†, ดวงพชรภรณ์ ขวัญเชียร*, เรียวฟาง สิโอเม†

* สถานการณ์แพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

† หลักสูตรการแพทย์แผนไทยประยุกต์บัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

‡ หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

§ ผู้รับผิดชอบบทความ: psumalee@tu.ac.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: สิวเป็นโรคผิวหนังที่พบอาการบวม แดง อักเสบ หรือติดเชื้อ เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Cutibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* โดยทางการแพทย์แผนไทยนิยมใช้สมุนไพรในการรักษาโรค รังจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) มีสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบหลักและเป็นสมุนไพรที่นิยมใช้รักษาโรคทางผิวหนัง แก้ไข้ แก้อักเสบ ปวด บวม สารสกัดจากใบรางจืดแห้งเคยมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. acnes* แต่ยังไม่มีการเปรียบเทียบฤทธิ์ของใบรางจืดสดและแห้งมาก่อน ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของใบรางจืดในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว ฤทธิ์ด้านการอักเสบและปริมาณสารฟีนอลิก และการเปรียบเทียบผลของใบรางจืดสดและแห้งและชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

วิธีการศึกษา: การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียใช้เทคนิค broth microdilution assay เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกใช้เทคนิค Folin-Ciocalteu และการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์ RAW264.7 โดยการวัดปริมาณไนโตริกออกไซด์

ผลการศึกษา: ผลการทดลองพบว่าสารสกัดใบรางจืดสดมีปริมาณสารฟีนอลิกสูงกว่าใบรางจืดแห้ง และสารสกัดชั้นเอทานอลของใบรางจืดสดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* และ ด้านการอักเสบโดยยับยั้งการหลั่งไนโตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด ส่วนฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มีเพียงสารสกัดจากใบรางจืดสดเท่านั้นที่มีฤทธิ์

อภิปรายผล: จากการทดลองครั้งนี้พบว่าใบรางจืดสดมีฤทธิ์ดีกว่าใบรางจืดแห้ง อีกทั้งสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลยังมีฤทธิ์ที่ดีกว่าสารสกัดที่ได้จากการต้ม น้ำ อุณหภูมิสูงอาจส่งผลให้สารสำคัญในใบรางจืดสลายตัว ดังนั้นใบรางจืดแห้งและสารสกัดชั้นน้ำมีฤทธิ์ที่ต่ำกว่าใบรางจืดสดที่สกัดด้วยเอทานอล

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: สรุปได้ว่าใบรางจืดสดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวและฤทธิ์ด้านการอักเสบได้ดีกว่าใบรางจืดแห้ง และวิธีการสกัดที่เหมาะสมคือการแช่สกัดในเอทานอล ดังนั้นใบรางจืดสดที่สกัดด้วยเอทานอลจึงเหมาะที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์รักษาสิวต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: รังจืด, ฤทธิ์ด้านการอักเสบ, ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย, สิว

A Comparison of Antibacterial Activity Against Acne-Inducing Bacteria, Anti-inflammatory Activity, and Total Phenolic Content of Fresh and Dried Leaves of *Thunbergia laurifolia* Lindl Extracts

Natthakan Chitkrachang^{*}, Sumalee Panthong^{*,§}, Supidcha Ploysombun[†], Sirinad Choosrichom[†], Natsima Ngamkham[†], Duangpacharaporn Kwanchian^{*}, Reawfang Sriyom[‡]

^{*}Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Khlong Nueng Subdistrict, Khlong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand.

[†]Bachelor of Applied Thai Traditional Medicine Program, Faculty of Medicine, Thammasat University, Khlong Nueng Subdistrict, Khlong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand.

[‡]Doctor of Philosophy Program in Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University, Khlong Nueng Subdistrict, Khlong Luang District, Pathum Thani 12120, Thailand

[§]Corresponding author: psumalee@tu.ac.th

Abstract

Introduction and Objectives: Acne is a skin disease with swelling, redness, inflammation, or bacterial infection caused by *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. In Thai traditional medicine, herbs have been employed to treat such diseases. *Thunbergia laurifolia* Lindl. (rang chued in Thai), with a main ingredient of phenolic compounds, is used for treating/relieving skin diseases, fever, pain, and swelling. The dried leaf extract of *T. laurifolia* has been reported on inhibition of *C. acnes*. However, a comparison of antibacterial activities of fresh and dried leaves of *T. laurifolia* has not yet been reported. Therefore, this study aimed to investigate *T. laurifolia* extract's antibacterial activity against bacteria-inducing acne, anti-inflammatory activity, and total phenolic content, and to compare the effects of fresh and dried *T. laurifolia* extracts obtained with various solvents.

Methods: Antibacterial activity determination was performed using broth microdilution assay to detect minimal inhibitory concentration. Total phenolic content was evaluated using Folin-Ciocalteu technique and anti-inflammatory activity was detected in nitric oxide released from RAW264.7 cells.

Results: The comparative examination was made of fresh and dried leaves and the solvent effect on biological activity of *T. laurifolia*. Fresh leaf extract was found to have a higher phenolic content than dried leaf extract. Ethanolic fresh leaf extract showed the highest inhibitory effect on *C. acnes* growth and nitric oxide production. In addition, only fresh leaf extract could inhibit *S. aureus* growth.

Discussion: The biological activity of fresh leaves of *T. laurifolia* was better than dried leaves; and the biological activity of ethanolic extract was better than the aqueous extract. High temperatures might cause the degradation of active ingredients in *T. laurifolia*. Thus, the biological activity of dried leaf extracts and the aqueous extracts was lower than in the ethanolic extract of fresh leaves of *T. laurifolia*.

Conclusion: Of *T. laurifolia*, fresh leaves have better antibacterial and anti-inflammatory activities than dried leaves. The suitable extraction is maceration in 95% ethanol. Thus, ethanolic *T. laurifolia* fresh leaf extract is more suitable for developing anti-acne products in the future.

Key words: *Thunbergia laurifolia* Lindl, anti-inflammatory activity, antibacterial activity, acne

บทนำและวัตถุประสงค์

สิว เป็นโรคผิวหนังที่เกิดจากการอุดตันของต่อมไขมันส่งผลให้เชื้อแบคทีเรีย *Cutibacterium acnes* เจริญเติบโตขึ้นและกระตุ้นให้เกิดการอักเสบบริเวณรูขุมขนที่ผิวหนัง นอกจากนั้นบริเวณที่เป็นสิวยังพบการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis*^[1] ที่อาจทำให้เกิดความรุนแรงของสิวและการอักเสบมากขึ้นเนื่องจากเม็ดเลือดขาวจะสร้างสารที่กระตุ้นกระบวนการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์, TNF- α , IL-1, IL-6 เป็นต้น^[2] ลักษณะทางคลินิกของสิว จะพบอาการบวม แดง อักเสบ มีแผลบริเวณผิวหนังหรือรูขุมขน โดยมักจะเป็นแผลประเภทตุ่มหนอง, ผื่นนูน, ตุ่มนูนขนาดใหญ่ นอกจากนั้นหากสิวมักมีการอักเสบรุนแรงจะทำให้เกิดเป็น สิวหัวช้าง ซึ่งระดับความรุนแรงของสิวในแต่ละบุคคลมีความแตกต่างกัน ทำให้ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตทั้งด้านอารมณ์ จิตใจ และสังคม ทำให้สูญเสียความมั่นใจในตนเอง เกิดความเครียดและวิตกกังวล^[3] การรักษาสิวในปัจจุบันจะมีการใช้ยาหลายชนิดร่วมกัน เช่น ยาปฏิชีวนะ ยาในกลุ่มฮอร์โมน กรดซาลิไซลิก เป็นต้น นอกจากนั้นยังพบการใช้สารจากธรรมชาติมาช่วยในการรักษาสิว เช่น น้ำมันจากต้นทรี^[1]

ตามหลักแนวคิดทางการแพทย์แผนไทย การเกิดการอักเสบบริเวณผิวหนัง มีสาเหตุจากกองสมุฏฐานของธาตุไฟกำเริบจากปัจจัยกระตุ้นทั้งภายในและภายนอกร่างกาย เช่น อาหาร อารมณ์ กิเลส (เชื้อโรค) เป็นต้น ทำให้ความร้อนที่สะสมกระตุ้นธาตุลมให้กำเริบกระทบต่อธาตุน้ำและธาตุดินให้ เสียสมดุลเป็นพิษต่อเลือดและน้ำเหลือง ส่งผลให้ผิวหนังเป็น แผล บวม แดง มีผื่น และแสบคัน^[4] ดังนั้นรสนยาของ

สมุนไพรที่นำมาใช้ในการรักษา คือ รสขมเย็น รสเมาเบื่อ รสฝาด รสจืด เมื่อวิเคราะห์ พบว่ารสนยาเย็นมีสรรพคุณแก้ความผิดปกติของเตโชธาตุ (ธาตุไฟ) ลดความร้อน แก้ไข้และแก้การอักเสบของร่างกาย ซึ่งมีความสอดคล้องกับพยาธิสภาพและลักษณะอาการของโรค^[5] โดยสมุนไพรที่นิยมนำมาใช้ถอนพิษทั้งปวง แก้ไข้ แก้อักเสบ และแก้ปวดบวมได้แก่ รวงจืด ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Thunbergia laurifolia* Lindl. ซึ่งมีสรรพคุณแก้ไข้ แก้อักเสบ แก้ปวดบวม ถอนพิษทั้งปวง^[6] รวงจืดประกอบด้วยสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิกหลายชนิด เช่น rosmarinic acid^[7-8] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดน้ำของใบรางจืดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง^[9] นอกจากนั้นสารสกัดเอทานอลของใบรางจืดแห้งมีฤทธิ์ในการลดอาการอักเสบบริเวณผิวหนังของกระต่ายที่มีการติดเชื้อ *S. aureus* โดยพบว่าครีมที่ผสมสารสกัดจากใบรางจืดช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อ ต้านอนุมูลอิสระและลดปริมาณไฮโดรโคโรนที่กระตุ้นการอักเสบได้แก่ TGF- β , TNF- α และ IFN- γ ^[10] และสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้^[9] จากการทบทวนวรรณกรรมจะเห็นได้ว่าส่วนที่ใช้เป็นยาของรางจืดคือใบ โดยลักษณะใบที่นำมาใช้มีทั้งใช้แบบใบสดและแบบใบแห้งที่นำมาคั้นน้ำหรือต้มน้ำ นอกจากนั้นยังมีการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการวิจัยที่เปรียบเทียบฤทธิ์ของใบรางจืดแบบสดและแบบแห้ง รวมถึงชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว ฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยศึกษาการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์และปริมาณสารฟีนอลิกของสารสกัดจากใบรางจืด รวม

ถึงการเปรียบเทียบผลของใบรางจืดสดและใบรางจืดแห้งและชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและแนวทางในการนำรางจืดไปใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับการรักษาสิวต่อไปในอนาคต

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

ใบรางจืดถูกเก็บจากสวนสมุนไพร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โดยใบรางจืดจะถูกนำไปตรวจสอบเทียบสายพันธุ์และขอเลขอ้างอิงจากพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์โดยมีเลขอ้างอิงคือ BK No. 083537

2. วิธีการศึกษา

2.1 การสกัดสาร

นำสมุนไพรมาล้างทำความสะอาดและผึ่งให้แห้ง จากนั้นแบ่งสมุนไพรออกเป็นสองส่วน โดยส่วนแรกจะนำไปสกัดแบบสด และส่วนที่สองนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและนำไปสกัดในรูปแบบของใบแห้ง การสกัดจะแบ่งเป็นสองวิธีคือการต้มน้ำและการแช่สกัดด้วย 95% เอทานอล โดยวิธีที่หนึ่งคือการต้มน้ำจะเริ่มจากการนำสมุนไพรไปต้มกับน้ำให้เดือด 15 นาที แล้วกรองเอาแต่น้ำ ทำเช่นนี้ซ้ำอีกสองครั้ง จากนั้นนำน้ำที่กรองได้ทั้งสามครั้งมาต้มเคี่ยวให้เหลือหนึ่งในสามส่วน แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ส่วนวิธีที่สองคือการนำสมุนไพรไปแช่สกัดด้วย 95% เอทานอลเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการกรอง แล้วนำของเหลวที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง

แบบสูญญากาศ ทำซ้ำอีกสองครั้ง แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง แล้วทำการคำนวณร้อยละผลผลิตของสารสกัดที่ได้ หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะทำการทดสอบ

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ *C. acnes* DMST 14916 และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยเชื้อ *C. acnes* จะถูกเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Brain heart infusion agar และบ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อ *S. aureus* จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient Agar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาทดสอบโดยใช้เทคนิค Broth microdilution assay^[11] โดยจะเริ่มต้นจากการเจือจางสารสกัดที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธีการเจือจางแบบสองเท่าโดยสารสกัดจะถูกทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว ปรับความขุ่นของเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.5 McFarland จากนั้นเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และเชื้อที่ปรับความขุ่นไว้แล้วลงในเพลทในปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุมแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C โดยเชื้อ *C. acnes* จะถูกบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ในขณะที่เชื้อ *S. aureus* จะถูกบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้ทำการเติม resazurin ลงไป 10 ไมโครลิตรต่อหลุม และทำการบ่มต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วอ่านผลโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีของ resazurin ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้หรือค่า MIC คือความเข้มข้นที่ resazurin ไม่เปลี่ยนสี จากนั้นจึงนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ มาทำการเพาะ

เลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและบ่มที่อุณหภูมิที่สภาวะที่เหมาะสมกับเชื้อดังกล่าวโดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้ หรือค่า MBC คือความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจะใช้ยา clindamycin เป็น positive control

2.3 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยการศึกษาผลการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์^[12]

การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบจะศึกษาการยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจของหนู (RAW 264.7) โดยเซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM ที่มีสารเติม 10% FBS, 50 IU/mL เพนนิซิลินและ 50 $\mu\text{g/mL}$ สเตربتอมัยซิน ทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่มีความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้นนำไปทดสอบโดยใส่เซลล์ลงในเพลท 96 หลุมที่ความหนาแน่น 1×10^5 เซลล์/หลุม บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเก่าออก แล้วทำการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการอักเสบด้วยการเติม lipopolysaccharide จากนั้นเติมสารสกัดสมุนไพรลงไป บ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดเซลล์ที่ผ่านการทดสอบกับสารสกัดจะนำไปตรวจวัดการรอดชีวิตของเซลล์โดยใช้สาร MTT โดยสารสกัดที่ให้ผลการรอดชีวิตของเซลล์ตั้งแต่ 70% ขึ้นไปจะถือว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่หากสารสกัดใดส่งผลให้มีการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่า 70% สารสกัดนั้นจะไม่ถูกนำมาตรวจวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ ในส่วนของการตรวจวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ให้ทำการนำส่วนใสไปตรวจวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ โดยใช้สาร Griess reagent แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์จะใช้ยา betamethasone เป็น positive control โดยสารทั้งหมดจะถูกทดสอบซ้ำ 3 ครั้งแล้วคำนวณค่าร้อยละ

การยับยั้งในแต่ละความเข้มข้นแล้วนำค่าที่ได้ไปหาค่า IC_{50} โดยผลการทดลองจะถูกแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.4 การตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลิก

เตรียมสารสกัดวางจืดและสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงทำการเจือจางสารสกัดให้มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยน้ำ deionize water ในขณะที่สารมาตรฐาน gallic acid จะถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100, 80, 40, 20 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการปิเปตสารตัวอย่างและสารมาตรฐานใส่ลงใน 96 well plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วทำการเติมสาร Folin-Ciocalteu's 100 ไมโครลิตรต่อหลุม และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ลงไป 80 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นทำการบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ทำการคำนวณปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดวางจืดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid และรายงานผลในหน่วย มิลลิกรัมของ gallic acid ต่อกรัมของสารสกัด โดยสารสกัดทั้งหมดจะถูกทดสอบซ้ำ 3 ครั้งและผลการทดลองจะถูกแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการศึกษา

1. การสกัดสารจากใบรางจืดสดและแห้ง

จากการนำใบรางจืดสดและใบรางจืดแห้งมาทำการสกัดด้วยการต้มน้ำและการแช่สกัดใน 95% เอทานอล พบว่าได้สารสกัดทั้งสิ้น 4 ชนิด ได้แก่ สารสกัดเอทานอลของใบรางจืดสด (TLFE) สารสกัดน้ำของใบรางจืดสด (TLFW) สารสกัดเอทานอลของใบ

รางจืดแห้ง (TLDE) สารสกัดน้ำของใบรางจืดแห้ง (TLDW) เมื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละของสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกัน พบว่าสารสกัดจากใบรางจืดแห้งให้ค่าร้อยละของสารสกัดสูงกว่า

สารสกัดจากใบรางจืดสด นอกจากนั้นยังพบว่าสารสกัดชั้นน้ำมีค่าร้อยละของสารสกัดสูงกว่าสารสกัดชั้นเอทานอล (Table 1)

Table 1 Percentage of yield of *T. laurifolia* extract

Sample	Extraction method	Code	Percentage of yield
Fresh leaves	Maceration with 95% ethanol	TLFE	2.98
	Decoction with water	TLFW	3.69
Dried leaves	Maceration with 95% ethanol	TLDE	8.66
	Decoction with water	TLDW	19.06

2. ฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์

ในการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ พบว่าสารสกัดทุกชนิดที่นำ

มาทดสอบไม่ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์โดยมีค่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์สูงกว่าร้อยละ 70 (Table 2)

Table 2 The survival rate of RAW264.7 cells with different concentrations of *T. laurifolia* extract

Sample	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Percentage of survival
TLFE	100	90.30 $\pm$ 4.22
	50	86.63 $\pm$ 1.86
	25	89.11 $\pm$ 4.84
	12.5	91.61 $\pm$ 2.61
TLFW	100	73.78 $\pm$ 4.65
TLDE	100	93.85 $\pm$ 1.25
TLDW	100	91.87 $\pm$ 11.62
Betamethasone	100	88.56 $\pm$ 5.60
	50	84.22 $\pm$ 3.95
	25	85.32 $\pm$ 4.98
	12.5	84.42 $\pm$ 2.90

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์พบว่า มีเพียงสารสกัดเอทานอลของใบรางจืดสด (TLFE) ที่สามารถยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 50.17 ± 8.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ฤทธิ์การยับยั้งยังคงมีค่าน้อยกว่า Betamethasone ซึ่งเป็นสาร positive control และสามารถยับยั้ง

ไนตริกออกไซด์ได้โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 25.87 ± 6.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดอื่น ๆ ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 3)

Table 3 Anti-inflammatory activity of nitric oxide releasing *T. laurifolia* extract

Sample	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Percentage of inhibition effect	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
TLFE	100	73.01 ± 2.60	50.17 ± 8.91
	50	52.68 ± 9.68	
	25	24.78 ± 3.43	
	12.5	13.97 ± 4.27	
TLFW	100	9.96 ± 5.46	> 100
TLDE	100	41.56 ± 8.09	> 100
TLDW	100	-3.99 ± 4.43	> 100
Betamethasone	100	63.53 ± 2.06	25.87 ± 6.59
	50	55.73 ± 2.74	
	25	49.38 ± 1.27	
	12.5	46.80 ± 3.02	

3. ฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบรางจืดต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สองชนิดคือ *S. aureus* และ *C. acnes* ผลที่ได้พบว่า สารสกัดเอทานอลและน้ำของใบรางจืดสดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีกว่าสารสกัดเอทานอลและน้ำของใบรางจืดแห้ง โดยพบว่าสารสกัดน้ำของใบรางจืดสด (TLFW) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดโดยมีค่า MIC เท่ากับ 2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดเอทานอลของใบรางจืดสด (TLFE)

โดยมีค่า MIC เท่ากับ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การยับยั้งเชื้อ *C. acnes* นั้นพบว่าสารสกัดเอทานอลของใบรางจืดสด (TLFE) มีฤทธิ์ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดน้ำของใบรางจืดสด (TLFW) และสารสกัดน้ำของใบรางจืดแห้ง (TLDW) โดยมีค่า MIC เท่ากับ 312.5, 625 และ 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดทั้งหมดยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื่อน้อยกว่า positive control คือ Clindamycin (Table 4)

Table 4 Antimicrobial activity of *T. laurifolia* extract

Sample	<i>S. aureus</i>		<i>C. acnes</i>	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)
TLFE	5,000	5,000	312.5	312.5
TLFW	2,500	2,500	625	625
TLDE	> 5,000	> 5,000	> 5,000	> 5,000
TLDW	> 5,000	> 5,000	625	625
Clindamycin	0.098	6.25	0.0225	0.0225

4. ปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดใบรางจืด

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดจากใบรางจืด เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดแบบเดียวกันพบว่าสารสกัดใบรางจืดสดมีปริมาณสารฟีนอลิกสูงกว่าใบรางจืดแห้ง โดยที่สารสกัดน้ำของใบรางจืดสดที่มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงที่สุดคือ 187.56 ± 4.79 มิลลิกรัมของ gallic acid ต่อกรัมของสารสกัด รองลงมาคือสารสกัดเอทานอลของใบรางจืดสดมีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ 99.85 ± 6.45 มิลลิกรัมของ gallic acid ต่อกรัมของสารสกัด ในส่วนของใบรางจืดแห้ง พบว่าสารสกัดน้ำของใบรางจืดแห้งมีค่าปริมาณสารฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัดเอทานอลของใบรางจืดแห้ง โดยมีค่าเท่ากับ 82.45 ± 3.82 และ 65.67 ± 4.80 มิลลิกรัมของ gallic acid ต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ (Table 5)

Table 5 Total phenolic content in *T. laurifolia* extract

Sample	Total phenolic content (mg gallic acid/gram of dried extract)
TLFE	99.85 ± 6.45
TLFW	187.56 ± 4.79
TLDE	65.67 ± 4.80
TLDW	82.45 ± 3.82

อภิปรายผล

สิวเป็นโรคทางผิวหนังชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้บ่อยในทุกเพศทุกวัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงวัยรุ่น ซึ่งการเกิดสิวมักมีด้วยกันหลายสาเหตุ ได้แก่ การแบ่งตัวที่ผิดปกติของผิวหนัง การสร้างไขมันมากขึ้นจากต่อมไขมัน หรือการติดเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่าสิ่ว โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดสิ่วได้แก่ *Propionibacterium acnes* ที่มีการผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายไขมันได้โดยปัจจุบันแบคทีเรียชนิดนี้ได้ถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *Cutibacterium acnes* เพื่อให้การจำแนกเชื้อชนิดนี้ตามหลักของอนุกรมวิธานมีความจำเพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น^[13] นอกจากเชื้อ *C. acnes* ยังมีเชื้อฉวยโอกาสชนิดอื่นๆ ที่อยู่บนผิวหนังที่สามารถกระตุ้นการเกิดสิ่วได้ โดยปัจจัยกระตุ้นความรุนแรงของโรค คือ ความเครียด ฮอรโมนและการติดเชื้ออื่นๆ บริเวณผิวหนัง ทำให้มีการอักเสบบริเวณนั้นๆ มากขึ้น^[1-2,14] จากสารานุกรมสมุนไพรไทยพบว่ารางจืดทุกส่วนมีสรรพคุณในการลดการอักเสบภายนอก ลดปวดบวมได้^[6] การศึกษาในครั้งนี้ ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิ่วและฤทธิ์ยับยั้งสารในกระบวนการอักเสบคือไนตริกออกไซด์ของสารสกัดจากใบรางจืด โดยทำการเปรียบเทียบผลของใบ

รางจืดสดและแห้ง รวมถึงเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดซึ่งยังไม่เคยมีรายงานวิจัยมาก่อน ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากใบรางจืดสดชั้นเอทานอลให้ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุดและมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูง จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ยังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดของสารสกัดจากใบรางจืดสด แต่พบว่ามีรายงานการศึกษาของใบรางจืดแห้งที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำ โดยพบว่าสารสกัดเอทานอลของใบรางจืดแห้งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. acnes* (*C. acnes*) ในขณะที่สารสกัดน้ำของใบรางจืดแห้งไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิด^[15] รายงานการศึกษานี้พบว่ามีสารสกัดเอทานอลของใบรางจืดแห้งไม่สามารถยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดได้^[16] ซึ่งคล้ายกับผลการศึกษาในครั้งนี้ แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดน้ำของใบรางจืดแห้งสามารถยับยั้ง *C. acnes* ได้ ซึ่งได้ผลที่แตกต่างจากการศึกษาอื่น ๆ เหตุผลดังกล่าวอาจเกิดจากการเก็บสมุนไพรจากคนละแหล่งและคนละฤดูกาลส่งผลให้ปริมาณสารสำคัญแตกต่างกันออกไปและทำให้ได้ผลการศึกษาที่แตกต่างกัน^[17] อย่างไรก็ตามฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านการอักเสบในการศึกษาครั้งนี้ยังคงมีค่าต่ำกว่า positive control ซึ่งอาจเกิดจากสารสกัดสมุนไพรประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิดส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ที่ต่ำกว่ามาตรฐานที่ประกอบด้วยสารสำคัญเพียงชนิดเดียว แต่เมื่อทำการแยกสารสำคัญจากสมุนไพรหลาย ๆ ชนิดและนำไปทดสอบนั้นจะเห็นได้ว่าค่าการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสมุนไพรจะมีค่าการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัด^[8] ในกรณีของใบรางจืดพบว่าประกอบด้วยสารสำคัญในกลุ่ม

ฟีนอลิกหลายชนิด ได้แก่ apigenin, gallic acid, caffeic acid และ rosmarinic acid^[7,18-19] ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวและยับยั้งไนตริกออกไซด์^[10,20-21] จากการทดลองครั้งนี้พบว่าใบรางจืดสดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยับยั้งไนตริกออกไซด์ดีกว่าใบรางจืดแห้ง อีกทั้งสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลยังมีฤทธิ์ที่ดีกว่าสารสกัดที่ได้จากการต้ม น้ำ ซึ่งอาจเกิดจากใบรางจืดสดที่สกัดด้วยเอทานอลนั้นไม่มีการสัมผัสกับความร้อน ส่งผลให้สารสำคัญที่ได้มีโอกาสสลายตัวได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับใบรางจืดแห้งที่ต้องผ่านกระบวนการอบและการต้มน้ำที่ต้องผ่านการสัมผัสกับความร้อนสูง จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสาร rosmarinic acid จะมีการสลายตัวเมื่อสัมผัสกับอุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที และความร้อนจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกลายเป็นสาร dihydroxyphenyllactic acid^[22] ดังนั้นการที่สารสกัดใบรางจืดสดที่สกัดด้วยน้ำแม้จะมีปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลิกสูงกว่าแต่กลับมีฤทธิ์ต่ำกว่าสารสกัดจากเอทานอล อาจเป็นเพราะโครงสร้างของสารที่มีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากความร้อนส่งผลให้ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านการอักเสบเปลี่ยนแปลงไป

ข้อสรุป

จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า ใบรางจืดสดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวและฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าใบรางจืดแห้ง และวิธีการสกัดที่เหมาะสมคือการแช่สกัดในเอทานอลเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพดี และเหมาะสำหรับนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ช่วยในการรักษาสิวต่อไป แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะเชิงของสารสกัดดังกล่าวควรต้องมีการทดลองต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาดังกล่าวได้รับการสนับสนุนทุนการวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

References

1. Zaenglein AL, Pathy AL, Schlosser BJ, Alikhan A, Baldwin HE, Berson DS, Bowe WP, Graber EM, Harper JC, Kang S, Keri JE, Leyden JJ, Reynolds RV, Silverberg NB, Gold LFS, Tollefson MM, Weiss JS, Dolan NC, Sagan AA, Stern M, Boyer KM, Bhushan R. Guidelines of care for the management of acne vulgaris. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2016;74(5):945-73.
2. Liu H, Archer NK, Dillen CA, Wang Y, Ashbaugh AG, Ortines RV, Kao T, Lee SK, Cai SS, Miller RJ, Marchitto MC, Zhang E, Riggins DP, Plaut RD, Stibitz S, Geha RS, Miller LS. *Staphylococcus aureus* epicutaneous exposure drives skin inflammation via IL-36-mediated T Cell responses. *Cell Host Microbe.* 2017;22(5):653-66.
3. Ayer J, Burrows N. Acne: more than skin deep. *Postgrad Med J.* 2006;82(970):500-6.
4. Wat Po traditional medical and ayurvedic association. Thai traditional medicine code. 2nd Ed. Bangkok: Traditional medical and ayurvedic association; 1975. 454 pages.
5. Chaloeamram C, Sedlak S. Study on knowledge of medicinal plant formulas for dermatitis treatment recorded in palm leaf manuscripts of Isan. *KKU Sci J.* 2020;48(3):350-63.
6. Wutthithammawet W. Encyclopedia of Thai herbs and medicinal plants for therapeutic use. Bangkok: Odeon-store publishing; 1997. 618 pages.
7. Chan E, Eng SY, Tan Y, Wong Z. Phytochemistry and pharmacological properties of *Thunbergia laurifolia*: A review. *Pharmacogn J.* 2011;3(24):1-6.
8. Chaiyana W, Chansakaow S, Intasai N, Kiattisin K, Lee K-H, Lin W-C, Lue S, Leelapornpisid P. Chemical constituents, antioxidant, anti-MMPs, and anti-hyaluronidase activities of *Thunbergia laurifolia* Lindl. leaf extracts for skin aging and skin damage prevention. *Molecules.* 2020;25(8):1923.
9. Junsri M, Siripongvutikorn S. *Thunbergia laurifolia*, a traditional herbal tea of Thailand: Botanical, chemical composition, biological properties and processing influence. *Int Food Res J.* 2016;23(3):923-7.
10. So-In C, Sunthamala N. Treatment efficacy of *Thunbergia laurifolia*, *Curcuma longa*, *Garcinia mangostana*, and *Andrographis paniculata* extracts in *Staphylococcus aureus*-induced rabbit dermatitis model. *Vet World.* 2022;15(1):188-97.
11. Sarker SD, Nahar L, Fau - Kumarasamy Y, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 2007;42(4):321-4.
12. Makchuchit S, Rattarom R, Itharat A. The anti-allergic and anti-inflammatory effects of Benjakul extract (a Thai traditional medicine), its constituent plants and its some pure constituents using *in vitro* experiments. *Biomed Pharmacother.* 2017;89:1018-26.
13. Dréno B. What is new in the pathophysiology of acne, an overview. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31(Suppl 5):8-12.
14. Mogana R, Adhikari A, Tzar MN, Ramliza R, Wiart C. Antibacterial activities of the extracts, fractions and isolated compounds from *Canarium patentinervium* Miq. against bacterial clinical isolates. *BMC complement med ther.* 2020;20(1):55.
15. Pukumpuang W, Thongwai N, Tragoolpua Y. Total phenolic contents, antibacterial and antioxidant activities of some Thai medicinal plant extracts. *J Med Plant Res.* 2012;6(35):4953-60.
16. Pinit N, Temkitthawon P, Lamierththong S, Pitaksuteepong T. Screening of antibacterial activities of 53 Thai herbal extracts against acne-involved bacteria. *J Sci Tech UBU.* 2017;Suppl. September:85-92.
17. Adeosun WB, Bodede O, Prinsloo G. Effect of different climatic regions and seasonal variation on the antibacterial and antifungal activity, and chemical profile of *Helichrysum aureonitens* Sch. Bip. *Metabolites.* 2022;12(8):758.
18. Sharma A. Antimicrobial activity of crude extract from *Thunbergia laurifolia*. (Bachelor of Science). Bangkok: Assumption University; 2018.
19. Cushnie TP, Hamilton VE, Lamb AJ. Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol Res.* 2003;158(4):281-9.
20. Lima VN, Oliveira-Tintino CD, Santos ES, Morais LP, Tintino SR, Freitas TS, Geraldo YS, Pereira RL, Cruz RP,

- Menezes IR, Coutinho HD. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microb. Pathog.* 2016;99:56-61.
21. Pattananandecha T, Apichai S, Julsrigival J, Ungsurungsie M, Samuhasaneetoo S, Chulasiri P, Kwankhao P, Pitiporn S, Ogata F, Kawasaki N, Saenjurn C. Antioxidant activity and anti-photoaging effects on UVA-irradiated human fibroblasts of rosmarinic acid enriched extract prepared from *Thunbergia laurifolia* leaves. *Plants (Basel)*. 2021;10(8):1648.
22. Vergara-Salinas JR, Pérez-Jiménez J, Torres JL, Agosin E, Pérez-Correa JR. Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (*Thymus vulgaris*). *J Agric Food Chem.* 2012;60(44):10920-9.