



ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากใบชะมวงต่อเชื้อ *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 13311 บนใบผักกาดหอมอินทรีย์

พรรณีภา ศิริเพิ่มพูล^{1*}และทิพวรรณ คำสม¹

Received: July 17, 2017

Revised: September 7, 2017

Accepted: September 11, 2017

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันทั่วโลกมีความต้องการบริโภคผลไม้สดและผักอินทรีย์เพิ่มขึ้นมาก ในขบวนการผลิตผลไม้และผักอินทรีย์เหล่านี้ไม่มีการใช้สารเคมีใด ๆ ดังนั้นสารธรรมชาติจากพืชจึงอาจเป็นทางเลือกที่ดีที่สุดสำหรับใช้ในขบวนการกำจัดจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนมากับพืชผักดังกล่าว งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดน้ำจากใบชะมวงต่อเชื้อ *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC13311 ที่จำลองการปนเปื้อนไว้บนใบผักกาดหอมอินทรีย์ รวมทั้งอิทธิพลของระยะเวลาสัมผัสสาร โดยล้างใบผักกาดหอมอินทรีย์ด้วยสารละลายไฮโปคลอไรท์ 1 % และฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) เพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ประจำถิ่น แล้วเติมเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC13311 (ประมาณ 5 Log CFU/กรัม) ลงบนใบผักและปล่อยให้แห้ง แล้วเติมสารสกัดใบชะมวงความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ท่วมใบผัก สุ่มตัวอย่างใบผักมาตรวจหาจำนวน *Salmonella* ทันที (0 นาที) และที่เวลา 5, 15 นาที ผลการทดลองพบว่าสารสกัดใบชะมวงมีประสิทธิภาพในการต้าน *S. Typhimurium* ATCC13311 ได้ดี เมื่อเทียบกับการล้างผักด้วยน้ำกลั่นโดยพบว่าจำนวนเชื้อลดลงประมาณ 2.5 Log CFU/กรัม หลังการล้างผักด้วยสารสกัดใบชะมวงนาน 5 นาที ประสิทธิภาพในการกำจัดจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการล้างผัก นอกจากนี้ยังตรวจไม่พบ *Salmonella* ทั้งบนใบผักและน้ำที่ล้างผักด้วยสารสกัดใบชะมวงนาน 15 นาที จากการศึกษาชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดใบชะมวงในการยับยั้งเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC13311 บนใบผักกาดหอมอินทรีย์และอาจเป็นทางเลือกในการใช้สารสกัดใบชะมวงเป็นน้ำยาล้างผักด้วยสารจากธรรมชาติ

คำสำคัญ: ใบผักกาดหอมอินทรีย์, ชะมวง, *Salmonella* Typhimurium

¹ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

*ผู้รับผิดชอบบทความ



Antimicrobial activity of extract from *Garcinia cowa* leaf against *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 13311 on organic leafy lettuce

Punnipa Siripermpool^{1*} and Tippawan Khamsom¹

Abstract

Recently, there has been an increase in consumption of organic fresh fruits and vegetables around the world. Organic foods are produced without the use of any chemicals, and hence, natural plant compounds may be good alternative as natural antimicrobial treatment. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial effectiveness of aqueous extract from *Garcinia cowa* leaf on organic leafy lettuce inoculated with *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC13311. The influence of exposure time was also investigated. Leaf samples were thoroughly washed in 1% NaOCl and placed in a biohood under UV light (254 nm) to reduce normal microflora. The leaf samples were inoculated with *S. Typhimurium* ATCC13311 (approx. 5 Log CFU/g) and dried. Inoculated leaves were immersed in solution containing 50 mg/ml extract of *Garcinia cowa* leaf. Samples were taken immediately (0 minutes) and also following at 5 and 15 minutes for enumeration of surviving *Salmonella*. The result showed that *Garcinia cowa* extract was effective against *S. Typhimurium* ATCC13311. A decrease of approximately 2.5 Log CFU/g of *Salmonella* was observed after 5- minute exposure to the extract when compared with those of the distilled water control. The antibacterial activity was also increased with exposure time. Moreover, *Salmonella* populations were undetectable both in leaf samples and washed solution after 15-minute treatment with the extract. This study demonstrates the potential of *Garcinia cowa* extract to inhibit *S. Typhimurium* ATCC13311 on organic leafy lettuce, thus being alternative as natural antimicrobial washing solution.

Keywords: Organic leafy lettuce, *Garcinia cowa*, *Salmonella* Typhimurium

บทนำ

Salmonella enterica เป็นเชื้อสาเหตุชนิดหนึ่ง ที่พบได้บ่อยของโรคติดเชื้อผ่านทางอาหาร และเป็นปัญหาสำคัญของวงการสาธารณสุขทั่วโลก ในปัจจุบันพบมากกว่า 2500 serovars โดย serovar ที่พบได้บ่อยที่สุดว่าเป็นสาเหตุของโรค Salmonellosis ในคน ได้แก่ serovars Typhimurium และ Enteritidis⁽¹⁾ โดยสามารถพบเชื้อ *Salmonella* นี้ได้ในลำไส้และถูกขับออกมาทั้งอุจจาระของสัตว์บางชนิด เช่น ไก่ และสุกร⁽²⁻⁴⁾ ดังนั้นจึงสามารถพบการปนเปื้อนของเชื้อนี้อยู่ตามพืช ผักสดต่าง ๆ หากมีการนำมูลสัตว์มาใช้ทำปุ๋ยในขบวนการเพาะปลูกพืช⁽⁵⁻⁷⁾ สำหรับในประเทศไทยมีรายงานในปี พ.ศ. 2556 ว่าสามารถเพาะแยกเชื้อ *Salmonella* ได้จากผักสดสูงถึงร้อยละ 46 (37 จาก 80 ตัวอย่าง)⁽⁸⁾

Garcinia เป็นพืชสกุลหนึ่งในวงศ์ Clusiaceae ที่มีการศึกษาวิจัยกันมาก เนื่องจากมีองค์ประกอบของสารหลายชนิดที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พืชชนิดนี้เป็นไม้ขนาดเล็กถึงปานกลาง ลำต้นสูงได้ถึง 30 เมตร พบได้ทั่วไปในเขตอบอุ่นของโลก⁽⁹⁾ *Garcinia cowa* Roxb. หรือชะมวงเป็นพืชชนิดหนึ่งในวงศ์ดังกล่าว พบมากในบริเวณภาคตะวันออกของประเทศไทย ผลและใบมีรสเปรี้ยวรับประทานได้ ใช้สำหรับประกอบอาหาร นอกจากนี้แพทย์พื้นบ้านยังใช้ชะมวงในการรักษาอาการเจ็บป่วยได้หลายชนิด เช่น ใช้เปลือกและรากเป็นยาลดไข้⁽¹⁰⁻¹¹⁾ ใบและผลใช้สำหรับรักษาอาการอาหารไม่ย่อย เพิ่มการไหลเวียนของเลือด และขับเสมหะ⁽¹¹⁾ มีรายงานว่าสารสกัดเอทานอลจากใบชะมวงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้หลายชนิด เช่น *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, และ *Pseudomonas fluorescens* แต่ไม่สามารถยับยั้ง *S. Typhimurium*⁽¹²⁾ อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานมานี้มีรายงานการศึกษาของประภาพร มงคลแก้ว⁽¹³⁾ ว่าความเป็นกรดของสารสกัดน้ำของใบชะมวงสดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. Typhimurium* ในหลอดทดลองได้ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ของสารสกัดด้วยน้ำจากใบชะมวงสดในการลดปริมาณ *S. Typhimurium* ATCC13311 ที่จำลองการปนเปื้อนไว้บนใบผักกาดหอม

อินทรีย์ เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้สารจากใบชะมวงซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นของประเทศไทยสำหรับล้างผักสดชนิดพร้อมบริโภคในระดับครัวเรือน

วัสดุและวิธีการ

1. วิธีการสกัดสาร

ล้างใบชะมวงสดด้วยน้ำกลั่น ผึ่งลมให้น้ำแห้งในที่ร่ม หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งใบชะมวง 500 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องปั่นผลไม้ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง (กวนด้วยแท่งแก้วเป็นระยะทุก 15 นาที) นำน้ำกรองที่ได้มาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เพื่อแยกกากออก นำส่วนใสไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator เตรียมเป็น Stock สารสกัดหยาบชะมวงความเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2. การตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากใบชะมวงในการต้าน *S. Typhimurium* ATCC 13311 ด้วยวิธี Disc diffusion⁽¹⁴⁾

เลี้ยงเชื้อทดสอบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง บน Tryptic soy agar (TSA; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อมาเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยใน Normal saline solution ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ก่อนป้ายให้ทั่วลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA; Oxoid) แล้วจึงวาง Standard plain disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ซึ่งหยดสารสกัดความเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงไป บ่มจานอาหาร MHA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Inhibition zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตรโดยมี Gentamicin disc 10µg/disc (Oxoid) และ Disc ที่ชุบน้ำกลั่นไร้เชื้อเป็น Positive และ Negative control ตามลำดับ

3. การหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และค่า Minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดใบชะมวงโดยวิธี Broth microdilution ตามมาตรฐาน Clinical and Laboratory Standard Institute guidelines⁽¹⁵⁾

โดยเจือจางสารสกัดใบชะมวงแบบ Serial two-fold ด้วย Mueller-Hinton broth (MHB; Oxoid) ลงใน 96-well microtiter plate (Thermo Scientific Nunclon™) ปรับเซลล์แขวนลอยของเชื้อทดสอบให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No.0.5 (ประมาณ 1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร) และเจือจางต่อไปให้มีจำนวนเชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร เติมนลงในหลุมทดสอบ ทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดอยู่ในช่วง 100-0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อทดสอบประมาณ 5×10^5 CFU/มิลลิลิตร บ่มจานทดสอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง โดยมีชุดควบคุมคือ Growth control (เชื้อทดสอบและ MHB) และ Sterile control (น้ำกลั่นไร้เชื้อและ MHB) อ่านค่า MIC จากความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในหลุมทดสอบที่สารละลายในหลุมใส หลังจากนั้น Subculture สารละลายจากทุกหลุมทดสอบที่เห็นว่าใสลงบน TSA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง อ่านค่า MBC จากความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อทดสอบบน TSA

4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบชะมวงในการลดจำนวน *S. Typhimurium* ATCC13311 ที่จำลองการปนเปื้อนบนใบผักกาดหอมอินทรีย์

แช่ใบผักกาดหอมอินทรีย์ในสารละลาย 1% NaClO นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ ผึ่งให้แห้งก่อนนำไปฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (254 นาโนเมตร) ใน Biohazard hood นานด้านละ 15 นาที ตัดแบ่งใบผักเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ถุง Stomacher ถุงละ 15 กรัม จำนวน 9 ถุง แบ่งใบผักเป็น 3 ชุด ชุดที่ 1 (Uninoculated) ไม่มีการเติมเชื้อลงไป จำนวน 3 ถุง ชุดที่ 2 และ 3 เติมน *S. Typhimurium* ATCC13311 ปริมาณ 5×10^5 CFU/มิลลิลิตร ลงไปถุงละ 15 มิลลิลิตร ผึ่งไว้ใน Biohazard hood นาน 5 นาที เพื่อให้แบคทีเรียเกาะติดใบผัก จากนั้นจำลองการล้างผักโดยเติมน้ำกลั่นไร้เชื้อ 220 มิลลิลิตร จำนวน 3 ถุง (ชุดควบคุม) หรือเติมน้ำกลั่นไร้เชื้อ จำนวน 3 ถุง (ชุดทดสอบ) ระยะเวลาแช่ผักนาน 0, 5 และ 15 นาที ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียรวมทั้งหมดและ *S. Typhimurium* ATCC13311 ที่รอดชีวิตบนใบผัก โดยเท

น้ำล้างผักออก ตีผสมใบผักในถุง กับ 0.1 % Peptone water 135 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง Stomacher นาน 2 นาที เจือจางด้วย 0.85% NaCl แบบ Ten-fold dilution จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม เพาะเชื้อลงบน Plate count agar (PCA; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) และ SS agar (Oxoid) ตามลำดับด้วยวิธีการ Drop plate (ชุดควบคุม) หรือ Spread plate (ชุดทดสอบ) เจือจางน้ำล้างผักด้วย 0.85% NaCl แบบ Ten-fold dilution จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมแล้วเพาะเชื้อด้วยวิธีการเดียวกับชุดทดสอบ ส่วนใบผักในชุด Uninoculated เติมน้ำกลั่นไร้เชื้อ 235 มิลลิลิตร และวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อเช่นเดียวกับชุดควบคุม

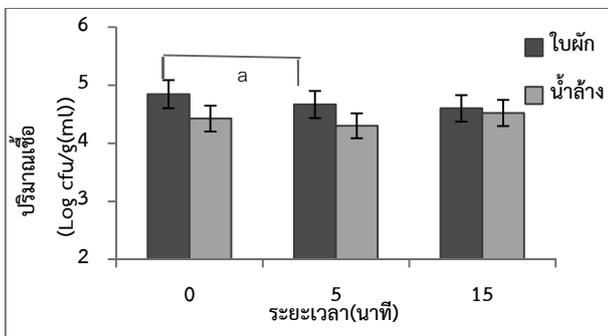
ผลการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดใบชะมวงสด ปริมาณ 500 กรัม ด้วยน้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากระเหยตัวที่ละลายออกด้วยเครื่อง Rotary vacuum evaporator แล้วได้ปริมาณสารสกัดหยาบ 45.21 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 9.04 % หน่วยน้ำหนักสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักสดพืช สารสกัดเข้มข้นที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดเล็กน้อย สีแดงเลือดนก มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 1

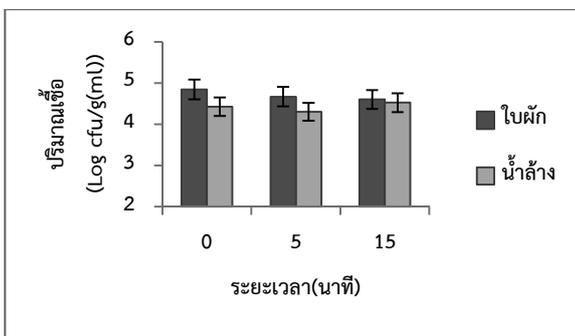
เมื่อนำสารสกัดน้ำจากใบชะมวงที่ระดับความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/Disc ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 1 มาทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้ง *S. Typhimurium* ATCC 13311 ด้วยวิธี Disc diffusion พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ เกิด Inhibition zone ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9 มิลลิเมตร แต่เมื่อปรับสารสกัดน้ำให้มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0 และทำการทดสอบด้วยวิธีการเดียวกันพบว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้งเชื้อ แสดงว่าสารสกัดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ส่วนความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดน้ำที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) และฆ่าเชื้อได้ (MBC) มีค่าเท่ากับ 12.5 และ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลการตรวจใบผักกาดหอมอินทรีย์ที่เติมเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นพบว่าปริมาณแบคทีเรียรวมทั้งหมดที่เหลืออยู่บนใบผักที่ล้างนาน

5 นาที มีจำนวนลดลง 0.2 Log CFU/กรัม ซึ่งแตกต่างจากที่เวลา 0 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F-test, $p < 0.05$) แต่ที่เวลา 15 นาที ปริมาณแบคทีเรียรวมทั้งหมดที่เหลืออยู่บนใบผักไม่แตกต่างจากที่เวลา 5 นาที นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณแบคทีเรียรวมทั้งหมดในน้ำที่ล้างผักนาน 0, 5 และ 15 นาที ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (รูปที่ 1) ส่วนเชื้อ *Salmonella* ที่เหลืออยู่บนใบผักที่ล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 5 และ 15 นาทีนั้น มีปริมาณลดลงเพียง 0.1 Log CFU/มิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติจากที่เวลา 0 นาที และ *Salmonella* ที่อยู่ในน้ำที่ล้างผักนาน 0, 5 และ 15 นาที มีจำนวนประมาณ 4 Log CFU/มิลลิลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (รูปที่ 2)

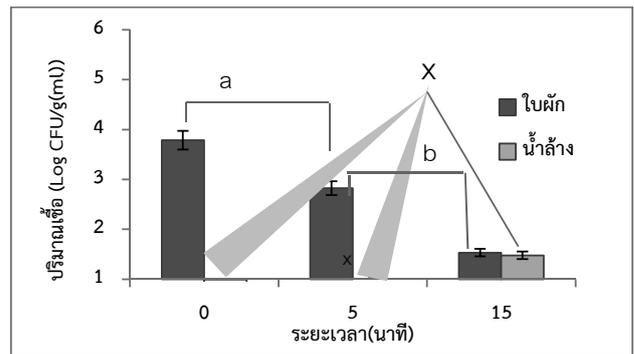


รูปที่ 1 ปริมาณแบคทีเรียรวมทั้งหมดที่ตรวจพบบนใบผักและน้ำที่ล้างผักด้วยน้ำกลั่นที่เวลา 0, 5 และ 15 นาที (a หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, $p < 0.05$ ระหว่างช่วงเวลา 0 และ 5 นาทีของเชือบนตัวอย่างใบผัก)

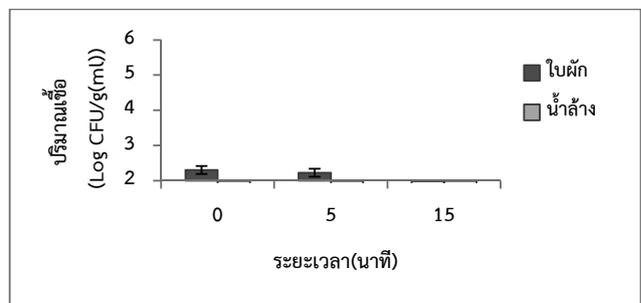


รูปที่ 2 ปริมาณเชื้อ *Salmonella* ที่ตรวจพบบนใบผักและน้ำที่ล้างผักด้วยน้ำกลั่นที่เวลา 0, 5 และ 15 นาที

ผลการใช้สารสกัดใบชะมวงความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4xMIC (50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) มาล้างใบผักกาดหอมอินทรีย์ที่จำลองการปนเปื้อน *S. Typhimurium* ATCC13311 เป็นเวลา 5 และ 15 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียรวมทั้งหมดลดลงอย่างต่อเนื่อง ประมาณ 0.95 และ 1.3 LogCFU/กรัม ซึ่งแตกต่างจากที่ เวลา 0 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F-test, $p < 0.05$) และแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำล้างผักตรวจพบได้ประมาณ 0.6, 1 และ 1.5 LogCFU/มิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างการล้างผักนาน 0, 5 นาที กับที่ระยะเวลา 15 นาที (F-test, $p < 0.05$) (รูปที่ 3) ส่วนเชื้อ *Salmonella* ที่พบรอดชีวิตอยู่บนใบผักเหลือเพียงประมาณ 2 Log CFU/กรัม เมื่อล้างผักด้วยสารสกัดใบชะมวงนาน 0 และ 5 นาที และไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้อีกเลยที่เวลา 15 นาที นอกจากนี้ไม่พบ *Salmonella* ในน้ำล้างผักเลย (รูปที่ 4)



รูปที่ 3 ปริมาณแบคทีเรียรวมทั้งหมดที่ตรวจพบบนใบผักและน้ำที่ล้างผักด้วยสารสกัดใบชะมวงที่เวลา 0, 5 และ 15 นาที (a, b และ x หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, $p < 0.05$ ระหว่างช่วงเวลา 0, 5 และ 15 นาทีของเชือบนตัวอย่างใบผัก (■) และน้ำล้าง (■) ตามลำดับ)



รูปที่ 4 ปริมาณเชื้อ *Salmonella* ที่ตรวจพบบนใบผักและน้ำที่ล้างผักด้วยสารสกัดใบชะมวงที่เวลา 0, 5 และ 15 นาที

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากผลการล้างใบผักกาดหอมอินทรีย์ด้วยสารสกัดใบชะมวงนาน 15 นาที แล้วนำใบผักกาดหอมอินทรีย์มาเพาะเชื้อเพื่อหาจำนวนแบคทีเรียรวมทั้งหมดบนใบผักและพบว่า มีจำนวนเชื้อลดลงประมาณ 3.5 Log CFU/กรัม โดยยังคงมีเชื้อเหลืออยู่บนใบผักประมาณ 1.5 Log CFU/กรัม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบชะมวงไม่สามารถฆ่าเชื้อที่ติดอยู่บนใบผักได้หมด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากใบผักกาดหอมอินทรีย์มีลักษณะทางกายภาพของผิวใบที่หึงกึ่ง ขรุขระ ทำให้เป็นที่ยึดเกาะหรือหลบซ่อนที่ดีของเชื้อทั้งหลาย ซึ่งโดยทั่วไปแล้วเชื้อประจำถิ่นของพืชนั้นจะอยู่ในส่วนของปากใบ ฐานของไตรโคม (Trichomes) รอยต่อระหว่างผนังเซลล์ของชั้น Epidermis รวมทั้งในร่องของเส้นใบย่อย⁽¹⁶⁾ หรืออาจเนื่องมาจากเชื้อประจำถิ่นที่อยู่บนใบผักนั้นอยู่ในรูปของสปอร์ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ เช่น ความร้อน ความแห้งแล้ง รังสีอัลตราไวโอเล็ต สีย้อม รวมทั้งน้ำยาฆ่าเชื้อหลายชนิด⁽¹⁷⁾ จึงทำให้สปอร์ของเชื้อเหล่านี้ทนต่อสารสกัดใบชะมวงด้วยเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาลักษณะจุลสัณฐานของเชื้อในครั้งนี้อย่างไรก็ตามการย้อมสีแกรมพบว่าแบคทีเรียที่รอดชีวิตอยู่บนใบผักที่ผ่านการล้างด้วยสารสกัดใบชะมวงนั้นมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกชนิดที่สร้างสปอร์และแบคทีเรียแกรมลบ

ส่วนประสิทธิภาพของสารสกัดใบชะมวงในการทำลาย *S. Typhimurium* ATCC 13311 นั้นพบว่ามีประสิทธิภาพดี เนื่องจากเมื่อล้างผักโดยการแช่ไว้นาน 5 นาที สามารถลดจำนวน *Salmonella* ลงไปได้ประมาณ 2.6 LogCFU/กรัม และหากแช่ผักไว้นาน 15 นาที สามารถลดจำนวนเชื้อลงไปจนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบชะมวงมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *Salmonella* ได้อย่างดีและรวดเร็ว ในการศึกษานี้สารสกัดดั้งเดิมที่มีค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ในขณะที่สารสกัดที่ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้เป็นกลางไม่มี

ฤทธิ์ยับยั้ง แสดงว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบนั้นเป็นกรดอินทรีย์ มีรายงานการวิจัยของ Jena และ คณะ⁽¹⁸⁾ ซึ่งวิเคราะห์สารสกัดด้วยน้ำจากใบชะมวงสดด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่ามีสารองค์ประกอบหลักที่สำคัญคือกรดอินทรีย์ (-)-hydroxycitric acid (HCA) ประมาณ 1.7% โดยกรดอินทรีย์ชนิดนี้เป็นอนุพันธ์ของ Citric acid และเป็น Competitive inhibitor ของเอนไซม์ ATP citrate lyase ซึ่งทำหน้าที่ในขบวนการเปลี่ยน Citrate ภายใน Cytosol ของเซลล์ไปเป็น Oxaloacetate และ Acetyl CoA⁽¹⁸⁾ ดังนั้นกลไกของสารสกัดใบชะมวงในการฆ่าเชื้อ *Salmonella* จึงอาจเกิดจากฤทธิ์ของ HCA ทำให้เซลล์แบคทีเรียขาด Acetyl CoA ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สำคัญและจำเป็นสำหรับขบวนการ Metabolism ต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น การสังเคราะห์กรดไขมันของเซลล์ เป็นต้น

จากผลการศึกษาซึ่งตรวจไม่พบ *Salmonella* ในน้ำที่ล้างผักด้วยสารสกัดจากใบชะมวง ตั้งแต่แรกรับสัมผัสสาร (0 นาที) แสดงให้เห็นว่าเมื่อเชื้อทดสอบชนิดนี้ถูกชะออกมาแขวนลอยอยู่ในน้ำล้างซึ่งไม่มีบริเวณให้เชื้อยึดเกาะแล้วนั้น สารสกัดสามารถทำลายเซลล์ของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ น้ำล้างผักนี้จึงสามารถทิ้งลงสู่สิ่งแวดล้อมได้อย่างปลอดภัย โดยไม่มีการแพร่กระจายเชื้อลงสู่แหล่งธรรมชาติ

ดังนั้นผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำจากใบชะมวงที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดจำนวน *S. Typhimurium* ATCC 13311 ที่จำลองการปนเปื้อนบนใบผักกาดหอมอินทรีย์ และในน้ำล้างผักได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยตรวจไม่พบ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ทั้งบนตัวอย่างใบผักและในน้ำที่ล้างผักด้วยสารสกัดนาน 15 นาที ดังนั้นสารสกัดด้วยน้ำจากใบชะมวงจึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการนำสารจากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ล้างผักในครัวเรือนได้โดยไม่เป็นพิษทั้งต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม

เอกสารอ้างอิง

1. Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsrose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC, *et al.* Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8: 887-900.
2. Angkititrakul S, Chomvarin C, Chaita T, Kanistanon K, Waeth-ewutajarn S. Epidemiology of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from pork, chicken meat and humans in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36: 1510-5.
3. Fedorka-Cray PJ, Ladely SR, Bailey JS, Stern NJ. Colonization of broiler chicks by *Salmonella typhimurium* definitive phage type 104. *J Food Prot* 2001; 64: 1698-704.
4. Wilson IG. Antimicrobial resistance of *Salmonella* in raw retail chickens, imported chicken portions, and human clinical specimens. *J Food Prot* 2004; 67: 1220-5.
5. Natvig EE, Ingham SC, Ingham BH, Cooperband LR, Roper TR. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 2737-44.
6. Quiroz-Santiago C, Rodas-Suárez OR, Carlos R V, Fernández FJ, Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas C. Prevalence of *Salmonella* in vegetables from Mexico. *J Food Prot* 2009; 72: 1279-82.
7. Raufu IA, Zongur L, Lawan FA, Bello HS, Adamu MS, Ameh JA, *et al.* Prevalence and antimicrobial profiles of *Salmonella* serovars from vegetables in Maiduguri, North eastern Nigeria. *Sokoto J Vet Sci* 2014; 12: 23-8.
8. Lertworapreecha M, Sutthimusik S, Tontika-pong K. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* isolated from pork, chicken, and vegetables in Southern Thailand. *Jundishapur J Microbiol* 2013; 6: 36-41.
9. Hemshekhar M, Sunitha K, Santhosh MS, Devaraja S, Kemparaju K, Vishwanath BS, *et al.* An overview on genus *Garcinia*: phytochemical and therapeutical aspects. *Phytochem Rev* 2011; 10: 325-51.
10. Mahabusarakam W, Chairerk P, Taylor WC. Xanthenes from *Garcinia cowa* Roxb. latex. *Phytochemistry* 2005; 66: 1148-53.
11. Panthong K, Hutadilok-Towatana N, Panthong A. Cowaxanthone F, a new tetraoxygenated xanthone, and other anti-inflammatory and antioxidant compounds from *Garcinia cowa*. *Can J Chem* 2009; 87: 1636-40.
12. Nanasombat S, Teckchuen N. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *J Med Plant Res* 2009; 3: 443-9.
13. Mongkhonkaew P. *In vitro* antimicrobial activity of *Garcinia cowa* leaf extract against selected food-borne pathogens [Bachelor's senior project, Microbiology]. Faculty of Science: Burapha University; 2015.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, 11 th ed. 2012. Pennsylvania: Wayne.

15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standar, 9 th ed. 2012. Pennsylvania: Wayne.
16. Beattie GA, Lindow SE. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology* 1999; 89: 353-9.
17. Serrano M, Zilhão R, Ricca E, Ozin AJ, Moran Jr. CP, Henriques AO. A *Bacillus subtilis* secreted protein with a role in endospore coat assembly and function. *J Bacteriol* 1999; 181: 3632-43.
18. Jena BS, Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakaria KK. Chemistry and biochemistry of (-)-hydroxycitric acid from *Garcinia*. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 10-2.