

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา จากสารสกัดใบผักขาว

Antibacterial and antifungal activities Fak Khaao leaf extract

■ บงกชวรรณ สุตะพาหะ¹ บรรยง คันทวะ²
Bongkotwan Sutabhaha¹ Banyong Khantawa²

¹ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

² คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

ผักขาวเป็นพืชไทยพื้นเมืองที่ใช้เป็นอาหารและแพทย์แผนไทยให้มีความสำคัญในการใช้เป็นยาต้านจุลชีพ ต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระและลดน้ำตาลในเลือด เป็นต้น การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดใบผักขาวก่อนนำไปพัฒนาตำรับยารักษาโรคผิวหนัง จากการสกัดด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอล และเมทานอล และทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดด้วยวิธี Agar well diffusion method และ Agar dilution method ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดใบผักขาวที่สกัดด้วยเฮกเซนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* และ *Escherichia coli*) และเชื้อรา (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*) ที่ใช้ในการทดสอบได้ ส่วนสารสกัดจากเมทานอลแม้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด และเชื้อรา *C. albicans* และ *A. flavus* แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรากลุ่มอื่นทั้ง 4 ชนิดได้ (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*, *E. floccosum*, MIC= 78.125–312.5 mg/mL: zone size 12.2±2.1 mm -15.0± 0.5 mm) ขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอล และเอทิลอะซิเตทยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดแกรมบวก (*S. aureus*, *S. pyogenes*) และเชื้อรากลุ่มอื่นทั้ง 4 ชนิด โดยมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา (MIC= 156.250 – 312.5 mg/mL: zone size 12.0±0.5-24.0±1.5 mm) ดีกว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (MIC=625.0 mg/mL: zone size 12.0±0.5 -14.0±0.5 mm)

คำรหัส: ผักขาว (สารสกัดใบ) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา รักษาโรคผิวหนัง

Abstract

Fak Khaao, Thai local plant name was used for dietary as well as Thai traditional medicine. It has been shown to have antimicrobial activity, anticancer, antioxidant agents and antidiabetes. The aims of this work were to study antibacterial and antifungal activities of Fak khaao leave extract in order to develop leave extract preparation for skin treatment. Fak khaao leave was extracted by 4 different media including hexane, ethyl acetate, ethanol and methanol. Antimicrobial activity was studied by agar well diffusion method and agar dilution method. The result showed that hexane extract has no effect on bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli*) or fungi (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*) tested. Methanol extract, though had no effect on bacteria or some fungi (*C. albicans* and *A. flavus*), but significantly inhibited 4 pathogenic fungi tested (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*, *E. floccosum*, MIC= 78.125-312.5 mg/mL: zone size 12.2±2.1 mm -15.0±0.5 mm). However ethanol and ethyl acetate extracts showed antibacterial activity on gram positive bacteria tested (*S. aureus*, *S. pyogenes*) and antifungal activity against 4 pathogenic fungi tested (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*, *E. floccosum*). The antifungal activity (MIC= 156.2-312.5 mg/mL with zone size 12.0±0.5-24.0±1.5 mm) was more active than antibacterial activity (MIC= 625.0 mg/ml with zone size 12.0 ± 0.5 – 14.0±0.5 mm.)

Keywords: Fak khaao (leaf extract), antimicrobial activity, treatment of skin disease

บทนำ

การส่งเสริมความพร้อมทางด้านการผลิตยารักษาโรค เป็นแผนหนึ่งของการพัฒนาสาธารณสุขในแผนพัฒนาประเทศ แต่ยังคงประสบปัญหาที่ยังไม่สามารถผลิตด้วยยาสำคัญที่มีฤทธิ์รักษาได้ ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศเป็นหลัก ทำให้เสียดุลการค้าต่างประเทศปีละนับหมื่นล้านบาท โดยเฉพาะเพื่อรักษาโรคที่เป็นกันบ่อยมากในหมู่คนไทย เช่นโรคผิวหนัง เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้น จึงส่งเสริมให้จุลชีพก่อโรคเจริญเติบโตได้ดี แบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนังที่พบบ่อยได้แก่เชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* ส่วนเชื้อราได้แก่เชื้อในกลุ่ม *Dermatophytes* (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*) พักข้าวเป็นชื่อที่ใช้เรียกกันในภาคกลาง มีชื่อพื้นเมืองว่าข้ากเครือ (ปัตตานี) ผักขาว (ภาคเหนือ) พุดู่เดาะ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng อยู่ในวงศ์ CUCURBITACEAE เป็นไม้เถาเลื้อย พาดพันต้นไม้ใหญ่หรือรั้วบ้าน เถาสีเขียวอมเหลือง ผิวของเถา มีเมล็ดสีขาวเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไป ใบเป็นใบเดี่ยวคล้ายใบโพธิ์ มีหนวดไว้สำหรับเกาะ ดอกตัวผู้สีเหลืองมีกลีบดอกรูปไข่ 5 กลีบ ดอกตัวเมียมีขนาดเล็กกว่า ผลมีรูปร่างกลมรีเนื้อแน่น ฉ่ำน้ำ มีหนามเล็กอยู่บริเวณผิวรอบผล ผลดิบสีเหลืองผลสุกสีแดงหรือแดงส้ม ออกดอกตลอดปี พักข้าวมีถิ่นกำเนิดในเอเชียเขตร้อน พบในป่ากร้างทั่วไปในประเทศไทย ลาว เขมร พม่า และประเทศอื่นๆ ในเขตร้อน ออกดอกตลอดปี มีสรรพคุณความเชื่อว่ารากดับพิษ แก้ผม่วง คุมกำเนิด ช้ำเหา สระผมแทนแชมพู ไบรสมขมเย็น ดับพิษ แก้ไข้ แก้ท้องเสียต่างๆ แก้ปวดบวม แก้พิษแมลงตาะบาดต่อย และใช้เป็นอาหาร เมล็ดแก้หูด ฝีมะม่วง บำรุงปอด แก้ไอริดสีดวงทวาร¹ จากการศึกษาพบว่าองค์ประกอบของสารสกัดจากใบพักข้าวที่เป็น circular protein มีฤทธิ์ antimicrobial อย่างแรง² น้ำมันจากเมล็ดพักข้าวมีฤทธิ์ยับยั้งมอด แมลงด้วง และสารสกัดจากเมล็ดพักข้าวมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidative activity)³ พักข้าวที่สกัดด้วยน้ำยับยั้งการเจริญของ colon 26-20 adenoma cell line และลดการแบ่งตัวของ colon 26-20 และ HepG2 cell line ได้อย่างมีนัยสำคัญ Iwamoto M. และคณะพบว่าใบพักข้าวมีสารสำคัญกลุ่ม saponin และ phenolic compound คล้ายที่พบในส่วนของ เมล็ดและราก^{4,5} นอกจากนี้ยังพบสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ด้านมะเร็ง และไวรัส เมื่อทำให้แห้งมีฤทธิ์ยับยั้งน้ำตาลในเลือดสูง กระตุ้นให้มดลูกบีบตัว กระตุ้นเอนไซม์ alcohol dehydrogenase และ aldehyde dehydrogenase ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก รบกวนการกินอาหารของแมลง เป็นพิษต่อเซลล์โปรตีนจากต้นมีฤทธิ์ต้านการขยายพันธุ์และการเจริญเติบโตของเชื้อ HIV-1 สารสกัดจากใบที่สกัดด้วย 50% เอทานอล เมื่อ

นำมาให้หนูกินหรือฉีดเข้าใต้ผิวหนังปริมาณ 10 กรัม/กก. ไม่พบความเป็นพิษ นอกจากนี้ พรสวรรค์ ดิษยบุตร ยัง พบว่า ส่วนสกัดเชื้อของใบพักข้าวมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายชนิด (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhae* และ *Bacillus subtilis*)⁶

จากข้อมูลข้างต้นทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราในสารสกัดใบพักข้าวจากตัวกลาง 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทานอล เอทิลอะซิเตท และเมทานอล เพื่อพัฒนาผลการวิจัยเป็นตำรับยาเกี่ยวกับผิวหนังต่อไป เป็นการลดการนำเข้าของยาสังเคราะห์และกระตุ้นเศรษฐกิจของชาติอีกทางหนึ่ง รวมถึงส่งเสริมให้มีการอนุรักษ์ขยายพันธุ์และประชาสัมพันธ์ให้ทราบถึงคุณค่าของพักข้าวพืชสมุนไพรที่ยังมีผู้น้อยมากในปัจจุบัน เหตุผลและที่มาของการเลือกศึกษาสารสกัดจากส่วนใบ คือ ส่วนของใบไม่ได้ใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์เหมือนเมล็ดผลรากหรือลำต้นจึงไม่ทำลายพันธุ์พืช นอกจากนี้การตัดแต่งใบยังเป็นการช่วยกระตุ้นการแตกแขนงขึ้นมาทดแทนอีกด้วย

วัตถุประสงค์และวิธีการทดลอง

1. เตรียมสารสกัดจากใบพักข้าว

ใบพักข้าวสดที่ล้างสะอาดนำไปอบแห้งที่ 50°C แล้วบดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร จากนั้นสกัดด้วย hexane, ethanol, methanol หรือ ethyl acetate โดยวิธี maceration หมักนาน 3 วันด้วยการคนทุกวัน กำจัด solvent ในสารสกัดโดย rotary evaporator จนได้สารสกัดจากใบพักข้าวเก็บในขวดแก้วปิดสนิท ไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ในการศึกษารั้งนี้ใช้ DMSO (Dimethyl sulfoxide) เป็นตัว ทำละลาย โดยมี Tween 80, Span 80, PG (polyethylene glycol) เป็นตัว ทำละลายร่วมและคำนวณหาปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ละลายสารสกัด 1 กรัมได้หมดพอดี

2. ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากใบพักข้าว

จุลชีพที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้แก่เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ATCC 25922 เชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 (ใช้ความเข้มข้นในการทดลองของเชื้อกลุ่มนี้เทียบกับ McFarland standard No. 0.5) เชื้อโมลต์ *Aspergillus flavus*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* และ *Epidermophyton floccosum* (ใช้ความเข้มข้นในการทดลองของเชื้อกลุ่มโมลต์เทียบกับ McFarland standard

No. 1.0) ทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion method และ Agar dilution method ใช้ Muller-Hinton agar เป็นอาหารสำหรับเชื้อแบคทีเรีย และ Sabouraud's dextrose agar สำหรับเชื้อราโดยใช้หลอดแก้วทดลองสำหรับเชื้อจางสารสกัดขนาด 13 x 10 มิลลิเมตร

3. การทดสอบผลของสารสกัด

3.1 การเตรียมสารละลายสารสกัดใบผักขาวที่

ความเข้มข้นต่างๆ

1. ละลายสารสกัดใบผักขาวที่สกัดด้วย hexane ด้วย DMSO จากนั้นเจือจางเป็น two fold dilution ด้วยน้ำกลั่น เริ่มต้นความเข้มข้นแรก 2,500 mg/mL ถึงหลอดสุดท้ายที่ ความเข้มข้น 2.44 mg/mL
2. ดำเนินการเช่นเดียวกับในข้อ 1 กับสารที่สกัดด้วย ethyl acetate, ethanol, methanol

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วย

Agar well diffusion method

1. ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของสารสกัดใบผักขาว นำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบน blood agar และเชื้อยีสต์ที่เจริญบน Sabouraud's dextrose agar ข้ามคืนไปกระจายตัวใน Trypticase soy broth 1 mL ให้มีความขุ่นเทียบเท่า McFarland standard No.0.5 (ประมาณ 1×10^8 CFU/mL) นำไม้พ่นสาลีจุ่มเชื้อ ปิดข้างหลอดแก้วพองหมดแล้วนำไปเปลี่ยนให้ทั่วผิวหน้าของ Mueller-Hinton agar/Sabouraud's dextrose agar จากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 mm แล้วหยดสารสกัดที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 ปริมาณ 100 μ L ปุ่มเพาะเลี้ยงในตู้ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำออกมาอ่านผลโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone
2. ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของกลุ่มโมลต์ของสารสกัดใบผักขาว นำเชื้อราที่เจริญบน Sabouraud's dextrose agar ที่เพาะเลี้ยงไว้ 1 สัปดาห์ (*Aspergillus flavus*) และ 2 สัปดาห์ (Dermatophytes) ไปกระจายตัวใน Sabouraud's dextrose broth 1 mL ให้มีความขุ่นเทียบเท่า McFarland standard No. 1.0 นำไม้พ่นสาลีจุ่มเชื้อ ปิดข้างหลอดแก้วพองหมดแล้วนำไปเปลี่ยนให้ทั่วผิวหน้าของ Sabouraud's dextrose agar จากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 mm แล้วหยดสารสกัดที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 ปริมาณ 100 μ L นำไปปุ่มเพาะเลี้ยงในตู้ 25°C เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ นำออกมาอ่านผลโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วย

Agar dilution method

1. ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของสารสกัด ใบผักขาว เตรียมจานอาหาร Mueller-Hinton agar/Sabouraud's dextrose agar ที่มีสารสกัดใบผักขาวด้วยความเข้มข้นตั้งแต่ 2,500 mg/mL จนถึง 2.44 mg/mL ด้วยการทำ two-fold dilution ทั้งไว้จน agar แข็งตัว หลังจากนั้นเตรียมเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราโดยวิธีเดียวกับในข้อ 3.2 ใช้ metal inoculator ขนาดความจุ 1 μ L ถ่ายเชื้อไปแต่ละบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar/Sabouraud's dextrose agar ที่มีสารสกัดของใบผักขาวผสมอยู่ โดยเริ่มจากอาหารที่ไม่มีสารสกัดและมีสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่ำก่อน หลังจากนั้นนำทั้งหมดไปเก็บเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากใบผักขาวที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Minimum inhibition concentration, MIC)
2. ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราในกลุ่มโมลต์ของสารสกัดใบผักขาว^{7,8} ดำเนินการเช่นเดียวกับในข้อ 1 แต่ใช้จานอาหาร Saouraud's dextrose agar แทน Mueller-Hinton agar เพาะเลี้ยงที่ 25°C เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์
หมายเหตุ: ใช้ยามาตรฐานเป็น positive control ส่วนน้ำกลั่น สารสกัด และตัวทำละลาย เป็น negative control กับทุกการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดใบผักขาว

ผลการทดลอง

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบผักขาว

สารที่สกัดด้วย hexane และ methanol ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทุกชนิดที่ใช้ทดสอบไม่ว่าจะเป็นเชื้อแกรมบวก (*S.aureus*, *S. pyogenes*) หรือเชื้อแกรมลบ (*E. coli*) สารที่สกัดด้วย ethyl acetate ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.aureus* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ 625 mg/mL : zone size 12.0 ± 0.5 mm (ตารางที่ 1) ส่วนสารที่สกัดด้วย ethanol ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. pyogenes* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ 625 mg/mL : zone size 14.0 ± 0.5 mm (ตารางที่ 2)

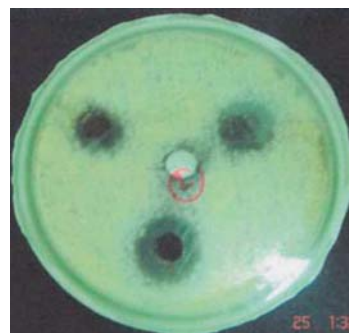
ฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากใบผักขาว

สารที่สกัดด้วย hexane ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ไม่ว่าจะเป็นเชื้อยีสต์ (*C. albicans*) กลุ่มราสายที่เป็นราปนเปื้อนในอากาศ (*A. flavus*) หรือกลุ่มราสายที่ก่อโรคกลาก (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*, *E. floccosum*)

สารที่สกัดด้วย ethyl acetate, ethanol และ methanol มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เฉพาะในกลุ่มราก่อโรคกลาก (ตารางที่ 3 - 6) โดยสารที่สกัดด้วย ethyl acetate ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* และ *E. floccosum* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ 312.5 mg/mL : zone size 20 ± 0.6 mm, 23.2 ± 0.6 mm และ 22.2 ± 0.5 mm ตามลำดับ และยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. gypseum* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ 156.25 mg/mL : zone size 22.7 ± 1.2 mm สารที่สกัดด้วย ethanol ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* และ *E. floccosum* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ 312.5 mg/mL : zone size 23.0 ± 0.5 mm, 24.0 ± 1.5 mm, 12.0 ± 0.5 mm ตามลำดับ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. gypseum* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ 156.25 mg/mL : zone size 22.0 ± 2.0 mm สารที่สกัดด้วย methanol ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* และ *E. floccosum* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ 156.250 mg/mL : zone size 15.0 ± 0.5 mm, 13 ± 0.5 mm และ 13.0 ± 0.5 mm ตามลำดับ และยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. gypseum* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ 78.125 mg/mL : zone size 12.2 ± 2.1 mm



รูปที่ 1 ลักษณะใบของผักขำ



รูปที่ 2 แสดง inhibition zone ของสารสกัดใบผักขำด้วย Methanol กับเชื้อ *Microsporum gypseum*

ตารางที่ 1ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดใบผักขำจากสารที่ใช้สกัด

สารสกัด	MIC* (mg/mL) /Zone size (mm)
Hexane fraction	625.0 / 12.0 ± 0.5
Ethyl acetate fraction	No zone
Ethanol fraction	No zone
Methanol fraction	No zone
Tween 80	No zone
Span 80	No zone
PG	No zone
DMSO	No zone

*MIC = minimum inhibition concentration

ตารางที่ 2ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ของสารสกัดใบผักขำจากสารที่ใช้สกัด

สารสกัด	MIC* (mg/mL) /Zone size (mm)
Hexane fraction	No zone
Ethyl acetate fraction	No zone
Ethanol fraction	$625.0/14.0 \pm 0.5$
Methanol fraction	No zone
Tween 80	No zone
Span 80	No zone
PG	No zone
DMSO	No zone

*MIC = minimum inhibition concentration

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Trichophyton rubrum* ของสารสกัดใบผักขาวจากสารที่ใช้สกัด

สารสกัด	MIC* (mg/mL) /Zone size (mm)
Hexane fraction	No zone
Ethyl acetate fraction	312.5/20.0±0.6
Ethanol fraction	312.5/23.0±0.5
Methanol fraction	156.25/15.0±0.5
Tween 80	No zone
Span 80	No zone
PG	No zone
DMSO	No zone

*MIC = minimum inhibition concentration

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Trichophyton mentagrophytes* ของสารสกัดใบผักขาวจากสารที่ใช้สกัด

สารสกัด	MIC* (mg/mL) /Zone size (mm)
Hexane fraction	No zone
Ethyl acetate fraction	312.5/23.2±0.6
Ethanol fraction	312.5/24.0±1.5
Methanol fraction	156.25/13.0±0.5
Tween 80	No zone
Span 80	No zone
PG	No zone
DMSO	No zone

*MIC = minimum inhibition concentration

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Microsporum gypseum* ของสารสกัดใบผักขาวจากสารที่ใช้สกัด

สารสกัด	MIC* (mg/mL) /Zone size (mm)
Hexane fraction	No zone
Ethyl acetate fraction	156.25/22.7±1.2
Ethanol fraction	156.25/22.0±2.0
Methanol fraction	78.125/12.2±2.1
Tween 80	No zone
Span 80	No zone
PG	No zone
DMSO	No zone

*MIC = minimum inhibition concentration

ตารางที่ 6ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Epidermophyton floccosum* ของสารสกัดใบผักขาวจากสารที่ใช้สกัด

สารสกัด	MIC* (mg/mL) /Zone size (mm)
Hexane fraction	No zone
Ethyl acetate fraction	312.5/22.2±0.5
Ethanol fraction	312.5/12.0±0.5
Methanol fraction	156.25/13.0±0.5
Tween 80	No zone
Span 80	No zone
PG	No zone
DMSO	No zone

*MIC = minimum inhibition concentration

อภิปรายผล

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของใบผักขาวในครั้งนี้ เริ่มจากการตรวจเอกลักษณ์ทางพฤกษอนุกรมวิธาน (plant taxonomy) และเภสัชเวท (pharmacognostic identification) ตลอดจนศึกษาสมบัติเคมีกายภาพของสารสกัดใบผักขาวที่ได้จากตัวทำละลายต่างๆ ผลการศึกษาคุณสมบัติ การละลายความเป็นกรด ต่าง และความคงสภาพของสารสกัด พบว่าสารที่สกัดได้มีลักษณะภายนอกและความหนืดใกล้เคียงกันแต่มีสมบัติการละลายที่แตกต่างกัน สารสกัดใบผักขาวแต่ละ fraction มี pH แตกต่าง (hexane fraction pH = 7.2, ethyl acetate fraction pH = 6.7, ethanol fraction pH = 8.0, methanol fraction pH = 8.3) แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบภายในของแต่ละ fraction มีความแตกต่างกันและส่งผลกระทบต่อความสมารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ต่างกันด้วย การสกัดที่ใช้หลักการ maceration จะได้สารลักษณะคล้ายกัน คือเป็นสารสีเขียวลำกึ่งแข็งเหนียว ในการทดลองได้ใช้ DMSO เป็นตัวเจือจางสารสกัดให้มีความเข้มข้น 50% ก่อนนำไปทดสอบกับเชื้อ โดยใช้ส่วนผสมของ PEG และ Tween 80 (อัตราส่วน 1:1) เป็น cosolvent ใน hexane fraction และใช้ส่วนผสม Tween 80 และ Span 80 (อัตราส่วน 1:1) เป็น cosolvent ใน ethyl acetate fraction ส่วน ethanol และ methanol fraction สามารถผสมกับ DMSO โดยไม่ต้องใช้ cosolvent

จากการศึกษาของพรสวรรค์ ดิษยบุตร พบว่าส่วนสกัดคือเทอร์ของใบผักขาวมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายชนิด⁶ เช่น *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhae*. ในการทดลองจึงได้เลือกใช้ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Streptococcus pyogenes* เป็นตัวแทนแบคทีเรียชนิดแกรม

บวกและใช้ *Escherichia coli* ATCC25922 เป็นตัวแทนแบคทีเรียชนิดแกรมลบ สำหรับเชื้อราได้เลือกใช้เชื้อ *Candida albicans* ATCC 90028 เป็นตัวแทนยีสต์ เชื้อ *Aspergillus flavus* เป็นตัวแทนราปนเปื้อนที่เจริญเร็วและเชื้อรากลุ่ม *dermatophytes* ได้แก่ *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* และ *Epidermophyton floccosum* เป็นตัวแทนเชื้อราก่อโรคผิวหนังของผู้ป่วยโรคกลาก (dermatophytoses) ซึ่งแยกได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผู้ป่วยกลุ่มนี้ตรวจพบสายร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากสิ่งส่งตรวจที่ขูดได้จากรอยโรคที่ผิวหนัง เล็บ หรือจาก ขน ผม เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบน Mycosel agar ที่ 25°C ประมาณ 2 สัปดาห์ จะได้โคโคนีสขาว หรือน้ำตาลอ่อน และเมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบสายร่ายร่วมกับสปอร์ ขนาดใหญ่ (macroconidia) และขนาดเล็ก (microconidia) มีลักษณะต่างกันตามชนิดของเชื้อ เชื้อมีความสามารถย่อยเคอราตินซึ่งเป็นส่วนประกอบของหนังกำพร้า ขน ผม และเล็บให้เปลี่ยนเป็นอมิโนโปรตีนที่จำเป็นต่อการแบ่งตัว ผลจากการทดลองพบว่าสารสกัดในตัวทำละลาย hexane มีปัญหาการละลายที่ไม่เข้ากันกับน้ำ ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ยากต่อการกระจายของสารสกัดจึงอาจเป็นเหตุหนึ่งที่ทำให้ไม่ปรากฏฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งแบคทีเรียและรา ขณะที่ fraction อื่นไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*, *Candida albicans* และ *Aspergillus flavus* ได้เช่นกัน แม้ว่าสารสกัด ethyl acetate และ ethanol fraction จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ (MIC = 625.0 mg/mL) แต่ไม่แรงเท่าฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มที่ก่อ โรคกลาก (MIC=156.25-312.5 mg/mL) ที่ให้ inhibition zone ที่กว้างกว่า ethyl acetate และ ethanol fraction ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *T. rubrum*, *T. men-*

tagrophytes และ *E. floccosum* ที่เหมือนกัน โดยมีค่า MIC ที่ 312.5 mg/mL และกับเชื้อ *M. gypseum* ที่ค่า MIC 156.25 mg/mL ส่วน methanol fraction มีฤทธิ์ยับยั้งกับเชื้อทั้งสามชนิดได้ดีกว่า (MIC=156.25 mg/mL) และให้ฤทธิ์ได้ดีที่สุดกับเชื้อ *M. gypseum* ที่ค่า MIC= 78.125 mg/mL อย่างไรก็ตามแม้ methanol fraction จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคกลากได้ดีกว่าแต่ inhibition zone ใน MIC ที่แคบกว่า (12.2/22.0 - 22.7) ดังนั้นจากค่า MIC และ inhibition zone ที่ทดลองได้ทำให้สรุปได้ว่า สารสกัดจากใบผักขำในส่วน ethyl acetate fraction, ethanol fraction และ methanol fraction ให้ฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่ม dermatophytes ได้ดี จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้เพื่อศึกษาขั้นตอนการพัฒนาเป็นตำรับยาทาภายนอกต้านเชื้อราก่อโรคผิวหนังต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ สมพร ภูติยานันต์ รองศาสตราจารย์ ภกญ. ศิริพร โอโกโนกิ อาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม และรองศาสตราจารย์ ภกญ. เกสร นันทจิต อาจารย์ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเตรียมสารสกัดและตรวจสอบคุณสมบัติสารสกัดใบผักขำที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Putiyanann S. 2003. Basic Knowledge of Thai Traditional Medicine. Chiang Mai University, Chiang Mai.
2. Yeung H.W., Ng TB, Wong NS and Li WW. 1987. Isolation and characterization of an abortifacient protein, momorcochin from root tubers of *Momordica cochinchinensis* (family cucurbitaceae), International Journal of Peptide and Protein Research, 1987; 30(1): 135-40.
3. Jacobson M., Crystal MM and Kleiman R. Effectiveness of several polyunsaturated seed oils as boll weevil feeding deterrents. *J. Am Oil Chem Soc*, 1981; 54(11): 982-3.
4. Iwamoto Masayo, Okabe Hikaru, Yamauchi Tatsuo, Tanaka Masako. Studies on the constituents of *Momordica cochinchinensis* Spreng. 1985a Isolation and characterization of the seed saponin, momordica saponin I and II. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1985a; 33(2): 464-78.
5. Iwamoto Masayo, Okabe Hikaru, Yamauchi Tatsuo. Studies on the constituents of *Momordica cochinchinensis* Spreng II. Isolation and characterization of root saponin, momordin I, II and III. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1985b; 33(1): 1-7.
6. พรสวรรค์ ดิษยนตร. การศึกษาคุณสมบัติการฆ่าเชื้อโรคของสมุนไพรไทยบางชนิด บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 2518 หน้า 59-103.
7. Fisher F and Cook NB. Fundamentals of Diagnostic Mycology. W.W. Saunder Company, Philadelphia, 1998.
8. Mc. Ginnis MR. Laboratory Handbook of Medically Mycology. Academic Press, New York, 1980.

