

นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของสารสกัดจากผลผักข้าวตอกต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นบนผิวหนัง *Staphylococcus Epidermidis* และยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *Staphylococcus Aureus*

ศุภฤกษ์ จิรขวาลา⁽¹⁾, สุกัญญา ศรีจำปา⁽²⁾, พัทธภรณ์ ทิพย์วัฒน์⁽²⁾, รัฐพล ไกรกลาง^{(3)*}

วันที่ได้รับต้นฉบับ: 16 กันยายน 2565

บทคัดย่อ

วันที่ตอบรับการตีพิมพ์: 31 ตุลาคม 2565

* ผู้รับผิดชอบบทความ

(1) นักศึกษาหลักสูตรสาธารณสุขศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาโภชนาการเพื่อสุขภาพ

คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

(2) สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

(3) สาขาวิชาการบริหารสาธารณสุข การส่งเสริมสุขภาพ

โภชนาการ คณะสาธารณสุขศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผักข้าว (Momordica Cochinchinensis (Lour.) Spreng.) เป็นพืชที่อุดมไปด้วยสารสำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ในขณะที่เดียวกันมีประโยชน์ต่อการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก เช่น เชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งช่วยป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคบนผิวหนัง โดยการศึกษาเป็นการวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดจากผักข้าว รวมถึงฤทธิ์การส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* ซึ่งส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค *Staphylococcus aureus* จากการศึกษาพบว่า เยื่อหุ้มเซลล์ได้ปริมาณสารสกัดสูงสุดที่ร้อยละ 32.35 ± 2.23 และสารสกัดส่วนเปลือกชั้นนอกมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดที่ (29.17 ± 0.28) มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้ง) ขณะที่สารสกัดส่วนเยื่อหุ้มเซลล์มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงสุดที่ (18.28 ± 0.89) มิลลิกรัมสมมูลกรดเคอิจิโน/กรัมน้ำหนักแห้ง) และพบว่าสารสกัดส่วนเปลือกชั้นนอกมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ดีที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ที่ 50.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ ที่ 100.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และในส่วนของทดสอบการส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกชั้นนอกที่ 12.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่งเสริมให้เชื้อ *S. epidermidis* เจริญเติบโตได้ดีใกล้เคียงกลุ่มควบคุม ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อนำ cell free supernatant ไปเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* กลับส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *S. aureus* ต่ำที่สุด ($21.43 \pm 7.34\%$) จากการค้นพบครั้งนี้บ่งชี้ถึงคุณประโยชน์ผักข้าวในแง่ของการควบคุมเชื้อก่อโรคบนผิวหนัง และสามารถนำไปต่อยอดเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์นอมนมผิวเพื่อสุขภาพในอนาคต

คำสำคัญ: ผักข้าว, เชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น, เชื้อก่อโรค, สแตปฟีโลคอคคัส อีพิเดอร์มิดิส, สแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส

Original Article

Effect of Gac Fruit Extracts on Growth of Skin Commensal Bacteria *Staphylococcus Epidermidis* and Growth Inhibition of Pathogenic Bacteria *Staphylococcus Aureus*

Supharoek Chirachawala⁽¹⁾, Sukanya Srijumpa⁽²⁾, Patcharaporn Tippayawat⁽²⁾, Ratthaphol Kraiklang^{(3)*}

Received Date: September 16, 2022

Accepted Date: October 31, 2022

Abstract

Gac fruit (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.) is a plant that contained with various kind of importance substances, especially, phenolic and flavonoid compounds, which has antioxidant activity and antimicrobial activity, against pathogenic bacteria. Concurrently, it is beneficial for the growth of probiotics such as *Staphylococcus epidermidis*, which prevents pathogenic microorganisms on the skin. This study was an experimental research in a laboratory which aimed to determine the total phenolic and total flavonoids compounds of gac fruit extract, including the growth-promoting effect of *S. epidermidis*, which affects to inhibit of the growth of *Staphylococcus aureus*. The results revealed that the aril has the highest extract content was $32.35\% \pm 2.23\%$, and the highest total phenolic content found in the peel extract (29.17 ± 0.28 mg GAE/g DW) and highest flavonoid content found in the aril extract (18.28 ± 0.89 mg QE/g DW). It was found that the extracts of the peel had the highest antibacterial activity, with the minimum inhibitory concentration at 50.00 mg/ml and the minimum bactericidal concentration at 100.00 mg/ml. The growth-promoting effect of *S. epidermidis*, the peel extracts had been used. At the concentration as 12.50 mg/ml can promote the growth of *S. epidermidis* similar to the control group. In addition, the result indicated that the lowest of %bacteria survival rate was observed when used cell free supernatant from this condition to co-culture with *S. aureus* ($21.43 \pm 7.34\%$). This discovery indicates the benefits of gac fruit in terms of controlling skin pathogens and might be further developed for the development of healthy skin care products in the future.

Keywords: Gac, Commensal Bacteria, Pathogenic Bacteria, *Staphylococcus Epidermidis*, *Staphylococcus Aureus*

* Corresponding author

(1) Master of Public Health Student in
Nutrition for Health,

Faculty of Public Health, Khon Kaen University

(2) Department of Associated Medical Science,
Faculty of Associated Medical Science,
Khon Kaen University

(3) Department of Public Health Administration,
Health Promotion, and Nutrition,
Faculty of Public Health,
Khon Kaen University

บทนำ

ฟักข้าว (*Momordica Cochinchinensis* (Lour.) Spreng.) ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้เถาแก่ของเอเชีย พบได้มากในทางตอนใต้ของเอเชีย โดยเฉพาะแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จัดอยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกันกับแตงกวาและมะระ ฟักข้าวเป็นพืชที่ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอาหารและยาสมุนไพร เนื่องจากฟักข้าวอุดมไปด้วยสารที่เป็นประโยชน์ ได้แก่ กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (ไลโคปีนและบีตา-แคโรทีน) และสารประกอบฟีนอลิก (ฟลาโวนอยด์) เป็นต้น สารสกัดจากฟักข้าวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ยับยั้งเนื้องอก ลดการอักเสบ และยับยั้งการเจริญและลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งต่างๆ โดยเฉพาะมะเร็งผิวหนัง (วิเชษฐ์ลีลามานิตย์, 2557) นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบฟีนอลิก เช่น gallic, ferulic และ protocatechuic acids ที่พบในฟักข้าวมีผลต่อการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก (Pacheco-Ordaz et al., 2018) เช่นเดียวกับสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (Sukumaran et al., 2011) ซึ่งกลไกการทำงานของสารประกอบฟีนอลิกต่อเซลล์ของแบคทีเรีย โดยสารประกอบฟีนอลิกจะทำความเสียหายแก่เยื่อหุ้มเซลล์บางส่วน และยับยั้งปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ เช่น เอนไซม์และสารพิษ และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม รวมทั้งทำให้โปรตีนเสียสภาพ ยิ่งกว่านั้นสารประกอบฟีนอลิกบางตัวในธรรมชาติ นอกจากมีการต้านแบคทีเรียโดยตรงแล้ว เมื่อนำมาใช้ร่วมกับเคมีบำบัดทั่วไปจะส่งผลให้มีการส่งเสริมฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมากขึ้นอีกด้วย (Majdanik et al., 2018) โดยปริมาณของสารประกอบทั้งสองมักแปรผันตรงกับฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย (Xiaoyong et al., 2014) จากข้อมูลดังกล่าว ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดจากฟักข้าวมาใช้เพื่อต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค และมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เพื่อเป็นสารในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ณ ปัจจุบันจึงทำให้ฟักข้าวถูกนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบ

ของอาหารเสริม เวชสำอาง และเภสัชภัณฑ์บำรุงผิว

ผิวหนังนั้นทำหน้าที่ช่วยป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้เข้าสู่ร่างกายและก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคได้ โดยอาศัยคุณลักษณะต่าง ๆ ที่พบบนผิวหนัง เช่น แบคทีเรียประจำถิ่นบนผิวหนัง น้ำมันจากต่อมไขมัน ความเป็นกรดต่างของผิวหนัง และผิวหนังชั้นหนังกำพร้า เป็นต้น โดยเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นนี้จะทำหน้าที่ดักจับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อโรคก่อความเสียหายแก่ร่างกายได้ เช่น *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนัง โดย *S. epidermidis* มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก (probiotic) ช่วยในการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* และ group A Streptococcus (GAS) ซึ่งส่งผลดีต่อภูมิคุ้มกันของผิวหนัง โดยลดการอักเสบของผิวหนัง หลังจากผิวหนังได้รับบาดเจ็บหรือมีบาดแผล และลดการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งผิวหนัง (Nakatsuji et al., 2018) จากบริบทดังกล่าวจึงทำให้เกิดการศึกษาวิจัยที่จะทำการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้สารสกัดจากพืช ซึ่งการใช้สารสกัดจากพืชที่อุดมไปด้วยสารประกอบโพลีฟีนอล มีส่วนในการเจริญเติบโตของเชื้อโพรไบโอติก โดยพบว่าสารโพลีฟีนอลช่วยกระตุ้นการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย (Ozdalet al., 2016)

จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดจากพืชมาช่วยปรับสมดุลเชื้อจุลินทรีย์บนผิวหนัง ในการศึกษาในครั้งนี้จึงสนใจที่จะนำสารสกัดจากพืชที่เพาะปลูกในประเทศไทย เช่น ฟักข้าว ซึ่งมีการนำมาพัฒนาเป็นสบู่ หรือโลชั่นในการบำรุงผิว เนื่องจากในเยื่อของฟักข้าวอุดมไปด้วยสารพฤกษเคมีที่ทำหน้าที่ในการต้านอนุมูลอิสระ (Kha et al., 2010) แต่การนำมาศึกษาในแง่ของการปรับสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์บนผิวหนังยังมีค่อนข้างจำกัด ดังนั้นการศึกษารุ่นนี้จึงมุ่งเน้นในการนำส่วนต่างๆ ของฟักข้าว (เปลือกชั้นนอก, เปลือกชั้นใน, เยื่อหุ้มเมล็ด และเมล็ด) มาทำการสกัด โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนผิวหนัง *S. epidermidis* และ

ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค *S. aureus*

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากฟักข้าวต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis*
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากฟักข้าวต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus*

วิธีดำเนินการวิจัย

• การเตรียมตัวอย่างและสารสกัดหยาบจากฟักข้าวส่วนต่างๆ

ผลฟักข้าวสุกที่ใช้ในการทดลองมีอายุของผลสุกที่ 3-6 วัน ซึ่งได้มาจากพื้นที่เพาะปลูกในมณฑลทหารบกที่ 36 จังหวัดเพชรบูรณ์ ภาคกลางตอนบนของประเทศไทย ในการเตรียมตัวอย่างทำการล้างฟักข้าวด้วยน้ำสะอาดและแยกส่วนประกอบของผลฟักข้าวเพื่อการศึกษา ได้แก่ เปลือกชั้นนอก (peel), เปลือกชั้นใน (mesocarp), เยื่อหุ้มเมล็ด (aril) และเมล็ด (seed) จากนั้นทำแต่ละส่วนให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ประมาณ 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น และทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในถุงซิปล็อค เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป ในส่วนการสกัดหยาบนำฟักข้าวส่วนต่างๆ ที่บดละเอียดและเก็บรักษาไว้ มาแช่ในตัวทำละลายเมทานอลในอัตราส่วน 1:10 (กรัม/มิลลิลิตร) ทำการปิดฝาและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (whatman no. 1) เก็บเฉพาะสารละลายแล้วนำไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator (Buchi รุ่น R210, บริษัท BUCHI (Thailand) Ltd.) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาค่าร้อยละของผลผลิต (%yield) ดังสมการที่ 1 (Tinrat, 2014; ญัฐกานต์ วงศ์สีสม และคณะ, 2557)

$$\%Yield = \frac{\text{น้ำหนักของผลผลิตของสารสกัดที่ผลิตได้ (g)}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างฟักข้าวตั้งต้น (g)}} \times 100 \quad (1)$$

• การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธีของ folin-ciocalteu spectrometric method (ดัดแปลงจาก Dadung et al., 2011) เปรียบเทียบกับกรดแกลลิก (gallic acid) โดยนำสารตัวอย่างที่เตรียมไว้มา 20 ไมโครลิตร เติมน้ำสารละลาย 10% folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บสารละลายไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำสารละลาย 7 % โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสมการของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก (gallic acid equivalent) ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด โดยหาค่าได้จากสมการที่ 2 ดังนี้

$$\text{Total Phenolic (mg/g)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}})}{\text{Slope}} \times \text{Amount}_{\text{sample}} \quad (2)$$

$\text{Abs}_{\text{sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

$\text{Abs}_{\text{blank}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

Slope คือ ค่าความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

$\text{Amount}_{\text{sample}}$ คือ ปริมาณสารตัวอย่าง (g)

ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

• การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสามารถตรวจสอบโดยใช้วิธี aluminium chloride colorimetry โดยใช้เคออลูซิทินเป็นสารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) โดยนำสารตัวอย่างที่เตรียมไว้มา 30 ไมโครลิตร เติมน้ำ 99.9%

เอทานอลปริมาตร 170 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 10% อลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl₃) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, 1 โมลาร์ โพแทสเซียมอะซิเตท (CH₃CO₂K) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ต่อมานำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเคอซิทินในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอซิทินต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด โดยหาค่าได้จากสมการที่ 3 ดังนี้

$$\text{Total Flavonoid (mg/g)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}})}{\text{Slope}} \times \text{Amount}_{\text{sample}} \quad \text{--- (3)}$$

Abs_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

Abs_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

Slope คือ ค่าความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

Amount_{sample} คือ ปริมาณสารตัวอย่าง (g)

ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

• การเตรียมแบคทีเรียทดสอบสำหรับการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* ATCC 29213 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.พัชรภรณ์ ทิพย์วัฒน์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยนำแบคทีเรียจำนวน 2 ชนิด จากหลอดเชื้อบริสุทธิ์ (stock เชื้อ) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค streak plate บนอาหารวุ้น BHI agar แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นแยกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว BHI broth แล้วบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปรับปริมาณเชื้อด้วย 0.9% น้ำเกลือ แล้ววัดความขุ่นโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น

600 นาโนเมตร (OD600) ให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.10 เทียบเท่า 0.5 McFarland (1.0×10⁸ - 1.5×10⁸ โคโลนี/มิลลิลิตร)

• การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ของสารสกัดฟักข้าว (Minimum inhibitory concentration; MIC)

หาค่า MIC โดยวิธี microdilution method (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009) เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10⁸ โคโลนี/มิลลิลิตร และเตรียมสารสกัดความเข้มข้นตั้งแต่ 0.78-100.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใช้ auto pipette ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ลง microtiter plate 96-well ในหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นดูดสารสกัดจากฟักข้าวลงในหลุมที่ 1 และ 2 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำ 2-fold dilution เติมเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยทำการเปลี่ยน tip ทุกครั้งที่เปลี่ยนหลุม โดยให้ผลบวกควบคุม คือหลุมที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อกับเชื้อ และผลลบควบคุม คือหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อกับสารสกัด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารละลายแต่ละหลุมมา 20 ไมโครลิตร หยดลง BHI agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดทำการอ่านผล โดยค่า MIC คือ ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่มีเชื้อเจริญและสามารถนับจำนวนโคโลนีได้ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งแบบอิสระต่อกัน

• การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ของสารสกัดฟักข้าว (Minimum bactericidal concentration; MBC)

นำค่า MIC ที่ได้มาหาค่า MBC โดยนำหลุมที่ไม่พบการเจริญของเชื้อมาเพาะเชื้อทดสอบ โดยใช้เทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผล โดยถ้าสารสกัดสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้จะไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งแบบอิสระต่อกัน

• การส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* โดยใช้สารสกัดฟักข้าว

ทำการทดสอบฤทธิ์ส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* โดยใช้วิธีทดสอบ MIC เพื่อคัดกรองความเข้มข้นที่เชื้อสามารถเจริญได้ โดยนำเชื้อมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 โคโลนี/มิลลิลิตร ทดสอบกับสารสกัดที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.78-100.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นใช้เทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทดสอบฤทธิ์ส่งเสริมการเจริญ โดยให้ตัวควบคุม คือ 0.9% น้ำเกลือกับเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการนับโคโลนีของเชื้อและบันทึกผล จากนั้นเลือกสถานะความเข้มข้นจากการส่งเสริมการเจริญเปรียบเทียบกับตัวควบคุมดังนี้ 1) มากที่สุด 2) เทียบเท่าหรือใกล้เคียงที่สุด และ 3) น้อยที่สุด โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งแบบอิสระต่อกัน

• การเตรียม Cell Free Supernatant (CFS) จาก *S. epidermidis*

หลังจากนั้นนำความเข้มข้นทั้ง 3 ได้แก่ 6.25, 12.50 และ 25.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และตัวควบคุม คือ 0.9% น้ำเกลือกับเชื้อ *S. epidermidis* ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้ได้ cell free supernatant (CFS) โดยนำไปปั่นที่ 3,500 rpm ระยะเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมารองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอใช้ในการทดลองต่อไป (Jang et al., 2020)

• การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*

นำของเหลวเนื้อตะกอนมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยทำการเตรียมของเหลวเนื้อตะกอนแต่ละความเข้มข้น ได้แก่ 6.25, 12.50 และ 25.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และตัวควบคุม คือ 0.9% น้ำเกลือ มาอย่างละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเชื้อ *S. aureus* ที่มีปริมาณเริ่มต้น $10^3 - 10^5$ โคโลนี/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในของเหลวเนื้อตะกอนแต่ละความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร

โดยให้ตัวควบคุม คืออาหารเลี้ยงเชื้อกับเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำแต่ละความเข้มข้นไปทำการเพาะเชื้อโดยใช้เทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการนับโคโลนีของเชื้อและบันทึกผล จากนั้นหาค่าร้อยละของอัตราการรอดชีวิต (%bacteria survival rate) ดังสมการที่ 4 (Kaewchomphunuch et al., 2022)

$$\text{Bacteria survival rate (\%)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีของตัวทดสอบ}}{\text{จำนวนโคโลนีของตัวควบคุม}} \times 100 \quad (4)$$

• สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ในการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการทดลองตัวอย่าง โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งโดยอิสระต่อกัน เพื่อหาค่าเฉลี่ย (Mean) และ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ตลอดจนการทดสอบฤทธิ์การส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในการยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยเลือกใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics v.28 ด้วยวิธี One-Way ANOVA โดยใช้ Post Hoc analysis และ Duncan เพื่อหาความแตกต่างในกลุ่ม และ Independent T-test ในการหาความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha=0.05$

ผลการวิจัย

• ปริมาณสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของฟักข้าว

จากการวิเคราะห์ปริมาณของสารสกัดที่สามารถสกัดได้จากฟักข้าวส่วนต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณสารที่สกัดได้ ซึ่งผลการทดลองมีปริมาณสารสกัดที่สกัดได้ โดยคิดเป็นร้อยละของผลผลิต (%yield) จากการเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดจากฟักข้าวแต่ละส่วน พบว่าสารสกัดที่สกัดได้จากเยื่อหุ้มเมล็ดของฟักข้าว ให้ปริมาณของสารสกัดมากที่สุดที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 32.35 ± 2.23 รองลงมา

คือ สารสกัดที่ได้จากส่วนของเปลือกชั้นในของฟักข้าว มีค่าเท่ากับร้อยละ 20.77 ± 1.79 ตามลำดับ ซึ่งจากตารางที่ 1 จะพบว่าส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดให้ปริมาณสารสกัดแตกต่างจากส่วนอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) และส่วนเปลือกชั้นนอกและส่วนเมล็ดของฟักข้าวให้ปริมาณสารสกัดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} \geq 0.05$)

● ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดฟักข้าว

ในฟักข้าวมีปริมาณสารสำคัญหลายชนิด ทั้งสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด อย่างไรก็ตามในฟักข้าวแต่ละส่วนอาจมีปริมาณแตกต่างกันออกไป จึงได้ทำการทดสอบเพื่อหาปริมาณสารสำคัญจากสารสกัดฟักข้าวแต่ละส่วน โดยจากการทดลองตัวอย่างสารสกัดจากฟักข้าว โดยทำการเปรียบเทียบความแตกต่างปริมาณสารสำคัญที่ได้ ซึ่งส่วนของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดพบว่ามีสารสกัดจากส่วนเปลือกชั้นนอกของฟักข้าวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดที่ 29.17 ± 0.28 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ สารสกัดจากส่วนเปลือกชั้นในของฟักข้าวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ 27.18 ± 0.82 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งจากตารางที่ 2 จะพบว่าสารสกัดฟักข้าวแต่ละส่วนมีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) และในส่วนของสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดพบว่ามีสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดของฟักข้าวมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดที่ 18.28 ± 0.89 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทิน/กรัมน้ำหนักแห้ง และสารสกัดจากส่วนเมล็ดของฟักข้าวมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดต่ำที่สุดที่ 6.57 ± 0.78 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทิน/กรัมน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเปลือกชั้นนอกและเปลือกชั้นใน มีปริมาณมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} \geq 0.05$)

● ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ของสารสกัดฟักข้าว (Minimum inhibitory concentration; MIC)

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดฟักข้าว ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งมีความเข้มข้นของสารสกัดอยู่ในช่วง 0.78-100.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียจำนวน 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *S. epidermidis* โดยจากการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดฟักข้าว สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดจากส่วนเปลือกชั้นนอกของฟักข้าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้ดีที่สุด ซึ่งค่า MIC ที่ได้เท่ากับ 50.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดจากส่วนของเปลือกชั้นในและเมล็ดก็สามารถยับยั้งการเจริญได้เช่นกัน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 100.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้น้อย ซึ่งสังเกตได้จากปริมาณความเข้มข้นที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อจากผลของค่า MIC ของเชื้อ *S. epidermidis* ที่ได้จากตารางที่ 3 จึงได้พิจารณาเลือกสารสกัดจากส่วนของเปลือกชั้นนอกจากฟักข้าว ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ส่งผลต่อการเจริญของพรีไบโอติกสูงที่สุด มาทำการทดสอบฤทธิ์การส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* ต่อไป

● ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ของสารสกัดฟักข้าว (Minimum bactericidal concentration; MBC)

จากการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดฟักข้าวที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งจากตารางที่ 4 พบว่าสารสกัดจากส่วนเปลือกชั้นนอกสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MBC เท่ากับ 100.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยสารสกัดจากผลฟักข้าวส่วนต่างๆ พบว่ามีความเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกัน เกิดจากองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด สารประกอบสำคัญต่างๆ และโครงสร้างของผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย

● การส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* โดยใช้สารสกัดฟักข้าว

การทดสอบฤทธิ์การส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* ซึ่งได้พิจารณาเลือกใช้สารสกัดจากส่วนเปลือกชั้นนอกของฟักข้าวมาทำการทดสอบ โดยจากการวิเคราะห์การใช้สารสกัดจากส่วนเปลือกชั้นนอกของฟักข้าวในสถานะต่างๆ ที่แตกต่างกันในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* พบว่าสารสกัดส่วนเปลือกชั้นนอกที่สถานะความเข้มข้นที่ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่สุด โดยมีจำนวนโคโลนีเท่ากับ $10.85 \pm 0.25 \log$ โคโลนี/มิลลิลิตร และมีการส่งเสริมการเจริญแตกต่างจากสถานะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) และที่สถานะความเข้มข้นที่ 50.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญน้อยที่สุด มีจำนวนโคโลนีคือ $9.89 \pm 0.15 \log$ โคโลนี/มิลลิลิตร และมีการส่งเสริมการเจริญไม่แตกต่างจากสถานะความเข้มข้นที่ 25.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} \geq 0.05$) รวมถึงสถานะความเข้มข้นที่ 12.50, 3.125, 1.56, 0.78 และตัวควบคุม มีการส่งเสริมการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} \geq 0.05$) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าแนวโน้มการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* จะคงที่ที่ความเข้มข้นต่ำ และจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของสารสกัดสูงขึ้น แต่เมื่อถึงจุดหนึ่งที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นการเจริญของเชื้อจะค่อยๆ ลดลง (ภาพที่ 1) และจากผลดังตารางที่ 5 จึงได้พิจารณาเลือกสถานะที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* มากที่สุด, เทียบเท่าหรือใกล้เคียงที่สุด และน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม ได้แก่ 6.25, 12.50 และ 25.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ที่สถานะที่แตกต่างกัน

● การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*

การทดสอบหาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ในการใช้ cell free supernatant (CFS)

ของ *S. epidermidis* ที่มีสถานะความเข้มข้นของสารสกัดในการส่งเสริมการเจริญคือ 6.25, 12.50 และ 25.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* โดยได้ทำการเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *S. aureus* ใน CFS ของ *S. epidermidis* ในสถานะความเข้มข้นที่ส่งเสริมการเจริญที่แตกต่างกัน จากตารางที่ 6 พบว่าเชื้อ *S. aureus* มีอัตราการรอดชีวิตน้อยที่สุดที่ $21.43 \pm 7.34\%$ ใน CFS ที่สถานะ 12.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาคือ CFS ที่สถานะ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ $46.56 \pm 17.06\%$ และจากภาพที่ 2 แสดงให้เห็นว่า CFS ที่สถานะ 12.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างจากสถานะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) นอกจากนี้ที่สถานะ 6.25, 25.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และตัวควบคุม มีอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *S. aureus* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} \geq 0.05$) ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ว่าแม้ที่สถานะ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่สุด แต่ก็ไม่ใช่สถานะที่เหมาะสมที่สุดในการใช้เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ดังนั้นแล้ว CFS ที่สถานะ 12.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จึงเป็นสถานะที่เหมาะสมที่ในการใช้เพื่อส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ในการทดลองครั้งนี้

บทสรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาต่างๆ พบว่าสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ ที่พบในพืชต่างๆ รวมถึงผลฟักข้าว มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคอีกด้วย (Sukumaran et al., 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบฟีนอลิกมีผลต่อการส่งเสริมการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก (Pacheco-Ordaz et al., 2018) โดยการศึกษานี้ได้เลือกศึกษาผลฟักข้าวสุกในการทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดจากส่วนต่างๆ ที่ส่งผลต่อการส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนผิวหนัง *S. epidermidis* และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค *S. aureus* โดยเลือกใช้ตัวทำ

ละลายเมทานอลในการสกัด ซึ่งการสกัดสารประกอบฟีนอลิก มักใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เพราะต่างก็เป็นสารอินทรีย์เหมือนกัน จึงเกิดการละลายกันตามหลักการละลายกันได้ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมสำหรับการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ คือ เมทานอล ซึ่งใช้ในการสกัดสารสำคัญที่มีขั้ว (polar active constituent) (เอนก หาลี & บุญยฤทธิ รัตนพันธุ์, 2559) ซึ่งจากการทดลองพบว่า ส่วนเปลือกชั้นนอกมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดที่ 29.17 ± 0.28 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้ง และส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดพบสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุดที่ 18.28 ± 0.89 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทิน/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งองค์ประกอบที่แตกต่างกันของสารที่สกัดได้จากฟักข้าวแต่ละส่วน อาจส่งผลให้ปริมาณสารที่สกัดได้แตกต่างกัน (Li et al., 2006)

สารประกอบฟีนอลิกที่พบในผลฟักข้าวสุกมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลเป็นผลพลอยได้จากเมทาบอลิซึมของเซลล์พืช ซึ่งสร้างโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อต้านทานโรคต่างๆ (Abdalla et al., 2007) และฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านแบคทีเรียที่ต่อต้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคหลายชนิด ซึ่งฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของฟลาโวนอยด์ขึ้นกับโครงสร้าง กล่าวคือขึ้นอยู่กับการแทนที่บนวงแหวนอะโรมาติก โดยหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งพิเศษบนวงแหวนอะโรมาติกของฟลาโวนอยด์ช่วยเสริมฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Xie et al., 2015) ในส่วนการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี MIC และ MBC พบว่า ส่วนของเปลือกชั้นนอกของฟักข้าวสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่สุด โดยให้ค่า MIC อยู่ที่ 50.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่า MBC อยู่ที่ 100.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งให้ผลแตกต่างจากการศึกษาของ Tinrat (2014) ที่ส่วนเปลือกของฟักข้าวผลสุกพบว่า มีค่า MIC อยู่ที่ >100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าค่า MBC เมื่อเทียบกับค่า MIC แล้ว จะมีค่าที่สูงกว่า เนื่องจากค่า MBC บ่งบอกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้จริง ในขณะที่ค่า MIC เป็นเพียงค่าเบื้องต้นเพื่อประเมินผลของความเข้มข้น เช่นเดียวกับการวิจัยของณัฐ

กานต์ วงศ์สัสสม และคณะ (2557) ที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร โดยสารสกัดจากของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่นพบว่าค่า MBC มีค่าที่สูงกว่าค่า MIC เช่นเดียวกัน

เชื้อ *S. epidermidis* เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบบนผิวหนัง คุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคก่อความเสียหายแก่ร่างกาย โดย *S. epidermidis* จะสร้างแบคทีริโอซิน (bacteriocins) ชนิด 1 และ 2 ที่ทนต่อความร้อน และ PSMδ ที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้ (Jang et al., 2020) ซึ่งผลการทดสอบสภาวะที่ส่งเสริมการเจริญจะพบว่า CFS ของ *S. epidermidis* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ และยังพบว่าแม้ที่สภาวะ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่สุด แต่ไม่ใช่สภาวะที่ดีที่สุดในการใช้เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ดังนั้นแล้ว CFS ที่สภาวะ 12.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *S. aureus* น้อยที่สุด จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่ในการใช้เพื่อส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งจากคุณสมบัติของพืชต่างๆ ข้างต้นของฟักข้าว มีความเป็นไปได้ที่จะนำฟักข้าวมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ นำมาพัฒนาทางการแพทย์และทางเภสัชภัณฑ์

ข้อเสนอแนะหรือการนำไปใช้ประโยชน์

1. ในการวิจัยควรมีการศึกษาตัวแปรอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น อุณหภูมิการเก็บรักษา ผลดิบ-สุกของผลฟักข้าว และ การใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน เพื่อหาปัจจัยที่ส่งผลปริมาณสารสำคัญและประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดต่างๆ และควรเพิ่มชนิดของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบในการทดสอบ ในการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของฟักข้าว เพื่อให้ข้อมูลกว้างขวางมากยิ่งขึ้น

2. ในการนำฟักข้าวไปแปรรูป เนื่องจากฟักข้าวมีสารพฤษเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่มาก

กระบวนการในการแปรรูปจึงต้องมีความระมัดระวังหลีกเลี่ยงวิธีการที่ทำให้เกิดความสูญเสียของปริมาณสารสำคัญเหล่านี้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขวามาต สกลศิลป์ศิริ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง rotary evaporator และขอขอบพระคุณ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และห้องปฏิบัติการ คณะเทคนิคการแพทย์สำหรับสถานที่ และครุภัณฑ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ณัฐกานต์ วงศ์สีลม, จามจุรี จินะตา, บุษบา มะโนแสน, จิรัชต์ กันทะขู้, สุริพร วันควร และ สุภาวดี ศรีแย้ม. (2557). การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น. **วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี**, 37(1), 3-15.
- เอนก หาลิ, & บุญยกฤต รัตนพันธุ์. (2559). ผลของชนิดตัวทำละลายและความเข้มข้นของกรดซิตริกที่มีต่อการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากข้าวหอมนิล. **วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี**, 39(3), 353-364.
- วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์. (2557). **ผักข้าว**. ค้นเมื่อ 1 ตุลาคม 2564, จาก <https://pharmacy.mahidol.ac.th/knowledge/files/0223.pdf>
- Abdalla, A. E. M., Darwish, S. M., Ayad, E. H. E., & El-Hamahmy, R. M. (2007). Egyptian mango by-product 1: Compositional quality of mango seed kernel. **Food Chemistry**, 103(4), 1134-1140.
- Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. (2009). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard-eighth edition**. CLSI documents M07-A8. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.
- Daduang, J., Daduang, S., Hongprabhas, P., & Boonsiri, P. (2011). High phenolics and antioxidants of some tropical vegetables related to antibacterial and anticancer activities. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 5(5), 608-615.
- Jang, I. T., Yang, M., Kim, H. J., & Park, J. K. (2020). Novel cytoplasmic bacteriocin compounds derived from *Staphylococcus epidermidis* selectively kill *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Pathogens**, 9(2), 1-10.
- Kaewchomphunuch, T., Charoenpichitnunt, T., Thongbaiyai, V., Ngamwongsatit, N. & Kaeoket, K. (2022). Cell-free culture supernatants of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. inhibit growth of pathogenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Thailand. **BMC Veterinary Research**, 18(60), 1-13.
- Kha, T. C., Nguyen, M. H., & Roach, P. D. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal of Food Engineering**, 98(3), 385-392.
- Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: I, solvent extraction method. **Separation and Purification Technology**, 48(2), 182-188.
- Majdanik, M. M., Kepa, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., & Wasik, T. J. (2018). Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* clinical strains. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 22(15), 1-18.
- Nakatsuji, T., Chen, T. H., Butcher, A. M., Trzoss, L. L., Nam, S. J., Shirakawa, K. T., et al. (2018). A commensal strain of *Staphylococcus epidermidis* protects against skin neoplasia. **Health and Medicine**, 4(2), 1-9.

- Ozda, T., Sela, D. A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., & Capanoglu, E. (2016). The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients*, 8(2), 1-36.
- Pacheco-Ordaz, R., Wall-Medrano, A., Goni, M. G., Ramos-Clamont-Montfort, G., Ayala-Zavala, J. F., & Gonzalez-Aguilar, G. A. (2018). Effect of phenolic compounds on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 66(1), 25-31.
- Sukumaran, S. et al. (2011). Phytochemical constituents and antibacterial efficacy of the flowers of *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Baker ex Heyne. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(9), 735-738.
- Tinrat, S. (2014). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of unripe and ripe fruit extracts of *Momordica cochinchinensis* Spreng (gac fruit). *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 28(1), 75-82.
- Xiaoyong, S., & Luming, C. (2014). Phenolic constituents, antimicrobial and antioxidant properties of blueberry leaves (V5). *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(12), 973-979.
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., & Ren, L. (2015). Antibacterial activities of flavonoids: Structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), 132-149.

ตารางที่ 1 ค่าร้อยละของผลผลิต (%yield) ของปริมาณสารสกัดพืชข้าวส่วนต่างๆ

ส่วน	ค่าร้อยละของผลผลิต (%yield)
เปลือกชั้นนอก	14.81 ± 0.82 ^c
เปลือกชั้นใน	20.77 ± 1.79 ^b
เยื่อหุ้มเมล็ด	32.35 ± 2.23 ^a
เมล็ด	15.02 ± 2.09 ^c

แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, ค่าในคอลัมน์เดียวกันมีตัวกำกับที่แตกต่างกัน แสดงถึงค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ในสารสกัดพืชข้าวส่วนต่างๆ

ส่วน	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด
	มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมน้ำหนักแห้ง	มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทิน/กรัมน้ำหนักแห้ง
เปลือกชั้นนอก	29.17 ± 0.28 ^a	11.70 ± 0.48 ^b
เปลือกชั้นใน	27.18 ± 0.82 ^b	10.75 ± 0.65 ^b
เยื่อหุ้มเมล็ด	25.03 ± 1.01 ^c	18.28 ± 0.89 ^a
เมล็ด	23.10 ± 0.41 ^d	6.57 ± 0.78 ^c

แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, ค่าในคอลัมน์เดียวกันมีตัวกำกับที่แตกต่างกัน แสดงถึงค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดผักขาวต่อแบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียทดสอบ	ค่า MIC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
	เปลือกชั้นนอก	เปลือกชั้นใน	เยื่อหุ้มเมล็ด	เมล็ด
<i>S. aureus</i>	50.00	100.00	>100.00	100.00
<i>S. epidermidis</i>	50.00	100.00	>100.00	100.00

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดผักขาวต่อแบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียทดสอบ	ค่า MBC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
	เปลือกชั้นนอก	เปลือกชั้นใน	เยื่อหุ้มเมล็ด	เมล็ด
<i>S. aureus</i>	100.00	>100.00	>100.00	>100.00
<i>S. epidermidis</i>	100.00	>100.00	>100.00	>100.00

ตารางที่ 5 การเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดจากเปลือกผักขาว

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	จำนวนโคโลนี (log โคโลนี/มิลลิลิตร)
* ตัวควบคุม	10.32 ± 0.37 ^b
0.78	10.37 ± 0.22 ^b
1.56	10.37 ± 0.29 ^b
3.125	10.38 ± 0.06 ^b
6.25	10.85 ± 0.25 ^c
12.50	10.34 ± 0.21 ^b

ตารางที่ 5 การเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดจากเปลือกผักขาว (ต่อ)

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	จำนวนโคโลนี (log โคโลนี/มิลลิลิตร)
25.00	9.90 ± 0.02 ^a
50.00	9.74 ± 0.12 ^a

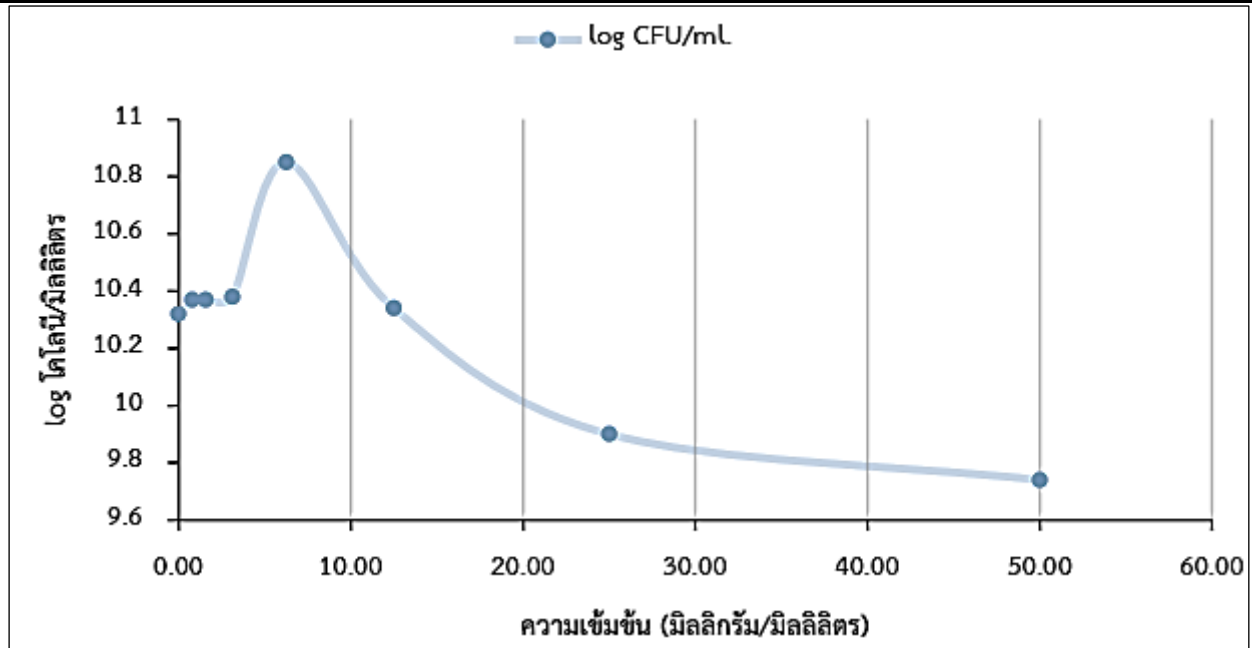
แสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ค่าในคอลัมน์เดียวกันมีตัวยกกำลังที่แตกต่างกัน แสดงถึงค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

* หมายเหตุ: ตัวควบคุม คือ เชื้อ *S. epidermidis* ที่เพาะเลี้ยงใน 0.9% น้ำเกลือ

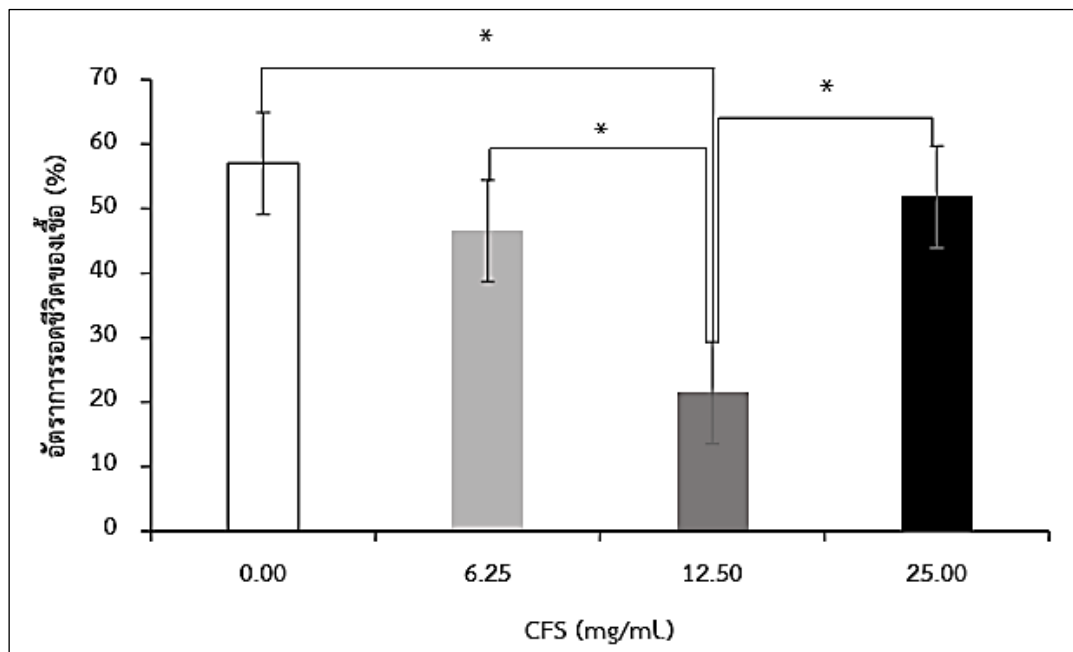
ตารางที่ 6 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *S. aureus* ใน CFS ของ *S. epidermidis*

CFS	จำนวนโคโลนี (log โคโลนี/มิลลิลิตร)	อัตราการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย (%)
* 0.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	10.80 ± 0.22	57.03 ± 22.46
6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	10.71 ± 0.19	46.56 ± 17.06
12.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	10.37 ± 0.31	21.43 ± 7.34
25.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	10.76 ± 0.31	51.81 ± 15.69

* หมายเหตุ: ความเข้มข้นที่ 0.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร คือ เชื้อ *S. epidermidis* ที่เพาะเลี้ยงใน 0.9% น้ำเกลือ



ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดจากเปลือกฟักข้าว



หมายเหตุ: * = $p < 0.001$

ภาพที่ 2 กราฟเปรียบเทียบอัตราการรอดของเชื้อ *S. aureus* ใน CFS ของ *S. epidermidis* ที่สภาวะแตกต่างกัน