

นิพนธ์ต้นฉบับ

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบหม่อนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคลุ่มแกรมบวก
ในกระบวนการหลังหมักปลาร้ากรกนก เทียนแย้ม⁽¹⁾, นิตยา แสงประจักษ์⁽²⁾, สุกัญญา ศรีจำปา⁽³⁾, พัทธราภรณ์ ทิพย์วัฒน์⁽³⁾, ปฐุมิการ พะสุวรรณ⁽⁴⁾, รัฐพล ไกรกลาง^{(5)*}

วันที่ได้รับต้นฉบับ: 22 พฤศจิกายน 2568

วันที่ตอบรับการตีพิมพ์: 4 กันยายน 2568

* ผู้รับผิดชอบบทความ

email: ratthaphol@kku.ac.th

(1) นักศึกษาหลักสูตรสาธารณสุขศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาโภชนศาสตร์เพื่อสุขภาพ

คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

(2) หลักสูตรสาธารณสุขศาสตรดุษฎีบัณฑิต

คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

(3) สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น(4) สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

(5) หลักสูตรสาธารณสุขศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาโภชนศาสตร์เพื่อสุขภาพ

คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

โรคที่เกิดจากอาหารที่เกิดจากการบริโภคจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนอาหารหรือน้ำดื่ม เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญซึ่งทำให้เกิดการเจ็บป่วยและเสียชีวิต จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคมีการปนเปื้อนสูงในอาหารหมักดอง เช่น ปลาร้า ซึ่งนิยมบริโภคในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีสำคัญในใบหม่อน 5 สายพันธุ์ และประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบหม่อนต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค ในกระบวนการหลังหมักปลาร้า จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากหม่อน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ บุรีรัมย์ 60 คุณไผ หม่อนไฟ สกลนคร 72 และสกลนคร 85 พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากสายพันธุ์สกลนคร 85 มี ปริมาณสารดังกล่าวมากที่สุด 0.183 ± 0.012 มิลลิกรัม/สมมูล gallic acid /มิลลิกรัมสารสกัด และ 125.39 ± 3.96 มิลลิกรัม/สมมูล quercetin /มิลลิกรัมสารสกัดตามลำดับ รวมทั้งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี อย่างไรก็ตาม จากผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกที่ทำให้เกิดโรค พบว่าสารสกัดหยาบสายพันธุ์หม่อนไฟจากน้ำและเอทานอลให้ฤทธิ์ยับยั้งที่ดีที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* อยู่ในช่วง 12.5-25.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 3.1-6.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ของเชื้อ *S. aureus* และ *B. Cereus* อยู่ในช่วง 25.0-50.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 3.1-12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อใช้สารสกัดหยาบจากสายพันธุ์หม่อนไฟที่ความเข้มข้น 50.0 มก./มล. ในกระบวนการหลังหมักปลาร้าเป็นเวลา 28 วัน สามารถลดจำนวนรวมของแบคทีเรีย และ *B. cereus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. aureus* ได้ในระดับปานกลางเมื่อเทียบกับปลาร้าควบคุม จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากใบหม่อนมีประสิทธิภาพและสามารถนำไปใช้ในกระบวนการหลังหมักปลาร้าเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคซึ่งลดความเสี่ยงต่อโรคที่เกิดจากอาหารได้

คำสำคัญ: สารสกัดจากพืช, ใบหม่อน, อาหารหมักดอง, การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

Original Article

The Efficacy of Mulberry Leaf Extract in Inhibiting Gram-positive Pathogenic Bacteria During the Post-fermentation Process of Fermented Fish (Pla-ra)

Kornkanok Tianyam⁽¹⁾, Nittaya Saengprajak⁽²⁾, Sukanya Srijumpa⁽³⁾, Patcharaporn Tippayawat⁽³⁾,
Patimakorn Pasuwan⁽⁴⁾, Ratthaphol Kariklang^{(5)*}

Received Date: November 22, 20225

Accepted Date: September 24 2025

Abstract

Foodborne disease caused by consuming of pathogenic microorganisms contaminated food or drinking water is an important public health problem which causing of illness and death. Pathogenic microorganisms are highly contaminated from fermented foods, such as fermented fish (Pla-ra), which is popularly consumed in the northeastern region of Thailand. This study aimed to investigate the key chemical compounds of five mulberry (*Morus* spp.) cultivars and to evaluate the efficacy of their leaf extracts in inhibiting the growth of pathogenic bacteria during the post-fermentation process of Pla-ra. From the antioxidant activity testing and the content of phenolic compounds and flavonoids from five mulberry strains, which are Buriram 60, Khun Pai, Mon Pai, SakonNakhon 72 and SakonNakhon 85, found that, the ethanolic crude extracts from SakonNakhon 85 strain has the highest amount of these substances, 0.183±0.012 mg gallic acid equivalent /mg of crude extracts, 125.39±3.96 mg quercetin equivalent / mg of crude extracts, respectively, as well as an antioxidant activity. However, from the gram positive pathogenic bacterial growth inhibition results shown the best inhibitory effect in both water and ethanolic crude extracts from Mon Pai strain. The minimum inhibitory concentration of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were 12.5-25.0 mg/mL and 3.1-6.3 mg/mL, respectively, and the minimum bactericidal concentration of *S. aureus* and *B. cereus* were 25.0-50.0 mg/mL and 3.1-12.5 mg/mL, respectively. Moreover, when using crude extracts from Mon Pai strain at a concentration of 50.0 mg/ml in the process after fermentation for 28 days. It can effectively reduce the total number of bacteria and *B. cereus*, and moderately inhibited the growth of *S. aureus* compared to the control samples. From the results of this study found that the crude extract from the mulberry leaf was effective and can be used in the fermentation process of fermented fish to inhibit pathogenic bacteria which can reduce the risk of foodborne disease.

Keywords: Plant Extracts, Mulberry Leaf, Fermented Food, Antibacterial

* Corresponding author

email: ratthaphol@kku.ac.th

(1) Master of Public Health student in

Nutrition for Health,

Faculty of Public Health,

Khon Kaen University

(2) Doctor of Public Health Program,

Faculty of Public Health,

Khon Kaen University

(3) Department of Associated Medical

Science, Faculty of Associated Medical

Science, KhonKaen University

(4) Department of Food Technology,

Faculty of Technology,

Khon Kaen University

(5) Nutrition for Health Program,

Faculty of Public Health,

Khon Kaen University

บทนำ

อาหารเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญของมนุษย์ อย่างไรก็ตาม การบริโภคอาหารหรือน้ำที่ไม่ถูกสุขลักษณะเป็นสาเหตุหลักของโรคจากอาหาร (foodborne diseases) ซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ข้อมูลจากสำนักป้องกันควบคุมโรคในปี 2562 ชี้ให้เห็นว่ามีผู้ป่วยอุจจาระร่วงเฉียบพลันและอาหารเป็นพิษจำนวนมาก ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งปลาร้าเป็นอาหารหมักดองที่นิยมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีความเสี่ยงสูงที่จะปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหากกระบวนการผลิตไม่ได้มาตรฐาน (ทิพย์กมล ภูมิพันธ์ & อุไรวรรณ อินทร์ม่วง, 2559) ปัญหานี้อาจทำให้ผู้ผลิตบางรายหันไปใช้สารเคมีสังเคราะห์ เช่น กรดซอร์บิก หรือไนไตรท์ เพื่อยับยั้งเชื้อ ซึ่งหากใช้ในปริมาณที่มากเกินไปกำหนดอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ (นพพร ลำเลิศกุล, 2549)

ดังนั้น การใช้สารสกัดจากธรรมชาติเพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกที่ปลอดภัยและยั่งยืนกว่า มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชหลายชนิด (มณฑล วิสุทธิ, 2560; สุพัฒนา จันทา & นฤมล พินเนียม ชนะไพฑูรย์, 2561) ใบหม่อน (*Morus alba* Linn) เป็นพืชที่มีศักยภาพสูงเนื่องจากอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (kuwanon G, albanol B) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิด (DeOliveira et al., 2015; อรณี ศรีนวล และคณะ, 2560)

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบหม่อน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พื้นเมือง (คุณไผ่และหม่อนไผ่) และพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนา (บุรีรัมย์ 60, สกลนคร 72 และสกลนคร 85) เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกระบวนการหลังหมักปลาร้า โดยจะศึกษาทั้งองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เพื่อเป็นแนวทางในการนำสารสกัดจากใบหม่อนมาใช้เป็นสารธรรมชาติเพื่อเพิ่มความปลอดภัยให้กับปลาร้า

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการวิจัยแบบกึ่งทดลอง (Quasi-Experimental Study) โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ผลดังต่อไปนี้

● เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ปลาร้า

ตัวอย่างปลาร้าถูกเก็บจากแหล่งผลิตขนาดใหญ่ 2 แห่งในจังหวัดขอนแก่น ซึ่งใช้ภาชนะซ้ำในการหมัก โดยกระบวนการหมักปลาร้าใช้ปลาน้ำจืดควักไส้หมักกับเกลือและข้าวคั่ว ในโถดินเผาหรือถังพลาสติกไม่น้อยกว่า 6 เดือน (บุญชม ศรีสะอาด, 2535) การเก็บตัวอย่างสุ่มร้อยละ 15 ของภาชนะหมัก ได้แก่ แหล่งที่ 1 จำนวน 5 ถึงจาก 30 ถึง และแหล่งที่ 2 จำนวน 15 ถึงจาก 86 ถึง โดยตักส่วนบน กลาง และล่างอย่างละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 500 กรัม (สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2553) ตัวอย่างถูกตีบดที่ 300 rpm นาน 2 นาที (เนื้อปลา 200 กรัม และน้ำปลาร้า 300 มิลลิลิตร) เก็บในขวดแก้วดูแรนฆ่าเชื้อ ใช้ทดสอบร่วมกับสารสกัดใบหม่อนที่อุณหภูมิห้อง 25–27 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือน และเก็บตัวอย่างที่เหลือที่ 4 องศาเซลเซียส

ใบหม่อน

ใบหม่อน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ คุณไผ่ หม่อนไผ่ บุรีรัมย์ 60 สกลนคร 72 และสกลนคร 85 จากกรมหม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดขอนแก่น อายุ 1–1.5 ปี เก็บในฤดูหนาวช่วงเวลา 09.00–10.00 น. (มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมแพทย์แผนไทยเดิม, 2559) โดยเก็บใบอ่อนลำดับที่ 2–4 จากยอด นำมาล้างสะอาด ตากแดด 4–5 ชม. (อมรรัตน์ สีสุทอง และคณะ, 2559) บดละเอียด บรรจุถุงสุญญากาศ และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปทดลอง

การสกัดสารสกัดหยาบจากใบหม่อน

สารสกัดเอทานอล: นำใบหม่อนบดละเอียดแช่ในแอบโซลูทเอทานอล อัตราส่วน 1:6 (w/v) ที่ 25–27 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน กรองด้วยกระดาษ Whatman No.1 และระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นบรรจุสุญญากาศและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

สารสกัดน้ำ: นำใบหม่อนบดละเอียดแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ อัตราส่วน 1:5 (w/v) ที่ 60 องศา

เซลเซียส นาน 2 ชม. กรองด้วยกระดาษ Whatman No.1 และทำแห้งด้วยเครื่อง lyophilizer จากนั้นบรรจุสุญญากาศและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

● วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์อนุมูลอิสระโดย DPPH assay

เตรียมสารละลาย 0.1 mM DPPH ในแอบโซลูทเอทานอลและน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ พร้อมสารสกัดใบหม่อนเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในตัวทำละลายเดียวกัน และเจือจางให้ได้ 0.5–0.625 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำสารสกัด 100 ไมโครลิตรผสมกับ DPPH 800 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และคำนวณร้อยละการยับยั้งด้วยสมการนี้

$$\% \text{ DPPH scavenging} = ((\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

คำนวณค่า %DPPH scavenging และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัดใบหม่อน จากนั้นหาค่า IC₅₀ จากสมการกราฟ และเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid (Daduang et al., 2011)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Ferric subtracting antioxidant power (FRAP) assay

เตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสม 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 20 mM FeCl₃·6H₂O และ 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl อัตราส่วน 10:1:1 (v/v/v) เตรียมสารสกัด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำ 300 ไมโครลิตรผสมกับ FRAP reagent 2,700 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid (Daduang et al., 2011)

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดใบหม่อน

ทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminum chloride colorimetry โดยใช้สารสกัดเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 300 ไมโครลิตรเติม 95% เอทานอล ปริมาตร 1.7 มิลลิลิตรสารละลาย 10% AlCl₃ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและ 1 M potassium acetate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโน

เมตร และคำนวณจากกราฟมาตรฐานเคอร์ซีติน (สุธีรา มณีฉาย และคณะ, 2559)

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดใบหม่อน

ทดสอบปริมาณฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้สารสกัดเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 400 ไมโครลิตรเติม 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร พัก 5 นาที เติม 7.5% Na₂CO₃ ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตรและคำนวณจากกราฟสารมาตรฐาน gallic acid (Daduang et al., 2011)

การเตรียมตัวอย่างปลาร้าเพื่อหมักร่วมกับสารสกัด

นำปลาร้าสด (เนื้อปลา 200 กรัม + น้ำปลาร้า 300 มิลลิลิตร) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดใบหม่อนเอทานอลและน้ำจากสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสูงสุด ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:1) หมักที่อุณหภูมิห้องนาน 1 เดือน และตรวจนับเชื้อแบคทีเรียที่สัปดาห์ 0, 2 และ 4

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar disc diffusion

เตรียมสารสกัดใบหม่อนแต่ละพันธุ์เข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และทำ two-fold dilution จนถึง 0.097 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion โดยเตรียม Mueller Hinton agar (MHA) เจาะหลุมเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และ swab เชื้อความเข้มข้นประมาณ 10⁸ CFU/มิลลิลิตร ลงบนผิวอาหาร เติมสารสกัดหรือยาปฏิชีวนะควบคุม (ampicillin, ciprofloxacin) 100 ไมโครกรัม/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง แล้ววัด inhibition zone (มิลลิเมตร) (CLSI, 2009)

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimal bactericidal concentration; MBC)

ทดสอบค่า MIC และ MBC ของสารสกัดใบหม่อนแต่ละสายพันธุ์ (50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ด้วยวิธี broth microdilution ตาม CLSI (2009) โดยใช้

ampicillin และ ciprofloxacin เป็น positive control และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็น negative control ใส่สารสกัดและเชื้อ ประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร (วัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร) ลงในถาด 96 หลุม (96 well plate) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรจากแต่ละหลุมหยดบน Mueller Hinton agar และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสอีก 24 ชั่วโมง เพื่อประเมินค่า MIC และ MBC

การทดสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี total plate count

ทำการ serial dilution ของตัวอย่างปาลาร้าแบบ 10-fold จนถึงระดับ 10^{-5} นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ในจานเพาะเชื้อ เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA) ที่อุณหภูมิ 44-46 องศาเซลเซียสประมาณ 12-15 มิลลิลิตร หมุนจาน 3-4 ครั้งไปทางขวาและซ้าย พล่อยให้อาหารแข็งตัว คำนวณและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนับโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี (Speck, 1984)

การทดสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

นำตัวอย่างปาลาร้า 1 มิลลิลิตร ที่เจือจางแบบ 10-fold (10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3}) ใส่ใน TSB ผสม 10% NaCl อย่างละ 3 หลอด บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นเพื่อบ่งชี้ presumptive *S. aureus* และนับจำนวนหลอดที่เชื้อเจริญเพื่อนำไปคำนวณค่า MPN จากนั้นเชื้อเชื้อที่เจริญ streak บน mannitol salt egg-yolk agar (MSAEY) ผสม 10% NaCl บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่สงสัยทั้งหมด คือมีลักษณะขุ่น สีเหลืองทอง และมี clear zone รอบโคโลนี เลี้ยงใน nutrient broth ที่ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร ผสม rabbit plasma 1 มิลลิลิตร เขย่าและบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมงหากไม่แข็งตัว ให้บ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมง (Speck, 1984)

การทดสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*

วิธีดัดแปลงจาก Speck (1984): ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ผสมกับ 0.85% NaCl 225 มิลลิลิตร ทำการเจือจาง 1:10–1:10,000 แล้วนำ 0.1 มิลลิลิตร จากแต่ละความเข้มข้น spread บน phenol red egg yolk polymyxin agar บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีตะกอนสีขาวโดยไม่มีโซนสีแดง เลี้ยง

บน nutrient agar slant ที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เชื้อที่ได้ตรวจสอบด้วยการทดสอบทางชีวเคมีดังนี้

Nitrate reduction: เลี้ยงใน nitrate broth 2-3 วัน เติม sulfanilic acid และ dimethyl naphthol 0.6 มิลลิลิตร ตามด้วย 16%KOH 0.2 มิลลิลิตร หากเกิดสีแดงภายใน 4 ชั่วโมง แปลผลบวก

Acetyl methyl carbinol (Voges-Proskauer test): เลี้ยงใน MR-VP broth 48 ชั่วโมง เติม 6% α -naphthol 0.6 มิลลิลิตร และ 16%KOH 0.2 มิลลิลิตร เขย่า หากเกิดสีแดงภายใน 4 ชั่วโมง แปลผลบวก

Lecithinase activity: เชื้อเชื้อลงบน egg yolk agar บ่ม 24-48 ชั่วโมง หากเกิดความขุ่นรอบโคโลนี แปลผลบวก

● สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการทดลองตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้งโดยอิสระต่อกัน เพื่อหาค่าเฉลี่ย (Mean) และ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงการยับยั้งเชื้อแกรมบวกในกระบวนการหลังหมักปาลาร้า ใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics v.22 วิเคราะห์ข้อมูลด้วย One-Way ANOVA และ Post Hoc (Duncan) เพื่อตรวจหาความแตกต่างระหว่างกลุ่ม และ Independent t-test สำหรับการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha=0.05$

ผลการวิจัย

● ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

จากการทดสอบสารมาตรฐาน ascorbic acid พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเมื่อเทียบกับสารสกัดทั้งหมด โดยมีค่า IC₅₀ ต่ำที่สุดที่ 0.59 ± 0.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (เอทานอล) และ 0.64 ± 0.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (น้ำ) โดยรวมแล้ว การสกัดด้วยเอทานอลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าการสกัดด้วยน้ำ ซึ่งสะท้อนจากค่า IC₅₀ ที่ต่ำกว่าในหลายสายพันธุ์ ใบหม่อนพันธุ์สกลนคร 85 (เอทานอล) แสดงฤทธิ์สูงสุดในกลุ่มสารสกัดทั้งหมด (IC₅₀ = 1.72 ± 0.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (น้ำ) มีฤทธิ์สูงสุดในกลุ่มที่ใช้น้ำ (IC₅₀ = 4.61 ± 0.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) อย่างไรก็ตาม

เมื่อเปรียบเทียบกับโดยตรง พบว่าพันธุ์สกลนคร 85 (เอทานอล) มีค่า IC50 ต่ำกว่าพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (น้ำ) อย่างมีนัยสำคัญ แสดงถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เหนือกว่า (ตารางที่ 1)

● ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดใบหม่อนทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่าใบหม่อนพันธุ์สกลนคร 85 มีฤทธิ์สูงสุด ทั้งในตัวทำละลายเอทานอล (0.062 ± 0.002 มิลลิกรัมสมมูล ascorbic acid/มิลลิกรัมสารสกัด) และน้ำ (0.019 ± 0.0009 มิลลิกรัม/มิลลิกรัมสารสกัด) เมื่อเปรียบเทียบตัวทำละลาย พบว่าการสกัดด้วยเอทานอลให้ฤทธิ์สูงกว่าน้ำ ยกเว้นพันธุ์สกลนคร 72 ที่การสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์สูงกว่าเอทานอล (ตารางที่ 1)

● การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

จากการนำสารสกัดมาทดสอบพบว่าเอทานอลมีประสิทธิภาพสูงกว่าน้ำในการสกัดสารประกอบสำคัญ ทั้งกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยพันธุ์สกลนคร 85 ที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงสุด (0.183 ± 0.012 มิลลิกรัมสมมูล gallic acid/มิลลิกรัมสารสกัด, 125.39 ± 3.96 มิลลิกรัมสมมูล quercetin/มิลลิกรัมสารสกัด) สูงกว่าพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่สกัดด้วยน้ำอย่างมาก (ตารางที่ 1)

● การวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อพบว่า สารสกัดใบหม่อนทุกสายพันธุ์ยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *B. cereus*) แต่ไม่ยับยั้งแกรมลบ (*E. coli* และ *Salmonella* spp.) โดยในกลุ่มเอทานอล พันธุ์หม่อนไผ่มีฤทธิ์สูงสุด (*S. aureus* 13.93 ± 0.83 มิลลิเมตร *B. cereus* 12.03 ± 1.35 มิลลิเมตร) ส่วนกลุ่มน้ำ พันธุ์หม่อนไผ่และบุรีรัมย์ 60 มีฤทธิ์ดีที่สุดต่อ *S. aureus* ผลการทดสอบค่า MIC/MBC ยืนยันว่าสารสกัดเอทานอลมีประสิทธิภาพสูง โดยพันธุ์หม่อนไผ่และสกลนคร 85 ยับยั้ง *S. aureus* ที่ค่า MIC 12.5–25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ MBC 25–50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ขณะที่พันธุ์หม่อนไผ่ยับยั้ง *B. cereus* ได้ดีที่สุด (MIC 3.125–6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร MBC 3.125–12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) สรุปได้ว่าสารสกัดเอทานอล

โดยเฉพาะพันธุ์หม่อนไผ่และสกลนคร 85 มีศักยภาพสูงในการยับยั้งเชื้อแกรมบวก(ตารางที่ 2 และตารางที่ 3)

● การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมดในกระบวนการหมัก

การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมดในกระบวนการหมักปลาร้าจาก 2 แหล่งผลิตร่วมกับสารสกัดใบหม่อนไผ่ (EtOH, DW 50 มก./มล. และ DW น้ อัตราส่วน 1:1) พบว่าสารสกัดเอทานอลช่วยลดจำนวนแบคทีเรียได้อย่างมีนัยสำคัญใน 2 สัปดาห์แรก โดยลดลง 5.18 และ 3.97 log CFU/มิลลิลิตร ในแหล่งผลิตที่ 1 และ 2 ตามลำดับ แต่ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 4 จนไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม ส่วนสารสกัดน้ำให้ผลคล้ายกัน โดยลดเชื้อได้ชัดเจนในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ขณะที่น้ำชาใบหม่อนลดปริมาณเชื้อได้ภายใน 2 สัปดาห์แรก โดยเฉพาะแหล่งผลิตที่ 2 ซึ่งยังคงลดได้ต่อเนื่องถึงสัปดาห์ที่ 4 สรุปได้ว่าการเติมสารสกัดใบหม่อนทุกชนิดช่วยลดปริมาณแบคทีเรียในระยะสั้น (1–2 สัปดาห์) แต่ประสิทธิภาพลดลงเมื่อการหมักนานขึ้น (ตารางที่ 4)

● การตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* ในกระบวนการหมัก

การตรวจวิเคราะห์ *S. aureus* ในกระบวนการหมักปลาร้าพบว่า ในแหล่งผลิตที่ 1 การเติมสารสกัดใบหม่อนทุกชนิด (เอทานอล น้ำ และน้ำชา) ทำให้ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นต่อเนื่องตลอด 2–4 สัปดาห์ สำหรับแหล่งผลิตที่ 2 สารสกัดน้ำและน้ำชาลดปริมาณเชื้อได้ในระยะแรก แต่เชื้อกลับเพิ่มขึ้นอีกในสัปดาห์ที่ 4 ขณะที่สารสกัดเอทานอลไม่สามารถยับยั้งได้เลย โดยปริมาณเชื้อเพิ่มจาก 43 MPN/มิลลิลิตร (สัปดาห์ที่ 2) เป็น >1100 MPN/มิลลิลิตร (สัปดาห์ที่ 4) สรุปได้ว่า แม้สารสกัดใบหม่อนมีฤทธิ์ต้านเชื้อในห้องปฏิบัติการ แต่ในสภาพจริงของการหมักปลาร้า ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ยังจำกัดและไม่สามารถควบคุมเชื้อได้ในระยะยาว อันเป็นผลจากปัจจัยแวดล้อมที่ซับซ้อนของระบบการหมัก (ตารางที่ 5)

● การตรวจวิเคราะห์ *B. cereus* ในกระบวนการหมัก

การตรวจวิเคราะห์ *B. cereus* ในกระบวนการหมักปลาร้าพบว่า สารสกัดใบหม่อนทุกชนิด (เอทานอล น้ำ และน้ำชา) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้อย่างมีประสิทธิภาพ ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 และ

ลดลงเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 4 แม้จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่เติมและไม่เติมสารสกัด แต่การเปลี่ยนแปลงไม่ต่อเนื่องและไม่สามารถกำจัดเชื้อได้ สรุปว่าสารสกัดใบหม่อนมีผลต่อ *B. cereus* แต่ไม่สามารถควบคุมการเจริญได้ในระยะยาว (ตารางที่ 6)

บทสรุปและอภิปรายผล

● อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาองค์ประกอบของสารเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของตัวทำละลายของใบหม่อนทั้ง 5 สายพันธุ์ และการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกระบวนการหลังหมักปลาร้าพบว่า มีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อปริมาณและประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบหม่อนได้แก่ชนิดตัวทำละลายอุณหภูมิในการสกัดและชนิดสายพันธุ์หม่อน โดยเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพสูงในการสกัดสารประกอบกลุ่ม ฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (Wang, Zu, Fu, & Efferth, 2012) เนื่องจากสารเหล่านี้มีคุณสมบัติที่ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วระดับปานกลาง ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของเอทานอล ทำให้สารสกัดที่ได้มีปริมาณสารสำคัญสูงและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า น้ำน้ำแม้จะสามารถใช้สกัดสารสำคัญได้ แต่ประสิทธิภาพจะต่ำกว่าเอทานอล เนื่องจากน้ำมีขั้วสูงกว่า ทำให้สามารถสกัดสารอินทรีย์ที่มีขั้วน้อยกว่าได้ไม่ดีเท่าที่ควร (ภาเกล้า ภูมิใหญ่ & ชญาณิศา สุพา, 2558; สุกร บุษยีน, ปาริยา ณ นคร, & นิรมล ศากยวงศ์, 2559) การสกัดด้วยน้ำจึงต้องควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะช่วยเพิ่มปริมาณสารที่สกัดได้ แต่ไม่ควรเกิน 150 องศาเซลเซียสเพราะจะทำให้สารฟลาโวนอยด์สลายตัวได้ (Prommuak, De-Eknamkul, & Shotipruk, 2008) และความแตกต่างทางชีวภาพปริมาณสารสำคัญในใบหม่อน ยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของหม่อนอีกด้วย (เช่น สกลนคร 85, หม่อนไผ่) แต่ละสายพันธุ์จะสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณที่แตกต่างกัน ทำให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดแตกต่างกันออกไปตามสายพันธุ์ แม้จะใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันก็ตาม (Iqbal et al., 2012; เทียนทิพย์ กสิกรณ์ และคณะ, 2562; ณชนก ฆาธอัครเดชา & อนงค์ ศรีโสภา, 2563)

ความแตกต่างในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบพบว่าสารสกัดจากใบหม่อนทั้ง 5 สายพันธุ์

ที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *B. cereus*) เท่านั้น แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ในพืชชนิดอื่นๆ (วัชรินทร์ รังษิณสุรัตน์ และคณะ, 2559; ลัดดาวัลย์ พะวร และคณะ, 2563) เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบที่มีผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่า โดยมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ที่ประกอบด้วย ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันไม่ให้สารแปลกปลอม รวมถึงสารสกัดจากพืช เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ (Shan, Cai, Brooks, & Corke, 2007) กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากใบหม่อนโดยสารสกัดจากพืช เช่น สารประกอบในกลุ่ม เทอร์พีนอยด์ (terpenoids), แอลคาลอยด์ (alkaloids) และฟีนอลิก (phenolic compounds) จะออกฤทธิ์โดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกโดยสารประกอบเหล่านี้จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนและเอนไซม์ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เสียหายความสามารถในการซึมผ่านของสารต่างๆ เสียไป และนำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด (Gill & Holley, 2006) ซึ่งสารสกัดในบรรดา 5 สายพันธุ์ที่ศึกษา หม่อนไผ่เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ *B. cereus* ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางชีวภาพของพืชแต่ละสายพันธุ์ที่มีผลต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้

เมื่อใช้ในการทดลองกับปลาร้าหลังหมักจริง สารสกัดจากน้ำและน้ำชาใบหม่อนกลับมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียโดยรวมและเชื้อ *B. cereus* ได้ดีกว่าสารสกัดเอทานอล ซึ่งอาจเป็นเพราะสารสกัดเอทานอลไม่สามารถละลายในน้ำกลั่นที่ไขมันได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้ประสิทธิภาพลดลง อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากน้ำและน้ำชาใบหม่อน ก็ยังไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีแคปซูลป้องกันการซึมผ่านของสาร (สุพันธุ์ นิมรัตน์, 2555; ณัฐพล มุ่งชูเกียรติสกุล, 2559)

● สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้แสดงว่าสารสกัดใบหม่อน โดยเฉพาะในรูปน้ำชา ซึ่งสามารถผลิตได้ในระดับครัวเรือน มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่อาจปนเปื้อนในกระบวนการผลิตปลาร้า อย่างไรก็ตาม เพื่อการประยุกต์ใช้จริง ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสัดส่วนและอุณหภูมิ

ที่เหมาะสมในการสกัด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสารสำคัญในการควบคุมเชื้อก่อโรคในกระบวนการหลังหมักปลาร้า

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัย คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2563 ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ

สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ฯ ขอนแก่น ที่เอื้อเพื่อพืชพรรณและการเก็บข้อมูล รองศาสตราจารย์ ดร. ชฎามาศ สกลศิลป์ศิริ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่อง rotary evaporator และคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับสถานที่และครุภัณฑ์ที่ใช้ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- ณชนก เมธาอัครเดชา, & อนงค์ ศรีโสภา. (2563). ปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชาใบหม่อนและชาผงใบหม่อนชนิดละลายน้ำ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 9(2), 230-242.
- ณัฐพล มุ่งชูเกียรติสกุล. (2559). การศึกษารูปแบบการดื้อยาและยีนดื้อยาของเชื้อ *Staphylococcus aureus*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- ทิพย์กมล ภูมิพันธ์, & อุไรวรรณ อินทร์ม่วง. (2559). สุขลักษณะของการประกอบกิจการผลิตปลาร้าและปลาส้มในอำเภอหนึ่ง จังหวัดขอนแก่น. *วารสารวิจัย มข. (ฉบับบัณฑิตศึกษา)*, 16(2), 75-85.
- เทียนทิพย์ กสิกรรม, ปัญญา ปัญญาทิพย์, ขวลิศ โยงรัมย์, อรวรรณ ดอกเกี้ยง, บรรลือ สังข์ทอง, & เพลินทิพย์ ภูทองกิ่ง. (2562). ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และเมลาโตนินของใบหม่อน 5 พันธุ์. *วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก*, 17(3), 428-436.
- นพพร ลำเลิศกุล. (2549). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. เชียงใหม่: พิกซ์การพิมพ์.
- บุญชม ศรีสะอาด. (2535). *วิธีการทางสถิติสำหรับนักวิจัย*. กรุงเทพฯ: สุวีริยาสาส์น.
- ภาเกล้า ภูมิใหญ่, & ชญาณิศรา สุพา. (2558). ตัวทำละลายที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากพืชสมุนไพร. ใน *รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ครั้งที่ 2*. (หน้า 627-635).กำแพงเพชร: มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร.
- มณฑล วิสุทธิ. (2560). ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococci* ของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นบางชนิดในจังหวัดนครราชสีมา. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 45(4), 805-816.
- มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมแพทย์แผนไทยเดิม. (2559). *ตำราเภสัชกรรมไทย*. มหาสารคาม: ภาควิชาแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- ลัดดาวัลย์ พะวร, อรุมา จันทรเสถียร, ปัญจมาภรณ์ จันทเสนา, & นพรัตน์ สีสังข์. (2563). การคัดกรองฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อฉวยโอกาสของผักพื้นบ้านซึ่งเก็บจากอำเภอสีดา จังหวัดนครราชสีมา. ค้นเมื่อ 20 กันยายน 2562, จาก http://journal.nmc.ac.th/th/admin/Journal/2563Vol12No1_105.pdf
- วัชรินทร์ รังษิณสุรัตน์, พชร กัมมารเจษฎากุล, & อิสยา จันทรวิทยานูจิต. (2559). ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* ATCC 25922. *วารสารมฉก. วิชาการ*, 19(38), 35-48.
- สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล. (2553). การสุ่มตัวอย่างอาหารเพื่อวิเคราะห์ความปลอดภัยด้านอาหาร. ค้นเมื่อ 27 มกราคม 2563, จาก [https://kaarsumtawyaangaahaar_1-34_cchbkhrrb%20\(4\).pdf](https://kaarsumtawyaangaahaar_1-34_cchbkhrrb%20(4).pdf)
- สำนักป้องกันควบคุมโรค. (2562). *สถานการณ์โรคและภัยสุขภาพ ในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 8*. ค้นเมื่อ 26 กันยายน 2562, จาก http://odpc8.ddc.moph.go.th/upload_epi_article/Ar5jxTIQgRsGtP8whedD.pdf
- สุธิยา มณีฉาย, และประสพ รินทอง. (2559). ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากดอกแก้วแระและดอกส้มป่อย. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, 44(1), 142-152.
- สุพัฒนา จันทา. (2561). *ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบสบเสื่อในการยับยั้งเชื้อ Ralstonia solanacearum* ในเชิง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน) สาขาวิชาเทคโนโลยีเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

- สุบัณฑิต นิมรรัตน์. (2555). การจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมวงศ์ไมโครคอคเคซีอีและ สเตรปโตคอคเคซีอี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุภกร บุญยืน, ปาริยา ณ นคร, & นิรมล ศากยวงศ์. (2559).ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และ ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดพืชทางนยาง. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 5(1), 20-28.
- อมรรัตน์ สีสุกอง, กัลยาภรณ์ จันตรี, & ศรีสุดา หาญภาคภูมิ. (2559). การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากวัชพืชบางชนิด. *วารสารวิจัยและพัฒนาโดยองค์กรในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 11(1), 69-82.
- อรณี ศรีนวล, วรวิทย์ มณีพิทักษ์สันติ, สุทธิรา พลเจริญ, ทิพรณี เสนะวงศ์, เสาวณีย์ อภิญาณวัฒน์, วิโรจน์ แก้วเรือง, และคณะ. (2560). การประเมินคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของใบหม่อน เพื่อเป็นวัตถุดิบทางเลือกในอาหารสัตว์น้ำ. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 48(2), 1156-1161.
- 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. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute.
- Daduang, J., Daduang, S., Hongsprabhas, 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.
- De Oliveira, A. M., Mesquita, M., da Silva, G. C., de Oliveira Lima, E., de Medeiros, P. L., Paiva, P. M., et al. (2015). Evaluation of toxicity and antimicrobial activity of an ethanolic extract from leaves of *Morus alba* L. (Moraceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, e513978.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1), 1-9.
- Iqbal, S., Younas, U., Sirajuddin, Chan, K. W., Sarfraz, R. A., & Uddin, K. (2012). Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of mulberry (*Morus* sp.): a comparative study. *International Journal Molecular Sciences*, 13, 6651-6664.
- Prommuak, C., De-Eknankul, W., & Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. *Separation and Purification Technology*, 62, 444-448.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117(1), 112-119.
- Speck, M. L. (1984). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, DC: American Public Health Association.
- Wang, W., Zu, Y., Fu, Y., & Efferth, T. (2012). In vitro antioxidant and antimicrobial activity of extracts from *Morus alba* L. leaves, stems and fruits. *The American journal of Chinese medicine*, 40(02), 349-356.

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของสารและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบหม่อน

ตัวทำ ละลาย	ตัวอย่าง	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ						ปริมาณสารประกอบ					
		วิธี DPPH assay (IC ₅₀)			วิธี FRAP assay			ฟีนอลิกรวม			ฟลาโวนอยด์รวม		
		(มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			(มิลลิกรัมสมมูล Ascorbic acid/มิลลิกรัม สารสกัด)			(มิลลิกรัมสมมูล gallic acid /มิลลิกรัมสาร สกัด)			(มิลลิกรัมสมมูล quercetin /มิลลิกรัมสาร สกัด)		
		$\bar{X} \pm S.D.$	95%CI	P-value	$\bar{X} \pm S.D.$	95%CI	P-value	$\bar{X} \pm S.D.$	95%CI	P-value	$\bar{X} \pm S.D.$	95%CI	P-value
เอทานอล	สารมาตรฐาน Trolox	0.59±0.00 ^{aA}	-	>0.001	-	-	>0.001	-	-	>0.001	-	-	>0.001
	บุรีรัมย์ 60	4.96±0.17 ^{cA}	35.53-197.08		0.029±0.000 ^{cA}	0.24-0.28		0.076±0.001 ^{cA}	0.073-0.078		50.54±0.96 ^{cA}	47.63-53.45	
	คุณไผ่	6.80±0.15 ^{dA}	102.00-106.45		0.022±0.001 ^{dA}	0.25-0.29		0.059±0.001 ^{dA}	0.055-0.063		40.70±0.52 ^{dA}	39.13-42.27	
	หม่อนไผ่	2.56±0.02 ^{bA}	100.03-116.55		0.054±0.001 ^{bA}	0.24-0.26		0.131±0.002 ^{bA}	0.12-0.14		107.00±1.11 ^{bA}	103.62-110.38	
	สกลนคร 72	23.17±1.88 ^{eA}	23.91-25.17		0.004±0.000 ^{eA}	0.23-0.25		0.010±0.001 ^{eA}	0.008-0.011		10.44±0.34 ^{eA}	9.41-11.46	
	สกลนคร 85	1.72±0.00 ^{abA}	21.06-22.48		0.062±0.002 ^{aA}	0.26-0.27		0.183±0.012 ^{aA}	0.15-0.22		125.39±3.96 ^{aA}	113.34-137.42	
น้ำ	สารมาตรฐาน Trolox	0.64±0.00 ^{aA}	-	0.441	-	-	0.005	-	-	>0.001	-	-	>0.001
	บุรีรัมย์ 60	4.61±0.14 ^{bA}	26.64-35.37		0.009±0.0005 ^{cB}	0.20-0.22		0.031±0.001 ^{aB}	0.029-0.032		9.48±0.23 ^{aB}	8.77-10.18	
	คุณไผ่	10.89±0.09 ^{cA}	31.69-32.11		0.001±0.000 ^{eB}	0.18-0.21		0.019±0.001 ^{cB}	0.017-0.021		6.57±0.15 ^{cB}	6.11-7.03	
	หม่อนไผ่	10.99±0.29 ^{cA}	31.90-32.44		0.003±0.0001 ^{dB}	0.18-0.21		0.007±0.001 ^{dB}	0.004-0.009		2.81±0.17 ^{dB}	2.28-3.34	
	สกลนคร 72	17.45±0.85 ^{dA}	31.20-32.23		0.012±0.0006 ^{bA}	0.18-0.20		0.003±0.000 ^{eB}	0.001-0.004		1.64±0.09 ^{eB}	1.37-1.90	
	สกลนคร 85	10.16±0.04 ^{cA}	31.18-31.46		0.019±0.0009 ^{aB}	0.18-0.19		0.021±0.001 ^{bB}	0.018-0.024		7.44±0.70 ^{bB}	5.31-9.56	

หมายเหตุ: a, b, c, d, e หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ Duncan's multiple range test (P<0.05) ในคอลัมน์เดียวกัน, A-B หมายถึง ตัวทำละลายมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05) ในแถวเดียวกันโดย A คือ สารสกัดจากตัวทำละลายที่ให้ผลที่สูงที่สุด, B คือ สารสกัดจากตัวทำละลายที่ให้ผลที่ต่ำที่สุด

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากใบหม่อน

ตัวทำ ละลาย	ตัวอย่าง	Inhibition Zone (มิลลิเมตร) จากสกัดจากใบหม่อน											
		<i>S. aureus</i>	95%CI	P-value	<i>B. cereus</i>	95%CI	P-value	<i>E. coli</i>	95%CI	P-value	<i>Salmonella</i> spp.	95%CI	P-value
เอทานอล	Positive control	29.68±1.30 ^a	26.45-32.91	>0.001	25.57±1.26 ^a	22.44-28.69	>0.001	33.38±1.85	27.96-39.70	>0.001	36.43±0.31 ^a	35.49-37.37	>0.001
	Negative control	NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	
	บูรีรัมย์ 60	10.87±0.81 ^c	8.86-12.87		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	
	คุณไผ่	9.72±0.78 ^c	7.78-11.66		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	
	หม่อนไผ่	13.93±0.83 ^b	11.86-16.00		12.03±1.35 ^b	8.66-15.41		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	
	สกลนคร 72	10.90±2.51 ^c	4.65-17.15		7.82±3.14 ^c	0.00-15.63		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	
	สกลนคร 85	12.50±2.18 ^{bc}	7.08-17.91		8.27±2.05 ^c	3.17-13.37		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	
น้ำ	Positive control	29.68±1.30 ^a	26.45-32.91	>0.001	25.57±1.03 ^a	22.44-28.69	>0.001	33.38±1.85 ^a	27.96-39.70	>0.001	36.43±0.31 ^a	27.96-39.70	>0.001
	Negative control	NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	
	บูรีรัมย์ 60	9.33±1.15 ^b	6.46-12.20		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	
	คุณไผ่	NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	
	หม่อนไผ่	11.53±2.65 ^b	4.94-18.13		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	
	สกลนคร 72	NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	
	สกลนคร 85	NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	

หมายเหตุ: a, b, c, d, e บ่งบอกถึงความแตกต่างภายในคอลัมน์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ Duncan's multiple range test (P<0.05), NI หมายถึง no inhibition

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อ (minimum bactericidal concentration, MBC) *S. Aureus* และ *B. cereus*

ตัวทำ ละลาย	ตัวอย่าง	ค่า MIC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)						ค่า MBC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)					
		<i>S. aureus</i>	95% CI	p-value	<i>B. cereus</i>	95% CI	p-value	<i>S. aureus</i>	95% CI	p-value	<i>B. cereus</i>	95% CI	p-value
เอทานอล	บูรีรัมย์ 60	25.00±0.00 ^a	25.00-25.00	0.072	12.50±0.00 ^b	12.50-12.50	0.003	41.67±11.79 ^a	5.81-77.52	0.903	20.83±5.89 ^b	2.90-38.76	0.003
	คุณไพร	25.00±0.00 ^a	25.00-25.00		12.50±0.00 ^b	12.50-12.50		41.67±11.79 ^a	5.81-77.52		25.00±0.00 ^b	25.00-25.00	
	หม่อนไผ่	16.67±5.89 ^a	-1.26 – 34.59		4.17±1.47 ^a	-0.32 – 8.65		41.67±11.79 ^a	5.81-77.52		6.25±4.42 ^a	-7.19 – 19.69	
	สกลนคร 72	25.00±0.00 ^a	25.00-25.00		12.50±0.00 ^b	12.50-12.50		50.00±0.00 ^a	50.00-50.00		12.50±0.00 ^a	-13.76 – 22.09	
	สกลนคร 85	16.67±5.89 ^a	-1.26 – 34.59		7.29±3.90 ^a	-4.57 – 19.15		41.67±11.79 ^a	5.81-77.52		7.29±3.90 ^a	-4.57 – 19.15	
น้ำกลั่น ปราศจาก เชื้อ	บูรีรัมย์ 60	NI	0.00-0.00	-	NI	0.00-0.00	-	NI	0.00-0.00	-	NI	0.00-0.00	-
	คุณไพร	NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	
	หม่อนไผ่	NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	
	สกลนคร 72	NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	
	สกลนคร 85	NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00		NI	0.00-0.00	

หมายเหตุ: Positive control : *S. aureus* = Ampicillin 1.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, *B. cereus* = Ciprofloxacin 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, Negative control : น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

a, b, c, d, e บ่งบอกถึงความแตกต่างภายในคอลัมน์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ Duncan's multiple range test (P<0.05), NI หมายถึง no inhibition

ตารางที่ 4 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างปลาร้าจากกระบวนการหลังหมัก

ตัวอย่าง	Total viable count (log CFU/มิลลิลิตร)					
	ปลาร้าแหล่งที่ 1			ปลาร้าแหล่งที่ 2		
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4
STD	5.15±0.09 ^{bc}	5.74±0.06 ^a	5.24±0.10 ^a	4.01±0.32 ^b	4.32±0.09 ^b	4.13±0.13 ^a
DW(ผ)	5.13±0.09 ^{bc}	5.10±0.03 ^{bc}	4.29±0.09 ^b	3.99±0.19 ^b	3.42±0.05 ^d	3.18±0.12 ^d
DW(น)	7.09±0.03 ^a	5.07±0.04 ^c	5.12±0.12 ^a	7.79±0.04 ^a	7.09±0.01 ^a	3.43±0.08 ^c
EtOH	5.05±0.08 ^c	5.18±0.23 ^{bc}	5.24±0.01 ^a	4.17±0.04 ^b	3.97±0.18 ^c	3.82±0.09 ^b

หมายเหตุ: a, b, c, d บ่งบอกถึงความแตกต่างภายในคอลัมน์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ Duncan's multiple range test (P<0.05), STD คือ ปลาร้าที่ได้รับจากแหล่งที่ 1 และ 2 ที่ไม่ได้เติมสารสกัด, DW(ผ)คือ ปลาร้าที่ผสมสารสกัดจากตัวทำละลายน้ำปราศจากเชื้อแล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง, DW(น)คือปลาร้าที่ผสมสารสกัดจากน้ำขาใบหม่อน ที่ใช้ในการทดสอบเพื่อประยุกต์ใช้กับแบบวิถีชาวบ้าน, EtOH คือปลาร้าที่ผสมสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอล

ตารางที่ 5 ปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างปลาร้าจากกระบวนการหลังหมัก

ตัวอย่าง	<i>S. aureus</i> (MPN/มิลลิลิตร)											
	ปลาร้าแหล่งที่ 1						ปลาร้าแหล่งที่ 2					
	สัปดาห์ที่ 0	%95CI	สัปดาห์ที่ 2	%95CI	สัปดาห์ที่ 4	%95CI	สัปดาห์ที่ 0	%95CI	สัปดาห์ที่ 2	%95CI	สัปดาห์ที่ 4	%95CI
STD	240	36-1,300	28	7-130	1100	150-4,800	9.4	3-44	15	4-47	>1100	-
DW(ผ)	460	71-2,400	>1100	-	>1100	-	>1100	-	35	14-230	36	14-230
DW(น)	290	36-1,300	>1100	-	>1100	-	20	10-150	<3	<0.5-9	9.4	3-44
EtOH	20	10-150	>1100	-	>1100	-	9.4	3-44	43	15-380	>1100	-

หมายเหตุ: มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยอ้างอิงจากตาราง MPN index, STD คือ ปลาร้าที่ได้รับจากแหล่งที่ 1 และ 2 ที่ไม่ได้เติมสารสกัด, DW(ผ) คือ ปลาร้าที่ผสมสารสกัดจากตัวทำละลายน้ำปราศจากเชื้อแล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง, DW(น) คือ ปลาร้าที่ผสมสารสกัดจากตัวทำละลายน้ำชาใบหม่อน ที่ใช้ในการทดสอบเพื่อประยุกต์ใช้กับแบบวิถีชาวบ้าน, EtOH คือ ปลาร้าที่ผสมสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอล

ตารางที่ 6 ปริมาณเชื้อ *Bacillus cereus* ในตัวอย่างปลาร้าจากกระบวนการหลังหมัก

ตัวอย่าง	<i>Bacillus cereus</i> (log CFU/มิลลิลิตร)					
	ปลาร้าแหล่งที่ 1			ปลาร้าแหล่งที่ 2		
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4
STD	4.93±0.02 ^a	5.32±0.04 ^a	5.28±0.04 ^a	3.56±0.09 ^a	3.81±0.02 ^a	3.73±0.15 ^a
DW(ผ)	4.65±0.06 ^c	4.97±0.03 ^b	5.00±0.05 ^b	3.26±0.10 ^b	3.37±0.08 ^{bc}	3.29±0.06 ^b
DW(น)	4.76±0.05 ^b	4.79±0.03 ^c	4.78±0.14 ^c	3.29±0.17 ^b	3.34±0.09 ^c	3.35±0.12 ^b
EtOH	4.71±0.05 ^{bc}	4.69±0.01 ^d	4.90±0.02 ^{bc}	3.32±0.05 ^b	3.48±0.07 ^b	3.44±0.10 ^b

หมายเหตุ: a, b, c, d บ่งบอกถึงความแตกต่างภายในคอลัมน์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ Duncan's multiple range test (P<0.05), STD คือ ปลาร้าที่ได้รับจากแหล่งที่ 1 และ 2 ที่ไม่ได้เติมสารสกัด, DW(ผ) คือ ปลาร้าที่ผสมสารสกัดจากตัวทำละลายน้ำปราศจากเชื้อแล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง, DW(น) คือ ปลาร้าที่ผสมสารสกัดจากตัวทำละลายน้ำชาใบหม่อน ที่ใช้ในการทดสอบเพื่อประยุกต์ใช้กับแบบวิถีชาวบ้าน, EtOH คือ ปลาร้าที่ผสมสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอล