

การศึกษาผลของสารสกัดที่ได้จากน้ำทับทิมและเปลือกทับทิมต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก

The effect of pomegranate juice and pomegranate peel extracts on free radical scavenging and antimicrobial activities against oral pathogens

กรวัชร ไทยรัตน์¹ และ พรเพ็ญ ดารารัตน์^{2*}
Kornvajra Thairat¹ and Pornpen Dararat^{2*}

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณสมบัติที่น่าสนใจของสารสกัดจากน้ำทับทิมและเปลือกทับทิมในเบื้องต้น โดยมุ่งเน้นการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียในช่องปาก โดยเฉพาะแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ที่พบในน้ำทับทิมและเปลือกทับทิม เช่น ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (Cyanidin-3-Glucoside) และ มัลวิดิน (Malvidin) กระบวนการสกัดและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นสูงสุดของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (Cyanidin-3-Glucoside) ในตัวอย่างคือ 0.310 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และของมัลวิดิน (Malvidin) คือ 0.768 ± 0.008 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม นอกจากนี้ ความเข้มข้นสูงสุดของสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างสารสกัดมีความเข้มข้น 343.63 ± 32.14 มิลลิกรัม GAE ต่อ 100 กรัม การศึกษาผลการยับยั้งแบคทีเรียจากสารสกัดตัวอย่างพบว่า มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ทั้งนี้ การวิจัยเบื้องต้นพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดยังคงมีปริมาณน้อย

ดังนั้น จึงจำเป็นต้องพัฒนากระบวนการสกัดให้บริสุทธิ์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้น มีแนวโน้มในการนำสารสกัดจากผลทับทิมไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย

คำสำคัญ: น้ำทับทิม; เปลือกทับทิม; แอนโทไซยานิน; สารประกอบฟีนอลิก; ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย

¹ งานบริการเพื่อการวิจัย สำนักงานวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, ประเทศไทย

² ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, ประเทศไทย

¹ Research Service Section, Faculty of Dentistry, Mahidol University, Thailand

² Department of Pharmacology, Faculty of Dentistry, Mahidol University, Thailand

* Corresponding Author: e-mail: pornpen.dar@mahidol.ac.th

Abstract

This study aims to evaluate the interesting properties of pomegranate juice and peel extracts, focusing on the investigation of antioxidant activity and oral bacteria inhibition, specifically Anthocyanins found in the juice and peel, such as Cyanidin-3-Glucoside and Malvidin. The extraction process and analysis were performed using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).

The experimental results revealed that the highest concentration of Cyanidin-3-Glucoside was 0.310 ± 0.01 mg/mL, and that of Malvidin was 0.768 ± 0.008 µg/mg. Additionally, the highest concentration of phenolic compounds in the sample extract was found to be 343.63 ± 32.14 mg GAE per 100 grams. The study also found that the sample extract showed antibacterial activity against two bacteria: *Staphylococcus aureus* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Furthermore, the preliminary antioxidant study showed low levels of antioxidants, indicating the need to refine the extraction process to increase the concentration.

The trend of using pomegranate extract shows promising potential for effective bacterial inhibition.

Keywords: pomegranate juice; pomegranate peel extracts; anthocyanin; phenolic compound; antibacterial

หลักการและเหตุผล

ผลทับทิม (*Punica granatum* L.) เป็นพืชที่ได้รับความนิยม มีความหลากหลายของสายพันธุ์ทั้งในประเทศไทย, สหรัฐอเมริกาและอินเดีย คณะผู้วิจัยศึกษาผลทับทิมจากแต่ละสายพันธุ์ เพื่อหาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระน้ำทับทิมและเปลือกทับทิม สารสำคัญที่ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) โดยเฉพาะ แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) (Chaovanalikit et al., 2012) การบริโภคน้ำทับทิม มีสารโพลีฟีนอล (Polyphenols) มีประโยชน์ต่อสุขภาพ สารต้านอนุมูลอิสระจากน้ำทับทิมและเปลือกทับทิมมีความสำคัญในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวก (Ahmad & Beg, 2001) โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปัญหาสุขภาพในช่องปากและระบบทางเดินอาหาร ตัวอย่างเช่น *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกก่อให้เกิดฟันผุ โดยเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรด สาเหตุทำลายเคลือบผิวฟันและสร้างไบโอฟิล์มเกิดคราบพลัคในช่องปาก *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) พบในระบบทางเดินอาหาร กลายเป็นเชื้อก่อโรคเมื่อเข้าสู่คลองรากฟัน กรณีติดเชื้อคลองรากฟัน และเป็นเชื้อมีความทนทานสูง

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) เป็นเชื้อที่พบได้บ่อยบนผิวหนัง และก่อให้เกิดการติดเชื้อในช่องปากหรือภาวะติดเชื้อในโพรงไขสันหลัง ส่วน *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่สัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบชนิดรุนแรง โดยเชื้อนี้ผลิตสารพิษและเอนไซม์ที่ทำลายเนื้อเยื่อเยื่อรอบฟัน ทำให้เกิดการสูญเสียกระดูกและเนื้อเยื่อปริทันต์ นำเปลือกทับทิมมาดเป็นผงนำมาใช้บรรเทาอาการเกิดหนองและอักเสบของเหงือกพบว่ายับยั้งแบคทีเรียในช่องปากได้ (Vasconcelos et al., 2006)

วิธีการสกัดที่แตกต่างจากวิธีเดิมนั้นได้มีการใช้เอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 แทนเมทานอล (Malviya et al., 2014) ปรับเปลี่ยนสารละลายการสกัดเพื่อเพิ่มความปลอดภัยในการทำงานและลดความเสี่ยงจากสารพิษที่ตกค้างจากการใช้เมทานอล การศึกษาสารแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) สารสำคัญในทับทิมสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Mandruk, 1953) คณะผู้วิจัยเปรียบเทียบสารสกัดจากทับทิมที่มาจากประเทศไทย, สหรัฐอเมริกา และอินเดีย เพื่อศึกษาผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ

เชื้อจุลินทรีย์ รวมทั้งข้อมูลทางเคมีและการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคุณสมบัติของน้ำทับทิมและเปลือกทับทิม โดยเป้าหมายเพื่อใช้ป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับช่องปาก (Silla et al., 2025) งานวิจัยนี้เลือกใช้สารสกัดส่วนน้ำทับทิมและเปลือกทับทิมเพื่อเปรียบเทียบการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ประกอบด้วย 1) *S. mutans* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobic) พบได้ในช่องปากของมนุษย์ และเป็นสาเหตุสำคัญเกิดฟันผุ (Lemos & Burne, 2008) 2) *E. faecalis* กลุ่มเอนเทอโรคอคคัส (Enterococci) ที่พบมากในช่องปาก เช่น ฟันผุ การติดเชื้อในช่องรากฟัน โรคเหงือกอักเสบ และการอักเสบรอบๆ การฝังรากเทียม (Kouidhi et al., 2011) 3) *S. aureus* พบมากในระบบทางเดินหายใจและช่องปาก จุลินทรีย์ที่พบได้บ่อยที่สุดในบริเวณอักเสบรากเทียม (Peri-implantitis) พร้อมกับเชื้อประเภทอื่นๆ (Kinane, 2001) นอกจากนี้ *S. aureus* เป็นหนึ่งในเชื้อก่อโรคที่ติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อนอีกด้วย (Moet et al., 2007) 4) *A. actinomycetemcomitans* เป็นแบคทีเรียแกรมลบอาศัยอยู่ในช่องปากและเจริญได้ดีในสภาวะไม่มีออกซิเจน เช่น บริเวณร่องเหงือก จึงเป็นสาเหตุเหงือกอักเสบชนิดรุนแรง (Gholizadeh et al., 2017)

วัตถุประสงค์ในการวิจัย

1. เพื่อศึกษาปริมาณไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (Cyanidin-3-Glucoside) และ มัลวิดิน (Malvidin) ในสารสกัดที่ได้จากน้ำทับทิมและเปลือกทับทิม
2. เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ในสารสกัดที่ได้จากน้ำทับทิมและเปลือกทับทิม

3. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อโรคของสารสกัดที่ได้จากน้ำทับทิมและเปลือกทับทิม ชนิดเชื้อ *S. mutans* (KPSK2), *E. faecalis* (ATCC19433), *S. aureus* (ATCC6538), *A. actinomycetemcomitans* (ATCC29523)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

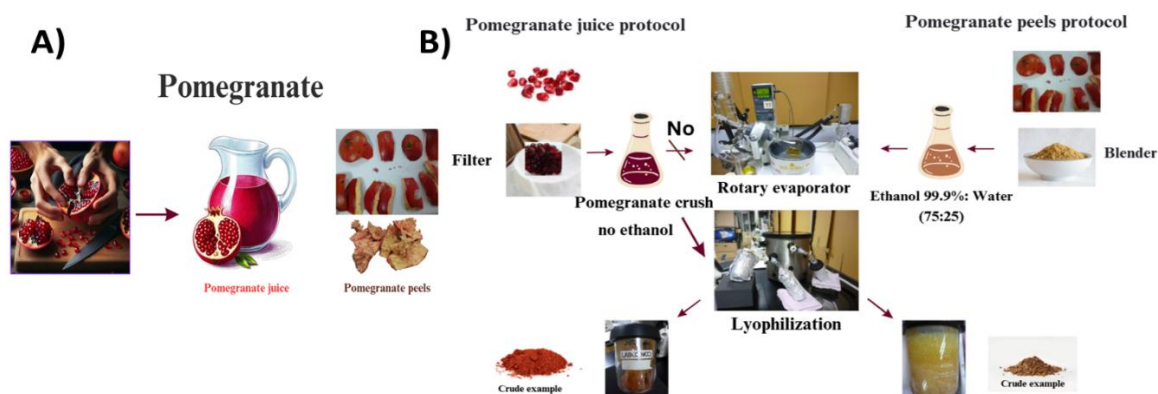
ได้สารสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากน้ำทับทิมและเปลือกทับทิม ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเพื่อส่งเสริมสุขภาพในอนาคต

วิธีการศึกษา

งานวิจัยศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดผลทับทิมทั้ง 3 ชนิด คือ ทับทิมประเทศไทย, ทับทิมอเมริกา และทับทิมอินเดีย โดยสกัดจากส่วนน้ำและส่วนเปลือกของทับทิมสามชนิด รวมเป็น 6 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1 ผ่านกระบวนการสกัดด้วยตัวทำละลายและทำให้แห้ง ดังแสดงในรูปที่ 1 จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปศึกษาสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อคือ สารประกอบฟีนอลิกและสารแอนโทไซยานิน ชนิดไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และมัลวิดิน ตลอดจนศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อโรคของสารสกัดที่ได้ ต่อชนิด *S. mutans* (KPSK2), *E. faecalis* (ATCC19433), *S. aureus* (ATCC6538) และ *A. actinomycetemcomitans* (ATCC29523) วิธีการแพร่กระจายของสารผ่านวุ้น (Agar Disc diffusion) และ การทดสอบยับยั้งความเข้มข้นต่ำที่สุด (Minimal bactericidal concentration, MBC) โดยมีกระบวนการศึกษาโดยละเอียด ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 สารสกัดเปลือกทับทิม และน้ำทับทิมที่มีการแบ่งประเภทต่าง ๆ

สารสกัด	ประเภท
A	น้ำทับทิมประเทศไทย
B	เปลือกทับทิมประเทศไทย
C	น้ำทับทิมประเทศสหรัฐอเมริกา
D	เปลือกทับทิมประเทศสหรัฐอเมริกา
E	น้ำทับทิมประเทศอินเดีย
F	เปลือกทับทิมประเทศอินเดีย



รูปที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากเปลือกทับทิม A) การแสดงรูปภาพน้ำทับทิมและเปลือกทับทิม และ B) การเตรียมสารสกัดจากน้ำทับทิมและเปลือกทับทิม

1. การเตรียมสารสกัดจากน้ำทับทิมและเปลือกทับทิม

1.1. นำผลทับทิมมาล้างทำความสะอาด แยกส่วน เมล็ดและส่วนเปลือกทับทิม ดังรูปที่ 1A

1.2. ส่วนของเมล็ดทับทิมนำมาปั่น จากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบางที่ปราศจากเชื้อโดยการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งไอน้ำ (Autoclave) (HVA110, Hirayama, Japan) กรองแยกกาก นำส่วนน้ำมาเตรียมเพื่อทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying หรือ lyophilization) ดังรูปภาพที่ 1B

1.3. ส่วนของเปลือกทับทิมนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (PHILIPS, HR1393/00, China) กำลังปั่น 22,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นชั่งเปลือกทับทิม จำนวน 100 กรัม ที่บดละเอียดใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

1.4. เติมตัวทำละลาย ได้แก่ เอทานอลร้อยละ 99.9 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ต่อน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออนในอัตราส่วน 75:25 โดยปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) โดยมีปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ที่มีเปลือกทับทิม 100 กรัม เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส (°C) ภายในภาชนะปิด ป้องกันเอทานอลระเหยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บในอุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส (°C) หลังจากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบางปราศจากเชื้อโดยการฆ่าเชื้อเครื่องนึ่งไอน้ำ

1.5. นำของเหลวที่ได้จากข้อ 1.2 และ 1.4 นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) (Buchi R-200, Buchi, Germany) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (°C) จนกระทั่งไม่มีตัวทำละลายควบแน่นกลับลงมา นำสารสกัดที่ได้เก็บไว้ในตู้เย็นควบคุม อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส (°C)

1.6 นำสารละลายของเหลวทั้งหมดทำให้แห้งด้วยเครื่องมือการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying or Lyophilization) (Buchi L-250, Buchi, Germany) ได้สารสกัดในลักษณะผงเข้มข้น เก็บรักษาในโถแก้วใสเม็ดซิลิกาเจลดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส (°C) ป้องกันการโดนแสง

2. การหาปริมาณสารแอนโทไซยานิน ชนิดไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ด้วยเครื่องการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer)

2.1. เตรียมสารมาตรฐานสารละลายเข้มข้นที่แตกต่างกัน และเตรียมตัวอย่างลักษณะเป็นผงละลายน้ำเริ่มต้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางให้อยู่ในช่วงค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง 0.200 ถึง 1.000 ที่ 510 นาโนเมตร (nm)

2.2 วิเคราะห์การหาแอนโทไซยานินชนิด ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ในตัวอย่างสารสกัดน้ำทับทิมและเปลือกทับทิมโดยเทียบสารมาตรฐานใช้เครื่องการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer, Epoch, Biotek Agilent, USA) ที่ช่วงความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (nm)

3. การหาปริมาณสารแอนโทไซยานินชนิดมัลวิดิน วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

3.1 เตรียมสารมาตรฐานสารละลายเข้มข้นที่แตกต่างกัน และเตรียมสารสกัด ให้มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายในน้ำ

3.2 วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินชนิดมัลวิดินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (LD-20AD Prominence, Shimadzu, Japan) ใช้คอลัมน์ชนิดคาร์บอน 18 เป็นเฟสคงที่ (Stationary Phase) ขนาด 150 มิลลิเมตร (mm) เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร (mm) (Supelco Ascentis Express, Supelco analytical, USA) และโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ ประกอบด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในน้ำ (A) และเมทานอล (B) ในอัตราส่วน 70:30 โดยปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) แบบไอโซแครติกเอลูชัน (Isocratic elution) ที่อัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อ นาที อุณหภูมิคอลัมน์ควบคุมที่ 25 องศาเซลเซียส (°C) ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เทียบค่าเวลาริเทนชันไทม์ (Retention time, Rt) เพื่อเทียบกับสารมาตรฐานมัลวิดิน วิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณ (Quantitative data) กราฟมาตรฐานของมัลวิดิน (Malvidin) หน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) โดยเติมสารสกัด หรือสารละลายมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิก โดยเติมสารรีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu reagent, Sigma-Aldrich) ความเข้มข้น 0.2 หน่วยนอร์แมลิตี ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 8 นาที เติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3 , Sigma-Aldrich) ความเข้มข้น 15 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำผสมแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (nm) หลังจากนั้นนำค่าที่วัดได้ของสารละลายความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาค่าของสารสกัด คำนวณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก (milligram Gallic Acid Equivalent, mg GAE) ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)

5. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

5.1 ทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการแพร่กระจายของสารผ่านวุ้น (Agar Disc diffusion)

นำสารสกัดทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. mutans*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *A. actinomycetemcomitans* ด้วยวิธีการแพร่กระจายของสารผ่านวุ้น (Agar Disc diffusion) (Lewis li et al., 2023) นำแบคทีเรียดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลว Mueller Hinton (BD Diagnostic, Sparks, MD, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่บ่มไว้มาปรับค่าความขุ่นให้มีค่าเท่ากับค่ามาตรฐาน McFarland 0.5 จากนั้นเจือจางแบคทีเรียที่ได้นี้ 10 เท่า มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.5×10^7 CFU (Colony forming unit) ต่อมิลลิลิตร ก่อนใช้ไม้ปั่นสำลีป้ายสารแขวนลอยแบคทีเรีย (Bacterial suspension) บนอาหารวุ้น Mueller Hinton ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใช้เจาะจุกก๊อก (Cork borer) เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นจำนวน 6 หลุม นำชิ้นวุ้นที่เจาะทิ้งไป ใส่สารสกัดหยาบปริมาตร 30 ไมโครลิตร ต่อหลุม ลงในหลุม 3 หลุม หลุมที่เหลือจะใส่ชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บข้อมูลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง (Inhibition zone) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย หลังการทดสอบด้วยการแพร่กระจายในวุ้น เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อเบื้องต้นของสารสกัด ละลายด้วยน้ำจนได้สารละลายความเข้มข้นร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 โดยมวลต่อปริมาตรตามลำดับ โดยใช้ร้อยละ 0.9 ของ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เป็นสารควบคุมลบ และร้อยละ 0.12 ของคลอโรเฮกซิดีน (Chlorhexidine) เป็นสารควบคุมบวก

5.2 การหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC)

เนื่องจากปริมาณสารสกัดที่ใช้ในการศึกษามีอยู่อย่างจำกัด การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory concentration, MIC) ยังมีได้ ทดสอบการศึกษานี้มุ่งเน้นการประเมินค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งสะท้อนถึงประสิทธิภาพของสารสกัดในเชิงการออกฤทธิ์ แบบฆ่าเชื้อ (Bactericidal activity) ได้อย่างชัดเจนมากกว่า สารสกัดน้ำและเปลือกหับทิมแต่ละชนิดมาเจือจางใน

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเติมเชื้อลงไปในหลุม นำไปบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตหลุมที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโตจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ สังเกตพบว่าสารละลายในทุกหลุมมีลักษณะใสและไม่มี ความขุ่น จึงทำการเพาะเชื้อด้วยวิธีการเกลี่ยเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Spread plate) นำไปบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ จึงอ่านค่าความเข้มข้นนั้นเป็นการประเมินค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

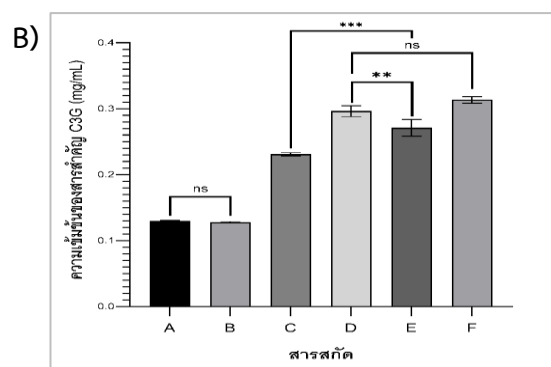
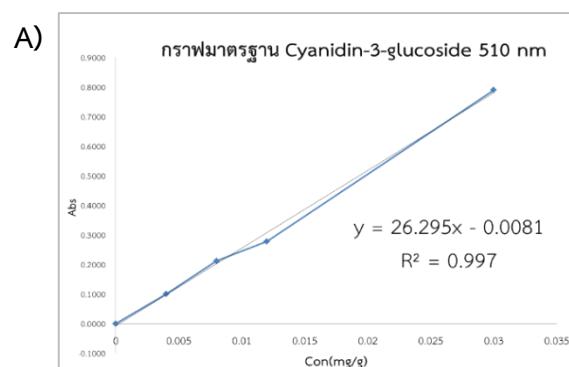
6. การวิเคราะห์ผลการวิจัยทางสถิติ

การทดสอบผลความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใช้โปรแกรม GraphPad Prism 10.2.3 สำหรับ Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนสองทาง (Two-way ANOVA) และทดสอบด้วยวิธี Tukey-Kramer เพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตั้งแต่สามกลุ่มขึ้นไป การเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่ม วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี t-test แบบไม่จับคู่หลายครั้ง (unpaired t-test) ร่วมกับการปรับค่า Bonferroni ระดับนัยสำคัญทางสถิติกำหนดที่ค่า $p < 0.05$

ผลการดำเนินการวิจัย

1. การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ชนิดไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (Cyanidin-3-Glucoside)

การวิเคราะห์หาปริมาณไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ด้วยเครื่องมือสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (nm) โดยคำนวณหาจากกราฟมาตรฐานของสารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ดังแสดงในรูปที่ 2A สารสกัดแต่ละชนิดมีสารสำคัญแอนโทไซยานินชนิดไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ดังแสดงในรูปที่ 2B พบว่าสารสกัด F (สารสกัดเปลือกทับทิมอินเดีย) ที่มีความเข้มข้นของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์อยู่ที่ 0.310 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัด D (สารสกัดเปลือกทับทิมสหรัฐอเมริกา) ที่มีความเข้มข้นของ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ที่ 0.302 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ส่วนสารสกัดจากน้ำทับทิมพบว่าปริมาณสารสกัด C (สกัดน้ำทับทิมอเมริกา) มีปริมาณไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์มากกว่าในสารสกัด F (สารสกัดน้ำทับทิมอินเดีย) อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในทับทิมไทยพบว่ามีปริมาณ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ทั้งในสารสกัดส่วนน้ำและเปลือกคือสารสกัด A (สกัดน้ำทับทิมไทย) และ B (สกัดเปลือกทับทิมไทย) น้อยกว่าจากทับทิมอเมริกาและอินเดียอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานิน ชนิดไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ในตัวอย่างสารสกัดทับทิมชนิดต่าง ๆ A) กราฟความเข้มข้นของสารมาตรฐานไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ที่วิเคราะห์ผ่านเครื่องมือสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร (nm) B) กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของตัวอย่างไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ของสารสกัดทับทิมแต่ละชนิด (A น้ำทับทิมไทย, B เปลือกทับทิมไทย, C น้ำทับทิมสหรัฐอเมริกา, D เปลือกทับทิมสหรัฐอเมริกา, E น้ำทับทิมอินเดีย และ F เปลือกทับทิมประเทศอินเดีย) ผลการวิเคราะห์ที่ไม่พบความแตกต่าง

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงด้วยสัญลักษณ์ ns (not significant) (ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ), ** ($p < 0.01$) และ *** ($p < 0.001$)

2. การหาปริมาณสารแอนโทไซยานินชนิดมัลวิดิน ในตัวอย่างจากทับทิม

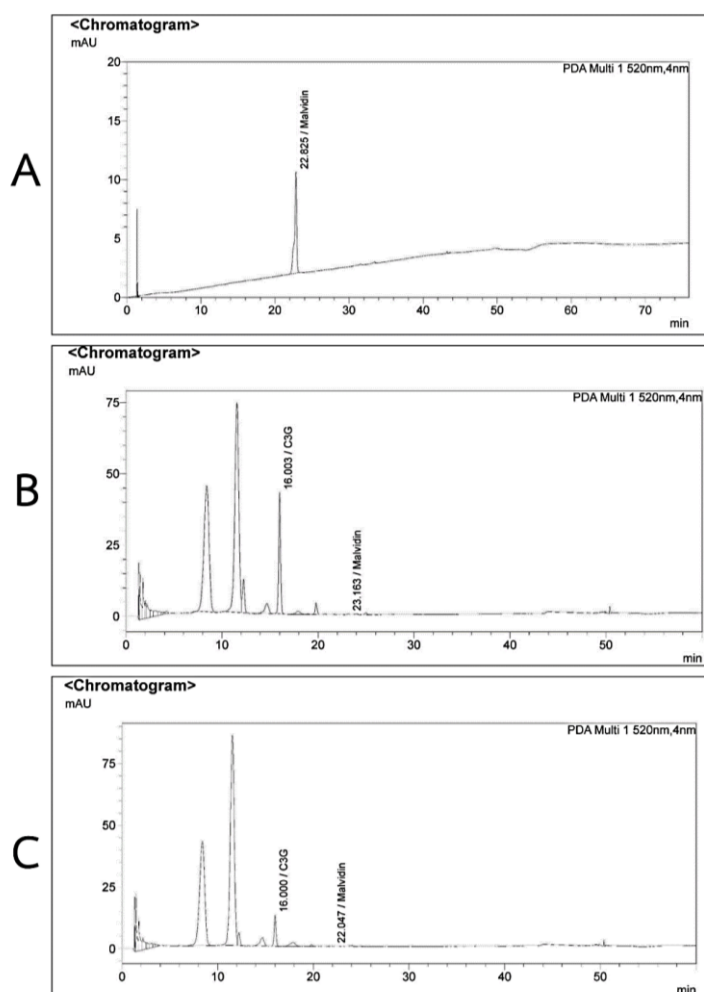
วิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินชนิดมัลวิดิน โดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ระบุตำแหน่งสารเทียบค่าเวลาริเทนชันไทม์ (Retention time, Rt) เวลาที่พีก (Peak) ของสารมัลวิดิน (Malvidin) ในโครมาโทแกรม โดยสารเทียบกับสารมาตรฐานมัลวิดิน (Malvidin) ซึ่งพบที่เวลาริเทนชันไทม์ (Retention time, Rt) 22.825 นาที (รูปที่ 3A) และวิเคราะห์ปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมัลวิดิน (Malvidin) พบว่าสารแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ชนิด มัลวิดิน (Malvidin) พบเพียงในสารสกัด C (สกัดน้ำทับทิม

อเมริกา) และ D (สารสกัดเปลือกทับทิมสหรัฐอเมริกา) เท่านั้น เวลาริเทนชันไทม์ (Retention time, Rt) 23.163 และ 22.047 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 3B และ 3C) สารสกัดชนิดอื่น ๆ ไม่พบสารสำคัญนี้ โดยในสารสกัด C (สารสกัดน้ำทับทิมสหรัฐอเมริกา) มีปริมาณสารสำคัญชนิดมัลวิดิน (Malvidin) สูงสุด 0.768 ± 0.008 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างจากสารสกัด D (สารสกัดเปลือกทับทิมสหรัฐอเมริกา) ที่พบสารสำคัญมัลวิดิน (Malvidin) 0.560 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2) และพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสารสกัดจากทับทิมไทย (สารสกัด A,B) และทับทิมอินเดีย (สารสกัด E,F) ไม่พบสารสำคัญมัลวิดินในสารตัวอย่าง

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณสารแอนโทไซยานินชนิดมัลวิดิน สารสกัดแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

สารสกัด	Retention time (min)	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)
A	ND	0
B	ND	0
C	Rt=23.163 min	$0.768 \pm 0.008^{***}$
D	Rt=22.047 min	0.560 ± 0.01
E	ND	0
F	ND	0

Not detected (ND) หมายถึงไม่พบสารสำคัญ, ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเชิงสถิติแสดงด้วย ns (not significant) (ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ), และ *** ($p < 0.001$)

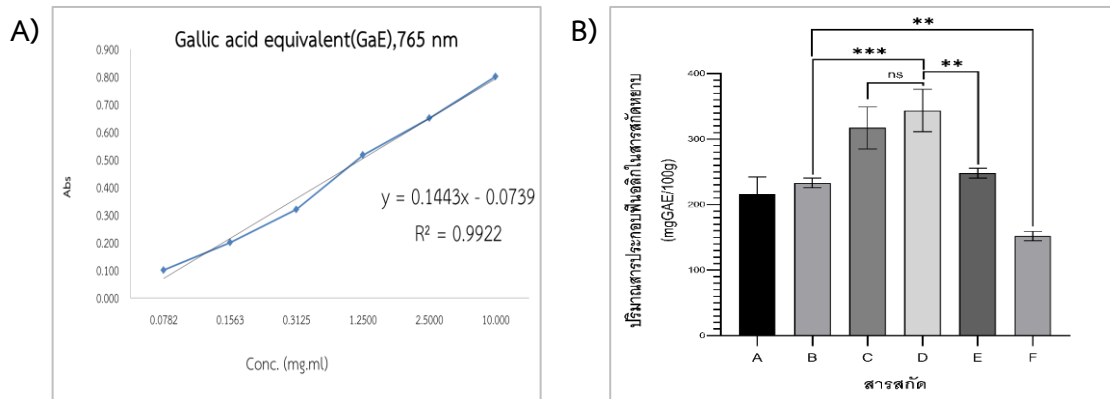


รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานมัลวิดิน และสารสกัดตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ณ ค่าช่วงความดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร (nm) เวลา (นาที) แสดงในแกนนอน และค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, mAU)แสดงในแกนตั้ง; โดย A) โครมาโทแกรมสารมาตรฐานมัลวิดิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, B) โครมาโทแกรมของสารสกัดทับทิม C (น้ำทับทิมสหรัฐอเมริกา) และ C) โครมาโทแกรมของสารสกัดทับทิม D (สารสกัดเปลือกทับทิมสหรัฐอเมริกา)

3. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

จากการนำสารสกัดทับทิมที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu สามารถสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้เปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ของสารสกัดดังแสดงในรูปที่ 4A เพื่อคำนวณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก (Milligram Gallic Acid Equivalent, mg GAE) ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้งของเปลือก พบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่วัดได้แสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 4B โดยสารสกัด D (สารสกัดเปลือกทับทิมสหรัฐอเมริกา) มีสารประกอบฟีนอลิกต่อมวลสารสกัด

หยาบมากที่สุด 343.63 ± 32.14 หน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมของตัวอย่างแห้ง (mg GAE/100 g ตัวอย่างแห้ง) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสารสกัด C (สารสกัดน้ำทับทิมสหรัฐอเมริกา) ที่พบสารประกอบฟีนอลิกต่อมวลสารสกัดหยาบที่ 317.05 ± 31.98 มิลลิกรัม GAE ต่อ 100 กรัม (mg GAE/100g) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสารสกัด A และ B (น้ำและเปลือกของทับทิมไทย) และสารสกัด E และ F (ทับทิมอินเดีย) ส่วนปริมาณฟีนอลิกต่อมวลสารสกัดหยาบของเปลือกทับทิมไทย (สารสกัด B) มีมากกว่าในสารสกัด F (ทับทิมอินเดีย) อย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างสารสกัดหยาบ A) กราฟแสดงความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic Acid Equivalent, mg GAE) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร(nm) B) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบของหัตถิแต่ละชนิด (A-F) (มิลลิกรัม GAE ต่อ100กรัม) ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเชิงสถิติแสดงด้วย ns คือไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ** ($p < 0.01$) และ *** ($p < 0.001$)

ตารางที่ 3 สารประกอบฟีนอลิกที่พบในตัวอย่างสารสกัด

สารสกัด	ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบ (มิลลิกรัม GAE ต่อ 100 กรัม)
A	40.62±4.93	216.08±26.24
B	43.81±1.39	233.04±7.37
C	59.61±6.01	317.05±31.98
D	64.60±6.04	343.63±32.14
E	46.63±1.46	248.03±7.74
F	28.57±1.39	151.94±7.37

4. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

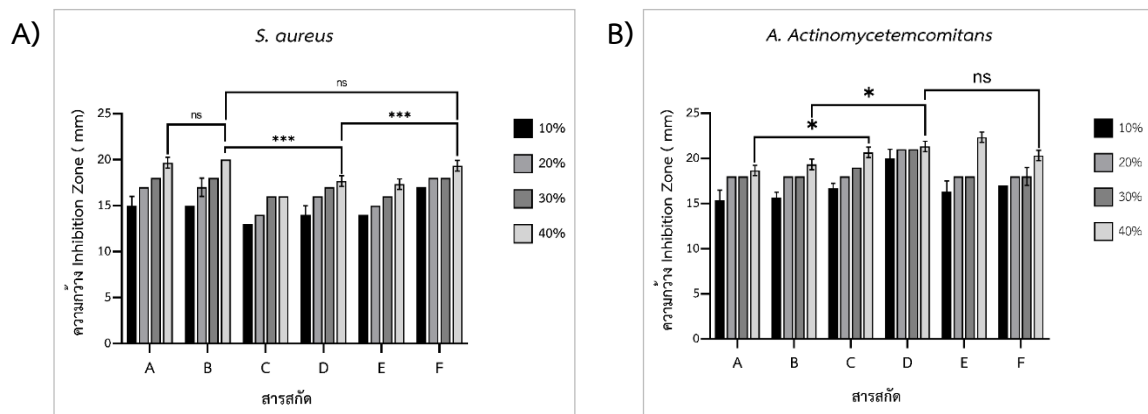
4.1 ทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการแพร่กระจายของสารผ่านวุ้น (Agar Disc diffusion)

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อเบื้องต้น วิธีการแพร่กระจายของสารผ่านวุ้น (Agar Disc diffusion) ของสารสกัดจากหัตถิ กับเชื้อ *S. mutans*, *E. faecalis*, *S. aureus* และ *A. actinomycetemcomitans* โดยใช้ร้อยละ 0.9 ของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เป็นสารควบคุมลบและร้อยละ 0.12 ของคลอเฮกซีดีน (Chlorhexidine) เป็นสารควบคุมบวกพบว่าการสกัดจากหัตถิไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* และ *E. faecalis* แต่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *A. actinomycetemcomitans* โดยมีรายละเอียดความกว้างของบริเวณยับยั้งการเจริญของจุลชีพ (Inhibition zone) ดังในตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นของสารบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Inhibition zone) จึงนำสารสกัดจากหัตถิไปหาค่าความเข้มข้น

ต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *A. actinomycetemcomitans* ผลการทดสอบดังแสดงในรูปที่ 5A พบว่าสารสกัดจากหัตถิไทยจากเปลือก (สารสกัด A,B) และสารสกัดเปลือกหัตถิอินเดีย (สารสกัด F) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธีการแพร่กระจายของสารลงบนอาหารวุ้น (Agar Disc diffusion) มากกว่าสารสกัดจากหัตถิอเมริกาทั้งน้ำและเปลือก (สารสกัด C,D) และสารสกัดจากส่วนน้ำหัตถิอินเดีย (สารสกัด E) อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อเบื้องต้นด้วยวิธีการแพร่กระจายของสารลงบนอาหารวุ้น (Agar Disc diffusion) ของสารสกัดหัตถิ ต่อเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* (รูปที่ 5B) พบว่าสารสกัด C,D (หัตถิอเมริกา) และสารสกัด E,F (หัตถิอินเดีย) พบว่ามากกว่าสารสกัดหัตถิไทย (สารสกัด A,B) อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นของสารต่อความกว้าง (Inhibition zone (mm))

เชื้อ	สารทดสอบ	ความเข้มข้นสารต่อความกว้าง (Inhibition Zone (mm))				NSS (NaCl)	0.12% CHX
		10%	20%	30%	40%		
<i>S. mutans</i>	A	0	0	0	0	0	28
	B	0	0	0	0	0	28
	C	0	0	0	0	0	23
	D	0	0	0	0	0	24
	E	0	0	0	0	0	24
	F	0	0	0	0	0	22
<i>E. faecalis</i>	A	0	0	0	0	0	14
	B	0	0	0	0	0	14
	C	0	0	0	0	0	13
	D	0	0	0	0	0	11
	E	0	0	0	0	0	12
	F	0	0	0	0	0	12
<i>S. aureus</i>	A	15	17	18	20	0	28
	B	15	17	18	20	0	28
	C	13	14	16	16	0	23
	D	15	16	17	18	0	22
	E	14	15	16	17	0	23
	F	17	18	18	19	0	20
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	A	16	18	18	19	0	22
	B	16	18	18	19	0	22
	C	17	18	19	21	0	22
	D	20	21	21	21	0	23
	E	17	18	18	22	0	23
	F	17	18	18	20	0	22



รูปที่ 5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อเบื้องต้น ด้วยวิธีการแพร่กระจายของสารลงบนอาหารวุ้น (Agar Disc diffusion) ของสารสกัดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร A) ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, B) ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *A. actinomycetemcomitans* โดยค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเชิงสถิติแสดงด้วย * (p < 0.05) และ *** (p < 0.001) และ ns (p > 0.05)

4.2 การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC)

ผลทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดทับทิมต่อเชื้อ *S. aureus* และ *A. actinomycetemcomitans* แสดงในตารางที่ 5 พบว่าสารสกัด A, B และ F มีฤทธิ์ในการยับยั้งการ

เจริญเติบโตของแบคทีเรียความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) *A. actinomycetemcomitans* ที่ใกล้เคียงกันที่ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการฆ่าเชื้อ *S. aureus* พบว่า สารสกัด E, F (ทับทิมอินเดีย) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ของสารสกัดจากทับทิม (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ชนิดสารสกัด	เชื้อ	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>S. aureus</i>
A		3.125	12.000
B		3.125	12.500
C		12.500	25.000
D		12.500	12.500
E		6.250	6.250
F		3.125	6.250

การอภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาสารสกัดจากน้ำและเปลือกทับทิม พบสารฟีนอลิกจากน้ำทับทิม (Blainski et al., 2013) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถตรวจสอบปริมาณสารสำคัญ สารแอนโทไซยานินด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และการใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อหาสารแอนโทไซยานินประเภทมัลวิดิน (Huang et al., 2016) ซึ่งพบในปริมาณที่น้อยและอาจต้องทำการสกัดให้บริสุทธิ์เพื่อให้ได้สารที่มีความเข้มข้นสูงสุด หากจะเปรียบเทียบสารสกัดสำคัญของแอนโทไซยานินและสารฟีนอลิก ประเภทเปลือกทับทิมอินเดีย มีสารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ในความเข้มข้นสูง และเปลือกทับทิมสหรัฐอเมริกา มีสารมัลวิดินไม่พบในเปลือกสายพันธุ์อื่น ๆ พบว่าน้ำทับทิม มีความเป็นกรดอยู่ในช่วงพีเอชประมาณ 4-5 พบสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด และการต้านจุลชีพที่ทำให้เกิดโรคในช่องปาก เปลือกทับทิมมีสารโพลีฟีนอลสูงกว่าน้ำทับทิม โดยเฉพาะแทนนิน (Tannins) สารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง (Muhacir-Güzel et al., 2014)

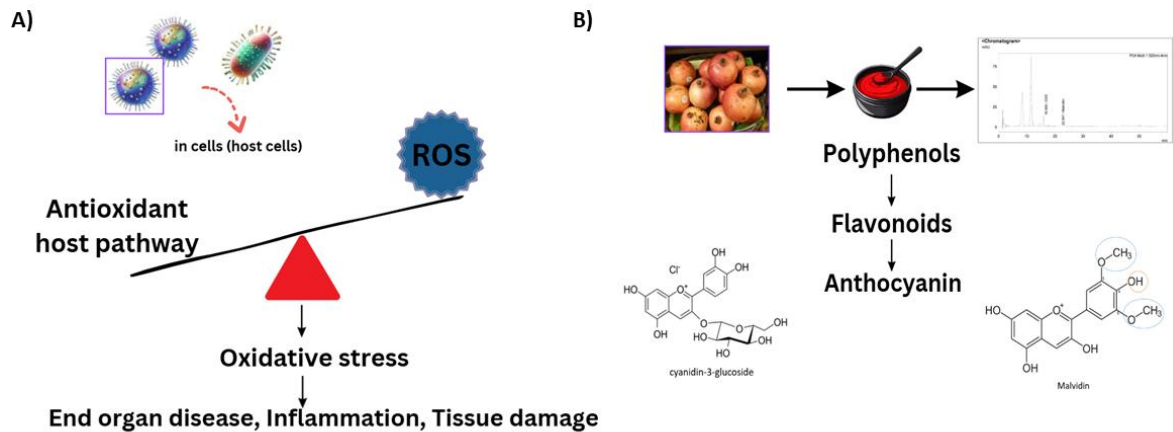
เปลือกทับทิมสามารถช่วยลดอนุมูลอิสระ (Aruoma, 1994) และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุและโรคเหงือก เช่น *S. mutans* และ *P. gingivalis* งานวิจัย

ก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดเปลือกทับทิมความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ ชนิด *S. aureus* ที่ 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Gallas et al., 2023) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาที่พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ของสารสกัดจากทับทิมอยู่ในช่วง 6.25 – 25.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากทับทิมไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* และ *E. faecalis* แต่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *A. actinomycetemcomitans* การประเมินขนาดของโซนการยับยั้ง (Inhibition zone) ในการวิจัยการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ (Alexandre et al., 2019) นอกจากนี้ การประเมินความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ซึ่งเกิดจากความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระ Reactive oxygen species (ROS) และสารต้านอนุมูลอิสระ อีกประเด็นสำคัญในการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดทับทิม สารออกซิเจนที่ว่องไวสูงเกินสมดุล จะก่อให้เกิดความเสียหายต่อองค์ประกอบสำคัญของเซลล์ ได้แก่ ดีเอ็นเอ โปรตีน และเยื่อหุ้มเซลล์ (Braud et al., 2017) ซึ่งอาจนำไปสู่ผลกระทบต่อสุขภาพในระยะยาว ดังแสดงในรูปที่ 6A

สารแอนโทไซยานินมีฤทธิ์ต้านจุลชีพผ่านหลายกลไกร่วมกัน ได้แก่ การทำลายความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ การยับยั้งเอนไซม์ที่สำคัญ การรบกวนการสร้างผนังเซลล์ การกระตุ้นให้เกิดภาวะออกซิเดชัน และ

การมีปฏิสัมพันธ์กับสารพันธุกรรมของจุลชีพ นอกจากนี้ ฤทธิ์ของสารยังอาจเพิ่มขึ้นในสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งส่งผลเสริมกันในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือทำให้เซลล์ตายในที่สุดและประเมินความปลอดภัยก่อนนำไปใช้ในระดับคลินิก การเปรียบเทียบกับอย่างทับทิมจากประเทศต่าง ๆ พบ

ความแตกต่างของฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งอาจได้รับอิทธิพลจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น สภาพภูมิอากาศ องค์ประกอบของดิน และกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยว ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการสังเคราะห์สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของพืช ส่งผลให้เกิดความแตกต่างขององค์ประกอบสารฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ



รูปที่ 6 แสดง A) กลไกแสดงภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) เป็นสภาวะทางร่างกายที่เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างปริมาณของอนุมูลอิสระ Reactive oxygen species (ROS) และสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย และ B) สรุปโครงสร้างสารแอนโทไซยานินจากผลทับทิมที่นำมาศึกษา

สรุปผลการวิจัยและประโยชน์ที่ได้จากการวิจัย

สารแอนโทไซยานินชนิดไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ สารสกัด F มีความเข้มข้นของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ สูงสุดที่ 0.310 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มัลวิดินพบในสารสกัด C และ D เท่านั้น โดยสารสกัด C มีปริมาณสูงสุดที่ 0.768 ± 0.008 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดอื่น ๆ ไม่พบมัลวิดิน ปริมาณสารฟีนอลิกของสารสกัด D มีค่าสูงสุด 343.63 ± 32.14 มิลลิกรัม GAE/100 กรัม ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อสารสกัดจากทับทิมไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. mutans* และ *E. faecalis* ได้ สภาวะความเป็นกรดของสารสกัดอาจช่วยเสริมฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *A. actinomycetemcomitans* การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC)

ข้อเสนอแนะจากการวิจัย

การนำสารสกัดจากทับทิมไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จำเป็นต้องคำนึงถึงการรักษาสภาพของสารสกัด อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้มีข้อจำกัดด้านอุปกรณ์ เนื่องจากไม่มีตู้ดูดความชื้นแบบใช้ระบบไฟฟ้า หากมีการใช้เครื่องควบคุมความชื้นอัตโนมัติ จะสามารถควบคุมสภาวะความชื้นได้อย่างเหมาะสม และช่วยให้การเก็บรักษาสารสกัดมีความสม่ำเสมอมากยิ่งขึ้นเมื่อเทียบกับวิธีการเดิม นอกจากนี้ ข้อจำกัดของการวิเคราะห์ผล พบว่าการประเมินผลภายในระยะเวลา 30 วัน จะให้ผลลัพธ์ที่มีความแม่นยำและเชื่อถือได้มากกว่า

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณการสนับสนุนของ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ทุนวิจัยประเภทนำร่องซึ่งเป็น “โครงการวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล”

เอกสารอ้างอิง

- Ahmad, I., & Beg, A. Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(2), 113-123.
[https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00335-4](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00335-4)
- Alexandre, E. M. C., Silva, S., Santos, S. A. O., Silvestre, A. J. D., Duarte, M. F., Saraiva, J. A., & Pintado, M. (2019). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. *Food research international*, 115, 167-176.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.044>
- Aruoma, O. I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 32(7), 671-683.
[https://doi.org/10.1016/0278-6915\(94\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0278-6915(94)90011-6)
- Blainski, A., Lopes, G. C., & de Mello, J. C. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852-6865.
<https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Braud, L., Battault, S., Meyer, G., Nascimento, A., Gaillard, S., de Sousa, G., Rahmani, R., Riva, C., Armand, M., Maixent, J. M., & Reboul, C. (2017). Antioxidant properties of tea blunt ROS-dependent lipogenesis: beneficial effect on hepatic steatosis in a high fat-high sucrose diet NAFLD obese rat model. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 40, 95-104.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.10.012>
- Chaovanalikit, A., Mingmuang, A., Kitbunluewit, T., Choldumrongkool, N., Sondee, J., & Chupratur, S. (2012). Anthocyanin and total phenolics content of mangosteen and effect of processing on the quality of Mangosteen products. *International Food Research Journal*, 19, 1047-1053.
- Gallas, J. A., Pelozo, L. L., Oliveira, W. P., Salvador, S. L., Corona, S. M., & Souza-Gabriel, A. E. (2023). Characterization, Antimicrobial Activity, and Antioxidant Efficacy of a Pomegranate Peel Solution Against Persistent Root Canal Pathogens. *Cureus*, 15(8), e43142.
<https://doi.org/10.7759/cureus.43142>
- Gholizadeh, P., Pormohammad, A., Eslami, H., Shokouhi, B., Fakhrzadeh, V., & Kafil, H. S. (2017). Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microbial Pathogenesis*, 113, 303-311.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.001>
- Huang, W., Zhu, Y., Li, C., Sui, Z., & Min, W. (2016). Effect of Blueberry Anthocyanins Malvidin and Glycosides on the Antioxidant Properties in Endothelial Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1591803.
<https://doi.org/10.1155/2016/1591803>
- Kinane, D. F. (2001). Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000, 25, 8-20.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2001.22250102.x>
- Kouidhi, B., Zmantar, T., Mahdouani, K., Hentati, H., & Bakhrouf, A. (2011). Antibiotic resistance and adhesion

- properties of oral Enterococci associated to dental caries. *BMC Microbiology*, 11, 155.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-155>
- Lemos, J. A., & Burne, R. A. (2008). A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology (Reading)*, 154(Pt 11), 3247-3255.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/023770-0>
- Lewis li, J. S., Clinical, & Laboratory Standards, I. (2023). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Clinical and Laboratory Standards Institute. <https://opac2.lib.oita-u.ac.jp/webopac/BB00624221>
- Malviya, S., Arvind, Jha, A., & Hettiarachchy, N. (2014). Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 4132-4137.
<https://doi.org/10.1007/s13197-013-0956-4>
- Mandruk, T. (1953). Anthocyanin pigments of higher plants and their antibacterial effect. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*, 15(1), 66-69.
- Moet, G. J., Jones, R. N., Biedenbach, D. J., Stilwell, M. G., & Fritsche, T. R. (2007). Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57(1), 7-13.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.05.009>
- Muhacir-Güzel, N., Türkyılmaz, M., Yemiş, O., Taşı, Ş., & Özkan, M. (2014). Changes in hydrolysable and condensed tannins of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaznar) juices from sacs and whole fruits during production and their relation with antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2, Part 1), 933-940.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.025>
- Silla, A., Punzo, A., Bonvicini, F., Perillo, M., Malaguti, M., Lorenzini, A., Foltran, I., Mercatante, D., Mandrioli, M., Rodriguez-Estrada, M. T., Hrelia, S., & Caliceti, C. (2025). Anti-Inflammatory, Antioxidant and Antibacterial Properties of Tomato Skin and Pomegranate Peel Extracts: A Sustainable Approach for Oral Health Care. *Antioxidants (Basel)*, 14(1), 54
<https://doi.org/10.3390/antiox14010054>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
<https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Vasconcelos, L. C., Sampaio, F. C., Sampaio, M. C., Pereira Mdo, S., Higino, J. S., & Peixoto, M. H. (2006). Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Brazilian Dental Journal*, 17(3), 223-227.
<https://doi.org/10.1590/s0103-64402006000300009>