

**องค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น และฤทธิ์ต้านเชื้อรา Candida spp.
ของสารสกัดใบหูกวางสีแดง
Red Leaves Terminalia Catappa Linn. Extract:
Phytochemical Constituents and Anti-Candida spp. Activity**

ณัฐรา เชิดชูธีรกุล^{1*}, ธีรพร ธีระวรวงศ์² และ ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร³
Natta Choedchutirakul^{1*}, Thien Thiraworawong² and Pilanthana Lertsatitthanakorn³
นักศึกษาระดับปริญญาโทหลักสูตรการแพทย์แผนไทยมหาดบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา^{1*},
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา²,
สาขาวิชาผลิตภัณฑ์สมุนไพร วิทยาลัยการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา³
Master's degree student in Thai Traditional Pharmacy Thai Tradition Pharmacy, Faculty of
Science and Technology, Bansomdejchapraya Rajabhat University^{1*},
Biology Program, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchapraya Rajabhat University²,
Herb, Hemp and Cannabis Products Program, Faculty of Science and Technology,
Bansomdejchapraya Rajabhat University³

(Received: May 15, 2020; Revised: August 31, 2021; Accepted: October 20, 2021)

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดใบหูกวางสีแดงด้วยวิธีการสังเกตการเกิดสีและการตกตะกอน และเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) และ 2) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราในกลุ่มแคนดิดา ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion และวิธี Broth Microdilution โดยนำใบหูกวางสีแดงมาสกัดโดยการหมักด้วย 95% Ethanol และใช้เชื้อรา C. Albican ATCC 90028, C. Glabrata TISTR 5006, C. Kefyr TISTR 5270, C. Krusei TISTR 5256 และ C. Tropicalis TISTR 5045 วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่าเฉลี่ยของค่า Rf และบริเวณยับยั้ง ทำการเก็บข้อมูลตั้งแต่เดือนธันวาคม 2561 ถึง สิงหาคม 2562 ผลการวิจัยพบว่า

1. ใบหูกวาง พบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น 7 ชนิด ได้แก่ แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และแทนนิน เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบสาร Gallic Acid และ Quercetin

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา Candida Spp. ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion พบว่า สารสกัดใบหูกวางสีแดงมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา C. Glabrata ได้ดีที่สุดในรองลงมาคือ C. Kefry และ C. Krusei โดยมีค่าเฉลี่ย Inhibition Zone เท่ากับ 1.36, 1.10 และ 1.03 mm (SD=0.11, 0.05, 0.30 mm) ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Broth Microdilution มีค่า MIC เท่ากับ 7.81, 31.25 และ 62.50 ตามลำดับ และมีค่า MFC เท่ากับ 125, 125 และ >125 mg/ml ตามลำดับ

ดังนั้น ใบหูกวางสีแดงจึงสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้านเชื้อราแคนดิดา สามารถเพิ่มทางเลือกในการรักษาให้กับผู้ป่วยได้

คำสำคัญ: ใบหูกวางสีแดง, องค์ประกอบทางพฤกษเคมี, ฤทธิ์ต้านเชื้อราแคนดิดา

*ผู้ให้การติดต่อ (Corresponding e-mail: may.wrint@gmail.com เบอร์โทรศัพท์ 090-9366615)

Abstract

This experimental study aimed to examine red leaves terminalia catappa linn.(Indian almond leaves) extract, in order to describe 1) color change reaction, precipitation, and Thin Layer Chromatography (TLC), as well as 2) the antifungal actions using the Agar disc diffusion method and Broth Microdilution, as well as maceration of dried leaves with 95% ethanolic liquid. The Candida species consisted of *C. albican* ATCC 90028, *C. glabrata* TISTR 5006, *C. kefyr* TISTR 5270, *C. krusei* TISTR 5256, and *C. tropicalis* TISTR 5045. Data were collected from December 2018 to August 2019, and were analyzed using mean, standard deviation of Rf, and inhibition zone. Results were as follows.

1. Terminalia Catappa Linn. red leaves were found to have 7 phytochemical components, namely: anthraquinones, terpenoids, flavonoids, saponins, tannins, as well as gallic acid and quercetin, revealed in the extract of Thin Layer Chromatography (TLC).

2. Antifungal activity study of extract showed that the mean inhibition zone were 1.36, 1.10, and 1.03 mm ($SD=0.11, 0.05, 0.30$ mm against *C. glabrata*, *C. Kefry* and *C. Krusei*, respectively). The minimum inhibitory concentration (MIC) were 7.81, 31.25 and 62.50 mg/ml, respectively, while the Minimum fungicidal concentration (MFC) were 125, 125 and >125 mg/ml against *C. glabrata*, *C. Kefry* and *C. Krusei*, respectively.

Per findings, the crude extract of Terminalia Catappa Linn. red leaves could be developed as an alternative anti-candidiasis product.

Keywords: Terminalia Catappa Linn, Red Leaves, Phytochemical, Inhibit Fungi

บทนำ

เชื้อราแคนดิดา (Candida) เป็นเชื้อราที่เกิดจากยีสต์ อาศัยอยู่ในร่างกาย พบได้บริเวณผิวหนัง ช่องปาก ลำคอ ในลำไส้ และช่องคลอด เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาส ก่อให้เกิดโรค Candidiasis มักพบการติดเชื้อในผู้ที่มีภาวะร่างกายอ่อนเพลียหรือมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง การได้รับยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน การปลูกถ่ายอวัยวะ และการฟอกเลือด ซึ่งสามารถติดเชื้อได้ทางเยื่อเมือก สารคัดหลั่ง จนกระทั่งติดเชื้อในกระแสเลือดไปยังอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย เชื้อราแคนดิดาที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในคนมากที่สุดคือ *C. Albican* นอกจากนี้ยังสามารถพบ *C. Glabrata*, *C. Tropicalis*, *C. Parapsilosis* และ *C. Krusei* ที่พบร่วมกับการติดเชื้อมากกว่า 90% (Spampinato, & Leonardi, 2013)

โรค Candidiasis เป็นสาเหตุการติดเชื้อในโรงพยาบาล 8% -10% และมีอัตราการเสียชีวิตจากการติดเชื้อ Candidiasis สูงตั้งแต่ 15% - 35% ขึ้นอยู่กับเชื้อแคนดิดา (Nicolas, 2013) เชื้อราชนิดที่พบว่าเป็นสาเหตุก่อโรค Candidiasis มากที่สุดได้แก่ *C. Albicans* (65.3%) รองลงมาคือ *Candida Glabrata* (11.3%) *C. Tropicalis* (7.2%), *C. Parapsilosis* (6.0%) และ *C. Krusei* (2.4%) (Pfaller, Moet, Messe, Jones, & Castanheira, 2010) โรค Candidiasis ที่ก่อปัญหาสำคัญ ได้แก่ โรคติดเชื้อแคนดิดาในปาก (Candidiasis of Oral Cavity) พบได้บ่อยในผู้ป่วยทารกแรกเกิด ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ ผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ติดเชื้อเอชไอวี/โรคเอดส์ ผู้ที่ใช้ยากดภูมิคุ้มกัน เตอรอยด์หรือยาฆ่าเชื้อติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน โดยทั่วไปแล้วผู้ที่ติดเชื้อราในช่องปากจะพบว่ามีรอยโรคลักษณะสีขาวเป็นหย่อม ๆ บนลิ้น กระพุ้งแก้มด้านในเหงือก ต่อมทอนซิลหรือลำคอ มีอาการเจ็บและอาจมีเลือดออกเล็กน้อยเมื่อถูกขูด หากแพร่กระจายไปยังหลอดอาหารจะทำให้เกิดอาการปวด หรือกลืนลำบากร่วมด้วย (Yuenyaow, & Wansutha, 2018)

การรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดาในปากที่นิยมคือการใช้ยาต้านเชื้อรา เช่น ยา Fluconazole Itraconazole และ Echinocandin เนื่องจากมีการดูดซึมทางปาก และมีความปลอดภัยในระดับที่น่าพอใจ (Meis, & Verweij,

2001) แต่ปัญหาที่พบจากการใช้ยาเหล่านี้คือมีรายงานการลดความไวของยา Fluconazole ต่อการต้านเชื้อ C. Glabrata, C. Krusei และ C. Lusitaniae (Vazquez, Peng, Sobel, Steele-Moore, Schuman, Holloway, et al., 2001) ซึ่งเชื้อราเหล่านี้ส่วนใหญ่คือต่อยาลายขนาน โดยเฉพาะ amphotericin B ซึ่งเป็นยาหลักที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อ Candida spp. ที่พบไม่บ่อย และ Echinocandins ทำให้การรักษายุ่งยาก และผู้ป่วยเสียชีวิตในอัตราสูง (Tantimavanich, Kitphiboonpun, & Prachayasittikul, 2018) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการดื้อยา Echinocandin ของเชื้อแคนดิดาที่เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ C. Albicans, C. Glabrata, C. Tropicalis และ C. Krusei (Alexander, 2013) ในประเทศไทยมีการนำสมุนไพรมารักษาบำบัดแผลในช่องปากในผู้ติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งสมุนไพรที่นำมาใช้ส่วนใหญ่จะพบสารแทนนินซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และทางการแพทย์แผนไทยนั้น รสฝาดสมานของสมุนไพรที่มีสารแทนนินจะมีฤทธิ์ช่วยให้แผลหายเร็ว (Udomkhamasuk, & Sanmanowong, 2007) เช่น เปลือกมังคุด เปลือกทับทิม ชาเขียวญี่ปุ่น ใบหูกวาง เป็นต้น (Tummarongkongkongsatit, & Rojtinakorn, 2007)

หูกวาง (*Terminalia catappa* L.) เป็นหนึ่งในพืชที่มีรสฝาด พบได้ทั่วไปในประเทศไทยอยู่ในสกุล Combretaceae เป็นไม้ยืนต้น ผลัดใบ สูง 10-35 เมตร นอกจากนี้ภูมิปัญญาชาวบ้านตั้งแต่ครั้งอดีต จนถึงปัจจุบันที่มีการนำเอาใบหูกวางแห้งแช่ในขวดหมึกปลากัด ซึ่งเชื่อว่าจะช่วยป้องกันโรคให้ปลาที่มีสุขภาพแข็งแรง (Pimonrad, Whangchai, Suwanphakdee, & Sriyasak, 2017) จึงได้มีการนำใบหูกวางมาศึกษาเพื่อรักษาโรคในปลากัดและปลาหางนกยูงพบว่า น้ำสกัดใบหูกวางสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas*, *Streptococcus* และโปรโตซัวชนิด *Tetrahymena* ที่ระดับความเข้มข้น 1,000, 4,000 และ 2,000 ppm ตามลำดับ (Polpornpisit, Tungtrongpaioj, Chansue, Koeyputdcha, Paphawasit, & Makato, 2006) การศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดจากใบหูกวาง ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* พบว่า ค่าต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (MIC) และค่าต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) มีค่าเท่ากับ 128 และ 1,000 ppm ตามลำดับ (Yamim, Chlard, & Penprapai, 2001) การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหูกวาง พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคท้องร่วง (*Escherichia Coli* และ *Staphylococcus Aureus*) กลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิว (*Cutibacterium Acnes* และ *S. Epidermidis*) และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกลิ่นอับชื้น (G1A, G1B, G1F, G6E, G6N, G6S, G4D, G10L, และ G2J) ได้ทั้ง 3 กลุ่ม โดยพบว่าสารสกัดในชั้นน้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือเชื้อ *E. Coli*, *S. Aureus* และเชื้อ *S. Epidermidis* ตามลำดับ (Namwong, 2018) จะเห็นได้ว่ามีการศึกษาถึงคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบหูกวางไว้อย่างชัดเจน ทั้งนี้ ยังไม่พบรายงานการวิจัยเรื่องฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิดต่าง ๆ ของสารสกัดใบหูกวาง

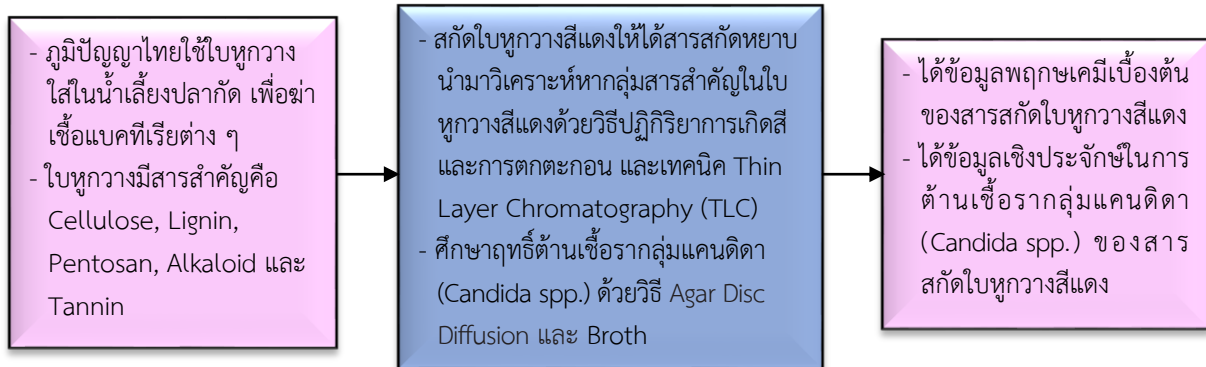
จากความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาดังกล่าว ประกอบกับการทบทวนวรรณกรรมทำให้ผู้วิจัยตระหนักถึงความสำคัญและความจำเป็นที่ศึกษาวิจัยเรื่อง การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น และฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida* spp. ของสารสกัดใบหูกวางสีแดงเพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น และฤทธิ์การต้านเชื้อราในกลุ่มแคนดิดาของสารสกัดหูกวางสีแดง โดยมุ่งหวังการนำผล ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ เพื่อเป็นประโยชน์ทางการรักษาโรคติดเชื้อราต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์วิจัย

1. เพื่อศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของสารสกัดหูกวางสีแดงด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีและการตกตะกอน และเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราในกลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) ของสารสกัดหูกวางสีแดงด้วยวิธี Agar Disc Diffusion และวิธี Broth Microdilution

กรอบแนวคิดการวิจัย

กรอบแนวคิดนี้ได้จากการทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวิธีการสกัดสารสำคัญ หางค์ประกอบทางพฤกษเคมี รวมถึงการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida spp.* ดังภาพ 1



ภาพ 1 กรอบแนวคิดการวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research) ประเภทการวิจัยพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ (Basic Science Research) แบบกลุ่มเดียวทดลองหลายครั้ง (One Shot Repeated Measures Design) โดยทำการศึกษาระหว่างเดือนธันวาคม 2561 ถึง สิงหาคม 2562 ณ ห้องปฏิบัติการทางเคมี และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา โดยควบคุมมาตรฐาน การจัดแบ่งโซนเลี้ยงเชื้อการกำจัดขยะติดเชื้อออกจากห้องปฏิบัติการเคมีทั่วไป ใช้รังสี UV ฆ่าเชื้อทุกครั้งก่อนปฏิบัติงาน รวมถึงการตรวจสอบมาตรฐานเครื่องมือทางห้องปฏิบัติการให้มีความเที่ยงตรงตามรอบที่กำหนด

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

1. ใบหูกวางเลือกเก็บใบแก่จัดที่มีสีแดง ทำการเก็บตัวอย่างจากบริเวณรอบ ๆ เขตอำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 โดยผ่านการตรวจสอบยืนยันชนิดของสมุนไพรโดยนักพฤกษศาสตร์ (Wongsatit, 2018)

2. เชื้อราทดสอบ (Tested Fungi) กลุ่ม *Candida spp.* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. Albicans* ATCC 90028, *C. Glabrata* TISTR 5006, *C. Kefyr* TISTR 5270, *Candida Krusei* TISTR 5256 และ *C. Tropicalis* TISTR 5045

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์ทางห้องปฏิบัติการ paper disc เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Whatman Ltd.), Filter Paper 110 มิลลิเมตร (No.4 Whatman Ltd.), Micropipette ขนาด 10-100 μ l และ 100-1000 μ l, Auto Pipette Tip (AXYGEN), ตู้เพาะเชื้อ (Incubator, MEMMERT), ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, MEMMERT), หม้อนึ่งแรงดันฆ่าเชื้อไอน้ำ (Autoclave, TOMY, ES-315), เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator, Heidolph), 96 Well microplate (Nunc, Corning, NY14831)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar (SAD) โดยใช้ปริมาณ 65 g.:1,000 ml เพื่อดูการสร้างโคโลนีของเชื้อราและทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้น, Sabouraud Dextrose Broth (SDB) โดยใช้ปริมาณ 30 g.:1,000 ml สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อราสำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อ สารสกัดจากใบหูกวางสีแดง

3. สารเคมี Absolute ethanol (Analytical Grade, Merck, Germany), กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (10% H_2SO_4 , Merck, Germany), คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$, RCI Labscan), สารละลายแอมโมเนีย (10% NH_3 , Merck, Germany), ไตคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2 , Honeywell, America), ลวดแมกนีเซียม, กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl, Merck, Germany), เพอริคคลอไรด์ (1% $FeCl_3$), น้ำยาเคดเด (Kedde's Reagent), น้ำยาตราเจนดอร์ฟ (Dragendorffs

Regent), กรดแกลเซียลอะซีติก (Glacial Acetic Acid, Quality Reagent Chemical (QREC), New Zealand), โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (5%KOH), เฟอริกคลอไรด์ (1%FeCl₃)

ขั้นตอนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

1. การเตรียมสารสกัดหยาบใบหูกวางสีแดง

นำตัวอย่างใบหูกวางสีแดงมาตัดแยกสิ่งปลอมปน เลือกใบที่มีสีแดง ล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง นำไปเข้าตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำใบแห้งจำนวน 100 กรัม มาสกัดด้วยวิธีการหมัก (Maceration) ด้วยตัวทำละลายคือ 95% Ethanol ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Rotator ด้วยความเร็ว 150 rpm เขย่าติดต่อกัน 7 ชั่วโมงต่อวันเป็นระยะเวลา 3 วัน กรองสารละลายและวัดปริมาตร ทำการสกัดซ้ำทั้งหมด 3 รอบ หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ กรองด้วยกระดาษกรอง ระเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสูญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 °C จะได้สารที่มีลักษณะข้นเหนียวสีแดงเข้มเรียกว่าสารสกัดหยาบ (Crude extract) เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C

2. การตรวจสอบหาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบหูกวางสีแดง โดยตรวจสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) 7 กลุ่ม ได้แก่ แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน แอลคาลอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน ดังนี้ (Ayoola, Coker, Adesegun, & Adepoju-Bello, 2008)

2.1 การตรวจสอบแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (Anthraquinones Glycoside)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำละลาย 10% H₂SO₄ 1.0 มิลลิลิตร เขย่า นำไปอุ่นบนเครื่องอ่างไอน้ำ (Waterbath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออกแล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปเติมน้ำละลายแอมโมเนีย (10% NH₃) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้นแสดงว่า พบแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ โดยเปรียบเทียบกับ Control ซึ่งนำสารสกัด 0.2 กรัม ละลาย 10% H₂SO₄ 1.0 มิลลิลิตร เพื่อสังเกตความแตกต่างระหว่างสีที่เกิดขึ้น

2.2 การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) 3-5 มิลลิลิตร 2-3 ครั้ง เติมน้ำคลอโรฟอร์ม (Chloroform) 2 มิลลิลิตร เขย่า ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H₂SO₄) 2 มิลลิลิตร ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อชั้นคลอโรฟอร์ม และกรดซัลฟิวริก แสดงว่าพบเทอร์พีนอยด์

2.3 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วย 50% Ethanol 3 มิลลิลิตร คนให้ละลาย เติมน้ำกลั่นเล็กน้อย ลงไป 2-3 ชั้น นำไปต้มผ่าน Water bath ที่อุณหภูมิ 70-75 °C ประมาณ 5 นาที ปล่อยให้สารละลายเย็นลง หยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc. HCl) 3-4 หยด เขย่า สังเกตสีที่ปรากฏ หากเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ส้ม หรือแดง แสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

2.4 การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปต้มผ่าน Water Bath ที่อุณหภูมิ 70-75 °C เป็นเวลา 5 นาที นำมาเติมน้ำกลั่น 2-3 มิลลิลิตร ใช้มือเขย่าอย่างแรงติดต่อกันนาน 1 นาที ถ้าปรากฏฟองและมีความคงตัวเกิดขึ้น โดยฟองยังคงอยู่ภายใน 30 นาที แสดงว่าพบซาโปนิน

2.5 การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอ่างไอน้ำ เติมน้ำละลาย 1% เฟอริกคลอไรด์ (1% FeCl₃) จำนวน 2-3 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายสีเขียวดำ หรือน้ำเงินดำ แสดงว่าพบแทนนิน

2.6 การตรวจสอบแอลคาลอยด์ (Alkaloids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 2% กรดซัลฟิวริก ($2\% \text{H}_2\text{SO}_4$) 15 มิลลิลิตร ต้มและคนด้วยแท่งแก้ว 10 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง หยดน้ำยาตราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's Reagent) 3 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบแอลคาลอยด์

2.7 การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac Glycosides)

ประกอบไปด้วยการทดสอบดังนี้ สเตียรอยด์ วงแหวนแล็กโตนไม่อิ่มตัว และน้ำตาลดีออกซี หากผลการทดสอบปรากฏผลบวกทั้ง 3 ส่วน จึงจะสรุปได้ว่าพบ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ วิธีทดสอบโดยเตรียมสารละลายตั้งต้นเพื่อใช้สำหรับการทดลองดังนี้ ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม สกัดสีออกด้วย ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) 2-3 ครั้ง

2.7.1 ทดสอบส่วนสเตียรอยด์ (Steroids) โดยใช้การทดสอบ ลิเบอร์แมน (Lieberman Test) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยไดคลอโรมีเทน 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน กรองส่วนที่ไม่ละลายออก เติมกรดอะซิติก (Acetic Acid Glacial) 1 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) 1 มิลลิลิตร สังเกตสีที่เกิดขึ้นทันที ถ้าปรากฏสีน้ำเงินหรือเขียว แสดงว่าพบสเตียรอยด์

2.7.2 ส่วนวงแหวนแล็กโตนไม่อิ่มตัว (Unsaturated lactone ring) นำสารละลายตั้งต้น 1 มิลลิลิตร เติมน้ำยาเคดเด (Kedde's Reagent) 1-2 หยด ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำยาละลาย 5% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (5% KOH) 1-2 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้นทันที ถ้าปรากฏสีม่วง แสดงว่าพบวงแหวนแล็กโตนไม่อิ่มตัว

2.7.3 ส่วนน้ำตาลดีออกซี (Deoxyribose) โดยใช้การทดสอบเคลเลอร์-คิลิยานี (Keller-Kiliani Test) สารละลายตั้งต้น 1 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก (Acetic Acid Glacial) 1 มิลลิลิตร เติมน้ำยาละลาย 1% เฟอร์ริกคลอไรด์ (1% FeCl_3) 1-2 หยด เขย่าให้เข้ากัน เอียงหลอดแล้วค่อย ๆ รินกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) ไปตามข้างหลอดประมาณ 1-2 มิลลิลิตร สังเกตสีตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารละลาย ถ้าปรากฏสีน้ำตาลระหว่างรอยต่อชั้นสารสกัด และกรดซัลฟิวริก แสดงว่าพบน้ำตาลดีออกซี (Chatteeranan, & Niyomthai, 2013)

3. การตรวจสอบสารสำคัญด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) (Polyiam, 2013)

3.1 เตรียมสารสกัดเอทานอลจากใบหูกวางสีแดง 5 มิลลิกรัม นำมาผสม 90% Ethanol 1 มิลลิลิตร เพื่อสกัดสารที่มีขั้วออกมา ผสมสารให้เข้ากันโดยเครื่อง Vortex เตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยนำสาร Gallic acid 0.2 มิลลิกรัม และสาร Quercetin 0.2 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลอย่างละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นใช้หลอด รูเล็ก (Capillary tube) นำสารสกัด และสารมาตรฐานมาในปริมาณ 5 ไมโครลิตร นำไปจุด (Spot) ลงบนแผ่น Aluminium Silica ขนาด 10 เซนติเมตร \times 10 เซนติเมตร 6 ตำแหน่งโดยกำหนดให้ห่างจากปลายล่างขอบแผ่น TLC ขึ้นมา 1 เซนติเมตรในแต่ละจุดห่างกัน 0.5 เซนติเมตร ด้านบนของแผ่น TLC ขีดระดับตัวทำละลายไว้ (Solvent front) ห่างจากขอบ 1 เซนติเมตร

3.2 เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยการผสม Hexane 30 ส่วน Ethyl Acetate 15 ส่วน และ Formic Acid 5 ส่วน (1 ส่วนคือ 1 มิลลิลิตร) จากนั้นเทลงในปีกเกอร์ให้มีความสูงจากก้นปีกเกอร์ ประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดด้วยกระดาษฟอยด์ ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที เพื่อให้บรรยากาศในปีกเกอร์อิ่มตัว

3.3 นำแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ไปตั้งในปีกเกอร์ที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายพร้อมกับปิดฝา ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงระดับ Solvent Front ที่กำหนดไว้ จากนั้นนำแผ่น TLC ออกจากปีกเกอร์ ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง ตรวจสอบแถบสารสำคัญที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm. จากนั้นใช้ดินสอทำสัญลักษณ์ตำแหน่งสารที่ปรากฏ เพื่อตรวจสอบระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสารและใช้ในการหาค่า R_f บันทึกภาพและตำแหน่งของแถบสารที่ปรากฏ จากนั้นคำนวณค่า R_f เปรียบเทียบค่า R_f ระหว่างสารสกัดที่ได้จากใบหูกวางสีแดงเทียบกับสารมาตรฐาน

4. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ Candida spp.

4.1 วิธี Agar Disc Diffusion (Janwittayanuchit, & Rungsripanurud, 2013)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ใน 0.85% Sodium chloride เทียบค่าความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard 0.5 นำมาป้ายบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Sabourad Dextrose Agar (SAD) ให้เชื้อ

กระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง 1-2 นาทีเตรียมแผ่น Paper disc นำสารสกัดใบหูกวางสีแดงมาละลายด้วย 95% Ethanol ให้ได้ความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ คือ 500, 250, 125 และ 62.50 mg/ml นำแผ่นดิสก์ที่หยดสารสกัดใบหูกวางสีแดง และแผ่นดิสก์ที่หยด 95% Ethanol ทิ้งไว้ 30 นาที และวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ นำเข้าตูบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.2 วิธี Broth Microdilution (Thatsanawichitphan, 2015)

ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบหูกวางสีแดง ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) และ ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบหูกวางสีแดง ที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Fungicidal Concentration; MFC) โดยวิธี Broth Microdilution ทำโดยเตรียมเชื้อ *Candida* spp. ทั้ง 5 สายพันธุ์ ใน 0.85% Sodium Chloride ปรับให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ McFarland Standard 0.5 เพื่อนำไปทดสอบกับสารสกัดใบหูกวางสีแดงคูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวใส่ลงใน 96-Well plate หลุมที่ 1-12 หลุมละ 50 μ l จากนั้นคูดสารสกัดใบหูกวางสีแดง ใส่ลงในหลุมที่ 1 ความเข้มข้น 500 mg/ml ใส่ลงในหลุมที่ 1 ของแถว D ถึง H ทำการเจือจางสารสกัดแบบ 2- Fold serial dilution จากนั้นเติมเชื้อราที่เตรียมไว้ลงในหลุมละ 50 μ l ทำซ้ำ 5 ครั้ง หรือ 5 แถว สำหรับสารสกัด และใช้ 95% Ethanol เป็น Negative Control จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลและบันทึกผลค่า MIC ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ กล่าวคือไม่พบการเจริญของเชื้อราเมื่อมองด้วยตาเปล่า จากนั้นนำสารละลายในหลุมทดสอบที่ไม่พบการเจริญของเชื้อรามาจุด (Spot) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ในปริมาณ 10 μ l จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลและบันทึกผลค่า MFC ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การวิเคราะห์การเตรียมสารสกัดหยาบใบหูกวางสีแดง (Crude Extract) มาคำนวณหา % Yield จากสูตรการหาร้อยละปริมาณสารสกัด (% Yield of Crude Extract)

$$\% \text{Yield of Crude Extract} = \frac{\text{Weight of Extract recovered (g)}}{\text{Weight of fresh dry plant (g)}} \times 100$$

2. การวิเคราะห์สารพิษเคมีจากการสังเกตการเกิดตะกอนและสีต่าง ๆ

3. วิธีการวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ใช้สถิติการวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองจาก การคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean) ของค่า R_f

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (ซม.)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (ซม.)}}$$

4. การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar disc diffusion ใช้สถิติการวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองการยับยั้งเชื้อ คือค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของค่าบริเวณใสรอบแผ่นดิสก์ (Inhibition Zone) จากการทดลอง 5 ซ้ำ

ผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์การเตรียมสารสกัดหยาบใบหูกวางสีแดง (Crude Extract) ใบหูกวางสีแดงแห้ง จำนวน 100 กรัม จะได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะข้นเหนียว (Crude Extract) ปริมาตร 18.23 กรัม นำมาคำนวณหา % Yield ของใบหูกวางสีแดง ดังสูตรข้างต้น จะได้ เท่ากับ 18.23%
2. การตรวจสอบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลจากใบหูกวางสีแดง โดยตรวจสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) 7 กลุ่ม ได้แก่ แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน แอลคาลอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยสังเกตปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอนพบว่าสารสกัดใบหูกวางสีแดงพบสารฟลักซ์เคมี ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 การตรวจสอบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากใบหูกวางสีแดง

สารฟลักซ์เคมี	ปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน ที่สังเกตพบ	ผลการตรวจสอบ
แอนทราควิโนนไกลโคไซด์	พบสารละลายเป็นสีชมพูแดง	+
เทอร์พีนอยด์	พบวงแหวนสีน้ำตาลเข้ม	+
ฟลาโวนอยด์	พบสารละลายสีเหลืองออกส้ม	+
ซาโปนิน	พบฟองเล็กน้อย	+
แทนนิน	พบสารละลายสีเขียวดำ	+
แอลคาลอยด์	พบตะกอนสีน้ำตาลอ่อน	-
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	- พบสีฟ้าอมเขียว - ไม่พบวงแหวนแล็กโทนไม่อิมตัว - ไม่พบสีน้ำตาลระหว่างรอยต่อชั้นสารสกัด และกรดซัลฟิวริก	-

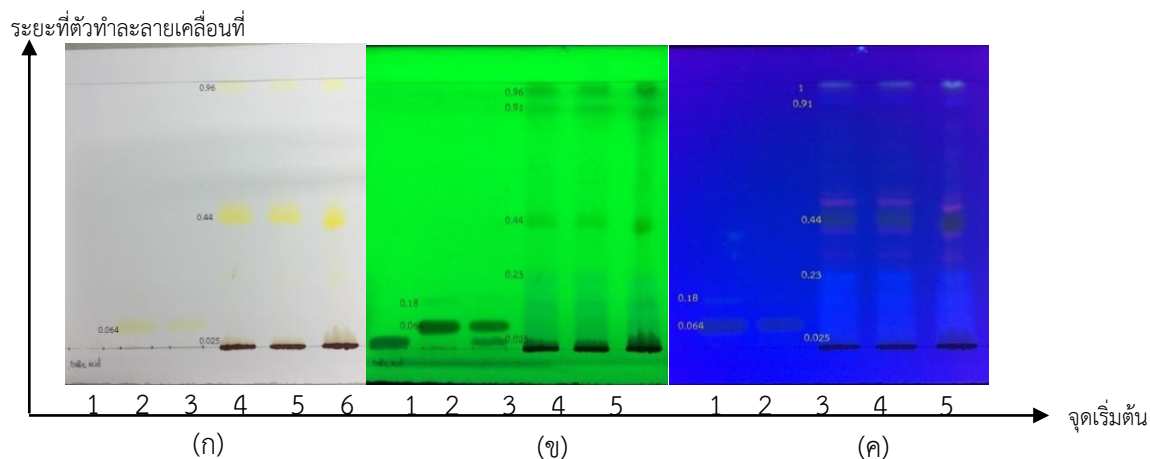
หมายเหตุ - หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ, + หมายถึง ตรวจสอบพบ

จากตาราง 1 การตรวจสอบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทานอลของใบหูกวางสีแดง (*Terminalia catappa* Linn.) พบสารฟลักซ์เคมี 5 ชนิด ได้แก่ แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ เนื่องจากพบสารละลายเป็นสีชมพูแดง พบสารเทอร์พีนอยด์ เนื่องจากปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลเข้ม พบสารฟลาโวนอยด์ เนื่องจากปรากฏสารละลายสีเหลืองออกส้ม พบสารซาโปนิน เนื่องจากปรากฏฟองเล็กน้อย และพบสารแทนนิน เนื่องจากปรากฏสารละลายสีเขียวดำ ไม่พบสารแอลคาลอยด์เนื่องจากไม่ปรากฏตะกอนสีส้มแดง และไม่พบสารคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ เนื่องจากปรากฏสีฟ้าอมเขียว ซึ่งแสดงว่าพบสเตียรอยด์เพียงตัวเดียว แต่ไม่พบวงแหวนแล็กโทนไม่อิมตัว และไม่พบสีน้ำตาลระหว่างรอยต่อชั้นสารสกัด และกรดซัลฟิวริกซึ่งเป็นส่วนของส่วนน้ำตาลคือออกซี

3. การวิเคราะห์ชนิดของสารสำคัญในสารสกัดใบหูกวางสีแดงด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

การตรวจสอบรูปแบบสารสำคัญในสารสกัด 95% Ethanol ของใบหูกวางสีแดง โดยใช้เทคนิค TLC โดยใช้ตัวทำละลาย Hexane, Ethyl acetate และ Formic acid ในอัตราส่วน 30:15:5 ของสารสกัดใบหูกวางสีแดงเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid และ Quercetin พบว่าส่วนสารมาตรฐาน Gallic acid เมื่อส่องภายใต้แสง สีขาวและส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm พบค่า R_f เท่ากับ 0.025 ไม่พบตำแหน่งสารเมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 nm ส่วนของสารมาตรฐาน Quercetin เมื่อส่องภายใต้แสงสีขาวพบค่า R_f เท่ากับ 0.064 ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm พบค่า R_f เท่ากับ 0.064 และ 0.18 ตามลำดับ ส่วนของสารมาตรฐานผสมระหว่าง Gallic Acid และ Quercetin พบว่าเมื่อส่องภายใต้แสงสีขาว พบค่า R_f เท่ากับ 0.025 และ 0.064 ตามลำดับ ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm พบค่า R_f เท่ากับ 0.025, 0.064 และ 0.18 ตามลำดับ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 nm พบค่า R_f 2 ตำแหน่ง คือ 0.064, 0.18 เมื่อตรวจสอบสารสกัดใบหูกวางสีแดง ด้วยการส่องภายใต้แสงสีขาว พบค่า R_f เท่ากับ 0.025 (เท่ากับ

Gallic Acid), 0.44 และ 0.96 ตามลำดับ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm พบค่า R_f เท่ากับ 0.025 (เท่ากับ Gallic Acid), 0.064 (เท่ากับ Quercetin), 0.18 (เท่ากับ Quercetin), 0.23, 0.44, 0.91 และ 0.96 ตามลำดับ และเมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 nm พบค่า R_f เท่ากับ 0.025 (เท่ากับ Gallic Acid), 0.23, 0.44, 0.91 และ 1 ตามลำดับ ดังภาพ 2



ภาพ 2 Thin Layer Chromatography (TLC) ของสารสกัดใบหูกวางสีแดง ภายใต้ (ก) แสงขาว (ข) แสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 254 nm (ค) แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 nm
 หมายเหตุ 1 = สารมาตรฐาน Gallic Acid, 2 = สารมาตรฐาน Quercetin, 3 = สารผสมของสารมาตรฐาน Gallic Acid และ Quercetin, 4 5 6 = สารสกัดใบหูกวางสีแดง

4. ฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางสีแดงในการยับยั้งเชื้อ *Candida* spp. โดยวิธี Agar Disc Diffusion จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของสารสกัดใบหูกวางสีแดง โดยใช้วิธี Agar Disc Diffusion พบว่าสารสกัดใบหูกวางสีแดงสามารถต้านเชื้อ *Candida* spp. ได้บางชนิด ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 บริเวณยับยั้งเชื้อ (Zone of inhibition) ของสารสกัดใบหูกวางสีแดง ในการยับยั้งเชื้อรา *Candida* spp.

เชื้อ	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อ (Zone of Inhibition) ($M \pm SD$, cm) ต่อความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)							
	62.50 mg/ml		125 mg/ml		250 mg/ml		500 mg/ml	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
C. Albican ATCC 90028	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C. Glabrata TISTR 5006	0.81	0.04	1.01	0.10	1.04	0.06	1.36	0.11
C. Kefry TISTR 5270	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.10	1.05
C. Krusei TISTR 5256	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.44	1.03	0.30
C. Tropicalis TISTR 5045	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Negative Control (95% Ethanol)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

M = Mean, SD = Standard Deviation

จากตาราง 2 พบว่า ใบหูกวางสีแดงที่สกัดด้วย 95% Ethanol เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida* spp. โดยวิธี Agar Disc Diffusion พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. Glabrata* ที่ระดับความเข้มข้น 62.50, 125, 250 และ 500 mg/ml ตามลำดับ โดยมีค่าบริเวณใสของการยับยั้งเชื้อเฉลี่ย (Inhibition Zone) เท่ากับ 0.81, 1.01, 1.04 และ 1.36 cm ($SD=0.04, 0.10, 0.06$ และ 0.11 cm) ตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. Kefry* ที่ระดับความเข้มข้น 500 mg/ml โดยมีค่าบริเวณใสของการยับยั้งเชื้อเฉลี่ย (Inhibition Zone) เท่ากับ 1.10 ± 1.05 cm และสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. Krusei* ที่ระดับความเข้มข้น 250 และ 500 mg/ml โดยมีค่า

บริเวณใสของการยับยั้งเชื้อเฉลี่ย (Inhibition Zone) เท่ากับ 0.50 ± 0.44 และ 1.03 ± 0.30 cm ตามลำดับ ไม่พบบริเวณใสของการยับยั้งเชื้อรา (Inhibition Zone) ของเชื้อ *C. Albican* และ *C. Tropicalis* ของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 62.50, 125, 250 และ 500 mg/ml

5. ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบหูกวางสีแดง ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบหูกวางสีแดง ที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ (Minimum Fungicidal Concentration; MFC) โดยวิธี Broth Microdilution

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อราของสารสกัดใบหูกวางสีแดง โดยใช้วิธี Broth Microdilution ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดใบหูกวางสีแดงมีค่า MIC และ MFC ต่อเชื้อ *Candida* spp. ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบหูกวางสีแดงที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบหูกวางสีแดงที่สามารถฆ่าเชื้อรา (MFC) ในสกุล *Candida*

เชื้อรา	ค่า MIC ของสารสกัด (mg/ml)	ค่า MFC ของสารสกัด (mg/ml)
<i>C. Albican</i> ATCC 90028	62.50	>125
<i>C. Glabrata</i> TISTR 5006	7.81	125
<i>C. Kefry</i> TISTR 5270	31.25	125
<i>C. Krusei</i> TISTR 5256	62.50	>125
<i>C. Tropicalis</i> TISTR 5045	31.25	>125

จากตาราง 3 พบว่า สารสกัดใบหูกวางสีแดงที่ได้จากการสกัดด้วย 95% Ethanol เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida* spp. โดยวิธี Broth Microdilution พบว่า สารสกัดใบหูกวางสีแดงมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อรา หรือค่า MIC ต่อเชื้อ *C. Albicans* และ *C. Krusei* เท่ากับ 62.50 mg/ml และสามารถยับยั้งเชื้อ *C. Glabrata*, *C. Kefyr* และ *C. Tropicalis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.81, 31.25 และ 31.25 mg/ml ตามลำดับ และพบว่า สารสกัดนี้มีค่า MFC ต่อเชื้อรา *C. Glabrata* และ *C. Kefyr* เท่ากับ 125 mg/ml และมีค่า MFC ต่อเชื้อรา *C. Albicans*, *C. Krusei* และ *C. Tropicalis* เท่ากับ >125 mg/ml

อภิปรายผล

1. จากการสกัดหยาบใบหูกวางสีแดงด้วย 95% Ethanol เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น พบว่า องค์ประกอบหลักของใบหูกวางสีแดงมีสารพฤกษเคมีที่สำคัญ 5 กลุ่ม ได้แก่ แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และแทนนิน เมื่อนำไปศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีเบื้องต้น ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) พบสาร Gallic Acid และ Quercetin ในสารสกัดใบหูกวางสีแดง เช่นเดียวกับ Huayhongthong (2016) ซึ่งทำการศึกษาสารพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรไทยบางชนิดที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน และพบว่าสารสกัดใบหูกวางสีแดงที่สกัดด้วยเอทานอล มีสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ สเตียรอยด์ ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ แทนนิน คูมาริน และแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ และสอดคล้องกับ Lalam (2020) ที่ศึกษาองค์ประกอบของใบหูกวางด้วยวิธีที่ทดสอบด้วยการตรวจสอบหลายวิธี พบว่า สารสกัดใบหูกวางประกอบด้วย อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน แทนนิน และซาโปนิน เป็นองค์ประกอบหลัก

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราในกลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.) โดยวิธี Agar Disc Diffusion พบว่า สารสกัดหยาบจากใบหูกวางสีแดงมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. Glabrata*, *C. Kefry* และ *C. Krusei* สูงที่สุด ที่ความเข้มข้น 500 mg/ml โดยมีค่าเฉลี่ย Inhibition zone เท่ากับ 1.36, 1.10 และ 1.03 cm ($SD=0.11$, 1.05 และ 0.30 cm) ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อรา (MIC) ของเชื้อ *C. Albican*, *C. Glabrata*, *C. Kefry*, *C. Krusei* และ *C. Tropicalis* เท่ากับ 62.50, 7.81, 31.25, 62.50 และ 31.25 mg/ml ตามลำดับ ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MFC) ของสารสกัดต่อเชื้อ *C. Albicans*, *C. Glabrata*, *C. Kefry*, *C. kusei*

และ *C. tropicalis* เท่ากับ >125, 125, 125, >125 และ >125 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งอธิบายได้ว่าเป็นผลมาจากสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน ที่เป็นองค์ประกอบหลักของใบหูกวางสีแดงซึ่งสารแทนนินมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดแบคทีเรียและราีสต์ โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนในการสร้าง DNA, RNA (Adnan, Ibrahim & Yaacob, 2017) ฟลาโวนอยด์ยังยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ควบคุมการแลกเปลี่ยนสารเข้าออกจากเซลล์จึงมีผลลดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Lalam, 2020) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Terças, Monteiro, Moffa, Santos, Sousa, Pinto, et al. (2017). พบว่าส่วนประกอบของใบหูกวางสกัดด้วย N-butanol สามารถแยกองค์ประกอบได้สารแทนนิน กรดแกลลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida* spp. ได้ดีที่สุดในงานวิจัยของ Pattaratanakorn, Boonchalaew, Chaipet, Seesad, Rattanakit, & aovachirasuwan (2014) ที่ทำการศึกษารสพฤกษเคมีและฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดเปลือกต้นมะขามป้อมต้านเชื้อแคนดิดา ในช่องปาก พบว่า สารสกัดเปลือกต้นมะขามป้อมที่สกัดด้วย 95% Ethanol มีสารฟีนอลิก และแทนนิน เป็นองค์ประกอบ (Yang, Kortensniemi, Karonen, Salminen, 2012) และมีฤทธิ์สามารถต้านเชื้อรา *C. Albicans* ได้ที่ความเข้มข้น 125 mg/ml

จากการวิจัยครั้งนี้พบว่า สารสกัดจากใบหูกวางสีแดงมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรากลุ่ม *Candida* spp. โดยมีค่า MIC ต่ำสุดต่อเชื้อ *C. Glabrata* ซึ่งเชื้อ *Candida* spp. เหล่านี้เป็นสาเหตุก่อโรคเชื้อราในช่องปากในผู้ป่วยที่มีระดับภูมิคุ้มกันบกพร่อง จากข้อมูลการวิจัยนี้จึงเป็นประโยชน์ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบหูกวางสีแดงในการต้านเชื้อราชนิดอื่นเพิ่มเติม ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาเภสัชภัณฑ์ต้านเชื้อราจากสารสกัดใบหูกวางสีแดงได้ในอนาคต

การนำผลการวิจัยไปใช้

1. ผลการวิจัยครั้งนี้เป็นข้อมูลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น ของสารสกัดใบหูกวางสีแดง และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรากลุ่มแคนดิดา (*Candida* spp.)
2. ผลการวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลประกอบการพัฒนาเภสัชภัณฑ์จากสารสกัดใบหูกวางสีแดงเพื่อต้านเชื้อก่อโรครวมเชื้อรา *Candida* spp. ซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของใบหูกวางสีแดง ส่งเสริมการปลูกต้นหูกวางของเกษตรกรและเพิ่มมูลค่าของใบหูกวาง

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

จากผลการวิจัยนี้สามารถบอกคุณภาพวิเคราะห์ของสารสกัดใบหูกวางสีแดงที่สกัดด้วยวิธีการหมักใน 95% Ethanol แต่ไม่สามารถบอกปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิดในสารสกัดซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida* spp. ได้จึงควรศึกษาต่อยอดด้านการสกัดสารจากใบหูกวางและนำสารสกัดมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์มากที่สุด และนำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับการต้านเชื้อราต่อไป

References

- Adnan, S. N. A., Ibrahim, N., & Yaacob, W. A. (2017). Disruption of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Protein Synthesis by Tannins. *GERMS*, 7(4), 186-192.
- Ayoola, A. G., Coker, A. B. H., Adesegun, S. A., & Adepoju-Bello, A. (2008). Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1019-1024.
- Chatteeranan, S., & Niyomthai, S. (2013). Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of *Clerodendrum Disparifolium* Leaves. *KKU Sci Journal*, 41(3), 723-730. (in Thai)
- Huayhongthong, N. (2016). *Phytochemical Screening/Antioxidant Activity/ α -Glucosidase/ α -Amylase*. Chemical Education Faculty of Science, Burapha University. (in Thai)

- Janwittayanuchit, I., & Rungsripanurud, W. (2013). *Agents Microbacterial In Medical Microbiology, Bacteria*. (pp. 434-436). Bangkok: Chulalongkorn University Press. (in Thai)
- Lalam, R. (2020). Antimicrobial and Phytochemical Analysis of Methanolic Leaf Extracts of *Terminalia Catappa* Against Some Human Pathogenic Bacteria. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2020*, 9(1), 1200-120.
- Meis, J. F. G. M., & Verweij, P. E. (2001). Current Management of Fungal Infections. *Drugs Journal*, 61(1), 13-25.
- Namwong, S. (2018). *Antibacterial Activity of Terminalia Catappa L. Extract*. Bangkok: Suan Sunandha Rajabhat University. (in Thai)
- Pattaratanakorn, K., Boonchalaew, J., Chaipet, S., Seesad, S., Rattanakiat, S., & Laovachirasuwan, P. (2014). Development of Mouthwash from Phyllanthus Emblica L. Bark Extract for Oral Candidiasis. In *The 5th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2013 "Pharmacy Profession: Moving Forward to ASEAN Harmonization"*. Faculty of Pharmaceutical Sciences. Khon Kaen University. (in Thai)
- Pfaller, M. A., Moet, G. J., Messe, S. A., Jones, R. N., & Castanheira, M. (2010). *Candida* Bloodstream Infections: Comparison of Species Distributions and Antifungal Resistance Patterns in Community-Onset and Nosocomial Isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, (2008–2009). *Antimicrobial Agents Chemother Journal*, 55(2), 561-566.
- Pimonrad, P., Whangchai, N., Suwanphakdee, S., & Sriyasak, P. (2017). *Training Materials of Extracts Tannin form Terminalia Catappa Leaf: Easy Preparation Methods And Application in Ornamental Fish*. Faculty of Fisheries, Maejo University. (in Thai)
- Polpornpisit, A., Tungtrongpaioj, J., Chansue, N., Koeyudcha, W., Paphawasit, N., & Makato, E. (2006). *The Study of Indian Almond Leaves (Terminalia Catappa L.) on Siamese Fighting Fish (Betta Splendens) and Guppy (Poecilia Reticulata) Diseases Treatment*. Unpublished Manuscript, Faculty of Veterinary Science - Vet, Chulalongkorn University. (In Thai)
- Polyiam, U. (2013). *Chemical Composition and Biological Active of Ficus Hispida Linn. Unpublished Manuscript*. Faculty of Science and Technology Rajamangala University of Technology Phra Nakhon. (In Thai)
- Spampinato, C., & Leonardi, D. (2013). *Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents*. BioMed Research International. Retrieved May 23, 2020 from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3708393/>
- Tantimavanich, S., Kitphiboonpun, W., & Prachayasittikul, V. (2018). *Candida Auris*: The First Resistant *Candida*. *Journal of Med Tech Assoc Thailand*, 46(2), 6472-6491. (In Thai)
- Terças, A. G., Monteiro, A. S., Moffa, E. B., Santos, J. R. A., Sousa, E. M., Pinto, A. R. B. et al. (2017). Phytochemical Characterization of *Terminalia Catappa* Linn. Extracts and Their Antifungal Activities Against *Candida* spp. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*, 2017(8), 595.
- Thatsanawichitphan, Y. (2014). *Antimicrobial Activity Extracts from Piper Interruptum Opiz and Piper Chantaranothainianum C. Suwanp. & D. A. Simpson*. A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Master of Education Degree in Science Education, Kanchanaburi Rajabhat University. (in Thai)

- Tummarongkongkongsatit, A., & Rojtinnakorn, J. (2007). Effective of Thai Herbs Extracts to Inhibit Bacterial Pathogens in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium Rosenbergii*). *Journal of Fisheries Technology Research*, 1(2), 192-200. (in Thai)
- Udomkhamsuk, W., & Sanmanowong, P. (2007). Enhancing Knowledge of Care for Oral Candidiasis Infection among Persons with HIV and Family Members. *KKU Research Journal*, 12(4), 465-471. (in Thai)
- Vazquez, J. A., Peng, G., Sobel, J. D., Steele-Moore, L., Schuman, P., Holloway, W. & et al. (2001). Evolution of Antifungal Susceptibility among *Candida* Species Isolates Recovered from Human Immunodeficiency Virus-Infected Women Receiving Fluconazole Prophylaxis. *Clinical Infectious Diseases*, 33(7), 1069-1075.
- Wongsatit, C. (2018). *Botanist Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy. Mahidol University. (Personal Communication, October 24, 2018)*
- Yamim, K., Chlard, C., & Penprapai, N. (2001). *Substance Properties of Terminalia Catappa Leaf for Inhibit Bacteria Aeromonas hydrophila*. Faculty of science and fisheries, Technology Rajamangala University. (in Thai)
- Yang, B., Kortesiemi, M., Liu, P., Karonen, M., & Salminen, J. P. (2012). Analysis of Hydrolysable Tannins and Other Phenolic Compounds in Emblic Leaf Flower (*Phyllanthus Emblica* L.) Fruits by High Performance Liquid Chromatography - Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60(35), 8672-8683.
- Yuenyaow, L., & Wansutha, S. (2018). Anti-*Candida Albicans* of Probiotic. *Journal of Traditional Thai Medical Research*, 4(2), 1-20. (in Thai)