

การใช้สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุก

The Use of Crude Extract of Punica Granatum Linn Pericarp to Inhibit Catfish Pathogenic Bacteria

ปวีณา วัดบัว (Paweena Wadbua)* ดร. สีนินาญ ศรี (Dr. Sineenat Siri)**

ดร. นิลุบล กิจอันเจริญ (Dr. Nilubol Kitancharoen)*** วิรัช ว่องพัฒน์กุล (Wirut Wongphathanakul)****

บทคัดย่อ

ทับทิม (*Punica granatum* Linn) จัดเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคท้องเสียและโรคบิดในคน อีกทั้งยังมีรายงานถึงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนทั้งแกรมบวกและลบหลายชนิด แต่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในปลา ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วยน้ำในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุก 2 ชนิดคือ *Aeromonas caviae* และ *A. sobria* พบว่าค่าของ inhibition zone ต่อเชื้อ *A. caviae* และ *A. sobria* เป็น 15.7 ± 0.4 และ 18.5 ± 0.5 มม. ตามลำดับ และมีค่า minimal bactericidal concentration (MBC) ที่ 24 ช.ม. ของการบ่มเป็น 6.25 และ 12.50 มก./มล. ตามลำดับ จากการศึกษากลุ่มสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบเบื้องต้นพบว่าสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมเป็นสารในกลุ่ม tannins, sterol glycosides, และ phenolic compounds เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโดยใช้ไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) พบว่าสารสกัดมีค่า lethal concentration 50 (LC_{50}) ที่ 24 ช.ม. เฉลี่ย 15.80 มก./มล. ซึ่งสูงกว่าค่า MBC ต่อเชื้อ *A. caviae* และ *A. sobria* จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมน่าจะสามารถใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุกได้ ซึ่งอาจสามารถใช้แทนยาปฏิชีวนะในฟาร์มเลี้ยงปลาเพื่อลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย การตกค้างของยาในเนื้อปลา และการลดต้นทุนการเพาะเลี้ยง

ABSTRACT

Pomegranate (*Punica granatum* Linn) is a local medicinal plant of Thailand, which is used as a remedy for diarrhea and dysentery. Moreover, there have been a number of reports of its antibacterial activity against both of gram positive and gram negative human-pathogenic bacteria. However, none is reported on its activity against fish pathogenic bacteria. Therefore, the antibacterial activity of crude extract of pomegranate pericarp against 2 strains of pathogenic bacteria of catfish, *Aeromonas caviae*

* มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

and *A. sobria*, was studied in this research. The pomegranate extract showed the inhibition zone against *A. caviae* and *A. sobria* of 15.7 ± 0.4 and 18.5 ± 0.5 mm, respectively. The minimal bactericidal concentration (MBC) values at 24 h of incubation were 6.25 and 12.50 mg/ml, respectively. In addition, the primary phytochemical study showed that the antibacterial compounds of crude pomegranate extract was classified to a group of tannins, sterol glycosides, and phenolic compounds. The in vivo cytotoxicity of the crude extract on brine shrimps (*Artemia salina*) was also investigated and the average of lethal concentration 50 (LC_{50}) value at 24 h of incubation was 15.80 mg/ml, which was higher than the MBC values against *A. caviae* and *A. sobria*. The results of this research suggested that the crude extract of pomegranate pericarp may be useful to inhibit catfish pathogenic bacteria and perhaps replace the uses of antibiotics in fish farming, thus probably reducing problems of antibiotic-resistant bacteria, left-over chemicals in fish flesh, and lower cost of fish farming.

คำสำคัญ : ทับทิม ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ความเป็นพิษต่อเซลล์ *Aeromonas caviae* *Aeromonas sobria*

Key Words : Pomegranate, Antibacterial activity, Cytotoxicity, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*

บทนำ

ทับทิม (*Punica granatum* Linn) เป็นไม้พุ่มขนาดกลาง ที่พบได้ในทั่วทุกภาคของประเทศไทย อีกทั้งยังจัดเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่ใช้กันมานาน โดยเปลือกผลของทับทิมนั้นมีสรรพคุณในการรักษาแผลพุพอง อาการท้องเสีย ท้องเดิน และอาการบิด (เกียรติเกศธร กาญจนพิสุทธิ์, 2541) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแกรมบวกและลบ เช่น *Bacillus subtilis* (Ahmad et al., 1998), *Escherichia coli* (Ahmad et al., 1998; ตริชฎา และคณะ, 2548), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (Anesini and Perez, 1993; Ahmad et al., 1998), methicillin-resistant *S. aureus* หรือ MRSA (Machado et al., 2003; Voravuthikunchai and Kitpipit, 2003), และ *Vibrio cholerae* (Guevara et al., 1994) ซึ่งรายงานวิจัยส่วนใหญ่ไม่ได้รายงานถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากทับทิม ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนเท่านั้น แต่ยังไม่มียาถึงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลา

ปัจจุบันโรคติดเชื้อแบคทีเรียในปลาสร้างความเสียหายต่อเกษตรกรผู้เลี้ยง รวมถึงเศรษฐกิจของประเทศไทยอย่างมาก โดยทั่วไปเมื่อเกษตรกรพบว่าปลาเป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียนั้น นิยมแก้ไข้ปัญหาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะดังกล่าวมักก่อให้เกิดปัญหาตามมาคือ การตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อปลาที่ส่งผลกระทบต่อ การส่งออก และการตกค้างของยาปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังก่อให้เกิดปัญหาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย เช่นการดื้อต่อยาเตตราไซคลิน และแอมพิซิลิน ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Aeromonas spp.* (Palu et al., 2006) ทำให้โรคดังกล่าวยากแก่การควบคุมและการรักษา

ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุก 2 ชนิดคือ *Aeromonas caviae* และ *A. sobria* การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) และการวิเคราะห์เบื้องต้นถึงกลุ่มของสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การสกัดสารจากเปลือกผลทับทิม

นำเปลือกผลทับทิมสดมาทำการสกัดด้วยน้ำ (อัตราส่วนพืชต่อน้ำ 1:4) ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษ Whatman No. 1 ทำให้สารละลายแข็งด้วย shelf freezer และทำให้สารแห้งด้วยความเย็นภายใต้สภาวะสุญญากาศด้วยเครื่อง lyophilizer และเก็บสารที่ได้ใน desiccator โดยสารสกัดจะทำการละลายกลับด้วยน้ำ และกรองผ่าน 0.22 μ M sterilized filters ก่อนนำไปใช้

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria* ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม

2.1 การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดเบื้องต้น

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยวิธี agar well diffusion assay ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Owais และคณะ (Owais et al., 2003) โดยนำแบคทีเรียที่เลี้ยงใน Luria-Bertani (LB) broth (McFarland 0.5) มาเกลี่ยให้ทั่วบน LB agar ด้วย sterile cotton swab จากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.2 มม. เติมสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมความเข้มข้น 100 มก./มล. ปริมาณ 15 μ l ลงในหลุม บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจวัดผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone

2.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

นำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมมาเจือจางแบบเจือจางลงทีละ 2 เท่า กับ Müller Hinton broth (MHB) ใน microwell plate ให้มีค่าความเข้มข้นระหว่าง 50–0 มก./มล. เติมเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* หรือ *A. sobria* (McFarland 0.5) ลงใน microwell plate (อัตราส่วน 1:1) บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นมา streak ลงบน Müller Hinton agar (MHA)

บ่มเลี้ยงเชื้อ อีกครั้งที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม. โดยในการทดลองจะทำการ streak เชื้อหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 24 ชม. จากนั้นวิเคราะห์ค่า minimal bactericidal concentration (MBC) โดยสังเกตค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ 99.99 % ที่ 2, 4, 8, 16, และ 24 ชม. ของการบ่ม (Zampini et al., 2005)

2.3 การยับยั้งการเจริญของเชื้อในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง

นำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมมาเจือจางแบบเจือจางลงทีละ 2 เท่า กับ Müller Hinton broth (MHB) ใน microwell plate ให้มีค่าความเข้มข้นระหว่าง 50–0 มก./มล. เติมเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* หรือ *A. sobria* (McFarland 0.5) ลงใน microwell plate (อัตราส่วน 1:1) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ทุก 2 ชม. เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟเพื่อศึกษาลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดพืชสมุนไพรในช่วงเวลา 24 ชม.

3. การทดสอบกลุ่มสารเคมีเบื้องต้นในสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม ด้วยวิธี TLC phytochemical assay

นำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมมาขีดบนแผ่น TLC ที่เคลือบด้วย silica gel 60F₂₅₄ เป็นระยะ 1 ชม. จากนั้นนำแผ่น TLC ใส่ในภาชนะปิดที่มีตัวทำละลาย (mobile phase) คือ chloroform : acetone : methanol : H₂O (1:7:4:5) เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 18 ซม. นำแผ่น TLC ออก และทิ้งให้แห้งในตู้ดูดควัน จากนั้นแบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยการบ่มกับเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* หรือ *A. sobria* เป็นเวลา 24 ชม. และสังเกตบริเวณ inhibition zone บนแผ่น TLC ส่วนที่ 2 นำไปพ่นด้วย Detecting agents เพื่อตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นในสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม โดยทำการทดสอบสารเคมีกลุ่ม tannins ด้วย vanillin-HCl (Ribereau-

Gayon, 1972), กลุ่ม sterol glycosides ด้วย 20% perchloric acid, กลุ่ม alkaloids ด้วย Iodine และ potassium iodide ใน glacial acetic acid, กลุ่ม coumarins ด้วย สารละลาย copper sulfate, anhydrous sodium carbonate และ sodium citrate (Stahl, 1969), และกลุ่ม phenolic compounds ด้วย สารละลาย 5% Aluminium chloride ใน methanol (Wagner *et al.*, 1984) จากนั้นทำการเปรียบเทียบตำแหน่ง inhibition zone บนแผ่น TLC กับผลการวิเคราะห์กลุ่มสารเคมีในตำแหน่งเดียวกัน ทำให้ทราบว่าบริเวณ inhibition zone มีสารเคมีกลุ่มใด

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทดสอบกับไรน้ำเค็ม (Solis *et al.*, 1993)

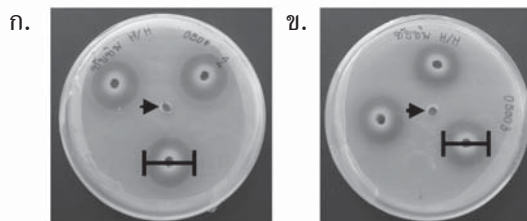
ทำการฟักไข่ไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) ใน artificial sea water เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนำ nauplii ที่ได้มาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม โดยทำการเจือจางสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมกับ artificial sea water แบบ เจือจางลงทีละ 2 เท่า ใน microwell plate โดยมีค่าความเข้มข้นระหว่าง 50-0 มก./มล. จากนั้นเติมสารละลายที่มี nauplii ของไรน้ำเค็มประมาณ 20 ตัว ลงในแต่ละหลุม ทำการตรวจนับจำนวน nauplii ด้วยกล้อง stereomicroscope ทุกๆ 3 ชม. เป็นเวลา 24 ชม. และทำการคำนวณหาค่าความเข้มข้น ของสารที่ทำให้ nauplii ของไรน้ำเค็มตาย 50% (lethal concentration 50, LC_{50}) ที่ 24 ชม.

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

1. การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas caviae* และ *A. sobria* ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม

จากการศึกษาเบื้องต้นของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่สกัดด้วยน้ำ พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผล

ทับทิมปริมาณ 1.5 มก. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาทุกทั้ง 2 ชนิด คือ *A. caviae* และ *A. sobria* ได้ดี โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 15.7 ± 0.4 และ 18.5 ± 0.5 มม. ตามลำดับ (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นค่า inhibition zone ที่สูงกว่าค่าที่รายงานโดยตรีชฎา และคณะ (2548) ที่พบว่าสารสกัดหยาบด้วยน้ำจากเปลือกผลทับทิมปริมาณ 2.5 มก. สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* จำนวน 6 สายพันธุ์ได้ค่า inhibition zone ระหว่าง 6.05-7.15 มม. ซึ่งคาดว่าสารสกัดอาจให้ผลการยับยั้งที่แตกต่างกันตามชนิดของแบคทีเรีย แม้ว่าแบคทีเรียดังกล่าวต่างเป็นแบคทีเรียแกรมลบด้วยกันก็ตาม



รูปที่ 1 ลักษณะ inhibition zone ของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมด้วยน้ำกลั่น (ก) ผลต่อเชื้อ *A. caviae* และ (ข) ผลต่อเชื้อ *A. sobria* ลูกศรคือน้ำกลั่นที่ใช้เป็น negative control

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมมาทดสอบหาค่า MBC พบว่าค่า MBC ของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria* ที่ 24 ชม. ของการบ่ม มีค่า 6.25 และ 12.50 มก./มล. ตามลำดับ โดย สารสกัด 6.25 มก./มล. สามารถฆ่าเชื้อ *A. caviae* ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 และสารสกัด 12.50 มก./มล. สามารถฆ่าเชื้อ *A. sobria* ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 (ตารางที่ 1) นอกจากนี้จากการทดลองพบว่า ยาปฏิชีวนะ เตตราซัยคลินซึ่งใช้เป็น positive control ในการทดลองนี้ มีค่า MBC ต่อเชื้อ *A. caviae* และ *A. sobria* เท่ากับ 19.50 และ 312 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ ซึ่งค่า MBC ต่อเชื้อ *A. sobria* ที่มีค่าสูงขนาดนี้ทำให้คาดว่า *A. sobria* น่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรีย

ที่ต่อยาเตตราซัยคลิน แต่ *A. sobria* สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม

ในการทดลองนี้ไม่ได้ทดสอบผลของสารสกัดต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แต่มีรายงานโดย Voravuthikunchai และ Kitpipit (2003) ที่พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากเปลือกผลทับทิมสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมธิซิลินจำนวน 35 สายพันธุ์ได้ โดยมีค่า MBC ระหว่าง 15.00–16.00 มก./มล. ดังนั้นสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมจึงเป็นสารสกัดชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรีย แกรมลบ และแกรมบวก และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ดื้อยาปฏิชีวนะบางชนิดได้

กราฟแสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* (Inhibition curve) ของสารสกัดหยาบด้วยน้ำจากเปลือกผลทับทิมแสดงในรูปที่ 2 พบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ (dose dependent response) นั่นคือเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดก็สูงขึ้นเช่นกัน

2. การทดสอบเบื้องต้นของกลุ่มสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม

จากการเปรียบเทียบตำแหน่ง inhibition zone บน แผ่น TLC กับผลการทดสอบสารเคมีในตำแหน่งดังกล่าวโดยใช้สารเคมีทดสอบสารในกลุ่ม tannins, sterol glycosides, alkaloids, coumarins และ phenolic compounds พบว่าสารเคมีในบริเวณดังกล่าวให้ผลบวกต่อสารในกลุ่ม sterol glycoside, tannins, และ phenolic compounds (ตารางที่ 2) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ ตรีชฎา และคณะ (2548) ที่พบว่าสารสกัดเปลือกผลทับทิมมีสารในกลุ่มของ flavonoids, tannins, sterols, และ triterpenes ทั้งนี้ tannins และ steroids

ที่พบในสารสกัดจากพืชหลายชนิดมีรายงานว่ามียุทธในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ (Bruyne *et al.*, 1999; Ramesh *et al.*, 2001) ดังนั้นการที่สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria* ได้นั้นน่าจะเนื่องจากสารสำคัญในกลุ่ม tannins, sterol glycosides, และ phenolic compounds

3. การทดสอบความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็ม

การใช้ไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) เป็นตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตในการทดสอบความเป็นพิษแบบ *in vivo* นั้น เป็นวิธีใหม่ที่สะดวกและให้ผลดีในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากธรรมชาติจากการทดสอบความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมเริ่มทำให้ไรน้ำเค็มตายอย่างชัดเจน ในชั่วโมงที่ 18 แต่มีอัตราการตายที่ต่ำ (รูปที่ 3) จากการคำนวณค่า LC_{50} จากกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การตายของไรน้ำเค็มกับค่าความเข้มข้นของสารสกัด (รูปที่ 4) ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ช.ม. พบว่ามีค่าเฉลี่ยเป็น 15.80 มก./มล. ซึ่งค่าความเข้มข้นดังกล่าวมีค่าสูงกว่าค่า MBC ของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria* ซึ่งเท่ากับ 6.25 และ 12.5 มก./มล. ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมในความเข้มข้น MBC น่าจะสามารถใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งสองชนิดในปลาได้ เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มต่ำ

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดหยาบด้วยน้ำจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลา 2 ชนิด คือ *A. caviae* และ *A. sobria* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 15.7 ± 0.4 และ 18.5 ± 0.5 มม. ตามลำดับ และมีค่า MBC ต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* และ *A. sobria* ที่ 24 ช.ม. หลังการบ่ม เป็น 6.25 และ

12.50 มก./มล. ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์เบื้องต้นถึงกลุ่มของสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด พบว่าเป็นสารเคมีกลุ่ม sterol glycoside, tannins, และ phenolic compounds เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อไรน้ำเค็ม พบว่าสารสกัด มีค่า LC_{50} ที่ 24 ช.ม. เฉลี่ย 15.80 มก./มล. ซึ่งค่า LC_{50} มีค่าสูงกว่าค่า MBC ของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาดุกทั้ง 2 ชนิด จึงน่าจะสามารถใช้ในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคได้ดีเพราะมีความเป็นพิษต่ำ ดังนั้นการใช้สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม จึงน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการแก้ปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียในปลาดุกและอาจนำไปใช้แทนยาปฏิชีวนะ เช่น เตตราไซคลิน เป็นต้น ที่อาจนำไปสู่การลดปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย ปัญหาสารตกค้างในเนื้อปลา รวมไปถึงเป็นการลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกร

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ใช้สารสกัดหยาบของเปลือกผลทับทิม ซึ่งการแยกบริสุทธิ์สารออกฤทธิ์และผลการทดลองในลูกปลาดุกกำลังอยู่ในขั้นดำเนินการ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ปี 2548

เอกสารอ้างอิง

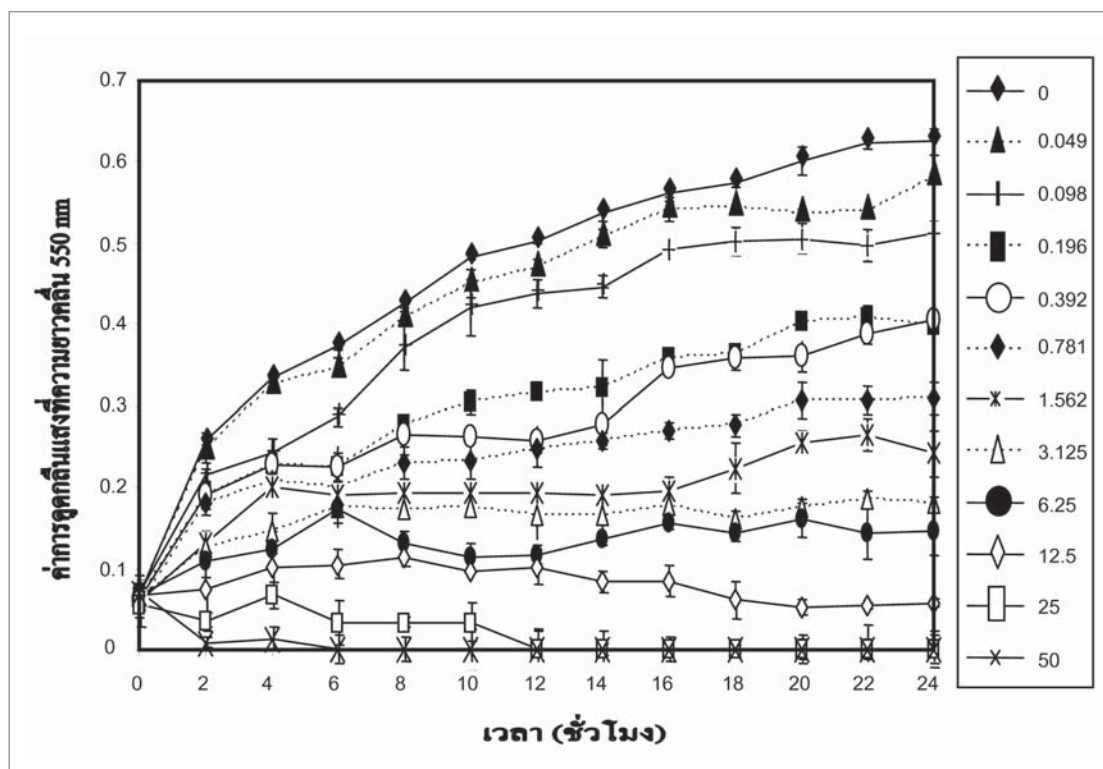
เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธ์. 2541. ทับทิม. นนทบุรี : ฐานเกษตรกรรม.
ตรีชฎา ศิริรักษ์ และคณะ. 2548. ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม (*Punica granatum*) ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคกลุ่ม Gram-negative bacilli. วารสารสงขลา นครินทร์ วทท. 27 (ฉบับพิเศษ 1): 235-244.

- Ahmad, I., et al. 1998. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. J. Ethnopharmacol. 62: 183-193.
- Anesini, C., and Perez, C. 1993. Scanning of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol. 39: 119-128.
- Bruyne, T.D., Pieters, L., Deelstra, H., and Vlietinck, A. 1999. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. Biochem. Syst. Ecol. 27: 445-459.
- Guevara, J.M., Chumpitaz, J., and Valencia, E. 1994. The in vitro action of plants on *Vibrio cholerae*. Rev gastroenterol Peru. 14: 27-31.
- Machado, T.B., et al. 2003. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Int J. Antimicrob Agents. 21: 279-284.
- Owais, M., Sharad, K.S., Shehbaz, A., and Saleemuddin, M. 2003. Antibacterial efficacy of *Withania somnifera* (ashwagandha) an indigenous medicinal plant against experimental marine salmonellosis. Phytomedicine. 12: 229-235.
- Palu, A., et al. 2006. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. Food Microbiology. 23: 504-509.
- Ramesh, N., et al. 2001. Phytochemical and antimicrobial studies on *Drynaria quercifolia*. Fitoterapia. 72: 934-936.

- Ribereau-Gayon. 1972. Plant phenolics. Oliver and Boyd, Edinburga, 184.
- Solis, P.N., et al. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Med.* 59 (3): 250–252.
- Stahl, E. 1969. Thin-Layer Chromatography. New York: Springer and Academic Press.
- Voravuthikunchai, S.P., and Kitpipit, L. 2003. Activities of crude extract of Thai medicinal plants on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol. Infect.* 9 (suppl 1): 236.
- Wagner, H., Bladt, S., and Zgainsky, EM. 1984. A thin Layer Chromatography. Berlin: Springer.
- Zampini, I.C., Vattuone, M.A., and Isla, M.I. 2005. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. *J. Ethnopharmacology* 102: 450–456.

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้เมื่อศึกษาที่เวลา 2, 4, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมความเข้มข้น 0–50 มก./มล. (เจือจางลงทีละ 2 เท่า)

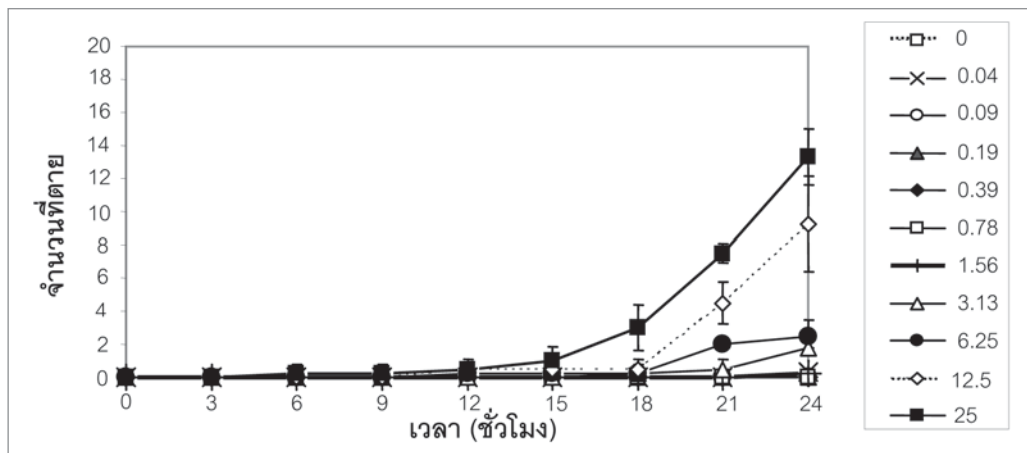
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (มก./มล.)	
	<i>A. caviae</i>	<i>A. sobria</i>
2	50	50
4	25	25
8	12.5	12.5
16	6.25	12.5
24	6.25	12.5



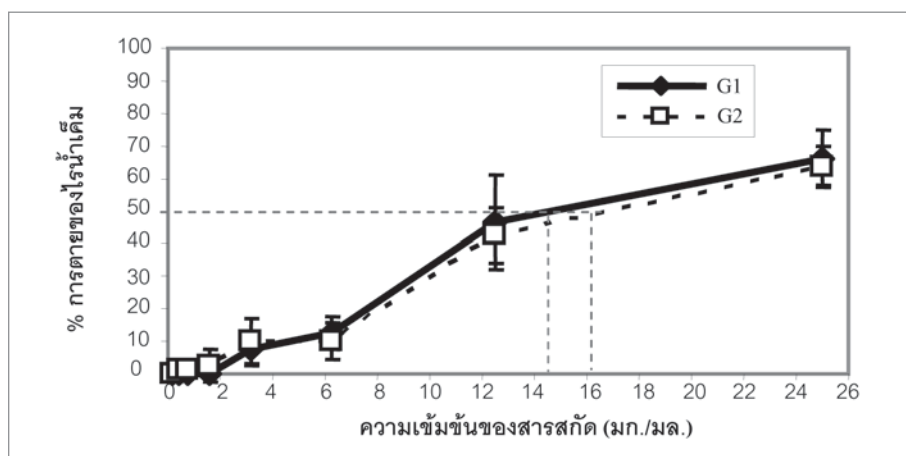
รูปที่ 2 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วยน้ำที่มีความเข้มข้น 0-50 มก./มล. ต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบกลุ่มสารเคมีของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

กลุ่มของสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ	ผลการทดสอบ
Tannins	+
Sterol glycosides	+
Alkoloids	-
Coumarins	-
Phenolic compounds	+



รูปที่ 3 จำนวนไรน้ำเค็มที่ตายเมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่ความเข้มข้น 0-25 มก./มล. โดยทำการตรวจนับทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4 เปอร์เซ็นต์การตายของไรน้ำเค็มเมื่อทดสอบกับสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกัน 2 ซ้ำ (G1 และ G2)