



สูตรผสมของสารสกัดจากพืชสำหรับยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด

Formulation of plant extracts for some pathogenic bacteria inhibition

มณฑล วิสุทธิ

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา อำเภอเมืองนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา 30000

E-mail: monton.v@nrru.ac.th

บทคัดย่อ

พืชสมุนไพรเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปเป็นยารักษาโรคต่าง ๆ ได้ โดยเฉพาะการรักษา และป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนัง การศึกษานี้ได้นำสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย 16 ชนิด มาเตรียมตำรับสูตรสมุนไพรทั้งหมด 16 สูตร สำหรับยับยั้งแบคทีเรีย และตรวจสอบตำรับสูตรด้วยวิธี Agar disc diffusion ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า สูตรผสมที่ 3 (ผลมะม่วงหาวมะนาวโห่) 12 (ใบพลู) และ 15 (เหง้าข่า) ให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแตกต่างจากสูตรผสมสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ในขั้นตอนถัดมา ได้มีการเตรียมสูตรผสมที่มีสารสกัดทั้ง 3 ชนิดผสมกัน ได้สูตรผสม 4 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 17, 18, 19 และสูตรผสมที่ 20 และนำไปตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion ผลการทดลองพบว่า สูตรผสมทั้งหมด 4 สูตรมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* อย่างไรก็ตามจากการสังเกตผลการทดลองที่ 48 ชั่วโมง พบว่าสูตรผสมที่ 17, 19 และ 20 มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเกิดขึ้นภายในโซนยับยั้งเชื้อ ยกเว้นสูตรที่ 18 ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้สมบูรณ์ จากนั้นจึงได้เลือกสูตรที่ 18 มาทำการหาความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ด้วยวิธี Broth microdilution ผลการทดลองพบว่าสูตรผสมที่ 18 มีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* และ MRSA เท่ากับ 0.62/0.62, 2.5/5.0 และ 0.31/0.31 mg/ml ตามลำดับ งานวิจัยแสดงให้เห็นว่า สูตรผสมสารสกัดจากเหง้าข่า ใบพลู และผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ มีความน่าสนใจในการพัฒนา เพื่อใช้สำหรับควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด

คำสำคัญ: สารสกัดจากพืช ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย มะม่วงหาวมะนาวโห่ พลู ข่า

Received: August 06, 2019

Revised: November 29, 2019

Accepted: December 31, 2019

Abstract

Medicinal plants could be an alternative treatment for non-infectious and infectious diseases, especially bacterial skin infections. This study selected 16 plant extracts and prepared 16 recipes to determine anti-bacterial activity by agar disc diffusion method. Primary results of anti-bacterial activity showed inhibitory activity from formulation number 3 (Bengal-Currants), 12 (Betel) and 15 (Galangal) which was significantly different from those of other formulations at $p < 0.05$. Then, the three mixture extracts were prepared for 4 formulas namely formulation 17, 18, 19 and 20. Anti-bacterial activity of these 4 recipes were determined by agar disc diffusion method. The results showed that all of them gave an anti-bacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. However, after observation at 48 h., only formula 18 completely inhibited tested bacteria around the disc. Formula 18 was selected to investigate the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values against representative bacterial stains by broth microdilution method. The MIC/MBC values for *S. aureus*, *E. coli* and MRSA as 0.62/0.62, 2.5/5.0 and 0.31/0.31 mg/ml, respectively. Taken together, this study provide evidence that formulations of extract mixture from Bengal-Currants, Betel, and Galangal, has antibacterial activity. These formulations should be developed to control pathogenic bacteria.

Keywords: Plant extract, Anti-bacterial activity, Bengal-Currants, Betel, Galangal

1. บทนำ

การติดเชื้อที่ผิวหนัง และแผลติดเชื้อเรื้อรัง เช่น การเป็นสิ่ว แผลในผู้ป่วยเบาหวาน แผลไฟไหม้ หรือแผลจากอุบัติเหตุ ส่วนใหญ่มีสาเหตุการติดเชื้อจากแบคทีเรีย โดยจะพบการติดเชื้อของแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ เช่น *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus* sp., *Anaerococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Porphyromonas* sp. และ *Streptococcus* sp. [1], [2] การรักษาสิ่ว หรือแผลติดเชื้อเรื้อรังส่วนใหญ่จะใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา ซึ่งการรักษาเป็นเวลานานอาจจะก่อให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรีย [2] ทำให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะไม่ได้ผล เพื่อลดปัญหาการดื้อยา และป้องกันไม่ให้เกิดการดื้อยาของเชื้อ

แบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น การศึกษาวิจัยเพื่อใช้สารเคมีจากพืช จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง สำหรับใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง

การใช้สารเคมีที่ได้จากธรรมชาติ เป็นทางเลือกที่ถูกนำมาใช้แทนการใช้ยาปฏิชีวนะสมุนไพร โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากพืช จึงเป็นแหล่งทางเลือกที่มีการศึกษาวิจัย สำหรับค้นหาสารเคมีที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีเพียงชนิดเดียวอาจก่อให้เกิดการดื้อต่อสารเคมี แบบเดียวกับที่พบในยาปฏิชีวนะได้เช่นกัน [3], [4], [5] ดังนั้นการศึกษาในรูปแบบสารสกัดหยาบจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง หลายงานวิจัยได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากพืชเพียงชนิดเดียวมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดี [6], [7] รวมไปถึงการ

วิจัยสารสกัดหยาบจากพืชในลักษณะสูตรผสมที่พบในตำรับยาแผนโบราณ [8], [9] สำหรับในงานวิจัยนี้ ได้ศึกษาการเตรียมสูตรผสมของสารสกัดจากพืช 16 ชนิด (ซึ่งเป็นพืชที่มีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียแกรมบวก [6], [7] และเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้รับประทานได้) เพื่อคัดเลือกสารสกัดที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดี เมื่อถูกเตรียมในลักษณะสูตรผสม จากนั้นนำสารสกัดที่คัดเลือกได้มาเตรียมเป็นสูตรผสมอีกครั้ง และตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย โดยคาดหวังว่าสูตรผสมที่ได้สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ด้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion และ Broth microdilution

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง และการเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. ศุภยงค์ วรวิฑูริย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ถูกนำมาแยกให้เป็นโคโลนี โดยเลี้ยงในอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA, Hi-media) จากนั้นเจียโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB, Hi-media) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการถ่ายเชื้อจากอาหาร TSB ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB, Hi-media) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 4-5 ชั่วโมง และนำมาปรับความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้เท่ากับความ

เข้มข้นของสารละลาย McFarland Standard No. 0.5 จะได้ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml และนำไปทดสอบในวิธีต่อไป

2.2 การเตรียมสกัดสารจากพืช

ส่วนต่าง ๆ ของพืชแต่ละชนิด ได้จากต้นไม้ที่พบในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา ทั้งหมด 16 ชนิด ซึ่งเป็นพืชที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้แล้วว่า มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ [6], [7] ได้แก่ ใบทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz) ใบพลับพลึง (*Crinum asiaticum* L.) ผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ (*Carissa carandas* L.) ต้นผักคัตว (*Cratoxylum formosum* (Jacq.) Benth. & Hook.f. ex Dyer) ผลมะระขี้นก (*Momordica charantia* L.) ต้นตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) ใบหูเสือ (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) ใบขี้เหล็ก (*Senna siamea* (Lam.) H.S.Irwin & Barneby) เปลือกลำต้นทรงบาดาล (*Senna surattensis* (Burm.f.) H.S.Irwin & Barneby) ใบหม่อน (*Morus alba* L.) ใบชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.) ใบพลู (*Piper betle* L.) ใบข่อย (*Morinda citrifolia* L.) ใบมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) เหง้าข่า (*Alpinia galanga* (L.) Willd.) และเหง้าขมิ้น (*Curcuma longa* L.) ส่วนต่าง ๆ ของพืชแต่ละชนิดถูกนำมาล้างทำความสะอาด แล้วนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 3-4 วัน บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด และนำไปแช่ใน 95% เอทานอล นาน 7 วัน จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อแยกกากออกจากสารละลาย นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator นำสารสกัดที่ได้ใส่ขวด แล้วนำไปชั่งน้ำหนักสารสกัด และคำนวณหาร้อยละของเนื้อสารสกัดที่ได้ จากนั้นละลายสารสกัดด้วยสารละลาย Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Hi-

media) ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 500 mg/ml เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 1 อัตราส่วนสูตรผสมของสารสกัดทั้งหมด 16 สูตร

สูตร	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษใช้แทนชื่อพืชที่มีอัตราส่วน 2 เท่า ในแต่ละสูตร A คือทองพันชั่ง B คือพลับพลึง C คือมะม่วงหาวมะนาวโห่ D คือผักตบ E คือมะระขี้นก F คือตะไคร้ G คือเห็ด H คือขี้เหล็ก I คือทรงบาดาล J คือหม่อน K คือชะพลู L คือพลู M คือขมิ้น N คือมะกรูด O คือข่า P คือขมิ้น

2.3 การเตรียมสูตรสารสกัดพืช

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสารสกัดจากพืชที่สามารถออกฤทธิ์ร่วมกับสารสกัดอื่นได้ ด้วยการเตรียมเป็นสูตรผสมของสารสกัด

ขั้นตอนที่หนึ่ง เป็นการคัดกรองสารสกัดเบื้องต้น ที่คาดว่าจะออกฤทธิ์ในลักษณะเสริมฤทธิ์กัน ด้วยการนำสารสกัดที่ได้ทั้งหมด 16 ชนิด มาเตรียมเป็นสูตรผสมทั้งหมด 16 สูตร ในแต่ละสูตรจะมีสารสกัดหนึ่งชนิดที่มีอัตราส่วนผสมมากกว่าสารสกัดชนิดอื่น 2 เท่า (ดัดแปลงจาก Temrangsee

et al [8]) ตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 (ในงานวิจัยนี้ กำหนดให้สารสกัด 1 ส่วน มีปริมาตรสารสกัดเท่ากับ 25 μ l) จากนั้นนำสูตรผสมที่ได้ไปตรวจฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียตามวิธี agar disc diffusion

ในขั้นตอนที่สอง เป็นการนำสารสกัดที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่ดีจากขั้นตอนที่หนึ่งมาเตรียมเป็นสูตรผสมอีกครั้ง สูตรผสมที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่ดีจากขั้นตอนแรก จะถูกพิจารณาด้วยการเลือกสารสกัดที่เป็นส่วนผสมหลัก (มีอัตราส่วนผสมมากกว่าสารสกัดชนิดอื่น) มาเตรียมเป็นสูตรผสมใหม่ และตรวจฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion และวิธี Broth microdilution

2.4 การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion

สูตรผสม และสารสกัดแต่ละชนิด จะถูกนำมาเตรียมเป็นแผ่นสารสกัด โดยการหยดสารสกัด หรือสูตรผสมปริมาตร 10 μ l ลงบนแผ่นกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm และตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009)

เชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ข้างต้น จะถูกนำมาใช้ทดสอบ ด้วยการใส่ cotton swab จุ่มเชื้อที่ปรับความชุ่มชื้นแล้ว เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA) จากนั้นวางแผ่นสารสกัด ในการทดลองนี้ ได้ใช้ชุดควบคุม negative control ใช้เป็น DMSO และ positive control ใช้เป็นยาปฏิชีวนะ Enrofloxacin นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นรอบแผ่นสารสกัดด้วย venire caliper 3 ครั้ง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยของวงการยับยั้ง

2.5 การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วย

วิธี Broth microdilution

สูตรผสมที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ดี จะถูกนำมาศึกษาปริมาณการยับยั้งแบคทีเรียด้วยการหาค่า MIC และค่า MBC (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009) โดยมีวิธีดังนี้ นำเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความเข้มข้นแล้วข้างต้น มาเจือจางต่อด้วยอาหารเหลว MHB ให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 1.0×10^6 CFU/ml

นำสูตรผสมที่ต้องการทดสอบมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 40 mg/ml จากนั้นดูดสูตรผสมปริมาตร 100 μ l ใส่ลงใน 96-well plate ที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อไปก่อนแล้วหลุมละ 100 μ l และทำการเจือจางแบบลำดับสอง ดูดเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้น ใส่ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate หลุมละ 100 μ l จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสูตรผสมเป็น 10-0.15 mg/ml โดยให้มีหลุมควบคุมเป็นเชื้อกับอาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อกับสูตรผสมที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (Negative control) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลองด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 nm และ

บันทึกผลการทดลองเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับหลุม Negative control ซึ่งจะมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ Negative control

จากนั้นนำอาหารของแต่ละหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากการหาค่า MIC ปริมาตร 10 μ l เพาะเลี้ยงบนอาหาร MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง การอ่านผลบันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของผิวหน้าอาหาร จะได้เป็นค่า MBC

2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองจากวิธี Agar disc diffusion จะถูกคำนวณทางสถิติ ด้วยการหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน รวมถึงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธี One way ANOVA ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะคิดที่ $p < 0.05$ ด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) เวอร์ชัน 22

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดด้วยเอทานอลจากพืช 16 ชนิด

วงศ์	พืช	ส่วนที่ใช้	ขนาดของโซนยับยั้งแบคทีเรีย (mm±SD)		
			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	MRSA
Acanthaceae	ทองพันชั่ง (<i>Rhinacanthus nasutus</i> (L.) Kurz)	ใบ	6.86±0.34	7.71±0.40	6.57±0.24
Amaryllidaceae	พลับพลึง (<i>Crinum asiaticum</i> L.)	ใบ	7.23±0.40	7.67±0.65	6.86±0.19
Apocynaceae	มะม่วงหาวมะนาวโห่ (<i>Carissa carandas</i>)	ผล	14.86±1.20	13.98±0.38	10.61±3.43
Clusiaceae	ผักคัตวู้ (<i>Cratoxylum formosum</i> (Jacq.) Benth. & Hook.f. ex Dyer)	ทั้งต้น	8.22±0.65	7.37±0.18	7.54±1.06
Cucurbitaceae	มะระขี้นก (<i>Momordica charantia</i> L.)	ผล	9.23±0.39	7.22±0.68	8.19±0.43
Graminae	ตะไคร้ (<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf)	ทั้งต้น	9.54±1.15	8.41±0.68	7.60±0.51

วงศ์	พืช	ส่วนที่ ใช้	ขนาดของโซนยับยั้งแบคทีเรีย (mm±SD)		
			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	MRSA
Labiatae	หูเสือ (<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.)	ใบ	14.83 ±1.07	8.64±2.28	13.82±0.10
Leguminosae	ขี้เหล็ก (<i>Senna siamea</i> (Lam.) H.S.Irwin & Barneby)	ใบ	8.84±0.95	7.94±0.79	9.07±1.10
Leguminosae	ทรงบาดาล (<i>Senna surattensis</i> (Burm.f.) H.S.Irwin & Barneby)	เปลือก ไม้	11.64±0.52	ND	15.00±1.21
Moraceae	หม่อน (<i>Morus alba</i> L.)	ใบ	9.66±2.36	8.11±0.66	ND
Piperaceae	ชะพลู (<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.)	ใบ	8.26±0.85	8.39±0.70	8.61±0.30
Piperaceae	พลู (<i>Piper betle</i> L.)	ใบ	19.71±0.87	15.46±1.34	28.41±0.78
Rubiaceae	ยอ (<i>Morinda citrifolia</i> L.)	ใบ	ND	7.65±0.44	ND
Rutaceae	มะกรูด (<i>Citrus hystrix</i> DC.)	ใบ	7.84±1.28	7.94±0.56	7.05±0.15
Zingiberaceae	ข่า (<i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd.)	เหง้า	26.34±0.95	7.74±0.51	29.46±0.69
Zingiberaceae	ขมิ้น (<i>Curcuma longa</i> L.)	เหง้า	7.88±0.45	ND	ND

ND (not detect); ไม่เกิดโซนยับยั้ง

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชและสูตรผสม

ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดแต่ละชนิด ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากพืชทั้งหมด 16 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ รวมไปถึงแบคทีเรียคือยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ใบหูเสือ เปลือกไม้ทรงบาดาล ใบพลู และเหง้าข่า (ตารางที่ 2) จากการรวบรวมข้อมูลเพื่อเตรียมงานวิจัย ผู้วิจัยได้เลือกพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมาทำการศึกษา ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหลาย ๆ ชนิด เมื่อถูกเตรียมเป็นสูตรผสม ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการเตรียมสูตรผสมทั้งหมด 16 สูตร ตามตารางที่ 1 จากนั้น จึงได้นำสูตรผสมเหล่านี้มาตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี

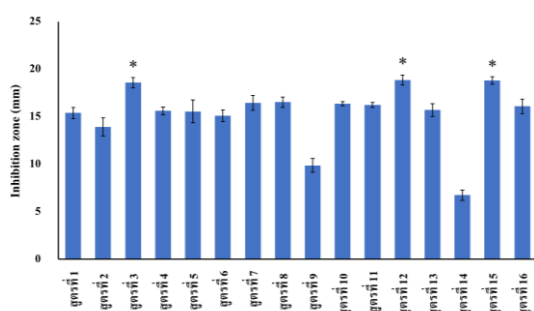
Agar disc diffusion ผลการทดลอง พบว่าสูตรที่ 3 (18.57±0.55 mm) สูตรที่ 12 (18.84±0.53 mm) และสูตรที่ 15 (18.80±0.39 mm) ให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดีกว่าสูตรอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเป็นสูตรผสมที่มีผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ใบพลู และเหง้าข่า เป็นส่วนผสมหลัก (รูปที่ 1)

สำหรับการตรวจฤทธิ์กับแบคทีเรียแกรมลบ พบว่า สูตรผสมทั้งหมด 16 สูตร ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* นอกจากนี้ สูตรผสมที่มีอัตราส่วนของสารสกัดทั้ง 16 ชนิดเท่ากัน ผลการทดลองพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับสูตรอื่น ๆ และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบเช่นกัน

การใช้สารสกัดในลักษณะสูตรผสม อาจต้องพิจารณาถึงการออกฤทธิ์ของสารสกัดแต่ละชนิดเมื่อถูกนำมาผสมรวมกัน ในการทดลองนี้ ได้

แสดงให้เห็นว่า สารสกัดแต่ละชนิดที่ผสมกันในสูตรผสม ออกฤทธิ์แบบหักล้างฤทธิ์ซึ่งกันและกัน ซึ่งแสดงให้เห็นในผลการทดลองกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่สูตรผสมทั้งหมด 16 สูตร ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* เมื่อเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัดเพียงชนิดเดียว ที่สารสกัดแต่ละชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* (ตารางที่ 1) สำหรับการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* สูตรผสมส่วนใหญ่แสดงผลในลักษณะเสริมฤทธิ์ และสูตรผสมบางชนิดให้ฤทธิ์หักล้างฤทธิ์ เช่น สูตรที่ 9 ซึ่งมีสารสกัดทรงบาดาลในอัตราส่วนเท่ากับ 2 กลับให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียน้อยกว่า การใช้สารสกัดทรงบาดาลเพียงชนิดเดียว

จากผลการทดลองข้างต้น ผู้วิจัยได้เลือกสารสกัดจากสูตรผสมที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญมา 3 ชนิด (รูปที่ 1) ได้แก่ สารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ (จากสูตรที่ 3) ใบพลู (จากสูตรที่ 12) และเหง้าข่า (จากสูตรที่ 15) จากนั้นนำสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มาเตรียมเป็นสูตรผสมใหม่ โดยใช้อัตราส่วนผสมที่เท่ากัน จะได้ทั้งหมด 4 สูตร (ตารางที่ 3) และตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion



รูปที่ 1 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดสูตรผสมทั้งหมด 16 สูตร คอกกันตร์ (*) แสดงถึงสูตรผสมที่มีค่าการยับยั้ง

แบคทีเรียได้ดีกว่าสูตรผสมอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการทดลองพบว่า สูตรผสมทั้ง 4 สูตร มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยสูตรที่ 17, 18, 19 และ 20 ให้ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* โดยมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเชื้อเท่ากับ 24.73 ± 0.3 , 25.24 ± 0.61 , 26.00 ± 1.84 และ 12.91 ± 0.82 mm ตามลำดับ และมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 9.14 ± 0.20 , 13.76 ± 2.10 , 10.87 ± 1.00 และ 11.84 ± 1.64 mm ตามลำดับ จากการหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติพบว่าสูตรที่ 17, 18 และ 19 มีผลการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* เท่ากัน ในขณะที่สูตรที่ 18, 19 และ 20 มีผลการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* เท่ากัน

และจากการสังเกตผลการทดลองที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสูตรที่ 18 สารสกัดสูตรผสมยังคงให้ผลการยับยั้งแบคทีเรีย โดยลักษณะรอบ ๆ แผ่นสารสกัดไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (บริเวณรอบแผ่นสารสกัดยังคงใส และขนาดโซนการยับยั้งยังคงเท่าเดิม) ในขณะที่สูตรที่ 17, 19 และ 20 มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเกิดขึ้นบริเวณรอบ ๆ แผ่นสารสกัด และขนาดโซนยับยั้งเล็กลง ผลการทดลองลักษณะนี้ พบทั้งในเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกสูตรผสมที่ 18 ไปทำการทดลองต่อไป เพื่อศึกษาความเข้มข้นน้อยที่สุดการยับยั้ง และฆ่าเซลล์แบคทีเรีย

ตารางที่ 3ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสูตรผสมของสารสกัดจากพืช

สูตรผสม	ขนาดของโซนยับยั้งแบคทีเรีย (mm±SD)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
สูตรที่ 17 (มะม่วงหาวมะนาวโห่:พลู:ข่า)	24.73±0.39 ⁺	9.14±0.20
สูตรที่ 18 (พลู:ข่า)	25.24±0.61 ⁺	13.76±2.10 ⁺
สูตรที่ 19 (มะม่วงหาวมะนาวโห่:ข่า)	26.00±1.84 ⁺	10.87±1.00 ⁺
สูตรที่ 20 (มะม่วงหาวมะนาวโห่:พลู)	12.91±0.82	11.84±1.64 ⁺

⁺ แสดงถึงสูตรผสมที่มีค่าการยับยั้งแบคทีเรียเท่ากับ โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การศึกษาการออกฤทธิ์ของสารต้านแบคทีเรียมากกว่าหนึ่งชนิดที่ผสมกัน มีวิธีการตรวจสอบได้หลากหลายวิธี หนึ่งในนั้นเป็นวิธีที่ทำใน 96 well plate ซึ่งต้องใช้ความชำนาญ และใช้ต้นทุนในการทดลอง ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธี Agar disc diffusion มาประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่ผสมกันมากกว่า 1 ชนิด ด้วยการเตรียมสูตรผสมของสารสกัดชนิดต่าง ๆ (ตารางที่ 2) จากนั้นนำไปทดสอบตามวิธี Agar disc diffusion การแปลผลการทดลอง โดยการนำไปเทียบกับชุดควบคุม หากให้ผลการยับยั้งน้อยกว่าชุดควบคุม แสดงว่า สารสกัดในสูตรผสมออกฤทธิ์ต้านกัน หากให้ค่าเท่ากับ แปลว่าสารสกัดแต่ละชนิดไม่มีผลต่อกัน และหากสูตรผสมให้ค่าการยับยั้งมากกว่า แปลว่า สารสกัดในสูตรผสมต่างเสริมฤทธิ์กัน ในงานวิจัย

นี้ได้แสดงให้เห็นว่า วิธี Agar disc diffusion เป็นอีกวิธีที่สามารถใช้แทนวิธีอื่น ๆ ในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้

3.2 ค่าการยับยั้งแบคทีเรียของสูตรผสมที่ 18 ด้วยวิธี Broth microdilution

ผลการทดลองพบว่า สูตรผสมที่ 18 ซึ่งเป็นสูตรผสมระหว่างสารสกัดจากใบพลู และเหง้าข่า โดยมีอัตราส่วนผสมของสารสกัด 1 ส่วน ต่อ 1 ส่วน ให้ฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเซลล์แบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ รวมไปถึงเชื้อคือยา โดยมีค่า MIC/MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* *E. coli* และ MRSA เท่ากับ 0.62/0.62, 2.5/5.0 และ 0.31/0.31 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ค่า MIC และค่า MBC ของสูตรผสมที่ 18 (พลู:ข่า) ต่อเชื้อแบคทีเรีย

สูตรผสม	ค่า MIC/MBC		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	MRSA
สูตรที่ 18 (mg/ml)	0.62/0.62	2.5/5.0	0.31/0.31
ใบพลู (mg/ml)	1.25/1.25 [†]	2.5/2.5	1.25/1.25 [†]
เหง้าข่า (mg/ml)	5.0/>10.0 [†]	5.0/>10.0	5.0/>10.0 [†]
Enrofloxacin (µg/ml)	0.12/0.25	0.01/0.03	4.0/8.0

[†] จากรายงานของ มณฑล [10]

สูตรผสมที่ 18 ให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบได้ดีกว่าการใช้สารสกัดเพียงชนิดเดียว โดยที่ สารสกัดจากพลูให้ค่า MIC และค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* และ MRSA เท่ากัน โดยมีค่าเท่ากับ 1.25 mg/ml และมีค่า MIC และค่า MBC ต่อเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 2.5 mg/ml สารสกัดจากเหง้าข่าให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus*, *E. coli* และ MRSA เท่ากับ 5.0 mg/ml ในขณะที่มีค่า MBC ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มากกว่า 10 mg/ml [10]

สารสกัดจากใบพลูมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ [11], [12] รวมไปถึงแบคทีเรียคือยา [6] นอกจากนี้สารสกัดจากใบพลูยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา [13] และ โปรโตซัว [14] ในสารสกัดจากใบพลูมีองค์ประกอบของสารเคมี 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ monoterpenes sesquiterpenes และ phenylpropanes และในกลุ่ม phenylpropanes มีสาร Chavicol acetate Eugenol และ Eugenol acetate ซึ่งพบในปริมาณมาก [15] และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย [12]

สารสกัดจากขำนั้นได้มีรายงานที่แสดงให้เห็นว่า มีสารยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ [16], [17] ในสารสกัดจากขำมีสารเคมีที่สำคัญ ได้แก่ 5-hydroxymethyl furfural Benzyl alcohol 1, 8 cineole Methylcinnamate 3-phenyl-2-butanone และ 1, 2 benzenedicarboxylic acid [17] ซึ่งมีรายงานวิจัยว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเช่นกัน

นอกจากนี้ ในงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ สำหรับงานวิจัยอื่น ๆ ได้มีผลการวิจัยที่แสดงว่าสารสกัดจากใบของต้นมะม่วงหาวมะนาวโห่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ เมื่อก่อรูปกับอนุภาคเงิน (silver nanoparticles) [18] นอกจากนี้ สารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ให้ค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 62.5-1,000 µg/ml [19]

อย่างไรก็ตาม ผลการวิจัยนี้ นอกจากแสดงให้เห็นว่าสารสกัดแต่ละชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแล้ว งานวิจัยนี้ยังได้แสดงให้เห็นว่า สูตรผสมจากสารสกัดจากเหง้าข่า ใบพลู และผลมะม่วง

หาวมะนาวโห่ ให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ รวมถึงแบคทีเรียคือยา

4. สรุปผลการวิจัย

การวิจัยนี้ได้มีการตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสูตรผสมของสารสกัด เพื่อคัดเลือกสารสกัดที่สามารถออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์กัน จึงได้ออกแบบวิธีการตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยนำสารสกัดแต่ละชนิดมาผสมกันในอัตราส่วนที่กำหนด จากนั้นศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion และหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากสารสกัดจากพืช 16 ชนิด เมื่อผ่านกระบวนการดังกล่าวแล้ว ทำให้สามารถคัดเลือกสารสกัดที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแบบเสริมฤทธิ์ ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ใบพลู และเหง้าข่า จากนั้นได้มีการเตรียมสูตรผสมที่มีสารสกัดทั้ง 3 ชนิดได้สูตรผสม 4 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 17 (ข่า:พลู:ผลมะม่วงหาวมะนาวโห่) 18 (ข่า:พลู) 19 (ข่า:ผลสดมะม่วงหาวมะนาวโห่) และ 20 (พลู:ผลสดมะม่วงหาวมะนาวโห่) และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่า สูตรที่ 18 สามารถยับยั้งเชื้อได้สมบูรณ์ และมีค่า MIC และ ค่า MBC ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* *E. coli* และ MRSA เท่ากับ 0.62/0.62, 2.5/5.0 และ 0.31/0.31 mg/ml ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สูตรผสมของสารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิดมีศักยภาพที่จะสามารถนำไปใช้เพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* *E. coli* และ MRSA ได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปีงบประมาณ 2561 และขอขอบคุณ ศ.ดร.ศุภยงค์ วรวิศิษฐ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในการวิจัยครั้งนี้ รวมถึงนางสาวคุณัญญา ประทุมมา และนางสาวณัฐสุดา หมนันท์ ที่ให้ความช่วยเหลือ เพื่อให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Misis A. M., Gardner S. E., and Grice E. A. The wound microbiome: modern approaches to examining the role of microorganisms in impaired chronic wound healing. *Advances in Wound Care*. 2014. 3(7) : 502-510.
- [2] Kazimoto T., Abdulla S., Bategereza L., Juma O., Mhimira F., Weisser M., Utzinger J., von Müller L. and Becker S. L. Causative agents and antimicrobial resistance patterns of human skin and soft tissue infections in Bagamoyo, Tanzania. *Acta Tropica*, 2018. 186 : 102-106.
- [3] Zaki M.E.S., Bastawy S. and Montasser K. Molecular study of resistance of *Staphylococcus aureus* to antiseptic quaternary ammonium compounds. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2019. 17 : 94-97.
- [4] Malik T. A., Kamili A. N., Chishti M. Z., Ahad S., Tantry M. A., Hussain P. R. and Johri R. K. Breaking the resistance of *Escherichia coli*: Antimicrobial activity of *Berberis lycium* Royle. *Microbial Pathogenesis*. 2017. 102 : 12-20.
- [5] de Souza Cândido E., de Barros E., Cardoso M. H. and Franco O. L. Bacterial cross-resistance to anti-infective compounds. Is it a real problem?. *Current Opinion in Pharmacology*. 2019. 48 : 76-81.
- [6] Visutthi M. Anti-staphylococcal screening of selected Thai medicinal plants from Nakhon Ratchasima province. *Suranaree Journal of Science and Technology*. 2016. 23(2) : 109-114.
- [7] Visutthi, M. Anti-bacterial and Anti-quorum Sensing Properties of Selected Medicinal Plants from Nakhon Ratchasima Province, Thailand. *Science and Technology RMUTT Journal*. 2016. 6(1) : 1-13.
- [8] Temrangsee P., Kondo S. and Itharat A. Antibacterial activity of extracts from five medicinal plants and their formula against bacteria that cause chronic wound infection. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2011. 94 : 166-171.
- [9] Chokpaisarn J., Yincharoen K., Sanpinit S., Pandian S. T. K., Nandhini J. R., Gowrishankar S., Limsuwan S., Kunworarath N., Voravuthikunchai S.P. and Chusri, S. Effects of a traditional Thai

- polyherbal medicine 'Ya-Samarn-Phlae' as a natural anti-biofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*. 2019. 128 : 354-362.
- [10] มณฑล วิสุทธิ.ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococci* ของพืชท้องถิ่นบางชนิดใน นครราชสีมา. *วารสารวิทยาศาสตร์ มข.* 2560. 45(4) : 805-816.
- [11] Srinivasan R., Santhakumari S. and Ravi A. V. In vitro antibiofilm efficacy of *Piper betle* against quorum sensing mediated biofilm formation of luminescent *Vibrio harveyi*. *Microbial Pathogenesis*. 2017. 110 : 232-239.
- [12] Teanpaisan R., Kawsud P., Pahumunto N., and Puripattananavong J. Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2017. 7(2) : 172-177.
- [13] Basak S., and Guha P. Betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil microemulsion: Characterization and antifungal activity on growth, and apparent lag time of *Aspergillus flavus* in tomato paste. *LWT*. 2017. 75 : 616-623.
- [14] Pecková R., Doležal K., Sak B., Květoňová D., Kváč M., Nurcahyo W. and Foitová I. Effect of *Piper betle* on *Giardia intestinalis* infection *in vivo*. *Experimental Parasitology*. 2018. 184 : 39-45.
- [15] Karak S., Acharya J., Begum S., Mazumdar I., Kundu R. and De B. Essential oil of *Piper betle* L. leaves: Chemical composition, anti-acetylcholinesterase, anti- β -glucuronidase and cytotoxic properties. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2018. 10 : 85-92.
- [16] Rao K., Ch B., Narasu L. M. and Giri A. Antibacterial activity of *Alpinia galanga* (L) Willd crude extracts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010. 162(3) : 871-884.
- [17] Tang X., Xu C., Yagiz Y., Simonne A. and Marshall M. R. Phytochemical profiles, and antimicrobial and antioxidant activities of greater galangal [*Alpinia galanga* (Linn.) Swartz.] flowers. *Food Chemistry*. 2018. 255 : 300-308.
- [18] Singh D., Kumar V., Yadav E., Falls N., Singh M., Komal U. and Verma A. One-pot green synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using aqueous leaves extract of *Carissa carandas*: antioxidant, anticancer and antibacterial activities. *IET Nanobiotechnology*. 2018. 12(6) : 748-756.
- [19] Aman S., Naim A., Siddiqi R. and Naz S. Antimicrobial polyphenols from small tropical fruits, tea and spice oilseeds. *Food Science and Technology International*. 2014. 20(4) : 241-251.