



ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ในเนื้อหมูดิบแช่เย็น
โดยสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบพรวด (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)

In situ anti-Staphylococcus aureus activities of ethanolic leaf extract of
Rhodomyrtus tomentosa (Aiton) Hassk. in raw chilled pork

มณฑล วิสุทธิ^{1*} และ อิงอร เอี่ยมโอยจู²

¹สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา
อำเภอเมืองนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา 30000

²สาขาวิทยาศาสตร์ศึกษา คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา
อำเภอเมืองนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา 30000

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

บทคัดย่อ

สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบพรวดมีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด รวมถึง *Staphylococcus aureus* การวิจัยในครั้งนี้ ได้ศึกษาฤทธิ์ต่าง ๆ ในการต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 29213 รวมถึงฤทธิ์ของสารสกัดเมื่อประยุกต์ใช้ในเนื้อหมูดิบแช่เย็น จากการตรวจสอบด้วยวิธี Time kill assay วิธี Biofilm formation assay การตรวจสอบลักษณะสีของโคโลนี และการทดลองในเนื้อหมูดิบ ผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดระดับ 4MIC (1.24 mg/ml) สามารถลดจำนวนเซลล์แบคทีเรียได้มากกว่า 99.9% ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า หรือเท่ากับค่า MIC สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มและการเกิดเมือกของ *S. aureus* ได้ รวมถึงการลดการสร้างสี Staphyloxanthin ของโคโลนี และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่พื้นผิวเนื้อหมูดิบที่บ่มที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 3 วัน เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และชุดควบคุมที่เติม 10% NaCl การศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยเอทานอล

Received: September 05, 2018

Revised: December 11, 2018

Accepted: December 27, 2018

จากใบพรวดอาจใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีในการยับยั้งแบคทีเรีย และอาจนำไปประยุกต์ในการเก็บรักษาอาหาร และในทางเภสัชกรรม

คำสำคัญ: สารสกัดจากใบพรวด ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ใบโอฟิล์ม เนื้อหมู

Abstract

Ethanol extract of *Rhodomyrtus tomentosa* leaf contained antibacterial activities against many Gram-positive pathogenic bacteria, including *Staphylococcus aureus*. This study investigated antibacterial effects on *S. aureus* using both *n vitro* and *in situ* assays. *In vitro* studies were determined by Time kill, Biofilm formation and colonial morphology detection. *In situ* assay was analyzed an anti-bacterial activity of the extract against *S. aureus* in chilled pork. Time-kill assay shown that the extract at a concentration of 4MIC (1.24 mg/ml) could reduce the number of *S. aureus* cells by 99.9% within 24 h. The ethanolic extract at more than or equal MIC concentration could prevent biofilm formation and inhibited slime and Staphyloxanthin production. In addition, the extract inhibited *S. aureus* growth in raw pork during storage at 10 °C compared to control and 10% salt solution in 3 days of storage. The results of this study revealed that the extract of *R. tomentosa* could be an alternative preservative chemical compound to inhibit bacteria and may be employed in food preservation and pharmaceutical purposes.

Keywords: *Rhodomyrtus tomentosa*, anti-bacterial activity, biofilm, pork

1. บทนำ

การปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์อาหาร นอกจากสารเคมีที่เป็นพิษ หรือวัตถุสังเคราะห์ปลอมแล้ว ยังหมายรวมถึงเชื้อจุลินทรีย์ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย เช่น *Staphylococcus aureus* เป็นต้น ซึ่งเชื่อกันว่าเป็นเชื้อที่ปนเปื้อนมากับอาหาร อาจปนเปื้อนมาจากขั้นตอนการแปรรูป หรือการผลิต [1, 2, 3] *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในอาหาร ส่วนใหญ่จะอยู่บนผิวหน้าของอาหาร หากเชื้อมีการเจริญเติบโต อาจสร้างไบโอฟิล์ม รวมไปถึงสารพิษต่าง ๆ เช่น enterotoxin ที่สามารถก่อให้เกิดความผิดปกติในระบบทางเดินอาหาร [4] นอกจากนี้ *S. aureus* สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์ได้ [5] ดังนั้นจึงมี

การใช้สารเคมี เพื่อควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ซึ่งการใช้สารเคมีอาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมในระยะยาว [6] ในอุตสาหกรรมอาหาร จึงมีการหลีกเลี่ยง หรือลดการใช้สารเคมีลง หรือทดแทนการใช้สารเคมีด้วย การใช้สารสกัดจากธรรมชาติ [7, 8, 9] เช่น สารสกัดจากพืช เป็นต้น

พืชหลายชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งรวมถึง ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย พรวด (*Rhodomyrtus tomentosa*) เป็นไม้พุ่มขนาดกลาง สามารถพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย และเป็นไม้ประจำถิ่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของต้นพรวด โดยเฉพาะสารสกัดจากใบพรวด มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด เช่น *S. aureus*, *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Listeria* sp.

และ *Clostridium* sp. เป็นต้น [10, 11, 12, 13, 14, 15] ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพรวดต่อแบคทีเรีย *S. aureus* ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม และลักษณะสีของโคโลนีของ *S. aureus* เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีสารสกัด รวมถึงการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อในเนื้อหมูสดแช่เย็น

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB, Hi-media) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการถ่ายเชื้อจากอาหาร TSB ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHA, Hi-media) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 4-5 ชั่วโมง และนำมาปรับความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้เท่ากับความขุ่นของสารละลาย McFarland Standard No. 0.5 จะได้ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml และนำไปทดสอบในวิธีต่อไปนี้

2.2 การเตรียมสกัดสารจากใบพรวด

ใบพรวดถูกเก็บจากพื้นที่ในจังหวัดนครราชสีมา นำมาล้างทำความสะอาด แล้วนำมามอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 3-4 วัน บดให้ละเอียด และนำไปแช่ใน 95% เอทานอล นาน 7 วัน จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อแยกกากออกไป นำไประเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator นำสารสกัดที่ได้ใส่ขวด แล้วนำไปชั่งน้ำหนักสาร และคำนวณหาปริมาณเนื้อสารสกัดที่ได้ และละลายสารสกัดด้วย 100% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้

สารสกัดที่มีความเข้มข้น 500 mg/ml เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้น

สารสกัดจากใบพรวดที่เตรียมได้จะถูกนำมาตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นด้วยวิธี Agar disc diffusion และวิเคราะห์ค่าการยับยั้งเชื้อน้อยที่สุดด้วยวิธี Broth microdilution ซึ่งได้อธิบายไว้ในรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ [10]

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเบื้องต้นด้วยวิธี Agar disc diffusion และการตรวจสอบค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ของสารสกัดด้วยวิธี Broth microdilution ในการทดลองนี้ได้ใช้ชุดควบคุม negative control ใช้เป็น DMSO และ positive control ใช้เป็นยาปฏิชีวนะ Vancomycin

2.4 การศึกษาระยะเวลาการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อเซลล์แบคทีเรีย ด้วยวิธี Time kill assay

ระยะเวลาการออกฤทธิ์ของสารสกัด [15] มีวิธีโดยสรุปดังนี้ นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 เจือจางด้วยอาหาร MHB ให้มีปริมาณเซลล์ประมาณ 1.0×10^6 CFU/ml จากนั้นเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบในระดับความเข้มข้นที่มากกว่า 2 เท่าของความเข้มข้นสุดท้าย (ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัด ได้แก่ 1/4MIC, 1/2MIC, MIC, 2MIC และ 4MIC) ตูบสารสกัดแต่ละระดับความเข้มข้นปริมาตร 1.5 ml เติมน้ำลงใน MHB ปริมาตร 1.5 ml ที่ปรับปริมาณเซลล์ในอาหารแล้วข้างต้น จะได้ปริมาตรสุทธิ 3 ml จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ตรวจนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย โดยการนำชุดทดลองทุกระดับความเข้มข้น และชุดควบคุมมาทำการเจือจางด้วย 0.85%

NaCl ให้มีระดับความเจือจางในช่วง 10^0 - 10^{-5} จากนั้น ทำการเกลี่ยบนอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA, Hi-media) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยนับจำนวนโคโลนี และคำนวณจำนวนโคโลนีที่นับได้เป็น Log CFU/ml จากนั้นนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์แบคทีเรีย และเวลา

2.5 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเซลล์แบคทีเรียในหลอดทดลอง

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ได้ดัดแปลงจากวิธีของ Merritt และคณะ [16] โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ เจือจางด้วยอาหาร TSB (เติม 1% น้ำตาลกลูโคส) ให้มีปริมาณเซลล์ประมาณ 1.0×10^6 CFU/ml จากนั้นเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบในระดับความเข้มข้นที่มากกว่า 2 เท่าของความเข้มข้นสุดท้าย (ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดได้แก่ 1/4MIC, 1/2MIC, MIC, 2MIC และ 4MIC) โดยเจือจางสารสกัดด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติม 1% น้ำตาลกลูโคส ปริมาตร 1 ml จากนั้นเติมเชื้อที่ปรับปริมาณเซลล์แล้ว ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดทดลองดังกล่าว จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ต้องการ นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เทอาหารและเซลล์แขวนลอยทิ้ง แล้วล้างด้วย 0.01 M Phosphate buffer saline (PBS) 3 ครั้ง ทำการตรึงเซลล์ที่เกาะอยู่ข้างหลอดด้วย 95% เอทานอล นาน 15 นาที จากนั้นทำการย้อมไบโอฟิล์มด้วย 0.1% Crystal violet นาน 30 นาที แล้วล้างสี ย้อมส่วนเกินออกด้วย PBS 3 ครั้ง ตั้งไว้ให้แห้ง จากนั้นละลายสีที่ย้อมติดไบโอฟิล์มด้วย 95% เอทานอล ปริมาตร 2 ml นาน 5 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ชุดควบคุมใช้

อาหาร TSB ผสม 1% น้ำตาลกลูโคส เป็น Positive control และชุดควบคุมสำหรับ Negative control ซึ่งเป็นอาหาร TSB ผสม 1% น้ำตาลกลูโคส แต่ไม่มีการเติมเชื้อลงในอาหาร คำนวณร้อยละการยับยั้งด้วย (ค่าเฉลี่ย OD₅₉₅ ของหลอดที่มีการผสมสารสกัด / ค่าเฉลี่ย OD₅₉₅ ของหลอดที่ใช้เป็นชุดควบคุม) x 100

2.6 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มด้วยสารสกัดจากใบพรด

แบคทีเรีย *S. aureus* ที่สร้างไบโอฟิล์ม จะมีลักษณะสีของโคโลนีเป็นสีแดง-ดำ ถึงสีดำวาว เมื่อเกลี่ยบนอาหาร Congo Red Agar (CRA, Hi-media) [17] ในการทดลองนี้ ได้มีการเตรียมอาหาร Brain-Heart Infusion Agar (Hi-media) ที่เติม 1% น้ำตาลซูโครส และสี Congo red ปริมาตร 0.8 g/L นำไปผ่านการ Sterilization จากนั้นเติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1/4MIC 1/2MIC MIC และชุดควบคุมที่เติม 0.5% DMSO จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมได้ข้างต้นปริมาตร 10 µl หยดลงบนผิวหน้าอาหารที่เติมสารสกัด และชุดควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง และบันทึกผลการทดลอง สังเกตสีโคโลนี โดยเทียบกับชุดควบคุม

2.7 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการสร้างสีของโคโลนีของ *S. aureus*

ในการทดลองนี้ ได้มีการเตรียมอาหาร TSA ที่เติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1/4MIC 1/2MIC MIC และชุดควบคุมที่เติม 0.5% DMSO จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 ปริมาตร 10 µl หยดลงบนผิวหน้าอาหาร TSA ที่เติมสารสกัด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง และบันทึกผลการทดลอง สังเกตสีโคโลนี โดยเทียบกับชุดควบคุม

2.8 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ เซลล์แบคทีเรียในเนื้อหมูแช่เย็น

ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์แบคทีเรียที่เรียกว่าเนื้อหมูได้ศึกษาตามรายงานวิจัยของ China และคณะ [18] นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ เจือจางด้วย 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 1.0×10^6 CFU/ml จากนั้นเตรียมตัวอย่างเนื้อหมู โดยล้างเนื้อหมูแบบน้ำไหลผ่าน หั่นเนื้อหมูให้ได้ขนาดประมาณ 11 cm x 3.5 cm x 1.5 cm ชิ้นละ 5 g นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้หยดลงบนชิ้นเนื้อหมูชิ้นละ 200 μ l จากนั้นนำเนื้อหมูที่ลงเชื้อแล้ว เก็บใส่ถุงพลาสติก 1 ถุงต่อเนื้อหมู 3 ชิ้น บ่มที่อุณหภูมิ 10 °C นาน 3 ชั่วโมง นำเนื้อหมูจากถุงแต่ละถุงมาเติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 4MIC, 2MIC, และ MIC โดยมีสารละลาย 10% NaCl และ 0.85% NaCl เป็น Positive control และ Negative control ตามลำดับ โดยใช้ปริมาตรสารสกัด 500 μ l ต่อเนื้อหมู 1 ชิ้น บ่มต่อที่อุณหภูมิ 10 °C จากนั้นสับตัวอย่างเนื้อหมูเพื่อตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยนำชิ้นเนื้อหมูออกมาและใส่ลงในถุงใหม่ จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 15 ml ผสมให้เข้ากัน และดูดสารละลายปริมาตร 0.1 ml ใส่ลงบนอาหาร Mannitol salt agar (MSA) แล้วเกลี่ยให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร (ทำทั้งหมด 2 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร MSA

2.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองที่แสดงในรูปแบบกราฟ จะถูกคำนวณทางสถิติแล้ว ด้วยการหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน รวมถึงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธี *t*-test เปรียบเทียบระหว่างชุดทดลอง และชุดควบคุม ค่า

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะวิเคราะห์ที่ $p < 0.05$

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบ

พรวด

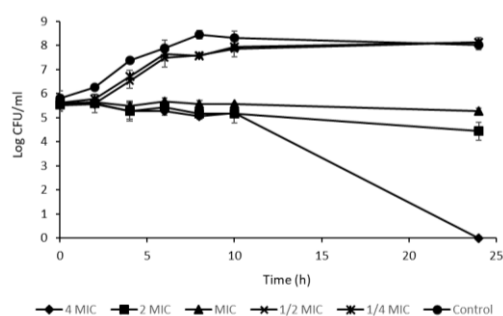
การศึกษาวิจัยนี้เป็นงานต่อเนื่องจากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ โดยได้รายงานฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบพรวด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.31 mg/ml และมีความการฆ่าเซลล์แบคทีเรีน้อยสุด (MBC) เท่ากับ 0.62 mg/ml [10] ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้รายงานฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพรวดที่มีผลกับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ระยะเวลา 0-24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของสารสกัดในระดับ 1/4MIC และ 1/2MIC ไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่ระดับ 1/4MIC และ 1/2MIC ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่เวลาเดียวกันจนถึง 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับ MIC, 2MIC และ 4MIC มีผลต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย และเริ่มแตกต่างจากระดับ 1/4MIC และ 1/2MIC และชุดควบคุมที่เวลา 6, 8 และที่ 24 ชั่วโมง ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้น 4MIC ที่ 24 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์น้อยกว่า 10^2 CFU/ml (รูปที่ 1)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ระดับ MIC และ 2MIC เป็นระดับความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย โดยจำนวนเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง มีปริมาณไม่แตกต่าง (น้อยกว่า 2 log) กับจำนวนเซลล์ที่เวลาเริ่มต้น และที่ความเข้มข้นของสารสกัด ระดับ 4MIC ที่เวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นถึงระดับความเข้มข้นที่สามารถลดจำนวนเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ (มากกว่า 2 log) เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ที่เวลาเริ่มต้น (รูปที่ 1)

จากรายงานก่อนนี้ ที่ระดับ 2MIC แสดงให้เห็นถึงค่า MBC ของสารสกัด ด้วยวิธี Broth microdilution แต่เมื่อศึกษาด้วยวิธี Time Kill ระดับความเข้มข้นที่ 4MIC แสดงให้เห็นว่าเป็นค่า MBC ของสารสกัดต่อเชื้อ *S. aureus* ลักษณะผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นถึงข้อจำกัดของวิธีทดลอง ลักษณะเช่นนี้ปรากฏให้เห็นในรายงานวิจัยต่าง ๆ [19, 20] ซึ่งความเข้มข้นที่แตกต่างกันนี้ไม่ได้ต่างกันมากกว่า 4 เท่า

3.2 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus*

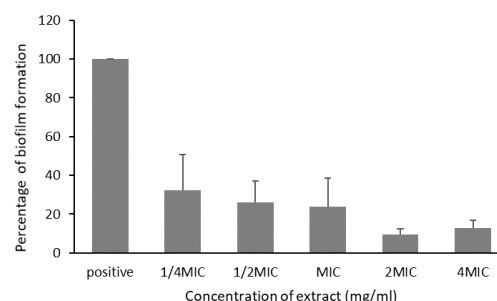
สารสกัดจากใบพรวดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบพรวดที่ระดับ 1/4MIC, 1/2MIC, MIC, 2MIC และ 4MIC สามารถยับยั้งการเกาะติดของเชื้อ *S. aureus* กับวัสดุได้ (รูปที่ 2) ซึ่งการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียเป็นขั้นตอนแรกของการก่อให้เกิดไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย [21]



รูปที่ 1 ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพรวดต่อการลดจำนวนเซลล์ของ *Staphylococcus aureus* ระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 24 ชั่วโมง

การเลี้ยงเชื้อในอาหาร CRA เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการบ่งชี้ลักษณะของเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างไบโอฟิล์ม [17] โดยเชื้อที่เจริญบนอาหาร CRA จะมีสีของโคโลนีเป็นสีแดง-ดำ (รูปที่ 3D) ผล

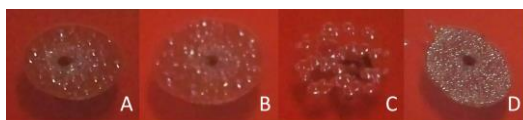
การทดลองในอาหาร CRA ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบพรวด สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ โดยโคโลนีที่เจริญในอาหาร CRA ที่เติมสารสกัดในระดับ 1/4MIC, 1/2MIC และ MIC มีลักษณะสีของโคโลนีเป็นสีแดง (รูปที่ 3A, 3B, 3C) ในขณะที่โคโลนีที่เลี้ยงในอาหาร CRA มีสีของโคโลนีสีแดง-ดำ (รูปที่ 3D) นอกจากนี้ ในงานวิจัยนี้ยังได้แสดงให้เห็นอีกว่า สารสกัดจากใบพรวดที่ระดับความเข้มข้น MIC ทำให้สีของโคโลนีของ *S. aureus* มีสีจางลง (รูปที่ 4C) เมื่อเทียบกับ สีของโคโลนีจากชุดการทดลองที่ระดับ 1/4MIC (รูปที่ 4A), 1/2MIC (รูปที่ 4B) และชุดควบคุม (รูปที่ 4D) ซึ่งสีโคโลนีของแบคทีเรีย *S. aureus* เกิดจากการที่เชื้อสร้างสารสีที่เรียกว่า Staphyloxanthin [22] ทำให้ลักษณะของโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* มีลักษณะเป็นสีเหลืองทองเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป (รูปที่ 4D)



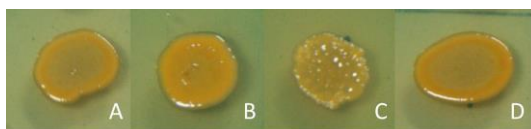
รูปที่ 2 ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพรวดต่อการยับยั้งไบโอฟิล์ม ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1/4MIC, 1/2MIC, MIC, 2MIC และ 4MIC

ฤทธิ์ยับยั้งไบโอฟิล์มของสารสกัดจากใบพรวดสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนนี้ ที่แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากใบพรวดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแกรมบวก [11, 12, 13, 14, 15] การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในเชื้อ *S. aureus* ส่งผลให้แบคทีเรียลดการสร้างเมดิ

Staphyloxanthin [22] และในงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบพรวดมีผลต่อการสร้างสารสี Staphyloxanthin ใน *S. aureus* ได้ ดังนั้น เมื่อสารสกัดจากใบพรวด ทำให้สีของโคโลนีจางลง จึงมีความเป็นไปได้ว่า สารสกัดจากใบพรวดอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารสีภายในโคโลนีของแบคทีเรีย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Leejae และคณะ [23] ที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้จากใบพรวดมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารสี Staphyloxanthin ในเชื้อ *S. aureus*



รูปที่ 3 ลักษณะสีของโคโลนีของ *S. aureus* ที่เจริญในอาหาร CRA (D) และในอาหาร CRA ที่เติมสารสกัดในระดับความเข้มข้น 1/4MIC (A), 1/2MIC (B) และ MIC (C)



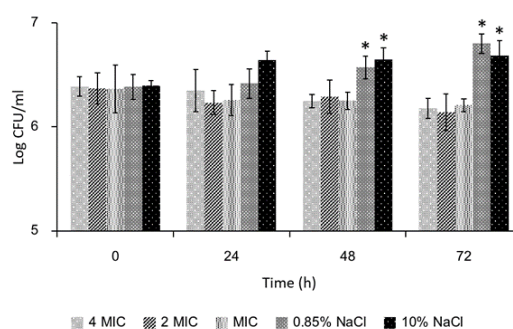
รูปที่ 4 ลักษณะสีของโคโลนีของ *S. aureus* ที่เจริญในอาหาร TSA (D) และในอาหาร TSA ที่เติมสารสกัดในระดับความเข้มข้น 1/4MIC (A), 1/2MIC (B) และ MIC (C)

3.3 ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพรวดต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในเนื้อหมู

การประยุกต์ใช้สารสกัดจากใบพรวดต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรียในเนื้อหมู ผลการทดลองจากการตรวจสอบปริมาณเชื้อในเนื้อหมูที่มีสารสกัดจากใบพรวดที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์แบคทีเรียมีแนวโน้มลดลง อย่างไรก็ตาม ปริมาณเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับ

กับจำนวนเชื้อที่เวลาเริ่มต้น เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับชุดควบคุมที่เติม 10% NaCl และ 0.85% NaCl พบว่าสารสกัดจากใบพรวดที่ระดับความเข้มข้น 4MIC, 2MIC และ MIC สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย *S. aureus* บนผิวเนื้อหมูได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง

จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ ได้รายงานว่ สารสกัดจากใบพรวดไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ [24, 25] และเซลล์สัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวปลา [26] อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ [24, 26] รวมถึงสารสกัดจากใบพรวดสามารถต่อต้านการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ [25] ซึ่งรายงานการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากใบพรวดน่าจะมีความปลอดภัย และอาจจะมีเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้เพื่อควบคุมการเจริญของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร สำหรับทดแทนการใช้สารเคมีที่อาจมีผลข้างเคียงต่อร่างกาย



รูปที่ 5 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ด้วยสารสกัดจากใบพรวด บนผิวเนื้อหมูที่แช่ในอุณหภูมิ 10 °C นาน 72 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ 4MIC 2MIC MIC โดยมี 10% NaCl และเนื้อที่ไม่เติมสารสกัด เป็นชุดควบคุม (ดอกจันทร์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p < 0.05$)

4. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพรวดในหลอดทดลอง (*In vitro*) และในเนื้อหมูดิบแช่เย็น ซึ่งเป็นการทดลองในสภาวะจริง (*In situ*) ทั้งสองการทดลอง ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบพรวดที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ที่ความเข้มข้นระดับ MIC, 2MIC และ 4MIC นอกจากนี้ การทดลองในหลอดทดลองยังได้แสดงให้เห็น ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพรวดต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม และสารสี Staphyloxanthin ในเชื้อ *S. aureus*

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2560 และขอขอบคุณ ศ.ดร.สุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในการวิจัยครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Oniciuc E.A., Nicolau A.I., Hernández M., and Rodríguez-Lázaro D. (2017). Presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the food chain. Trends in Food Science & Technology, 61, 49-59.
- [2] Huang Y.C., Chen C.J., Kuo C.C., and Lu M.C. (2018). Emergence, transmission and phylogeny of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 8 (USA300) in Taiwan. Journal of Hospital Infection, 100(3), 355-358.
- [3] Hawken P., Weese J.S., Friendship R., and Warriner K. (2013). Carriage and dissemination of *Clostridium difficile* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pork processing. Food Control, 31(2), 433-437.
- [4] Argudín, M.Á., Mendoza, M.C., & Rodicio, M.R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins, 2(7), 1751-1773.
- [5] Mulcahy M.E., and McLoughlin R.M. (2016). Host-bacterial crosstalk determines *Staphylococcus aureus* nasal colonization. Trends in Microbiology, 24(11), 872-886.
- [6] Dehghan P., Mohammadi A., Mohammadzadeh-Aghdash H., and Dolatabadi J.E.N. (2018). Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its constituents. Trends in Food Science & Technology, 80, 123-130.
- [7] Hugo C.J., and Hugo A. (2015). Current trends in natural preservatives for fresh sausage products. Trends in Food Science & Technology, 45(1), 12-23.
- [8] Pobiega, K., Kraśniewska, K., & Gniewosz, M. (2018). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality—A review. Trends in Food Science & Technology, 83, 53-62.
- [9] Gutiérrez-del-Río, I., Fernández, J., & Lombó, F. (2018). Plant nutraceuticals as

- antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(3), 309-315.
- [10] Visutthi M. (2016). Anti-Staphylococcal screening of selected Thai medicinal plants from Nakhon Ratchasima province. *Suranaree Journal of Science and Technology*, 23(2), 109-114.
- [11] Odedina G. F., Vongkamjan K., and Voravuthikunchai S. P. (2015). Potential bio-control agent from *Rhodomyrtus tomentosa* against *Listeria monocytogenes*. *Nutrients*, 7(9), 7451-7468.
- [12] Srisuwan S., Mackin K. E., Hocking D., Lyras D., Bennett-Wood V., Voravuthikunchai S. P., and Robins-Browne R. M. (2018). Antibacterial activity of rhodomyltone on *Clostridium difficile* vegetative cells and spores *in vitro*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 52(5), 724-729.
- [13] Limsuwan S., Kayser O., and Voravuthikunchai S. P. (2012). Antibacterial activity of *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. leaf extract against clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, Article ID 697183, 6 pages.
- [14] Saising J., and Voravuthikunchai S. P. (2012). Anti *Propionibacterium acnes* activity of rhodomyltone, an effective compound from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. leaves. *Anaerobe*, 18(4), 400-404.
- [15] Saising J., Ongsakul M., and Voravuthikunchai S. P. (2011). *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. ethanol extract and rhodomyltone: a potential strategy for the treatment of biofilm-forming staphylococci. *Journal of Medical Microbiology*, 60(12), 1793-1800.
- [16] Merritt J. H., Kadouri D. E., and O'Toole G. A. (2011). Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols in Microbiology*, 22(1), 1B-1.
- [17] Freeman D. J., Falkiner F. R., and Keane C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8), 872-874.
- [18] China R., Mukherjee S., Sen S., Bose S., Datta S., Koley H., Ghosh S., and Dhar P. (2012). Antimicrobial activity of *Sesbania grandiflora* flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiological Research*, 167(8), 500-506.
- [19] Flamm R.K., Farrell D.J., Rhomberg P.R., Scangarella-Oman N.E., and Sader H.S. 2017. Gepotidacin (GSK2140944) *in vitro* activity against Gram-positive and Gram-

- negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61: e00468-17.
- [20] Sweeney D., Shinabarger D.L., Arhin F.F., Belley A., Moeck G., and Pillar C.M. (2017). Comparative *in vitro* activity of oritavancin and other agents against methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 87(2), 121-128.
- [21] Götz F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1367-1378.
- [22] Resch A., Rosenstein R., Nerz C., and Götz F. (2005). Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2663-2676.
- [23] Leejae S., Hasap L., and Voravuthikunchai S. P. (2013). Inhibition of staphyloxanthin biosynthesis in *Staphylococcus aureus* by rhodomyrton, a novel antibiotic candidate. *Journal of Medical Microbiology*, 62(3), 421-428.
- [24] Hmoteh J., Musthafa K. S., and Voravuthikunchai S. P. (2018). Effects of *Rhodomyrtus tomentosa* extract on virulence factors of *Candida albicans* and human neutrophil function. *Archives of Oral Biology*, 87, 35-42.
- [25] Srisuwan S., and Voravuthikunchai S. P. (2017). *Rhodomyrtus tomentosa* leaf extract inhibits methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* adhesion, invasion, and intracellular survival in human HaCaT keratinocytes. *Microbial Drug Resistance*, 23(8), 1002-1012.
- [26] Na-Phatthalung P., Teles M., Voravuthikunchai S. P., Tort L., and Fierro-Castro C. (2018). Immune-related gene expression and physiological responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after intraperitoneal administration of *Rhodomyrtus tomentosa* leaf extract: A potent phytoimmunostimulant. *Fish & Shellfish Immunology*, 77, 429-437.