ประสิทธิภาพสูตรผสมของสารสกัดจากทับทิม มะขามป้อม และพุดศุภโชค เพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์เลี้ยง

Antibacterial activity of extracts mixed from *Punica granatum* *Phyllanthus emblica* and *Gardenia jasminoides* for control pathogenic bacteria in pets

สุจิตรา รักกุศล[1] ณัฐริกา เผือดจันทึก[1] มณฑล วิสุทธิ[2]
และพิมพ์ชนก โล่ห์ทองคำ[1*]
Sujittra Rakkusol, Natharika Paerdjantuk, Monton Visutthi[2]
and Pimchanok Lohthongkam[1*]

รับบทความ 3 กันยายน 2562/ ปรับแก้ไข 20 ธันวาคม 2562/ ตอบรับบทความ 22 ธันวาคม 2562
Received: September 3, 2019/ Revised: December 20, 2019/ Accepted: December 22, 2019

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีการนำผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาใช้เพื่อการรักษาโรคในสัตว์อย่างกว้างขวาง งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสูตรผสมสารสกัดจากทับทิม มะขามป้อม และพุดศุภโชค โดยใช้ส่วนเปลือก เนื้อ เมล็ด ใบ และดอก เป็นการเพิ่มมูลค่าของเปลือกและเมล็ดผลไม้ที่เหลือทิ้ง โดยนำตัวอย่างพืชมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ได้สารสกัดเดี่ยว 6 ชนิด และสร้างสูตรผสมสารสกัดขึ้นมา 26 สูตร ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA และ *Escherichia coli* ATCC25922 ด้วยวิธี disc diffusion เพื่อเลือกสูตรผสมสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่ดี มาศึกษาปริมาณความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยับยั้งเชื้อ (MIC) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสูตรผสมสารสกัดที่ 1-13 ไม่มีมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิด แต่สูตรผสมสารสกัดที่ 14-26 มีมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ MRSA แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* นอกจากนี้พบว่าสูตรผสมสารสกัดที่ 16 และ 17 ให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA ที่ดีกว่าสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากค่า MIC พบว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิม เนื้อมะขามป้อม และใบพุดศุภโชค สูตรผสมสารสกัดที่ 18 และ 21 มีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 2.5 mg/ml สูตรผสมสารสกัดที่ 16 และ 17 มีค่า MIC ต่อเชื้อ MRSA เท่ากับ 0.62 และ 0.31 mg/ml ตามลำดับ และทุกสูตรผสมสารสกัดมีค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* มากกว่า 10 mg/ml สามารถนำผลการศึกษาครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้พัฒนาต่อเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในสัตว์ได้

คำสำคัญ : สารสกัด สูตรผสมสารสกัด ทับทิม มะขามป้อม พุดศุภโชค

[1] หลักสูตรเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา 340 ถ.สุรนารายณ์ อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
Veterinary Technology of Program, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University, 340 Suranarai road, Maueng District, Nakhon Ratchasima, 30000
[2] หลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา 340 ถ.สุรนารายณ์ อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
Biology Program, Faculty of Science and Technology, Nakhon Ratchasima Rajabhat University, 340 Suranarai road, Maueng District, Nakhon Ratchasima, 30000
**Corresponding author, e-mail : Pimchanok.l@nrru.ac.th*

Abstract

Nowadays, natural products are widely used for the treatment of animal diseases. The objectives of the study were to examine antibacterial activity of formula extracts mixed from *Punica granatum Phyllanthus emblica* and *Gardenia jasminoides.* using the 95% ethanol extraction from peels fleshes leaves and flowers. The extracts of all 6 types and extracts mixed were subjected to bacterial testing with *Staphylococcus aureus* ATCC25923, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* NRRU001R and *Escherichia coli* ATCC25922. The efficiency of antibacterial activity was tested by disc diffusion method in order to choose the extracts mixture that has an inhibitory activity and determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC). The experiment showed that extracts mixed No. 1-13 did not have an antibacterial activity with all tested bacteria while the extracts mixed No. 14-26 could inhibit the growth of *S. aureus* and MRSA, excepted *E. coli.* Extracts mixed No. 16 and 17 significantly provided a better antibacterial activity than other extracts mixture. MIC value of the pomegranate peels extracts emblica fleshes extracts and Gardenia jasminoide leaves extracts mixed No. 18 and 21 *S. aureus* 2.5 mg/ml, while the MIC values of the extracts mixed No. 16 and 17 on MRSA were 0.62 and 0.31 mg/ml, respectively. However, the MIC value all extracts mixed on *E. coli* was over 10 mg/ml. These results can be applied to develop into products use in animals.

Keywords: Extracts, Mixed Extract, Pomegranate, Emblica, *Gardenia jasminoide*

บทนำ

เชื้อแบคทีเรียเป็นหนึ่งในปัญหาที่สำคัญในปัจจุบันสำหรับการเลี้ยงสัตว์ เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์มีความหลากหลายมากขึ้นและมีแนวโน้มที่ดื้อยาเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการสูญเสียค่าใช้จ่ายจำนวนมาก (อมรรัตน์และคณะ, 2559) เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, และ *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ โดย *S. aureus* เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อที่ผิวหนังและอาหารเป็นพิษ ส่วนเชื้อ *E. coli* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะและก่อโรคอุจจาระร่วง อีกทั้ง *S. aureus* และ *E. coli* ยังเป็นสาเหตุของการเกิดเต้านมอักเสบ (Mastitis) ในโคนมซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในปัจจุบัน (วัชรินทร์ และคณะ, 2559)

ปัจจุบันมีการนำสารสกัดจากจากธรรมชาติมาใช้เพื่อการรักษาโรคเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีความหลากหลายทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ โอกาสที่ทำให้เชื้อโรคดื้อยาและผลข้างเคียงจึงมีน้อยกว่าการใช้ยาเคมีสังเคราะห์ อย่างไรก็ตามทุกส่วนของพืชมีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ไม่ว่าจะใช้เดี่ยวหรือใช้ร่วมกัน ทั้งนี้มีงานวิจัยหลายฉบับที่รายงานถึงคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียจากส่วนต่างๆของพืช เช่น สารสกัดจากเปลือกผลไม้หลายชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น ทับทิม มะละกอ มะม่วง และสัปปะรด (สุคนธ์และคณะ, 2555) สารสกัดจากเปลือกทับทิมมีองค์ประกอบของสาร punicalagin ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้แก่ *S. aureus* และ *P. aerugenosa* (Burapadaja and Bunchoo, 1995) สารสกัดจากผลมะขามป้อมมีฤทธิ์ต่อเชื้อ *Salmonella Typhimurium* ที่แยกได้จากไก่ (พรรณพิชญา และคณะ, 2550) และสารสกัดจากใบพุดศุภโชคมีองค์ประกอบของสาร linalool ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Xiao et al., 2016) ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกพืชที่น่าสนใจ 3 ชนิด ได้แก่ ทับทิม มะขามป้อม และพุดศุภโชค ซึ่งเป็นพืชที่มีอยู่ในทุกพื้นที่ หาได้ง่ายในท้องถิ่น นำมาทำการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์เลี้ยง โดยนำเปลือกทับทิม เมล็ดทับทิม เนื้อมะขามป้อม เมล็ดมะขามป้อม ใบพุดศุภโชค และดอกพุดศุภโชคมาสกัดหยาบด้วยเอทานอล ผสมเป็นสูตรชนิดใหม่ แล้วทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อด้วยวิธี disc diffusion และหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด เป็นการเพิ่มมูลค่าของเปลือกและเมล็ดผลไม้ที่เหลือทิ้งและช่วยลดปริมาณขยะต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม เมล็ดทับทิม เนื้อมะขามป้อม เมล็ดมะขามป้อม ใบพุดศุภโชค และดอกพุดศุภโชค ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้แก่ *S. Aureus* Methicillin-resistant *S. aureus* และ *E. coli* ด้วยวิธี disc diffusion

2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสูตรผสมของสารสกัดจากเปลือกทับทิม เมล็ดทับทิม เนื้อมะขามป้อม เมล็ดมะขามป้อม ใบพุดศุภโชค และดอกพุดศุภโชค ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้แก่ *S.aureus* Methicillin-resistant *S.aureus* และ *E. coli* ด้วยวิธี disc diffusion และ broth microdilution

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดจากพืช

นำส่วนประกอบของพืชจำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ เปลือกทับทิม เมล็ดทับทิม เนื้อมะขามป้อม เมล็ดมะขามป้อม ใบพุดศุภโชคและดอกพุดศุภโชค มาหั่นให้เป็นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 48ºC นาน 48-72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง MF 10 basic Microfine gringer grive เก็บตัวอย่างในภาชนะปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนที่จะนำมาใช้สกัด

2. การเตรียมสารสกัดด้วยตัวทำละลาย

ตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งและบดแล้ว สกัดโดยวิธีหมักในตัวทำละลายเอทานอล 95% โดยใส่ตัวอย่างพืชลงในขวดเก็บสาร (Reagent bottle) แล้วเติมตัวทำละลายเอทานอลเอทานอล 95% ในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 1 ต่อ 2 แช่เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมากรองเอาส่วนของเหลวออกจากกาก เข้าเครื่องระเหยตัวทำละลาย Rotary evaporator นำสารสกัดหยาบไปชั่งน้ำหนัก และคำนวนหาร้อยละของสารสกัดที่ได้ ก่อนเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4ºC เพื่อเตรียมไว้ทำการทดลองต่อไป

การเตรียมสารสกัดเดี่ยวที่ระดับความเข้มข้น 500 mg/ml โดยนำส่วนสารสกัดหยาบมาละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO)

การเตรียมสูตรผสมของสารสกัด โดยใช้สารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 500 mg/ml ทำการสุ่มผสมกันในอัตราส่วน X:1:1, 1:X:1 และ 1:1:X กำหนด 1 ส่วนในปริมาตร 100 µl จะได้สูตรสารสกัดทั้งหมด 26 สูตร ดังตารางที่ 1

3. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด 2-3 โคโลนี ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Muller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 5 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นด้วย sterile sodium chloride 0.85% ให้ได้ความขุ่นเท่ากับสารละลาย McFarland No. 0.5 จะได้ความเข้มข้นของจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.5×10^8 CFU/ml

ตารางที่ 1 แสดงสูตรผสมของสารสกัดพืช

สูตรที่	เมล็ดทับทิม	เมล็ดมะขามป้อม	ดอกพุดศุภโชค
1	1	1	1
2	2	1	1
3	3	1	1
4	4	1	1
5	5	1	1
6	1	2	1
7	1	3	1
8	1	4	1
9	1	5	1
10	1	1	2
11	1	1	3
12	1	1	4
13	1	1	5

สูตรที่	เปลือกทับทิม	เนื้อมะขามป้อม	ใบพุดศุภโชค
14	1	1	1
15	2	1	1
16	3	1	1
17	4	1	1
18	5	1	1
19	1	2	1
20	1	3	1
21	1	4	1
22	1	5	1
23	1	1	2
24	1	1	3
25	1	1	4
26	1	1	5

การเตรียมแผ่นสารสกัด (paper disc) โดยเจาะกระดาษกรอง (Whatman No.1) ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 20 นาที และเตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้น 500 mg/ml โดยละลายด้วย DMSO จากนั้นดูดสารสกัดที่เตรียมได้แล้ว ปริมาตร 10 µl หยดลงกลางแผ่น paper disc จะได้ ปริมาณสารสกัด 2.5 mg/disc ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 24 ชั่วโมง ก่อนใช้ในการทดสอบ จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปลอดเชื้อ จุ่มเชื้อทดสอบที่ เตรียมไว้ข้างต้น นำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Nutrient Agar (NA) จากนั้นใช้ปากคีบปลอดเชื้อ (Sterile forceps) คีบแผ่น paper disc ข้างต้น วางบนอาหาร Nutrient Agar (NA) ที่ swab เชื้อแล้ว โดยให้แผ่น paper disc ห่างกัน 15-20 mm. และห่างจากขอบจานอาหาร 15 mm (ในหนึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อจะวางแผ่น paper disc ทั้งหมด 8 แผ่น) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดลองโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Vernier calipers) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส หรือบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) รอบแผ่น paper disc ทั้งหมด 3 ครั้ง และคำนวนหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุม negative control ใช้เป็น DMSO และ positive control ใช้แผ่นยาปฏิชีวนะสำเร็จรูป Enrofloxacin 5 µg (Oxoid, UK)

4. การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration; MIC)

เตรียมเชื้อแบคทีเรียตามวิธีการข้างต้น และเตรียมสารสกัดแต่ละชนิดให้ได้ความเข้มข้น 40 mg/ml. นำมาเจือจางลงครั้งละ 2 เท่า ด้วยอาหาร Muller Hinton Broth (MHB) ใน 96 well plate เพื่อให้มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดระหว่าง 0.25-20 mg/ml. จากนั้นเติมเชื้อที่ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 1×10^{6} CFU/ml. ลงในแต่ละหลุม ปริมาตร 100 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง การอ่านผลการทดลองค่า MIC ให้สังเกตความขุ่นหรือใสของอาหารที่ไม่มีเชื้อเจริญเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีแต่อาหารกับสารสกัด ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อให้บันทึกผลการทดลองเป็นค่า MIC ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

5. การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration; MBC)

หาค่า MBC ด้วยวิธี drop plate หยดอาหารที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจากการหาค่า MIC ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) โดยใช้ปริมาตร 10 µl แล้วปล่อย

ให้แห้ง จากนั้นนำไปเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลโดยบันทึกค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อหรือไม่มีโคโลนีของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

6. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion ทั้งสารสกัดเดี่ยวและสูตรผสมแบ่งชุดการทดลองโดยวิธี Completely Randomized Design (CRD) แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ One way ANOVA โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' New Multiple Range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P<0.05$)

ผลการวิจัย

จากการนำตัวอย่างพืชทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ทับทิม มะขามป้อมและพุดศุภโชค สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% พบว่าปริมาณของสารสกัดที่ได้มีความแตกต่างกัน โดยสารสกัดจากเนื้อมะขามป้อมให้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด คือให้ปริมาณสารสกัดคิดเป็นร้อยละ 34.23 ของปริมาณพืชที่ใช้ รองลงมาคือสารสกัดจากดอกและใบพุดศุภโชค ซึ่งให้ปริมาณสารสกัดคิดเป็นร้อยละ 23.48 และ 22.92 ตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณสารสกัดจากพืชด้วยตัวทำละลายเอทานอล และร้อยละของสารสกัดที่ได้

พืชที่ใช้สกัด	ส่วนที่ใช้สกัด	ปริมาณที่ใช้สกัด (กรัม)	ปริมาณสารสกัดที่ได้ (กรัม)	ร้อยละสารสกัดที่ได้ (%yield)
ทับทิม	เมล็ด	135	15.53	11.50
	เปลือก	195	35.15	18.03
มะขามป้อม	เมล็ด	30	46.37	1.55
	เนื้อ	170	58.19	34.23
พุดศุภโชค	ดอก	50	11.74	23.48
	ใบ	195	44.69	22.92

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเดี่ยวความเข้มข้น 500 mg/ml (ตารางที่ 3) พบว่าสารสกัดจากเนื้อมะขามป้อม เปลือกทับทิมและใบพุดศุภโชคสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้โดยมีค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้ง (clear zone) เท่ากับ 11.50±0.49 10.50±0.41 และ 7.00±0.16 mm ตามลำดับ สารสกัดจากเปลือกทับทิมและเนื้อมะขามป้อมสามารถยับยั้งเชื้อ MRSA ได้โดยมีค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเท่ากับ 24.67±0.17 และ 19.67±0.40 mm ตามลำดับ แต่สารสกัดทุกชนิดไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเดี่ยวต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion

สารสกัด	Inhibition zone (mean ± SD; mm.)		
	S. aureus	**MRSA**	***E. coli***
เมล็ดทับทิม	NA	NA	NA
เมล็ดมะขามป้อม	NA	NA	NA
ดอกพุดศุภโชค	NA	NA	NA
เปลือกทับทิม	10.50±0.41[a]	24.67±0.17[a]	NA
เนื้อมะขามป้อม	11.50±0.49[a]	19.67±0.40[b]	NA
ใบพุดศุภโชค	7.00±0.16[b]	NA	NA
Enrofloxacin	31.57	19.81	26.14

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง (a,b,c) แสดงความความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P<0.05)

ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ของสารสกัดเดี่ยว (ตารางที่ 4) เมื่อนำสารสกัดเดี่ยวที่ความเข้มข้น 500 mg/ml มาทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* ผลพบว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิม เนื้อมะขามป้อม เมล็ดมะขามป้อม มีค่า MIC เท่ากับ 5 mg/ml สารสกัดจากใบพุดศุภโชคมีค่า MIC เท่ากับ 10 mg/ml สารสกัดจากเมล็ดทับทิมและสารสกัดจากดอกพุดศุภโชคมีค่า MIC มากกว่า 10 mg/ml และค่า MBC ของสารสกัดทุกชนิดสามารถยับยั้งเชื้อได้ไม่แตกต่างกัน โดยสามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ความเข้มข้นมากกว่า 10 mg/ml และเมื่อทดสอบกับเชื้อ MRSA พบว่าสารสกัด

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ของสารสกัดเดี่ยว

สารสกัด	ค่า MIC และ MBC (mg/ml)					
	S. aureus		MRSA		*E.coli*	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
เปลือกทับทิม	5	>10	1.25	5	>10	>10
เมล็ดทับทิม	>10	>10	1.25	5	>10	>10
เนื้อมะขามป้อม	5	>10	>10	>10	>10	>10
เมล็ดมะขามป้อม	5	>10	2.5	2.5	>10	>10
ใบพุดศุภโชค	10	>10	>10	>10	>10	>10
ดอกพุดศุภโชค	>10	>10	>10	>10	>10	>10

จากเปลือกทับทิม และเมล็ดทับทิมมีค่า MIC เท่ากับ 1.25 mg/ml สารสกัดจากเมล็ดมะขามป้อมมีค่า MIC มากกว่า 2.5 mg/ml สารสกัดจากเนื้อมะขามป้อม ใบพุดศุภโชค และดอกพุดศุภโชค มีค่า MIC มากกว่า10 mg/ml

ค่า MBC ของสารสกัดจากเมล็ดทับทิม เปลือกทับทิม และเมล็ดทับทิมสามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 5 mg/ml ตามลำดับ และสารสกัดเดี่ยวทั้ง 6 ชนิดสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ไม่แตกต่างกันโดยมีค่า MIC และ MBC มากกว่า 10 mg/ml

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสูตรผสมสารสกัด (ตารางที่ 5) ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus,* MRSA และ *E. coli* ของสารสกัดจากสูตรผสมที่ 1–13 พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ และสารสกัดจากสูตรผสมที่ 14 - 26 พบว่า ทุก

สูตรมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคผิวหนังได้ 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ MRSA เมื่อพิจารณาอิทธิพลของอัตราส่วนระหว่างเปลือกทับทิม เนื้อมะขามป้อม ใบพุดศุภโชค ที่อัตราส่วนต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ พบว่าอัตราส่วนของความสามารถสกัดผสมอัตราส่วนที่ 1:2:1, 5:1:1, 1:4:1 และ 1:5:1 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเท่ากับ 12.00±0.20 11.50±0.10 11.50±0.17 และ 11.50±0.13 mm ตามลำดับ และอัตราส่วนของสารสกัดผสมอัตราส่วนที่ 3:1:1 และ 4:1:1 สามารถยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเท่ากับ 22.00±0.20 และ 21.50±0.10 mm ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้

สูตรผสมสารสกัดที่ให้ผลดีที่สุดคือ สูตรที่ 16 17 18 19 21 และ 22 ได้ถูกนำมาประเมินฤทธิ์การยับยั้งเชื้อเพื่อหาค่า MIC และ MBC (ตารางที่ 6) เมื่อทำการทดสอบเชื้อ *S. aureus* โดยสูตรที่ 18 และ 21 ให้ค่า MIC เท่ากับ 2.5 mg/ml สูตรที่ 16 17 19 และ 22 ให้ค่า MIC เท่ากับ 5 mg/ml ส่วนค่า MBC ของสูตรผสมทุกสูตรไม่แตกต่างกันโดยมีค่ามากกว่า 10 mg/ml ค่าการยับยั้งของสูตรผสมสารสกัดต่อเชื้อ MRSA พบว่าสูตรที่ 17 และ 16 สามารถยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดมีค่า MIC เท่ากับ 0.62 และ 0.31 mg/ml ตามลำดับ ส่วนค่า MBC ของสูตรผสมสารสกัดไม่แตกต่างกันโดยมีค่ามากกว่า 10 mg/ml และค่าการยับยั้งสูตรผสมสารสกัดต่อเชื้อ *E. coli* ไม่แตกต่างกันโดยมีค่า MIC และ MBC มากกว่า 10 mg/ml

สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชด้วยเอทานอล 95% ต่อพืช 6 ชนิด ทดสอบต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC25923 MRSA NRRU001R และ *E. coli* ATCC25922 จากสารสกัดทั้ง 6 ชนิด พบว่า สารสกัดจากเนื้อมะขามป้อมมีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ พบว่าสารสกัดจากเนื้อมะขามป้อมทำให้มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 11.50±0.49 mm เปลือกทับทิมมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 10.50±0.41 mm และใบพุดศุภโชคมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 7.00±0.16 mm จากสารสกัดทั้ง 6 ชนิด พบว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิมมีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดที่สามารถยับยั้ง MRSAได้โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 24.67±0.17 mm สารสกัดจากเนื้อมะขามป้อม มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 19.67±0.40 mm และไม่มีสารสกัดที่สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ จากคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียจากส่วนต่างๆของพืช เช่น เปลือกทับทิมมีสารที่สำคัญ เช่น สารซาโปรนิน สารโพลีฟินอล และสารแทนนิน ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ต้านจุลชีพและปัจจุบันมีรายงานการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดร่วมกับยาปฏิชีวนะมากมาย เช่น การใช้สารสกัดเมทานอลจากผลทับทิมร่วมกับยาปฏิชีวนะ ciprofloxacin ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง Extended-Spectrum Beta-lactamase (ESBL) ที่ผลิตโดย *Escherichia coli* (Horpiencharoen et al., 2019)

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสูตรผสมสารสกัด พบว่าสูตรผสมสารสกัดที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด คือสูตรที่ 19 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 12.00±0.20 mm สูตรผสมสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ดีที่สุด คือสูตรที่ 16 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 22.00±0.20 mm และไม่มีสูตรสารสกัดที่สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้

ประสิทธิภาพของสูตรผสมสารสกัดต่อเชื้อ *S. aureus* พบว่าสูตรที่ 18 และ 21 ให้ผลการยับยั้งสูงสุด ผลการทดสอบค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 2.5 mg/ml และมากกว่า 10 mg/ml ตามลำดับ ประสิทธิภาพของสูตรผสมสารสกัดต่อเชื้อ MRSA พบว่าสูตรที่ 16 และ 17 ให้ผลการยับยั้งสูงสุด ผลการทดสอบค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ MRSA เท่ากับ 0.62 2.5 mg/ml และ 0.31 2.5 mg/ml ตามลำดับ สูตรที่ 16, 17, 18, 19, 21 และ 22 ต่อเชื้อ *E. coli* เท่ากับ mg/ml ตามลำดับ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการประยุกต์ใช้เปลือกและเมล็ดผลไม้ที่เหลือทิ้งและสามารถพัฒนาต่อเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในสัตว์ จากผลการศึกษาแนะนำใช้สูตรที่ 18 และ 21 เนื่องจากให้ผลดีที่สุดต่อเชื้อ *S. aureus* และสูตรที่ 16 และ 17 ให้ผลดีที่สุดต่อเชื้อ MRSA

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสูตรผสมสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion

สูตรผสมสารสกัด	อัตราส่วนสูตร	Inhibition zone (mean ± SD; mm.)		
		S. aureus	**MRSA**	***E. coli***
1	1:1:1	NA	NA	NA
2	2:1:1	NA	NA	NA
3	3:1:1	NA	NA	NA
4	4:1:1	NA	NA	NA
5	5:1:1	NA	NA	NA
6	1:2:1	NA	NA	NA
7	1:3:1	NA	NA	NA
8	1:4:1	NA	NA	NA
9	1:5:1	NA	NA	NA
10	1:1:2	NA	NA	NA
11	1:1:3	NA	NA	NA
12	1:1:4	NA	NA	NA
13	1:1:5	NA	NA	NA
14	1:1:1	11.00 ± 0.53^{ab}	20.00 ± 0.20^{ab}	NA
15	2:1:1	10.00 ± 0.20^{ab}	20.67 ± 0.02^{ab}	NA
16	3:1:1	10.50 ± 0.10^{ab}	22.00 ± 0.20^{a}	NA
17	4:1:1	10.00 ± 0.26^{ab}	21.50 ± 0.10^{a}	NA
18	5:1:1	11.50 ± 0.10^{a}	20.67 ± 0.31^{ab}	NA
19	1:2:1	12.00 ± 0.20^{a}	17.83 ± 0.10^{abc}	NA
20	1:3:1	10.00 ± 0.17^{ab}	18.67 ± 0.15^{abc}	NA
21	1:4:1	11.50 ± 0.17^{a}	20.00 ± 0.00^{ab}	NA
22	1:5:1	11.50 ± 0.13^{a}	18.67 ± 0.31^{abc}	NA
23	1:1:2	11.50 ± 0.00^{ab}	16.67 ± 0.32^{bc}	NA
24	1:1:3	11.00 ± 0.20^{ab}	19.50 ± 0.26^{abc}	NA
25	1:1:4	10.5 ± 0.00^{ab}	18.33 ± 0.19^{abc}	NA
26	1:1:5	8.5 ± 0.10^{b}	15.33 ± 0.08^{c}	NA
Enrofloxacin		31.57	19.81	26.14

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง (a,b,c) แสดงความความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ของสูตรผสมสารสกัด

สูตรผสมสารสกัด	ค่า MIC และ MBC (mg/ml)					
	S. aureus		MRSA		*E. coli*	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
สูตรที่ 16	5	>10	0.62	2.5	>10	>10
สูตรที่ 17	5	>10	0.31	2.5	>10	>10
สูตรที่ 18	2.5	>10	2.5	>10	>10	>10
สูตรที่ 19	5	>10	5	>10	>10	>10
สูตรที่ 21	2.5	>10	2.5	>10	>10	>10
สูตรที่ 22	5	>10	5	>10	>10	>10

เอกสารอ้างอิง

พรรณพิชญา ฟุ้งวิทยา ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย ชาญณรงค์ รอดคำ และอุบลทิพย์ นิมมานนิตย์. (2550). ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากผลมะขามป้อมต่อเชื้อซัลโมเนลลา ไทฟิมูเรียมที่แยกได้จากไก่. *ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 33*.

วันทนี สว่างอารมณ์ และพาฝัน จันทร์เล็ก. (2555). การเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*. *วารสารก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์*. *12(2)*, น. 47-57.

สุคนธ์ ตันติไพบูลย์, วุฒิเทียนชัย น่วมเศรษฐี, เพชรลดา เดชายืนยง (2012). ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจาก เปลือกไม้บางชนิด. *KKU Res J*, *17*, น. 880-94.

Burapadaja, S. & Bunchoo, A. (1995). Antimicrobial activity of tannins from Terminalia citrine. *Planta Medica*, *61*, pp. 365.

Dhale, D. A & Mogle. U. P. (2011). Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of *Phyllanthus emblica* (L.). *Science Research Reporter*, *1(3)*, pp. 138-142.

Debnath, T., Park, P.J., Nath, N.C.D., Samad, N.B., Park, H.W. & Lim. B.O. (2010). Antioxidant activity of *Gardenia jasminoides* Ellis fruit extracts *Food Chem*, *128*, pp. 697-703.

Dhale D.A., (2012). Pharmacognistic evaluation of *Phyllanthus emblica* Linn Euphorbiaceae). International *Journal of Pharma and Biosciences*, 3(3), 210- 217.

Horpiencharoen, W., Thongratsakul, S. & Poolkhet. C. (2019). Risk factors of clinical mastitis and antimicrobial susceptibility test results of mastitis milk from dairy cattle in western Thailand: Bayesian network analysis. *Prev Vet Med*, *164*, 49-55.

Lee, J.H., Lee, D.U. & Jeong, C.S. (2009). *Gardenia jasminoides Ellis* ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastric and reverse gastric lesions in rats. Food and *Chemical Toxicology*, *47*, 1127-31.

Nuamsetti, T., Dechayuenyong, P. & Tantipaibulvut S. (2012). Antibacterial acivity of pomegranate fruit peels and arils. *Science Asia*. *38*, 319-22.

Raghu, H.S. & Ravindra, P. (2010). Antimocrobial activity and phytochemical study of *Phyllanthus emblica* Linn. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, *1*, 30–33.

Xiao, W., Li, S., Wang, S. & Ho, C.T. (2016). Chemistry and bioactivity of *Gardenia jasminoides. Journal of Food and Drug Analysis*. *25(1)*, pp. 1-19