



ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกลุ่ม Staphylococci ของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นบางชนิดในจังหวัดนครราชสีมา

Antagonistic Effect of Staphylococci of Extracts From Some Local Plants in Nakorn-Ratchasima Province

มณฑล วิสุทธิ

โปรแกรมชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

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

บทคัดย่อ

แบคทีเรียก่อโรคกลุ่ม staphylococci เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปตามผิวหนังและเยื่อของมนุษย์และสัตว์ อีกทั้งยังสามารถปรับตัวให้ทนต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาได้ดี ดังนั้นการค้นหายาต้านเชื้อจากพืช เพื่อควบคุมเชื้อกลุ่มนี้จึงมีความจำเป็น ในการวิจัยนี้ได้มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอธานอลจากส่วนต่างๆ ของพืชท้องถิ่นที่พบในจังหวัดนครราชสีมาจำนวนทั้งหมด 58 ตัวอย่าง จากพืช 47 ชนิด ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ด้วยวิธี agar disc diffusion และ broth microdilution การตรวจสอบเบื้องต้นพบว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งหมด 16 ชนิด โดยผักแขยง และผลกรวยป่าให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสมากกว่าสารสกัดชนิดอื่น และเมื่อหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (ค่า Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) พบว่าค่า MIC/MBC ของสารสกัดจากเหง้ากระชาย ผลกรวยป่า และใบพรวด มีค่าเท่ากับ 0.156/0.156 mg/ml 0.625/0.625 mg/ml และ 0.312/0.625 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งจะให้ค่า MIC ที่ดีกว่าสารสกัดชนิดอื่น จึงสามารถจัดอยู่ในกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งดี (มีค่า MIC < 1 mg/ml) ส่วนกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลาง (มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 1-2.5 mg/ml) มีทั้งหมด 20 ชนิด และกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งอ่อน (มีค่า MIC > 2.5 mg/ml) มี 35 ชนิด งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่านอกจาก กระชาย และพรวด กรวยป่าน่าจะเป็นพืชที่มีศักยภาพ สำหรับการศึกษาวิจัยในเชิงลึก เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อไป

ABSTRACT

A group of staphylococci is commensal of the skin and mucosal surfaces in human and animals. Moreover, members of this group are remarkable in their ability to resist to antibiotics. Therefore, it is necessary to search for antibacterial substances from plants as an alternative drug to control resistant bacteria. The present study aimed to investigate the anti-staphylococcal activity of 58 ethanolic plant extracts from 47 plants species using an agar disc diffusion method for preliminary screening and a broth microdilution to determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values. Among 59 extracts tested, only 16 extracts gave antibacterial activity such as extracts from *Limnophila aromatica* and fruit of *Casearia grewiifolia* possessed an inhibitory zone more than the others. For the results of MIC/MBC values, three extracts from the rhizome of *Boesenbergia rotunda*, fruit of *C. grewiifolia* and leaves of *Rhodomyrtus tomentosa* were 0.156/0.156, 0.625/0.625 and 0.312/0.625 mg/ml respectively. Therefore, three of these herbs were classified for a good antibacterial activity with MIC value less than 1 mg /ml. There were 20 plant extracts for the moderate activity ($1 < \text{MIC values} \leq 2.5$ mg/ml) along with 35 extracts presented the weak activity ($\text{MIC} > 2.5$ mg/ml). The present work indicates that *B. rotunda*, *R. tomentosa*, and *C. grewiifolia* may be the potential plant for further advance research on antibacterial activity.

คำสำคัญ: *Staphylococcus aureus* การต้านแบคทีเรีย พืชท้องถิ่น นครราชสีมา

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Antibacterial activity, Local plant, Nakorn-Ratchasima

บทนำ

แบคทีเรียกลุ่ม staphylococci เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบได้ทั่วไปตามผิวหนัง และเยื่อหุ้มบุผิวตามส่วนต่างๆ ของร่างกายของมนุษย์ และสัตว์ นอกจากนี้เป็นเชื้อประจำถิ่นในร่างกายแล้ว เชื้อแบคทีเรียบางชนิดในกลุ่มนี้เป็นเชื้อก่อโรคที่สามารถก่อโรคได้ทั้งในมนุษย์ และสัตว์ (Gordon and Lowy, 2008; Weese, 2010) เชื้อในกลุ่มนี้ยังแยกได้อีกสองกลุ่มย่อย คือ coagulase-positive staphylococci (CPS) และ coagulase-negative staphylococci (CNS)

กลุ่ม CPS เป็นกลุ่มของแบคทีเรียก่อโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ตัวอย่างเช่น *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) สามารถก่อให้เกิดโรคได้หลายโรค เช่น ฝีหนอง ตาอักเสบ เต้านมอักเสบ ไช้กระดูกอักเสบการติดเชื้อที่บาดแผล ลำไส้อักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ปอดอักเสบ รวมทั้งโรคอาหารเป็นพิษด้วย (Gordon and Lowy, 2008) นอกจากนี้ ยังพบอีกว่า เชื้อในกลุ่ม staphylococci สามารถพัฒนาเซลล์ให้ทนต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. aureus* มีการวิวัฒนาการของสายพันธุ์ทำให้มีคุณสมบัติในการต้านยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด และมีการดื้อยาเพิ่มมากขึ้น โดยสายพันธุ์ที่สำคัญ ได้แก่

methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) ซึ่งทำให้เกิดอาการติดเชื้อรุนแรงรักษาได้ยาก (Gordon and Lowy, 2008; Uhlemann et al., 2014) และจากรายงานการวิจัยในปี 2016 ได้รายงานว่า มีการตรวจพบยีนดื้อยาปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นยาทางเลือกชนิดสุดท้ายที่ใช้รักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียดื้อยา (McGann et al., 2016) นั้นแสดงให้เห็นว่า ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเริ่มเข้าสู่ขั้นวิกฤตแล้ว

พืชเป็นแหล่งสำคัญที่มีการตรวจหาสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยการอ้างอิงจากตำรายาสมุนไพรท้องถิ่นของแต่ละประเทศ นักวิทยาศาสตร์ได้มีการค้นหา และพัฒนาสารออกฤทธิ์หลายชนิดจากพืชสมุนไพร เช่น Berberine, Epicatechin, Ellagitannin และ Eugenol เป็นต้น (Cowan, 1999) นอกจากพืชสมุนไพรแล้ว พืชท้องถิ่นในแต่ละประเทศได้มีการศึกษาเช่นกัน และโดยเฉพาะในประเทศไทย มีความหลากหลายของพืชสูง มีพืชหลายชนิดที่ยังไม่มีการศึกษา และมีหลายชนิดมีการศึกษาแล้ว แต่ยังไม่มีการศึกษาในเชิงลึก รวมไปถึงการประยุกต์ใช้จริง งานวิจัยนี้ได้นำพืชที่เคยมีการสำรวจพบในจังหวัดนครราชสีมาทั้งหมด 47 ชนิด มาสกัดสารสำคัญด้วยเอทานอล แล้วทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ด้วยวิธี disc diffusion และ broth microdilution

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. ศุภยาศร์ วรวุฒิกุลชัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัด

2. การเตรียมพืช และการสกัดสารจากพืช

พืชท้องถิ่นจากแต่ละพื้นที่ในจังหวัดนครราชสีมาจำนวน 47 ชนิด ถูกเก็บรวบรวมและคัดแยกส่วนต่างๆ ของพืชเพื่อนำมาสกัดได้ทั้งหมด 58 ส่วน (ดังแสดงในตารางที่ 1) นำมาล้างให้สะอาด และผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อน เป็นเวลา 3-4 วัน หรือจนกว่าจะแห้ง แล้วนำมาบดให้ละเอียด และบรรจุใส่ลงในขวดโหล แห้ด้วย 95% เอทานอลในอัตราส่วนสมุนไพรแห้ง ต่อเอทานอลเท่ากับ 1 ต่อ 3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน กรองผ่านผ้าขาวบาง นำของเหลวใส่ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายเหนียวขึ้น นำสารสกัดหยาบไปชั่งน้ำหนัก และคำนวณหาร้อยละของสารสกัดที่ได้ (ร้อยละของสารสกัด = (น้ำหนักของสารสกัด/น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง)×100) ก่อนเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเตรียมไว้ทำการทดลองต่อไป

3. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเบื้องต้นด้วยวิธี disc diffusion

ตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเบื้องต้นด้วยวิธี disc diffusion (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009) เชื้อเชื้อ *S. aureus* จากงานอาหารเลี้ยงเชื้อมา 1 โคลนี ใส่ลงในอาหาร Mueller-Hinton broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นด้วย sterile sodium chloride 0.85% ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับสารละลาย McFarland No. 0.5 จะได้ความเข้มข้นของจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.5×10^8 CFU/ml

การเตรียมแผ่น paper disc โดยเจาะกระดาษกรอง Whatman No.1 ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และเตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้น 250 mg/ml โดยละลายด้วย Dimethyl

sulfoxide (DMSO) จากนั้นดูดสารสกัดที่เตรียมได้แล้ว ปริมาตร 10 µl หยดลงกลางแผ่น paper disc จะได้ ปริมาณสารสกัด 2.5 mg/disc ทั้งไว้ให้แห้งประมาณ 24 ชั่วโมง ก่อนใช้ในการทดสอบ

ใช้ไม้พันสำลีที่ปลอดเชื้อ จุ่มเชื้อทดสอบที่ เตรียมไว้ข้างต้น นำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำอาหาร MHA จากนั้นใช้ปากคีบปลอดเชื้อ (Sterile forceps) คีบ paper disc ข้างต้น วางบนอาหาร MHA ที่ swab เชื้อ แล้ว โดยให้แผ่น paper disc ห่างกัน 15-20 mm และ ห่างจากขอบจานอาหาร 15 mm (ในหนึ่งจานอาหาร

เลี้ยงเชื้อจะวางแผ่น paper disc ทั้งหมด 6 แผ่น) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดลองโดยใช้เวอร์เนีย คาลิเปอร์ (Vernier calipers) วัดเส้นผ่านศูนย์กลาง ของวงใส หรือบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) รอบ แผ่น paper disc ทั้งหมด 3 ครั้ง และคำนวณหาส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุม negative control ใช้เป็น DMSO และ positive control ใช้เป็น ยาปฏิชีวนะ Vancomycin (30 µg/disc)

ตารางที่ 1 ชนิดของพืช และส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาเตรียมสารสกัด และร้อยละของสารสกัดที่สกัดได้

Plant species (ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อไทย)	Plant part used	% yield
<i>Abutilon indicum</i> (L.) Sweet (ครอบฟันลี)	leaf	1.33
	fruit	2.61
<i>Aegle marmelos</i> (L.) Correa ex Roxb. (มะตูม)	fruit	7.81
<i>Alpinia galanga</i> Sw. (ข่า)	rhizome	7.10
<i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f.) Wall ex Nees. (ฟ้าทะลายโจร)	whole plant	29.79
<i>Artocarpus lakoocha</i> Roxb. (มะหาด)	leaf	2.23
<i>Asparagus racemosus</i> Willd. (รากสามสิบ)	leaf	2.91
	root	1.63
	root bark	3.59
<i>Averrhoa carambola</i> Linn. (มะเฟือง)	leaf	3.79
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss (สะเดา)	leaf	4.05
<i>Bauhinia purpurea</i> L. (ชงโค)	leaf	5.74
<i>Boesenbergia rotunda</i> (Roxb.) Schltr. (กระชาย)	rhizome	5.70
<i>Cardiospermum halicacabum</i> Linn. (โคกกระออม)	leaf	6.65
	fruit	38.60
<i>Cerbera odollam</i> Gaertn. (ตีนเป็ดน้ำ)	flower	13.64
<i>Careya arborea</i> Roxb (กระโดน)	leaf	6.81
<i>Casearia grewifolia</i> Vent. (กรวยป่า)	leaf	5.95
	bark	1.62
	fruit	9.77

ตารางที่ 1 ชนิดของพืช และส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาเตรียมสารสกัด และร้อยละของสารสกัดที่สกัดได้ (ต่อ)

Plant species (ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อไทย)	Plant part used	% yield
<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban. (บัวบก)	whole plant	16.55
<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M.King & H. Rob. (สาบเสือ)	leaf	5.50
<i>Cleome gynandra</i> L. (ผักเสี้ยน)	leaf	6.96
<i>Crateva adansonii</i> DC. subsp. <i>trifoliata</i> (Roxb.) Jacobs (กุ่มบก)	leaf	2.98
<i>Diospyros rhodocalyx</i> Kurz. (ตะโกนา)	leaf	1.94
<i>Dolichandrone serrulata</i> (DC.) Seem. (แคนา)	leaf	8.57
<i>Feronia limonia</i> (L.) Swing (มะขวิด)	leaf	8.34
<i>Limnophila aromatica</i> (Lam.) Merr (ผักแขยง)	whole plant	6.41
<i>Maerua siamensis</i> (Kurz.) Pax (แจง)	leaf	4.85
<i>Melastoma malabathricum</i> Linn (โคลงเคลง)	leaf	7.88
<i>Metha cordifolia</i> Opiz. (สระแห่น)	leaf	4.35
<i>Millingtonia hortensis</i> Linn. (ปีบ)	leaf	12.84
<i>Momordica cochinchinensis</i> (Lour.) Spreng. (ฟักข้าว)	leaf	0.72
<i>Moringa oleifera</i> Lam. (มะรุม)	leaf	6.11
<i>Oroxylum indicum</i> (L.) Kurz. (เพกา)	leaf	3.15
<i>Passiflora foetida</i> Linn. (กะทกรก)	leaf	4.28
<i>Peltophorum pterocarpum</i> (DC.) Backer ex K.Heyne (นนทรี)	leaf	4.51
	bark	2.94
	fruit	5.96
<i>Persicaria odorata</i> Lour. (ผักแพว)	whole plant	2.07
<i>Phyllanthus acidus</i> (L.) Skeels (มะขยม)	leaf	5.71
<i>Piper betle</i> Linn. (พลู)	leaf	8.19
<i>Rhodomyrtus tomentosa</i> (Aiton) Hassk. (พรวด)	leaf	6.88
<i>Ricinus communis</i> Linn. (ละหุ่ง)	leaf	1.52
<i>Schleichera oleosa</i> (Lour.) Oken. (ตะคร้อ)	leaf	3.39
	seed	1.21
	peel	1.30
	bark	0.46
<i>Sesbania grandiflora</i> (L.) Poiret (แคบ้าน)	leaf	1.52
<i>Streblus asper</i> Lour. (ข่อย)	leaf	3.39
	fruit	1.21
<i>Syzygium cumini</i> Linn. (หว้า)	leaf	1.30
<i>Tamarindus indica</i> L. (มะขาม)	bark	0.46
<i>Thunbergia laurifolia</i> Lindl. (รางจืด)	leaf	4.38
<i>Tiliacora triandra</i> (Colebr.) Diels (ย่านาง)	leaf	0.39

ตารางที่ 1 ชนิดของพืช และส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาเตรียมสารสกัด และร้อยละของสารสกัดที่สกัดได้ (ต่อ)

Plant species (ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อไทย)	Plant part used	% yield
<i>Xanthostemon chrysanthus</i> (F.Muell.) Benth. (รักแรงพอบ)	leaf	7.08
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe. (ขิง)	rhizome	6.30
<i>Ziziphus mauritiana</i> Lam. (พุทรา)	leaf	11.20
<i>Zizyphus oenoplia</i> (L.) Mill. (เล็บเหยี่ยว)	leaf	0.47

4. การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration; MIC)

หาค่า MIC โดยวิธี microdilution method (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009) เตรียมเชื้อแบคทีเรียตามวิธีการข้างต้น และเตรียมสารสกัดแต่ละชนิดให้ได้ความเข้มข้น 40 mg/ml นำมาเจือจางลงครึ่งละ 2 เท่า ด้วยอาหาร MHB ใน 96 well plate จะมีค่าความเข้มข้นสารสกัดระหว่าง 0.25-20 mg/ml จากนั้นเติมเชื้อที่ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 1×10^6 CFU/ml ลงในแต่ละหลุมปริมาตร 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง การอ่านผลการทดลองค่า MIC ให้สังเกตความขุ่นหรือใสของอาหารที่ไม่มีเชื้อเจริญเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีแต่อาหารกับสารสกัด ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อให้บันทึกผลการทดลองเป็นค่า MIC ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (โดยเลือกค่า MIC ที่เหมือนกันอย่างน้อย 2 ซ้ำ) ใช้ยาปฏิชีวนะ Vancomycin เป็น positive control การเตรียมยา Vancomycin เตรียมที่ความเข้มข้น 32 μ g/ml เจือจางลงครึ่งละ 2 เท่า และเติมเชื้อลงไป ความเข้มข้นสุดท้ายของยาจะมีค่าความเข้มข้นระหว่าง 0.125-8 μ g/ml

5. การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration; MBC)

หาค่า MBC โดยใช้วิธี drop plate (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009) หยดอาหารที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจากการหาค่า MIC ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) โดยใช้ปริมาตร 10 μ l แล้วปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำไปเข้าตูบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดลองค่า MBC โดยบันทึกค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ คือไม่มีโคโลนีของเชื้อของอาหาร NA ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เพื่อยืนยันผลการทดลอง

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดทั้งหมด 58 ชนิด ด้วยวิธี disc diffusion (แสดงในตารางที่ 2) จากพืชท้องถิ่นที่พบในจังหวัดนครราชสีมา พบว่าสารสกัด 16 ชนิด ให้ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* โดยผักแขยง และผลกรวยป่า ให้เส้นผ่านศูนย์กลางของวงการยับยั้งเชื้อมากกว่าสารสกัดชนิดอื่นๆ ส่วนที่เหลืออีก 42 ชนิด ไม่ให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ

อย่างไรก็ตาม สารสกัดทั้งหมด 58 สารสกัด กระจาย (0.16/0.16 mg/ml) ผลกรวยป่า (0.62/0.62 mg/ml) และใบพรวด (0.31/0.62 mg/ml) ให้ค่า MIC broths microdilution เพื่อตรวจหาค่า MIC และค่า ที่ต่ำกว่าสารสกัดชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการทดลองแสดงใน MBC ในสารสกัดทั้งหมด พบว่า สารสกัดจากเหง้า ตารางที่ 2

ตารางที่ 2ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ในสารสกัดจากพืชที่พบในจังหวัด นครราชสีมา

Plant species (ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อไทย)	Plant part used	Inhibition zone (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Abutilon indicum</i> (ครอบฟันลี)	leaf	-	10.00	>10.00
	fruit	-	10.00	>10.00
<i>Aegle marmelos</i> (มะตูม)	fruit	-	10.00	>10.00
<i>Alpinia galanga</i> (ข่า)	rhizome	7.33 ± 0.58	5.00	>10.00
<i>Andrographis paniculata</i> (ฟ้าทะลายโจร)	whole plant	-	2.50	>10.00
<i>Artocarpus lakoocha</i> (มะหาด)	leaf	8.12 ± 0.37	10.00	>10.00
<i>Asparagus racemosus</i> (รากสามสิบ)	leaf	-	1.25	>10.00
	root	-	>10.00	>10.00
	root bark	6.30 ± 0.36	10.00	>10.00
<i>Averrhoa carambola</i> (มะเฟือง)	leaf	-	1.25	>10.00
<i>Azadirachta indica</i> (สะเดา)	leaf	-	5.00	>10.00
<i>Bauhinia purpurea</i> (ชงโค)	leaf	-	5.00	5.00
<i>Boesenbergia rotunda</i> (กระชาย)	rhizome	8.00 ± 0.00	0.16	0.16
<i>Cardiospermum halicacabum</i> (โคกกระออม)	leaf	-	>10.00	>10.00
	fruit	-	10.00	>10.00
<i>Cerbera odollam</i> (ตีนเป็ดน้ำ)	flower	-	5.00	10.00
<i>Careya arborea</i> (กระโดน)	leaf	-	5.00	10.00
<i>Casearia grewiaifolia</i> (กรวยป่า)	leaf	-	5.00	>10.00
	bark	6.95 ± 0.39	2.50	10.00
	fruit	12.97 ± 0.91	0.62	0.62
<i>Centella asiatica</i> (บัวบก)	whole plant	-	10.00	>10.00
<i>Chromolaena odorata</i> (สาบเสือ)	leaf	9.12 ± 1.14	5.00	>10.00
<i>Cleome gynandra</i> (ผักเสี้ยน)	leaf	-	2.50	10.00
<i>Crateva adansonii</i> (กุ่มบก)	leaf	-	2.50	>10.00
<i>Diospyros rhodocalyx</i> (ตะโกนา)	leaf	-	2.50	>10.00

หมายเหตุ: - หมายถึง ไม่เกิดบริเวณใส (no inhibition zone)

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ในสารสกัดจากพืชที่พบในจังหวัดนครราชสีมา (ต่อ)

Plant species (ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อไทย)	Plant part used	Inhibition zone (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Dolichandrone serrulata</i> (แคนนา)	leaf	-	2.50	10.00
<i>Feronia limonia</i> (มะขวิด)	leaf	-	2.50	>10.00
<i>Limnophila aromatica</i> (ผักแขยง)	whole plant	13.00 ± 0.50	2.50	5.00
<i>Maerua siamensis</i> (แจง)	leaf	-	5.00	>10.00
<i>Melastoma malabathricum</i> (โคลงเคลง)	leaf	-	2.50	5.00
<i>Metha cordifolia</i> (สระแหน่)	leaf	-	10.00	>10.00
<i>Millingtonia hortensis</i> (ปีป)	leaf	9.29 ± 0.26	2.50	>10.00
<i>Momordica cochinchinensis</i> (ฟักข้าว)	leaf	-	2.50	>10.00
<i>Moringa oleifera</i> (มะรุม)	leaf	-	5.00	>10.00
<i>Oroxylum indicum</i> (เพกา)	leaf	8.72 ± 0.36	2.50	10.00
<i>Passiflora foetida</i> (กะทกรก)	leaf	-	>10.00	>10.00
<i>Peltophorum pterocarpum</i> (นนทรี)	leaf	-	5.00	5.00
	bark	-	2.50	5.00
	fruit	-	5.00	>10.00
<i>Persicaria odorata</i> (ผักแพว)	whole plant	-	2.50	>10.00
<i>Phyllanthus acidus</i> (มะยม)	leaf	-	10.00	>10.00
<i>Piper betle</i> (พลู)	leaf	8.80 ± 0.40	1.25	1.25
<i>Rhodomyrtus tomentosa</i> (พรวด)	leaf	9.30 ± 0.80	0.31	0.62
<i>Ricinus communis</i> (ละหุ่ง)	leaf	-	10.00	>10.00
<i>Schleichera oleosa</i> (ตะคร้อ)	leaf	-	5.00	>10.00
	seed	-	>10.00	>10.00
	peel	-	10.00	>10.00
	bark	-	10.00	10.00
<i>Sesbania grandiflora</i> (แคบ้าน)	leaf	-	10.00	>10.00
<i>Streblus asper</i> (ข่อย)	leaf	-	>10.00	>10.00
<i>Syzygium cumini</i> (หว่า)	leaf	10.32 ± 0.50	5.00	5.00
<i>Tamarindus indica</i> (มะขาม)	bark	-	10.00	>10.00
<i>Thunbergia laurifolia</i> (รางจืด)	leaf	-	2.50	>10.00
<i>Tiliacora triandra</i> (ย่านาง)	leaf	-	5.00	>10.00
<i>Xanthostemon chrysanthus</i> (รักแรกพบ)	leaf	11.60 ± 0.50	1.25	2.50

หมายเหตุ: - หมายถึง ไม่เกิดบริเวณใส (no inhibition zone)

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ในสารสกัดจากพืชที่พบในจังหวัด นครราชสีมา (ต่อ)

Plant species (ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อไทย)	Plant part used	Inhibition zone (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Zingiber officinale</i> (ขิง)	rhizome	7.33 ± 0.58	1.25	>10.00
<i>Ziziphus mauritiana</i> (พุทรา)	leaf	8.14 ± 0.24	1.25	10.00
<i>Zizyphus oenoplia</i> (เล็บเหยี่ยว)	leaf	-	5.00	10.00

หมายเหตุ: - หมายถึง ไม่เกิดบริเวณใส (no inhibition zone)

อภิปรายผลการวิจัย

Rios และ Recio (2005) และ Van Vuuren (2008) ได้ทำการแบ่งกลุ่มการออกฤทธิ์ของสารสกัดโดยใช้ค่า MIC และได้ให้ความเห็นว่าสารสกัดที่มีค่า MIC มากกว่า 1 mg/ml จัดเป็นสารที่มีฤทธิ์การยับยั้งน้อย และไม่เหมาะที่จะนำไปศึกษาต่อ หรือเพื่อแยกสารบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับในงานวิจัยนี้ ได้จัดแบ่งพืชออกเป็น 3 กลุ่ม ตามค่า MIC ได้แก่ กลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งดีคือ มีค่า MIC < 1 mg/ml มี 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากเหง้ากระชาย ผลกรวยป่า และ ใบพรวด กลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลางคือ มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 1-2.5 mg/ml มี 20 ชนิด และกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งอ่อนคือ มีค่า MIC > 2.5 mg/ml มี 35 ชนิด

ในงานวิจัยนี้ พืชที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่มีฤทธิ์ดีทั้ง สามชนิด ได้แก่ กระชาย กรวยป่า และ พรวด มีรายงานการศึกษาวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากพืชทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น สารสกัดจากเหง้ากระชายที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.01 mg/ml (Voravuthikunchai, et al., 2006) และเหง้ากระชายที่สกัดด้วยเมทานอล พบว่ามีค่า MIC อยู่ที่ 12.8 mg/ml (Rukayadi, et al., 2013) สำหรับในงานวิจัยนี้ได้เตรียมสารสกัดโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย และให้ค่า MIC เท่ากับ 0.512 mg/ml เมื่อ

เปรียบเทียบค่า MIC กับรายงานวิจัยที่ได้กล่าวไปแล้ว กระชายที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (Voravuthikunchai et al., 2006) และกระชายที่สกัดด้วยเมทานอล (Rukayadi et al., 2013) แสดงให้เห็นว่า ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารมีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในสารสกัด (Cowan, 1999) นอกจากนี้สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชาย ได้แก่ สาร Pinocembrin (MIC เท่ากับ 0.512 mg/ml) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (Voravuthikunchai et al., 2005)

สำหรับกรวยป่า งานวิจัยนี้พบว่า มีค่า MIC ต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดหยาบจากใบ เปลือกไม้ และผล มีค่าเท่ากับ 5, 2.5 และ 0.658 mg/ml ตามลำดับ และจากข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบ และเปลือกไม้ของกรวยป่า ที่สกัดด้วยเมทานอลต่อเชื้อ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ พบว่ามีค่า MIC >5 mg/ml (Mosaddik et al., 2004) และมีรายงานการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเปลือกต้นกรวยป่า พบสาร caseargrewnins A, B, C และ D มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น โปรโตซัว *Plasmodium falciparum* และแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* (Kanokmedhakul et al., 2005) งานวิจัยนี้เป็นการรายงานฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากกรวยป่าต่อแบคทีเรีย *S. aureus* อย่างไรก็ตาม การศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อใน

แบคทีเรีย *S. aureus* ทั้งสารสกัดหยาบจากกรวยป่า และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ในกรวยป่ายังไม่มีรายงาน

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากพรอดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่ได้รายงานว่สารสกัดจากใบพรอดมีฤทธิ์ยับยั้ง และฆ่าแบคทีเรีย *S. aureus* โดยมีค่า MIC น้อยกว่า 1 mg/ml เช่นกัน (0.078 mg/ml) (Visutthi et al., 2011; Saising and Voravuthikunchai, 2012) รวมถึงมีฤทธิ์ยับยั้ง และฆ่าแบคทีเรีย บวกชนิดอื่น ด้วย (Limsuwan and Voravuthikunchai, 2013) สารสกัดจากใบพรอดในงานวิจัยนี้ได้เก็บใบจากต้นที่อยู่ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และสารสกัดจากใบของต้นพรอดที่ได้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อนหน้านี้ (Visutthi et al., 2011) ถูกเก็บในภาคใต้ของประเทศไทย และเมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ของแต่ละงานวิจัยแล้วพบว่าค่า MIC มีความแตกต่างกัน ซึ่งให้เห็นว่า สภาพอากาศ และพื้นที่ปลูกที่แตกต่างกันมีผลต่อการสร้างสารสำคัญในพืช (Sangwan et al., 2001) อย่างไรก็ตาม ค่า MIC ของสารสกัดจากพืชทั้งสองแหล่งยังจัดอยู่ในระดับที่มีฤทธิ์ยับยั้งดี นอกจากนี้ สาร rhodomyrtone ที่แยกได้จากพรอด มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ในระดับเดียวกับยาปฏิชีวนะ (Sianglum et al., 2011; Visutthi et al., 2011)

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รายงานฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นบางส่วนที่พบในจังหวัดนครราชสีมา โดยมีพืชหลายชนิดมีการศึกษาแล้ว แต่เป็นพืชที่พบในพื้นที่ภูมิภาคอื่นๆ และบางชนิดยังไม่มีการศึกษาในรูปแบบของสารสกัด โดยเฉพาะสารสกัดจากกรวยป่ากับเชื้อ *S. aureus* จากการทดลองพบว่าซึ่งเป็นพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

S. aureus ได้ดี ดังนั้น กรวยป่าจึงน่าจะเป็นพืชที่มีสารออกฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยเฉพาะเชื้อกลุ่ม staphylococci ซึ่งเป็นเชื้อที่พบวกก่อโรคได้ทั้งในคน และสัตว์ การค้นหาพืชที่มีสารต้านเชื้อจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเป็นฐานข้อมูลเพื่อการศึกษาวิจัยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559 ขอขอบคุณ นายอานาภาพ สกิจจวา นางสาวนงคัลลักษณ์ ศรีแก้ว นางสาวอรชา เอี่ยมบุ๋ นางสาวกัญญา กลพิมาย นางสาวจันทิมาพร พาขุนทด นางสาวประกายมาศ ช่างงาน นางสาวลลิตรา กรอนกลาง ที่ช่วยเหลือ และให้ความร่วมมือในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณ ศ.ดร.ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้อาณัติและเชื้อแบคทีเรียในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard-eighth edition. CLSI documents M07-A8. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): 564-582.
- Gordon, R.J., and Lowy, F.D. (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases* 46(Supplement 5): S350-S359.

- Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Kanarsa, T., and Buayairaksa, M. (2005). New bioactive clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia grewiifolia*. *Journal of Natural Products* 68(2): 183-188.
- Limsuwan, S., and Voravuthikunchai, S.P. (2013). Anti-*Streptococcus pyogenes* activity of selected medicinal plant extracts used in Thai traditional medicine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12(4): 535-540.
- McGann, P., Snedrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A.C., Clifford, R., Hinkle, M., Whitman, T., Lesho, E., and Schaecher, K.E. (2016). *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *blaCTX-M* on a novel *IncF* plasmid: first report of *mcr-1* in the United States. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 60(7): 4420-4421.
- Mosaddik, M.A., Banbury, L., Forster, P., Booth, R., Markham, J., Leach, D., and Waterman, P.G. (2004). Screening of some Australian Flacourtiaceae species for *in vitro* antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytomedicine* 11(5): 461-466.
- Rios, J.L., and Recio, M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethno-pharmacology* 100(1): 80-84.
- Rukayadi, Y., Lau, K.Y., Zainin, N.S., and Zakaria, M. (2013). Screening antimicrobial activity of tropical edible medicinal plant extracts against five standard microorganisms for natural food preservative. *International Food Research Journal* 20(5): 2905-2910.
- Saising, J. and Voravuthikunchai, S.P. (2012). Anti *Propionibacterium acnes* activity of rhodomertone, an effective compound from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. leaves. *Anaerobe* 18: 400-404.
- Sangwan, N.S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F., and Sangwan, R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34(1): 3-21.
- Sianglum, W., Srimanote, P., Wonglumsom, W., Kittiniyom, K., and Voravuthikunchai, S.P. (2011). Proteome analyses of cellular proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with rhodomertone, a novel antibiotic candidate. *PLoS ONE* 6: e16628.
- Uhlemann, A.C., Otto, M., Lowy, F.D., & DeLeo, F.R. (2014). Evolution of community-and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution* 21: 563-574.
- Van Vuuren, S.F. (2008). Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *Journal of Ethno-pharmacology* 119(3): 462-472.
- Visutthi, M., Srimanote, P., and Voravuthikunchai, S.P. (2011). Responses in the expression of extracellular proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with rhodomertone. *The Journal of Microbiology* 49(6): 956-964.
- Voravuthikunchai, S.P., Limsuwan, S., Supapol, O., and Subhadhirasakul, S. (2006). Antibacterial activity of extracts from family Zingiberaceae against foodborne pathogens. *Journal of Food Safety* 26(4): 325-334.
- Voravuthikunchai, S.P., Phongpaichit, S., and Subhadhirasakul, S. (2005). Evaluation of antibacterial activities of medicinal plants

widely used among AIDS patients in Thailand. *Pharmaceutical Biology* 43(8): 701-706.

Weese, J.S. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. *ILAR Journal* 51(3): 233-244.



1. [Situs Slot KayaMendadak88](#)
2. [Situs Slot Online Terbaik Dan Terpercaya No 1](#)
3. [Slot Gacor](#)
4. Slot Terbaru: <https://www.shaptahik.com/slot-terbaru.php>
5. [Slot Pragmatic Play](#)
6. [Situs Slot Online Terpercaya](#)
7. [Kumpulan Situs Judi Slot Terpercaya](#)
8. [Game Slot Online](#)
9. [Judi Slot Online Jackpot Terbesar](#)
10. [Situs Judi Slot Online Terpercaya 2021](#)
11. [Situs Slot Online Indonesia](#)
12. [SLOT88](#)
13. [RAJASLOTXO](#)
14. [Slot Joker123](#)
15. [Situs Judi Slot Yang Sering Menang](#)
16. [Daftar Situs Slot Online](#)
17. [Agen Slot Online Resmi](#)
18. [Slot Deposit Pulsa](#)
19. [Agen Slot Online dan Situs Slot Gacor Indonesia](#)
20. [Situs Judi Slot Online Terbaik & Judi Online 2021](#)
21. [Agen Slot Online Terpercaya](#)
22. [Daftar Situs Judi Slot Terbaik Dan Terpercaya No 1](#)
23. [Pragmatic Play Indonesia](#)
24. [Daftar Situs Judi Slot Online Gampang Menang Terbaik 2021](#)
25. [AloJudi Slot](#)
26. [KayaMendadak88 Slot](#)
27. Situs Judi Slot Online: <http://happy.daa.jp/slot-online/>
28. [Situs Judi Slot Online Joker Slot Gaming](#)
29. [Situs Slot Gacor 2022](#)
30. [Slot Gacor Gampang Menang](#)
31. Link Alternatif: <https://nimafadavibeats.com/>
32. Situs Judi Slot Online Indonesia: <https://hgj.nbc.mybluehost.me/>
33. [Situs Judi Slot Mudah Menang](#)
34. [Situs Slot Online Terbaik dan Terpercaya](#)
35. [Situs Judi Slot Online Terpercaya](#)
36. [slot](#)
37. [Situs Judi Slot Online Jackpot Terbesar](#)
38. [Situs Judi Slot Terbaik Dan Terpercaya No 1](#)
39. [Judi Slot Online Jackpot Terbesar Gampang Menang](#)
40. [Slot Online Terlengkap](#)
41. [Slot Pulsa](#)
42. [Slot Deposit DANA](#)
43. [SLOT88 Pulsa](#)
44. [Situs Judi Slot Online Gampang Menang](#)
45. <https://www.nubekasi.id/>
46. [Forum Slot Online Indonesia](#)
47. [Daftar Terbaru Situs Judi Slot Online Terpercaya 2022](#)
48. [Situs Judi Slot Online Indonesia Terpercaya](#)
49. [Situs Judi Slot Online Terpercaya di Indonesia 2022](#)
50. [situs judi slot gacor online terpercaya](#)
51. [Situs Judi Slot Online Terbaik dan Terpercaya 2022](#)
52. [Joker123 Slot](#)
53. [Daftar Situs Judi Slot Online Deposit Pulsa Terbaik](#)
54. [Daftar Situs Judi Slot Online Gacor Gampang Menang 2022](#)
55. [Mesin slot gacor 88](#)
56. [Mesin slot](#)
57. [Link Slot Online](#)
58. [Situs Judi Slot Online Resmi 2021](#)
59. [Slot Via Dana](#)
60. [Situs Judi Slot Online Terpercaya No 1](#)
61. [Link Alternatif Joker123](#)
62. [Situs Judi Slot Online Banyak Bonus Free Bet](#)
63. [mercusuar.id](#)
64. [situs judi slot terbaik dan terpercaya no 1](#)
65. [Slot Gacor Gampang Menang](#)
66. [Slot Online Yang Sering Kasih Jackpot](#)
67. [Slot Online](#)
68. [Judi Slot Online Jackpot Terbesar](#)
69. [Game Slot Online](#)
70. [Judi Slot Terpercaya](#)
71. [Kumpulan Situs Judi QQ Online Terpercaya](#)
72. [Slot Online Terbaru](#)
73. [Situs Game Slot Online Terbaik](#)
74. [Daftar Situs Judi Slot Online Gacor Gampang Menang 2022](#)

75. [Situs Judi Slot Online Terbaik Dan Terpercaya No 1](#)
76. [Situs Slot Online Terlengkap](#)
77. [Situs Slot Deposit Pulsa dan Slot Online Terbaik](#)
78. [Situs Slot Terbaru 2022](#)
79. [Situs Slot Gacor Gampang Menang](#)
80. [Situs Judi Slot Online Terpercaya 2022](#)
81. [Situs Slot Online Indonesia Terbaik](#)
82. [Slot Hacker](#)
83. [Situs Slot Online Terbaik](#)
84. [Hack Slot Pragmatic](#)
85. [Slot Judi Bonus 200 New Member Besar](#)
86. [Slot Gacor Gampang Menang](#)
87. [Daftar Situs Judi Slot Online Indonesia](#)
88. [Situs Judi Slot Terbaik dan Terpercaya No 1](#)
89. [Daftar Situs Judi Slot Online Terpercaya](#)
90. [Link Slot Terpercaya](#)
91. [Link Alternatif JOKER123](#)
92. [Situs Judi Slot Online Gacor Terbaik 2022](#)
93. [Situs Judi Slot Online Gacor Terbaik & Terpercaya 2022](#)
94. [Situs Judi Slot Online Jackpot Terbesar](#)
95. [Game Slot Online Uang Asli](#)
96. [Situs Judi Slot Online Resmi](#)
97. [Slot Online Terpercaya](#)
98. [Situs Slot Online](#)
99. [Situs Judi Slot Terbaik 2022](#)
100. [Game Slot Penghasil Uang](#)
101. [Situs Judi Slot Online Gacor Gampang Menang](#)
102. [777 Slot Online](#)
103. [Slot Gacor Online](#)
104. [Daftar Situs Judi Slot Online Terpercaya](#)
105. [Slot Online Gacor](#)
106. [Situs Slot Online Terbaik 2021](#)
107. [Slot Online Terpercaya 2022](#)
108. [Situs Slot Online Terbaik dan Terpercaya](#)
109. [Situs Slot Online Uang Asli](#)
110. [Situs Slot Gacor Online Terbaik](#)
111. [Daftar Situs Judi Slot Online Terlengkap](#)
112. [Link Slot Online Jackpot Terbesar](#)
113. [Slot Online Paling Gacor](#)
114. [Slot JOKER123](#)
115. [Situs Slot Terbaik](#)
116. [Nama Nama Situs Judi Slot Online Gampang Menang](#)
117. [Kumpulan Situs Slot Online Terbaik 2022](#)
118. [Situs Judi Online Resmi Aman Dan Terpercaya 2022](#)
119. [Link Slot Online JOKER123](#)
120. [Situs Judi Slot Online Terpercaya 2022 Mudah Menang](#)
121. [Slot Online Yang Sering Kasih Jackpot](#)
122. [Situs Judi Slot Mudah Menang](#)
123. [Situs Slot Online Terpercaya](#)
124. [Daftar Situs Judi Slot Online Gacor Mudah Menang Terbaik 2022](#)
125. [Daftar Slot Gacor Gampang Menang 2022](#)
126. [Daftar Situs Judi Slot Online Gampang Menang](#)