



ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์และคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของใบครามหมัก

Antimicrobial activity and antioxidant capacity of fermented indigo leaves

งามนิจ นนทโส^{1*} และ ชีรศักดิ์ สมดี¹

¹สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

Ngarmnit Nontaso^{1*} and Theerasak Somdee¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, 40002 Thailand

*Corresponding Author, E-mail: ngarmnit@kku.ac.th

Received: 3 July 2020 | Revised: 12 September 2020 | Accepted: 24 November 2020

บทคัดย่อ

สารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติสามารถยับยั้งการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) เท่ากับ 781.25 µg/ml สารสกัดใบครามหมักด้วยแบคทีเรียไอโซเลตที่ 7 สารสกัดใบครามหมักด้วยแบคทีเรียไอโซเลตที่ 9 และสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Streptococcus agalactiae* มีค่า MIC เท่ากับ 6,250 1,562.5 และ 3,125 µg/ml และสามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus cereus* มีค่า MIC เท่ากับ 1,562.5 1,562.5 และ 781.25 µg/ml ตามลำดับ ส่วน *Candida albicans* ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดใบครามหมักด้วยแบคทีเรียไอโซเลตที่ 7 และ สารสกัดใบครามหมักด้วยแบคทีเรียไอโซเลตที่ 9 มีค่า MIC เท่ากับ 6,250 และ 390.63 µg/ml ตามลำดับ ส่วนเขตการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ด้วยสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติที่ความเข้มข้น 15 30 60 และ 120 mg/ml เท่ากับ 17.3 17.6 18.0 และ 19.1 mm และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดใบครามหมักด้วยไอโซเลตที่ 9 ที่ความเข้มข้นเดียวกัน มีค่าเท่ากับ 16.2 18.4 19.3 และ 22.2 mm ส่วนเขตการยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* ด้วยสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติที่ความเข้มข้น 30 60 120 mg/ml เท่ากับ 8.2 9.6 และ 14.2 mm เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดใบครามหมักด้วยไอโซเลตที่ 9 ที่ความเข้มข้นเดียวกันเท่ากับมีเขตการยับยั้งการเจริญ เท่ากับ 9.1 13.3 และ 17.8 mm การทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ของสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติมีค่า 92.83±0.04 µg TE/g และสารสกัดใบครามหมักด้วยไอโซเลตที่ 9 มีค่า 91.58±0.04 µg TE/g ส่วน FTIR Spectra ของสารสกัดจากใบครามหมักตามธรรมชาติและจากใบครามหมักด้วยไอโซเลตที่ 9 พบ 4 พีค ที่ 3333.78 2122.47 1838.47 และ 663.48 cm⁻¹ และ 3332.81 2128.80 1636.35 และ 664.11 cm⁻¹ ตามลำดับ

ABSTRACT

Naturally fermented indigo leaf extract was able to inhibit the growth of *Aeromonas hydrophila* with a MIC value of 781.25 µg/ml. Indigo leaf extract fermented with the bacterium isolate 7, indigo leaf extract fermented with the bacterium isolate 9 and naturally fermented indigo leaf extract can inhibit the growth of *Streptococcus agalactiae* with MIC values of 6,250, 1,562.5 and 3,125 µg/ml and can also inhibit the growth of *Bacillus cereus* with MIC values of 1,562.5, 1,562.5 and 781.25 µg/ml, respectively. *Candida albicans* was inhibited by indigo leaf

extract fermented with the bacterium isolate 7 and indigo leaf extract fermented with the bacterium isolate 7 with MIC values of 6,250 and 390.63 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The inhibitory zone of *B. cereus* with naturally fermented indigo leaf extract at concentrations of 15, 30, 60 and 120 mg / ml was 17.3, 17.6, 18.0 and 19.1 mm whereas fermented indigo leaf extract with the bacterium isolate 9 at the same concentrations with *B. cereus* inhibitory zone of 16.2, 18.4, 19.3 and 22.2 mm. The inhibitory zone of *A. hydrophila* with naturally fermented indigo leaf extract at the 30, 60, 120 mg / ml was 8.2, 9.6 and 14.2 mm whereas indigo leaf extract fermented with the bacterium isolate 9 at the same concentrations was 9.1, 13.3 and 17.8 mm. The antioxidant properties using ABTS assay of naturally fermented indigo leaf extract was $92.83 \pm 0.04 \mu\text{g TE / g}$, and indigo leaf extract fermented with the bacterium isolate 9 was $91.58 \pm 0.04 \mu\text{g TE / g}$. FTIR Spectra of crude extract of naturally fermented indigo leaves and indigo leaves fermented with the bacteria isolate 9 possess 4 peaks, including 3333.178, 2122.47, 1838.47 and 663.48 cm^{-1} and 3332.81, 2128.80, 1636.35 and 664.11 cm^{-1} , respectively.

คำสำคัญ: ต้นคราม จุลินทรีย์ก่อโรค ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เขตการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ สารต้านอนุมูลอิสระ

Keywords: Indigo plant, Pathogenic microorganisms, MIC, Inhibition zone, Antioxidant

บทนำ

พืชที่ให้สีครามมีหลายชนิด เช่น ต้นคราม ต้นฮ่อม และ ต้นเบือก คนโบราณในหลายประเทศรู้จักนำใบจากต้นครามมาทำเป็นสีย้อมผ้า รวมทั้งในประเทศไทย โดยในทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือก็มีการปลูกต้นครามเพื่อนำมาย้อมผ้าเป็นเวลานาน ต้นครามที่คนอีสานนิยมปลูกและใช้ในการย้อมผ้าเป็นต้นครามคือชนิด *Indigofera tinctoria* Linn ซึ่งคนอีสานดั้งเดิมนิยมสวมเสื้อฝ้ายแขนยาวย้อมสีคราม เนื่องจากมีความเชื่อว่ารักษาอาการไข้ให้หายได้และทำให้สุขภาพแข็งแรง บางคนยังนำน้ำครามที่ได้จากการหมักสีครามไปใช้ในการทาแผลลวกควายที่ถูกตอนจะทำให้ลดการอักเสบมีแผลแห้งดี ในปัจจุบันได้มีการศึกษาการใช้ประโยชน์จากต้นครามในด้านการแพทย์ พบว่าสารสกัดจากรากของต้นคราม *Isatis indigotica* มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคไข้หวัดใหญ่ ไวรัสตับอักเสบเอ และไข้สมองอักเสบเจอี (Quin and Xu, 1998; Wu et al., 1997) นอกจากนี้สารสกัดจากรากของต้นคราม *Isatis indigotica* สามารถยับยั้ง SARS-Coronavirus มีค่า IC50 เท่ากับ $53.8 \pm 4.2 \mu\text{g/ml}$ (Lin et al., 2005) และสารสกัดจากการต้นคราม *Indigofera suffruticosa* Mill สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้ (Leite et al., 2006) นอกจากนี้สารสกัดผงใบครามแห้ง *Indigofera tinctoria* Linn สกัดด้วย methanol มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งการเจริญ

ของ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* และ *Bacillus pumilus* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Renukadevi and Sultana, 2011) ส่วนรากและใบต้นคราม *Indigofera tinctoria* Linn สกัดด้วย methanol มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ แต่สารสกัดจากรากไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ส่วนสารสกัดใบครามสามารถยับยั้งการเจริญของ *Enterobacter faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Paratyphi*, *Enterobacter aerogenes* และ *Klebsiella pneumoniae* (Swaminathan, 2018) ใบครามแก่ ใบครามอ่อน และ เมล็ดครามที่สกัดด้วย methanol มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Jang et al., 2012)

เนื่องจากต้นครามมีประโยชน์มากดังกล่าวมาแล้ว แต่ยังไม่มีการศึกษาการนำสารสกัดของใบต้นครามที่หมักด้วยแบคทีเรียซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง Indigo และการสร้าง leucoindigo มาหมักใบต้นคราม *Indigofera tinctoria* Linn แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด และหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) รวมทั้งทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติ

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการหมักไบโครม

แบคทีเรีย ที่ใช้เป็นแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ β -glucosidase ซึ่งแยกเชื้อได้จากการหมักไบโครมตามธรรมชาติที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12 h ซึ่งเป็นเวลาที่มีปริมาณ indigo สูงที่สุด ได้คัดเลือกมา 10 ไอโซเลตที่สามารถผลิต Indigo จาก Indican medium ได้ในช่วง 180.256 - 581.282 mg/ml (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 h ปรับความขุ่นของเชื้อแต่ละไอโซเลตให้เท่ากับ McFarland standard No. 1 ซึ่งมีเชื้อประมาณ 3.0×10^8 cell/ml

การหมักไบโครมตามสภาพธรรมชาติ

ไบโครมสดไม่ต้องทำความสะอาดให้ปลอดเชื้อ นำมาบดให้ละเอียด แล้วชั่งใส่ Basal medium ปลอดเชื้อ ในอัตราส่วน 0.12 g/ml (อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 l ประกอบด้วย K_2HPO_4 1.0 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g NaCl 0.5 g $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 h

การหมักไบโครมโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย

นำไบโครมสดมาทำความสะอาดที่บริเวณผิวให้ปลอดเชื้อ โดยการแช่ใน 70% Ethanol เป็นเวลา 1 min จากนั้นจึงนำไปแช่ใน 1% H_2O_2 เป็นเวลา 1 min แล้วจึงนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยเปลี่ยนน้ำกลั่นเป็นจำนวน 5 ครั้ง ทั้งให้สะอาด น้ำ แล้วนำไปบดให้ละเอียด ชั่งใส่ใน Basal medium ปลอดเชื้อ ในอัตราส่วน 0.12 g/ml เติมน้ำเชื้อแต่ละไอโซเลตที่เตรียมไว้ ลงในแต่ละชุดของไบโครมปลอดเชื้อโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 h พิสูจน์การปลอดเชื้อโดยนำไบโครมบดใส่ใน Nutrient broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 h หากไม่มีเชื้อเจริญ จึงนำไบโครมที่หมักไว้ไปทดลองต่อไป

การเตรียมสารสกัดไบโครมหมัก

นำหลอดบรรจุไบโครมหมักไปปั่นในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 min เพื่อทำลายเซลล์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm เป็นเวลา 5 min เก็บส่วนที่เป็นน้ำใสซึ่งเป็นสารสกัดไบโครมหมักที่มีความเข้มข้น 120 μ g/ μ l

การเตรียมเชื้อทดสอบ

เชื้อทดสอบประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Streptococcus agalactiae* ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella* Typhimurium, *Aeromonas hydrophila* และ *Burkholderia pseudomallei* รวมถึงยีสต์ *Candida albicans* ซึ่งทั้งหมดเป็น clinical isolates ที่ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อจากสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และ รศ.ดร. เสาวนิต ทองพิมพ์ นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบแต่ละเชื้อไปเลี้ยงใน Nutrient broth ส่วน *C. albicans* เลี้ยงใน MY broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 h ปรับความขุ่นของเชื้อแต่ละเชื้อเท่ากับ McFarland standard No. 0.1 ซึ่งมีเชื้อ ประมาณ 3.0×10^7 cell/ml

การเตรียมสี Resazurin

ละลายสี Resazurin 270 mg ในน้ำกลั่น 40 ml ทำให้ปลอดเชื้อ นำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้การเจริญของเชื้อทดสอบโดยจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินม่วงไปเป็นสีแดงชมพูหรือไม่มีสี หากเชื้อไม่เจริญจะยังคงมีสีน้ำเงินม่วง

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดไบโครมหมักที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (MIC)

ได้ใช้วิธีของ Mann and Markham (1998) โดยใช้ 96 well plate ปลอดเชื้อ (รูปที่ 1) สำหรับการทดสอบสารสกัดไบโครมหมัก 11 ชนิดต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 1 ชนิด และให้คอลัมน์ที่ 12 เป็นชุดควบคุม ประกอบด้วย positive control คือไม่มีสารสกัดไบโครมหมักแต่มีเชื้อทดสอบที่ยังมีชีวิต (A12 B12 C12 และ D12) และ negative control (E12 F12 G12 และ H12) คือไม่มีสารสกัดไบโครมหมักและไม่มีเชื้อทดสอบ ซึ่งสีของ Resazurin จะต้องคงสีน้ำเงินม่วง ส่วนคอลัมน์ที่ 1-11 คือสารสกัดไบโครมหมักแต่ละชนิดลงในแต่ละคอลัมน์ โดยคอลัมน์ที่ 11 เป็นสารสกัดไบโครมหมักตามธรรมชาติและคอลัมน์ที่ 1-10 เป็นสารสกัดไบโครมหมักด้วยเชื้อไอโซเลตที่ 1 จนถึงสารสกัดไบโครมหมักด้วยเชื้อไอโซเลตที่ 10 โดยในแต่ละหลุมจะเติมน้ำเชื้อทดสอบหลุมละ 10 μ l ยกเว้น negative control เติมน้ำ Muller Hinton broth ลงในทุกหลุมละ 50 μ l โดยจะมีการเติมสี Resazurin ในปริมาตร 10 μ l ลงในแต่ละหลุม และเติมสารสกัดไบโครมหมัก 50 μ l โดยทำให้แต่ละแถว A B C D E F G และ H มีความเข้มข้นของสารสกัดไบโครมหมักที่แตกต่างกัน

โดยมีค่า 25,000 12,500 6,250 3,125 1,562.50 781.25 390.63 และ 195.31 µg/ml ตามลำดับ ปิดฝา Plate แล้วนำไปบ่มที่ 35°C เป็นเวลา 18 h อ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดของไบโครามหมักที่ทำให้จุลินทรีย์ทดสอบไม่เจริญ (ค่า MIC) ในแต่ละคอลัมน์ที่ 1-11 โดยดูจากหลุมที่จุลินทรีย์ไม่เจริญจะยังคงสีน้ำเงินมัว แต่หลุมถัดไปจะสีแดงชมพู บันทึกค่า MIC คือความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งเจริญของจุลินทรีย์ หากทุกหลุมในแต่ละคอลัมน์ 1-11 มีจุลินทรีย์เจริญจะมีสีแดงชมพู เนื่องจากสารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงสุดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ให้บันทึกค่า MIC > 25,000 µg/ml

การทดสอบหาเขตยับยั้งของสารสกัดไบโครามหมักต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Inhibition zone)

ได้เลือกสารสกัดไบโครามหมัก และแบคทีเรียก่อโรค โดยดูจากผลการทดสอบ MIC มาทดสอบหาเขตยับยั้ง (Inhibition zone) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton ผสม Resazurin ที่อาหารร่วนมีความหนา 4 mm เท่ากันตลอดงาน ใช้สำลี่ปั่นปลายไม้ปลอดเชื้อ จุ่มเชื้อทดสอบ 1 ชนิดป้ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ 3 แนวระนาบ แล้วใช้ฟลาสเจอร์เปิดปลอดเชื้อเจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ทุกหลุมมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 mm วางแผ่นเพนนิซิลิน 10 units บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใช้สำหรับการตรวจสอบหาเขตยับยั้งของสารสกัดไบโครามหมัก ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (15 30 60 120 mg/ml) โดยเติมสารสกัด 80 µl ลงในแต่ละหลุมที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 h วัดเส้นผ่านศูนย์กลางในหน่วยมิลลิเมตรบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีสีแดงในจานอาหารที่ผสม TTZ และบริเวณที่มีสีฟ้าจาง ๆ ในอาหารที่ผสม Resazurin

การทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ได้เลือกสารสกัดไบโครามหมักโดยดูจากผลการทดสอบ MIC มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี ABTS assay (Re et al., 1999) โดยใช้ Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-methychroman-2-carboxylic acid) เป็นสารมาตรฐาน ใช้ ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ความเข้มข้น 7 mM ที่ทำให้เป็น

ABTS radical cation โดยผสมกับ $K_2S_2O_8$ (potassium persulfate) 2.45 mM ในสัดส่วน 1:1 โดยปริมาตร ก่อนนำมาใช้จะต้องตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 12-16 h แล้วจึงเจือจางสาร ABTS radical cation โดยใช้ PBS (Phosphate buffer saline) pH 7.4 ให้มีค่าดูดกลืนแสง 0.4 ที่ช่วงคลื่น 734 nm จากนั้นเจือจางสารสกัดไบโครามหมักแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 2.4 1.2 0.8 0.6 และ 0.48 mg เติมลงในแต่ละหลุมของ microplate เติม ABTS radical cation (ทำ 4 ซ้ำ) นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 734 nm โดยใช้ Microplate reader ที่อุณหภูมิ 25°C วัดค่าทุกนาที่ เป็นเวลา 30 min และทำ Trolox standard curve คำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของไบโครามหมักในหน่วย Trolox Equivalent ต่อไบโครามหมัก 1 g (µM TE/g) จากสมการที่ได้จาก Trolox standard curve

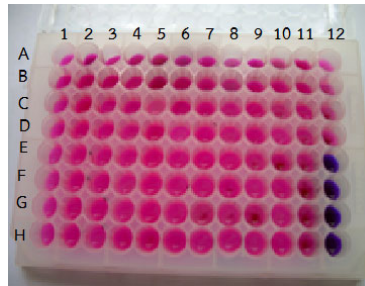
การหาค่าคลื่นความถี่ (Spectrum)

ได้เลือกสารสกัดไบโครามหมัก โดยดูจากผลการทดสอบค่า MIC ไปศึกษา FTIR Spectrum โดยใช้เครื่องมือฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ FTIR-8900 ยี่ห้อ SHIMADZU model FTIR-8900 Japan ที่เลขคลื่น 3500 ถึง 600 cm^{-1}

ผลการวิจัย

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดไบโครามหมักที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (MIC)

ไบโครามหมักตามธรรมชาติสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. Cereus*, *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 781.25 3125 และ 781.25 µg/ml ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ดังตารางที่ 1 และรูปที่ 1 ส่วนไบโครามหมักด้วยแบคทีเรียไฮโซเลตต่าง ๆ พบว่า เมื่อหมักด้วยไฮโซเลตที่ 7 สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus*, *S. Agalactiae* และ *C. albicans* มีค่า MIC 1,562.50 6,250 และ 6,250 µg/ml ตามลำดับ ไบโครามหมักด้วยไฮโซเลตที่ 9 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. Cereus*, *S. agalactiae* และ *C. albicans* มีค่า MIC 1,562.50 1,562.50 และ 390.63 µg/ml



รูปที่ 1 สารสกัดของใบครามหมัก (คอลัมน์ 1-11) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดใบครามหมัก (MIC) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ค่า MIC ($\mu\text{g/ml}$) ของสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติ (11) และหมักด้วยเชื้อแบคทีเรียโอสเลตที่ 1-10										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>S. aureus</i>										
>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000
<i>B. cereus</i>										
3,125	3,125	3,125	6,250	1,562.5	6,250	1,562.5	12,500	1,562.5	12,500	781.25
<i>St. agalactiae</i>										
3,125	3,125	12,500	12,500	1,562.5	6,250	6,250	25,000	1,562.5	12,500	3,125
<i>Ps. aeruginosa</i>										
>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000
<i>E. coli</i> O157										
>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000
<i>S. Typhimurium</i>										
>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000
<i>A. hydrophila</i>										
>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	781.25
<i>B. pseudomallei</i>										
>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000	>25,000
<i>C. albicans</i>										
>25,000	781.25	12,500	3,125	>25,000	3,125	6,250	3,125	390.63	3,125	>25,000

การทดสอบหาเขตยับยั้ง (Inhibition zone)

ได้เลือกสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติและสารสกัดใบครามหมักด้วยแบคทีเรียโอสเลตที่ 9 มาทดสอบหาเขตยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งโอสเลตที่ 9 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปร่างเป็นแท่งขนาดใหญ่อยู่เรียงกันเป็นสาย พบว่าสารสกัดใบครามหมักด้วยโอสเลตที่ 9 ที่ความเข้มข้น

15 30 60 120 mg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* โดยมีเขตการยับยั้ง 16.2 18.4 19.3 และ 22.2 mm ขณะที่ความเข้มข้น 30 60 และ 120 mg/ml สามารถยับยั้ง *A. hydrophila* มีเขตการยับยั้ง 9.1 13.3 และ 17.8 mm แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. Agalactiae* *E. coli* O157, *S. Typhimurium* และ *B. pseudomallei*

ส่วนสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติที่ความเข้มข้น 15 30 60 และ 120 mg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* โดยมีเขตการยับยั้ง 17.3 17.6 18.0 และ 19.1 mm ที่ความเข้มข้น 30 60 และ 120 mg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* มีเขตการยับยั้ง 8.2 9.6 และ 14.2 mm แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. Agalactiae*, *E. coli* O157,

S. Typhimurium และ *B. pseudomallei* ดังตารางที่ 2 ยาเพนนิซิลิน 10 units สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. Aureus*, *B. Cereus*, *S. agalactiae* โดยมีเขตการยับยั้ง 12.2 16.5 และ 15.5 mm แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. Hydrophila*, *E. coli* O157, *S. Typhimurium* และ *B. Pseudomallei* ดังตารางที่ 2 และตารางที่ 3

ตารางที่ 2 เขตการยับยั้งของสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

	เขตการยับยั้ง (mm)				
	เพนนิซิลินที่ความเข้มข้นต่างๆ (mg/ml)				
	10 units	15 units	30 units	60 units	120 units
<i>S. aureus</i>	12.2	0	0	0	0
<i>B. cereus</i>	16.5	17.3	17.6	18.0	19.1
<i>St. agalactiae</i>	15.5	0	0	0	0
<i>E. coli</i> O157	0	0	0	0	0
<i>S. Typhimurium</i>	0	0	0	0	0
<i>A. hydrophila</i>	0	0	8.2	9.6	14.2
<i>B. pseudomallei</i>	0	0	0	0	0

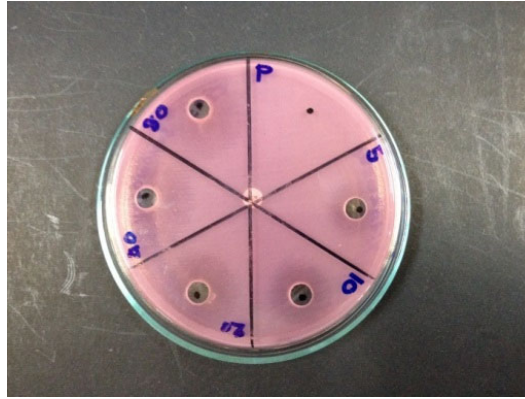
ตารางที่ 3 เขตการยับยั้งของสารสกัดใบครามหมักด้วยไอโซเลตที่ 9 ต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

	เขตการยับยั้ง (mm)				
	เพนนิซิลินที่ความเข้มข้นต่างๆ (mg/ml)				
	10 units	15 units	30 units	60 units	120 units
<i>S. aureus</i>	12.2	0	0	0	0
<i>B. cereus</i>	16.5	16.2	18.4	19.3	22.2
<i>St. agalactiae</i>	15.5	0	0	0	0
<i>E. coli</i> O157	0	0	0	0	0
<i>S. Typhimurium</i>	0	0	0	0	0
<i>A. hydrophila</i>	0	0	9.1	13.3	17.8
<i>B. pseudomallei</i>	0	0	0	0	0

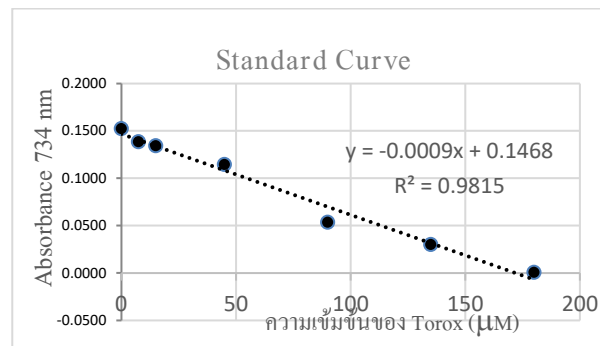
คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบครามหมัก

ความสามารถของ Trolox ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS radical cation (ABTS⁺•) โดยการวัดค่า ดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 734 nm พบว่า มีค่าลดลง เมื่อ Trolox มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ (7.5 15 45 90 135 และ 180 µmol) และเวลาที่ใช้การทำปฏิกิริยาเริ่มตั้งแต่ 1 min จนถึง 30 min มีค่า ดูดกลืนแสงที่วัดได้ไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นจึงเลือกค่า ค่า ดูดกลืนแสงที่เวลา 5 min ไปใช้ในการทำ Trolox standard

curve (รูปที่ 3) ได้นำค่าค่าดูดกลืนแสง 734 nm ที่เวลา 5 min ของสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติและสารสกัดใบครามหมักด้วยไอโซเลตที่ 9 แต่ละความเข้มข้น ไปคำนวณหาค่า คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อเปรียบเทียบกับ Trolox ในหน่วย µg TE/g ของใบครามหมัก โดยคำนวณจากสมการที่ได้จาก Trolox standard curve พบว่าสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติมีค่าการต้านอนุมูลอิสระ 92.83±0.04 µg TE/g และเมื่อหมักด้วยไอโซเลตที่ 9 มีค่าการต้านอนุมูลอิสระ 91.58±0.04 µg TE/g ต่ำกว่าสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติ



รูปที่ 2 เขตการยับยั้งของสารสกัดใบครามหมักด้วยไฮโซเลตที่ 9 ต่อการเจริญของ *A. hydrophila* แผ่นกลมขาวตรงกลางเป็นแผ่นเพนนิซิลิน 10 units บริเวณสีฟ้าจาง รอบหลุมที่เติมสารสกัดเป็นเขตการยับยั้ง

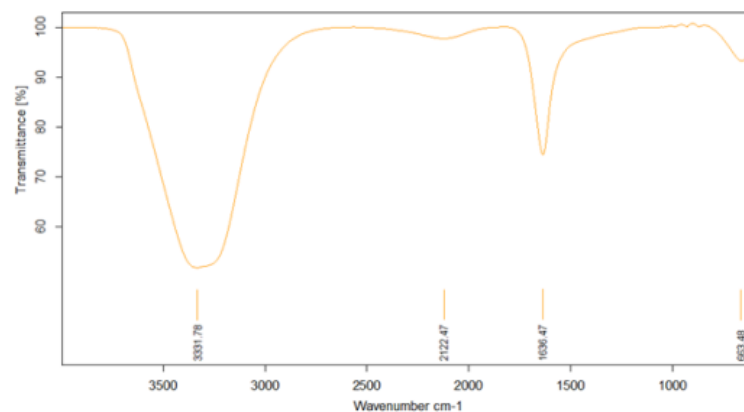


รูปที่ 3 Trolox standard curve ใช้วิธี ABTS assay โดยวัดค่าค่าดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 734 nm

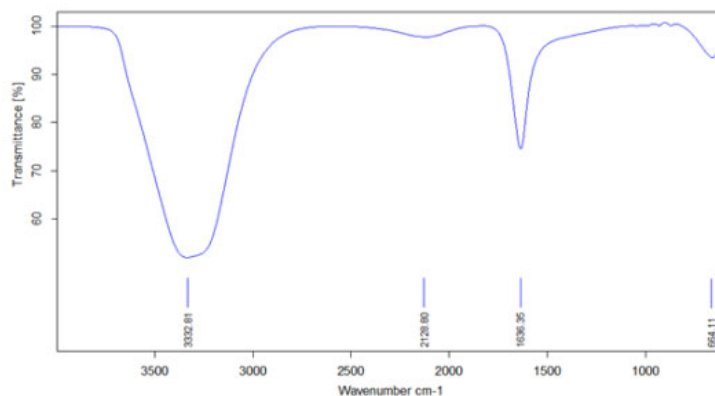
การหาค่าคลื่นความถี่ (Spectrum)

FTIR Spectra ของสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติ พบ peak ที่ 3333.178 2122.47 1838.47 และ

663.48 cm^{-1} ดังในรูปที่ 4 ส่วน FTIR Spectra ของสารสกัดใบครามหมักด้วยไฮโซเลตที่ 9 พบ peak ที่ 3332.81 2128.80 1636.35 และ 664.11 cm^{-1} ดังในรูปที่ 5



รูปที่ 4 FTIR spectra ของสารสกัดใบครามหมักธรรมชาติที่สกัดด้วยน้ำ



รูปที่ 5 FTIR spectra ของสารสกัดใบครามหมักด้วยไอโซเลต 9 ที่สกัดด้วยน้ำ

วิจารณ์ผลการวิจัย

สารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติและสารสกัดใบครามหมักด้วยแบคทีเรียไอโซเลตที่ 9 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *A. hydrophila*, *S. agalactiae* และ *B. cereus* รวมถึงยีสต์ก่อโรคคือ *C. albicans* และมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งควรจะมีการศึกษาต่อไปในเรื่องฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคและการบ่งชี้ชนิดของไอโซเลตที่ 9 โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล รวมทั้งการนำสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติและสารสกัดใบครามหมักด้วยไอโซเลตที่ 9 ไปใช้ในการบำบัดโรคปลาที่เกิดจากเชื้อ *A. hydrophila* หรือเชื้อ *S. agalactiae* เนื่องจากเป็นเชื้อก่อโรคปลาที่ทำความเสียหายเป็นอย่างมากแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงปลา ได้มีการศึกษาหาวิธีการควบคุมโรคแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในปลาที่เป็นโรค เช่น วิธีการใช้แบคทีเรียโอเฟจ ควบคุมเชื้อก่อโรคปลาชนิด *A. hydrophila* (ตระหนัก และคณะ 2560) และได้มีการแยกเชื้อ *S. agalactiae* จากปลานิลที่เป็นโรค (ศยามล และคณะ, 2562) การศึกษาการนำสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติไปใช้ในการรักษาโรคปลาที่เกิดจากเชื้อ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* จึงเป็นแนวทางเลือกในการลดต้นทุนในการเลี้ยงปลาและป้องกันอันตรายจากยาปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อปลาและเชื้อก่อโรคด้านยาปฏิชีวนะ เนื่องจากสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติ สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* โดยมีค่า MIC 781.25 µg/ml เมื่อนำมาทดสอบหาค่าเขตการยับยั้ง พบว่าที่ความเข้มข้น 30 60 และ 120 mg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* มีค่า 8.2 9.6 และ 14.2 mm ต่ำกว่าสารสกัดใบครามหมักด้วยไอโซเลตที่ 9 มีค่า 9.1 13.3 และ 17.8 mm ส่วนเชื้อ *S. agalactiae* ถูกยับยั้งการเจริญด้วยสารสกัดใบคราม

หมักตามธรรมชาติและสารสกัดใบครามหมักด้วยไอโซเลตที่ 9 มีค่า MIC 3,125 และ 1,562.5 µg/ml ทั้งสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติและสารสกัดใบครามหมักด้วยไอโซเลตที่ 9 มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระมีค่า 92.83 ± 0.04 µg TE/g และ 91.58 ± 0.04 µg TE/g ด้วยวิธี ABTS assay ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าจากสารสกัดใบครามแก่และใบครามอ่อนสกัดด้วยน้ำ (water extract) มีค่า 81.24 ± 0.3 และ 75.93 ± 0.3 µmol TE/g DW (Kim et al., 2012) แต่มีค่าต่ำกว่าค่าจากสารสกัดใบครามแก่และใบครามอ่อน ซึ่งสกัดด้วย methanol : น้ำ (1:1) ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 24 h ซึ่งมีค่า 185.46 ± 9.1 และ 134.43 ± 6.6 µmol TE/g DW ตามลำดับ (Jang et al., 2012)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในใบครามที่ทำให้มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคและมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระขึ้นกับชนิดของคราม วิธีสกัด และเวลาที่ใช้ เช่น พบสาร indirubin tryptanthrin polyphenols และ flavonoids ในสารสกัดใบคราม *Polygonum tinctorium* Lour ที่ต้มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 24 h จากนั้นจึงสกัดด้วย methanol (Park et al., 2014) พบสาร polyphenols flavonoids และ flavonols ในสารสกัดใบครามแก่และใบครามอ่อน ซึ่งสกัดด้วย methanol : น้ำ (1:1) ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 24 h (Jang et al., 2012) และ พบสาร polyphenols flavonoids flavonols ascorbic acid และ anthocyanin ในสารสกัดใบครามแก่และใบครามอ่อน ซึ่งสกัดด้วยน้ำในสัดส่วนต่างกัน แต่ในสารสกัดใบครามแก่จะไม่พบ anthocyanin (Kim et al., 2012) พบสาร flavonoids saponin tannin quinon steroid/terpenoid และ phenols ในผงใบครามแห้ง *Indigofera tinctoria* Linn ที่สกัดด้วย methanol (Renukadevi and

Sultana, 2011) จึงคาดว่าสารหลักที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูล-อิสระในสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติและสารสกัดใบครามหมักด้วยไฮโซเลตที่ 9 อาจเป็นสาร polyphenols และ flavonoids

FTIR Spectra ของสารจากใบคราม *Indigfera tinctoria* Linn ที่หมักตามธรรมชาติ พบ 4 peak ที่ 33331.78 2122.47 1838.47 และ 663.48 cm^{-1} ส่วน FTIR Spectra ของสารจากใบครามหมักด้วยไฮโซเลตที่ 9 พบ 4 peak ที่ 3332.81 2128.80 1636.35 และ 664.11 cm^{-1} ซึ่งแตกต่างจาก FTIR Spectra ของใบครามแก่ *Polygonum tinctorium* Ait ที่สกัดด้วยน้ำ พบ 7 peak ที่ 3354.91 2917.92 2160.46 1977.34 1611.10 1369.71 และ 1232.37 cm^{-1} และของใบครามอ่อน ซึ่งพบ 8 peak ที่ 3275.84 2934.57 1602.46 1515.38 1378.03 1323.93 1024.28 และ 870.29 cm^{-1} (Kim et al., 2012) ซึ่งจำนวน peak ของ FTIR Spectra ของสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติและสารสกัดใบครามหมักด้วยไฮโซเลตที่ 9 มีจำนวนน้อยกว่าใบครามไม่หมัก เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักอาจใช้สารที่พบในใบครามเป็นแหล่งอาหารในการเจริญ ทำให้สารบางอย่างมีปริมาณลดลงหรือหายไป หรือเปลี่ยนโครงสร้างจากเดิม จึงเป็นที่น่าสนใจหากจะใช้วิธี microbial transformation กับพืชสมุนไพรเพื่อหาสารใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ หรือสามารถต้านอนุมูลอิสระ

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติ สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. hydrophila* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 781.25 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อนำมาทดสอบหาค่าเขตการยับยั้งที่ความเข้มข้น 30 60 และ 120 mg/ml พบว่าสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติและสารสกัดใบครามหมักด้วยไฮโซเลตที่ 9 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. Hydrophila*, *S. agalactiae* และ *B. cereus* ส่วนการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบครามหมักตามธรรมชาติและสารสกัดใบครามหมักด้วยไฮโซเลตที่ 9 มีค่า $92.83 \pm 0.04 \mu\text{g TE/g}$ และ $91.58 \pm 0.04 \mu\text{g TE/g}$ ตามลำดับ ส่วนผลของ FTIR Spectra ของสารสกัดจากใบครามหมักตามธรรมชาติ พบ 4 peak ที่ 33331.78 2122.47 1838.47 และ 663.48 cm^{-1} และสารสกัดใบครามหมักด้วยไฮโซเลตที่ 9 พบ 4 peak ที่ 3332.81 2128.80 1636.35 และ 664.11 cm^{-1} ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น และสาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ คุณศักดิ์สิทธิ์ สุวรรณ นักวิทยาศาสตร์ ประจำเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และคุณพิมพ์ภัทร ฉันทวรศักดิ์ ที่ช่วยทำให้งานวิจัยนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- ตระหนัก สมندر เกศินี จันทรโสภณ และเสรี จันทรโสภณ. (2560). การคัดแยกและใช้แบคทีเรียโอเพิลยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ในปลานิล. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง 11(2): 60-69.
- ศยามล รักศรี รัชต์ ชัดติยะ ศุภรัตน์ บุญยาดรา และ ภูิก วงศ์เสถียร. (2562). การติดเชื้อปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ด้วย *Streptococcus agalactiae* โดยวิธีการให้ทางจมูกและเหงือก. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง 13(2): 81-90.
- Jang, H. G., Heo, B. G., Park, Y. S., Namiesnik, J., Katrick, E., Vearasilp, K., Trakhtenberg, S. and Gorinstein, S. (2012). Chemical composition, antioxidant and anticancer effects of the seeds and leaves of indigo plant. Applied Biochemistry and Biotechnology 167(7): 1986-2004.
- Kim, K. S., Hwang, W. G., Jang, H. G., Heo, B. G., Suhaj, M., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Jastrzebski, Z., Tashma, Z. and Gorinstein, S. (2012). Assessment of indigo (*Polygonum tinctorium* Ait.) water extracts' bioactive compounds and their antioxidant and antiproliferative activities. Food Science and Technology 46(2): 500-510.
- Leite, S. P., Vieira, J. R. C., Medeiros, P. L., Leite, R. M. P., Lima, V. L. M., Xavier, H. S. and Lima, E. O. (2006). Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 3(2): 261-265.
- Lin, C. W., Tsai, F. J., Tsai, C. H., Lai, C. C., Wan, L., Ho, T. Y., Hsieh, C. C., and Chao, P. D. (2005). Anti-SARS coronavirus 3C-like protease effects of *Isatis indigotica* root and plant-derived phenolic compounds. Antiviral Research 68(1): 36-42.
- Mann, C. M. and Markham, J. L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oil. Journal of Applied Microbiology 84(4): 538-544.

- Park, Y. J., Shin, C. S., Kim, B. E., Cheon, G. Y., Bae, J. H., Ku, Y. G., Park, S. M., Heo, B. G., Kim, D. G., Cho, J. Y. and Gorinstein, S. (2014). Antioxidant and binding properties of methanol extracts from indigo plant leaves. *Chemical Papers* 68(10): 1421–1427.
- Qin, G. W. and Xu, R. S. (1998). Recent advances on bioactive natural products from Chinese medicinal plants. *Medicinal Research Reviews* 18(6): 375-382.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying in improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biology and Medicine* 26(9-10): 1231-1237.
- Renukadevi, K. P. and Sultana, S. S. (2011). Determination of antibacterial, antioxidant and cytotoxicity effect of *Indigofera tinctoria* on lung cancer line NCI- h69. *International Journal of Pharmacology* 7(3): 356-362.
- Swaminathan, C. (2018). Phytochemical analysis and antibacterial and antioxidant properties of *Indigofera tinctoria* L. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 11(6): 136-138.
- Wu, X. Y., Qin, G. W., Cheung, K. K. and Cheng, K. F. (1997). New alkaloids from *Isatis indigotica*. *Tetrahedron* 53(39): 13323-13328.

