ประสิทธิผลของเจลล้างมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวแดง ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

EFFECT OF HAND CLEANSING GEL MIXED THE CRUDE EXTRACT OF *NYMPHAEA LOTUS* L. IN INHIBITING PATHOGENIC BACTERIA

พัชราภรณ์ ไชยศรี[1*] วิชิต ไชยเวศ[2] ชาคริต วังคะออม[3] และนงค์ลักษณ์ เหลาพรม[4]

Patcharaporn Chaisri[1*] Wichit Chaiwes[2] Charkrit Wangka-orm[3] and Nonglak Laoprom[4]

[1]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

[2] คณะวิทยาศาสตร์การกีฬาและสุขภาพ สถาบันการพลศึกษา วิทยาเขตอุดรธานี

[3]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

[4]คณะวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร

*corresponding author e-mail: patcharapornch@gmail.com

(Received: 26 March 2019 ; Revised: 26 April 2019 ; Accepted: 29 September 2019)

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิผลของเจลล้างมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวแดงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ทำการสกัดสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวแดงด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอธิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำ ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. Faecalis E. Coli* ATCC 25922 *K. Pneumonia P. aeruginosa* ATCC 27853 *S. typhimurium, S. aureus* ATCC 29213 *S. epidermidis* ATCC 35984 และ *V. cholerae* โดยวิธี Agar well diffusion หรือวิธีเจาะหลุมบนวุ้น ทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดในแต่ละตัวทำละลาย พบว่า ในชั้นของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากกลีบดอก และสารสกัดเฮกเซนจากเกสรบัวแดงมีค่าในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่มระบบทางเดินอาหารมากที่สุด อย่างไรก็ตามจากการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเจลล้างมือที่ผสมสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากกลีบดอกมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *E. coli* ATCC 25922 *S. epidermidis* ATCC 35984 *V. cholerae* และ *S. aureus* ATCC 29213 และส่วนผสมสารสกัด เฮกเซนจากเกสรแดง สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 3 สายพันธุ์ คือ *E. Coli* ATCC 25922 *S. epidermidis* ATCC 35984 และ *V. cholerae* แต่ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 29213 ได้ ผลที่ได้แสดงให้เห็นศักยภาพที่สำคัญในการยับยั้ง

เชื้อแบคทีเรียของสารสกัดบัวแดงและสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันโรคติดเชื้อในระบบต่างๆ ของร่างกายได้

คำสำคัญ: เจลล้างมือ สารสกัดบัวแดง การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

Abstract

The objectives of this research were to determine the antimicrobial activity of hand cleansing gel mixed with water lily (*Nymphaea lotus L.*) extract. Petal and pollen of *Nymphaea lotus L.* were extracted with serial different solvent: hexane, ethyl acetate, methanol and water. Antibacterial activity of crude extracts from petals and pollen were preliminarily examined against bacteria using *E.faecalis, E.Coli* ATCC 25922 *K. Pneumonia P. Aeruginosa* ATCC 27853 *S. typhimurium, S. aureus* ATCC 29213 *S. epidermidis* ATCC 35984 and *V. cholerae* by agar well diffusion method. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) were tested by using broth dilution method. The ethyl acetate extracts from petals and hexane extracts from pollen were the best to inhibit gastrointestinal bacteria. However, hand cleansing gel mixed the ethyl acetate extracts from petals inhibited all 4 strains bacteria; *E. Coli* ATCC 25922 *S. epidermidis* ATCC 35984 *V. cholerae* and *S. aureus* ATCC 29213. Hexane extracts from pollen mixed hand cleansing gel only inhibited *E. Coli* ATCC 25922 *S. epidermidis* ATCC 35984 and *V. cholerae* but it not found inhibited *S. aureus* ATCC 29213. The results of this study revealed that the potential uses of the extracts of native medicinal plants can develop to hand cleansing gel for inhibiting pathogenic bacteria and uses as prevention for bacterial infections.

Keywords: Hand cleansing gel, *Nymphaea lotus L.* Extracts, Antibacterial activity

บทนำ

ในปัจจุบันมีเชื้อจุลินทรีย์ก่อให้เกิดโรคมากมาย พบว่า การแพร่กระจายจากการสัมผัส ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคระบบทางเดินอาหาร หรือโรคระบบทางเดินหายใจ (นิตยาจาร และคณะ, 2546) โรคต่างๆ เหล่านี้นอกจากจะก่อให้เกิดปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อภาพรวมทางเศรษฐกิจด้วย การป้องกันเชื้อโรคแพร่เข้าสู่ร่างกายจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น ซึ่งวิธีการป้องกันการสัมผัสจากเชื้อโรค คือ การล้างมือให้สะอาด ร่วมกับการใช้ผลิตภัณฑ์สบู่

เหลวหรือน้ำยาล้างมือที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายทั่วไปจะมีการเติมสารเคมีที่ช่วยฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งมักมีส่วนผสมของเอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) และไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol) แม้ว่าแอลกอฮอล์จะกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 60–90 โดยน้ำหนัก แต่อาจส่งผลให้เกิดการระคายเคืองหรือแพ้สารเคมีได้ (บวรพงศ์, 2548) อีกทั้งผลิตภัณฑ์ล้างมือส่วนใหญ่ในท้องตลาดมีราคาค่อนข้างสูง ทางคณะผู้วิจัยเล็งเห็นว่าหากมีการนำสารสกัดสมุนไพรมาใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างมือหรือเจลล้างมือจะช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมี ผู้ที่มีผิวแพ้ง่ายสามารถใช้ได้ ลดค่าใช้จ่าย/ต้นทุนในการผลิต และเป็นการเพิ่มมูลค่าสมุนไพรของไทย สารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนได้รับความนิยมมากขึ้นเนื่องจากมีราคาถูกและเป็นสารธรรมชาติจึงมีผลข้างเคียงน้อยกว่าสารสังเคราะห์ (ตรีเพชร, 2552) ทะเลบัวแดงจังหวัดอุดรธานี เป็นทะเลสาบน้ำจืดมีความอุดมสมบูรณ์ในระบบนิเวศวิทยา ที่เป็นแหล่งชมทุ่งบัวแดงตามธรรมชาติที่ใหญ่ที่สุดในประเทศไทย บัวเป็นพืชเศรษฐกิจที่กำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในปัจจุบันและได้มีการนำมาศึกษาวิจัย และพบว่าสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งศัตรูพืช (ปิยะวดี, 2552) จากการศึกษาวิจัยพบสารชนิดต่างๆ ที่มีสรรพคุณในการบำรุงร่างกายหรือนำมาปรุงเป็นยารักษาโรคได้ (Dan-dan et al., 2015)

แต่อย่างไรก็ดียังไม่มีการศึกษาวิจัยเรื่องการพัฒนาของผลิตภัณฑ์เจลล้างมือที่มีส่วนผสมสารสกัดบัวแดงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงได้สนใจนำบัวแดง มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันของกลีบดอกและเกสรของบัวแดง เพื่อพัฒนาเป็นเจลล้างมือที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกลุ่มผู้ที่มีอาการแพ้แอลกอฮอล์ อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาเพื่อเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากธรรมชาติทดแทนสารสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บและเตรียมตัวอย่างบัวแดง

ทำการเก็บตัวอย่างบัวแดง มาทั้งลำต้น จากพื้นที่ทะเลสาบบัวแดงทะเลสาบน้ำจืดขนาดใหญ่ในอำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี นำส่วนที่เป็นกลีบดอกและเกสรมาทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นผึ่งให้แห้งจนถึงหมาดและนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างบัวแดงที่อบแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร (Herbal Grinder HK-08B) เก็บตัวอย่างที่บดแล้วไว้ในตู้ดูดความชื้น

2. การสกัดสารสกัดจากบัวแดง

2.1 การสกัดสารจากบัวแดงโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

ทำการสกัดสารจากกลีบดอกและเกสรบัวแดง โดยใช้อัตราส่วนตัวอย่างบัวแดงต่อปริมาตรน้ำกลั่นเท่ากับ 1:50 กรัมต่อมิลลิลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วย ผ้าขาวบางสะอาด นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ความเร็ว 70 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วนำไปแช่แข็งแบบแห้ง (freeze dry) และชั่งสารสกัดที่ได้ เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การสกัดสารจากบัวแดงโดยใช้เฮกเซน เอธิลอะซิเตต และเมทานอล เป็นตัวทำละลาย

ทำการสกัดสารจากกลีบดอกและเกสรบัวแดง โดยเริ่มสกัดจากตัวทำละลายขั้วน้อยสุดไปขั้วมากสุด (เฮกเซน เอธิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ) โดยอัตราส่วนกลีบดอกและบัวแดงต่อปริมาตรตัวทำละลายอินทรีย์ คือ 1 : 50 กรัมต่อมิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยกระดาษอะลูมิเนียมแล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางสะอาด นำสารสกัดที่ได้ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ส่วนที่ได้เรียกว่าสารสกัดเฮกเซน ส่วนกากที่เหลือนำมาอบให้แห้งที่ตู้อบ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่เหลือจากการผ่านตัวทำละลายอย่างเฮกเซน จากนั้นทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอธิลอะซิเตตและเมทานอล ทำเช่นเดียวกับการสกัดด้วยเฮกเซนจะได้สารสกัดเอธิลอะซิเตตและสารสกัดเมทานอล และชั่งสารสกัดที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์

3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

แบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ ที่ใช้ทดสอบประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมลบ 5 ชนิด ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 *K. Pneumonia* *P. Aeruginosa* ATCC 27853 *S. typhimurium* และ *V. cholerae* และแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด ได้แก่ *E. faecalis S. aureus* ATCC 29213 และ *S.epidermidis* ATCC 35984 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง ธรรมศิริรักษ์ สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากบัวแดง โดยวิธี Agar well diffusion

ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดจากบัวแดง โดยวิธี Agar well diffusion อ้างอิงตามวิธีการของ Cockerill et al. (2012) โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 8 สายพันธุ์ แล้วเจือจางให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland ใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยเชื้อให้ทั่วบนอาหารเพาะเชื้อ Nutrient agar (NA) ทิ้งไว้ประมาณ 5–10 นาที จากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ด้วย cork borer แล้วปิเปตสารสกัดบัวแดงในส่วนของเกสรและกลีบดอกในแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร และทิ้งไว้เป็นเวลา 15–20 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (ทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ จำนวน 3 ซ้ำ) เมื่อครบเวลานำ petri dish มาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (inhibition clear zone) ด้วยเวอร์เนีย บันทึกผลในการทดสอบนี้ใช้ยา gentamycin 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมผลบวก และใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นตัวควบคุมผลลบ

3.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration: MIC) ด้วยวิธี broth dilution และการหาค่าความเข้มข้นในการทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (Minimum bactericidal concentration: MBC) ของสารสกัดบัวแดง

ทำการเจือจางสารสกัดกลีบดอกและเกสรที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2–10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (two–fold serial dilution) จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 well microtiter plate จากนั้นปิเปตเชื้อทดสอบ ความเข้มข้น 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในทุกความเข้มข้น หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นใสในแต่ละหลุม เพื่อยืนยันผล นำ tetrazolium 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 20 ไมโครลิตร ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง การอ่านผลหากไม่มีการเจริญของเชื้อสีของ tetrazolium จะเป็นสีเหลืองซึ่งอ่านความเข้มข้นของสารทดสอบเป็นค่า MIC แต่หากมีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสีของ tetrazolium จะเป็นสีม่วง นำหลอดที่ไม่มีความขุ่นจากการทดสอบค่า MIC โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะสารละลายจากหลุมทดสอบทุกความเข้มข้นของสารสกัดมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ค่า MBC คือไม่มีแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การทดลองนี้ใช้ gentamycin เป็นตัวควบคุมผลบวก และใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นตัวควบคุมผลลบ

4. การเตรียมผลิตภัณฑ์เจลล้างมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวแดง

ทำการผสมคาร์โบพอล 940 จำนวน 0.15 กรัม กวนในน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 123 มิลลิลิตร อย่างน้อย 30 นาที จากนั้นนำสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากกลีบดอกของบัวแดง ความเข้มข้น 75.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือสารสกัดเฮกเซนจากเกสรของบัวแดง ความเข้มข้น 23.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไตรเอทิลลามีน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และโพลีเอธิลีนไกลคอล 5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน น้ำหนักสุดท้ายของเจลที่เตรียมประมาณ 200 กรัม บรรจุใส่ในขวดและเก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. การเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์เจลล้างมือที่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวแดงและผลิตภัณฑ์เจลล้างมือตามท้องตลาด

ในการทดสอบประสิทธิผลเจลล้างมือที่มีส่วนผสมสารสกัดบัวแดงโดยวิธี Agar well diffusion โดยนำเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้เจือจางให้ได้ความขุ่นเท่ากับความเข้มข้น 0.5 McFarland ทำการเกลี่ย (swab) ให้ทั่วบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ด้วยไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ 5–10 นาที เจาะหลุมเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ชั่งน้ำหนักเจลที่เตรียมได้ที่มีส่วนผสมจากสารสกัดสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากกลีบดอกของบัว และสารสกัดเฮกเซนจากเกสรของบัวแดง จำนวน 0.1 กรัม ลงในหลุม ทิ้งไว้ 15–20 นาที นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งด้วยเวอร์เนีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ชุดควบคุมผลบวก คือ เจลล้างมือแอลกอฮอล์ที่วางจำหน่ายในท้องตลาด

6. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากบัวแดง โดยวิธี Agar well diffusion การหาค่า MIC และ MBC ที่ทำการทดสอบวิธีละ 3 ครั้ง (n = 3) มาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดหยาบจากกลีบดอกและเกสรของบัวแดง

จากการสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวแดงในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด พบว่ากลีบดอกและเกสรของบัวแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ ให้ปริมาณสารสกัดสูงที่สุด ร้อยละ 35 และ 28 ตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล เฮกเซน และเอธิลอะซิเตต ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 ลักษณะของสารสกัดจากส่วนของกลีบดอกและเกสรบัวแดงที่ได้จะมีลักษณะคล้ายกัน คือ เป็นผลึกเหนียวสีน้ำตาล

ตารางที่ 1 ปริมาณร้อยละของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวแดงที่สกัดด้วยน้ำและสกัดลำดับส่วนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ลักษณะของสารสกัด	น้ำหนักสารที่ได้ (g)	% yield (w/w)
เฮกเซน	กลีบดอก	ผลึกเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	2.61	4.34
	เกสร	ผลึกเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	2.67	4.46
เอธิลอะซิเตต	กลีบดอก	ผลึกเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	1.61	3.14
	เกสร	ผงละเอียดสีน้ำตาลอ่อน	1.05	2.09
เมทานอล	กลีบดอก	ผลึกเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	14.80	31.32
	เกสร	ผงละเอียดสีน้ำตาลแดง	10.90	22.60
น้ำ	กลีบดอก	ผลึกเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	21.06	35.07
	เกสร	ผลึกเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	16.99	28.32

2. ผลของสารสกัดบัวแดงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion

สารสกัดเฮกเซน และเอธิลอะซิเตต มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียมากที่สุดถึง 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. faecalis, E. Coli* ATCC 25922 *K. pneumoniae P. aeruginosa* ATCC 27853 *S. aureus* ATCC 29213 *S. epidermidis* และรองลงมา คือ สารสกัดเมทานอล โดยยับยั้งได้ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. Coli* ATCC 25922 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S. aureus* ATCC 29213 *S. epidermidis* ATCC 35984 และ *V. Cholerae* ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดบัวแดงด้วยวิธี Agar well diffusion

สารสกัด	แบคทีเรียทดสอบ	ขนาดโซนยับยั้ง (เซนติเมตร)			
10 mg/ml		เฮกเซน	เอธิลอะซีเตท	เมทานอล	น้ำ
กลีบดอก	*E. coli*	1.13 ± 0.32	1.05± 0.45	N.D.	N.D.
เกสร	ATCC 25922	1.60 ± 0.46	1.57 ± 0.15	1.40 ± 0.17	1.10 ± 0.10
Gentamycin		1.03 ± 0.45			
DMSO		N.D.			
กลีบดอก	*S. aureus*	1.70 ± 0.20	1.00 ± 0.00	1.07 ± 0.30	N.D.
เกสร	ATCC 29213	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Gentamycin		2.01 ± 0.12			
DMSO		N.D.			

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สารสกัด	แบคทีเรียทดสอบ	ขนาดโซนยับยั้ง (เซนติเมตร)			
10 mg/ml		เฮกเซน	เอธิลอะซีเตท	เมทานอล	น้ำ
กลีบดอก	*S. epidermidis*	0.97 ± 0.06	0.93 ± 0.06	0.70 ± 0.21	0.69 ± 0.04
เกสร	ATCC 35984	1.17 ± 0.15	1.13 ± 0.21	1.30 ± 0.17	N.D.
Gentamycin		1.57 ± 0.06			
DMSO		N.D.			
กลีบดอก	*V. cholerae*	1.20 ± 0.10	0.93 ± 0.58	0.83 ± 0.26	N.D.
เกสร		N.D.	1.17 ± 0.15	N.D.	N.D.
Gentamycin		2.37 ± 0.15			
DMSO		N.D.			
กลีบดอก	*S. typhimurium*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
เกสร		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Gentamycin		1.07 ± 0.30			
DMSO		N.D.			
กลีบดอก	*P. aeruginosa*	1.83 ± 0.06	1.40 ± 0.10	1.53 ± 0.21	0.77 ± 0.14
เกสร	ATCC 27853	1.47 ± 0.06	1.23 ± 0.25	1.40 ± 0.20	N.D.
Gentamycin		1.56 ± 0.12			
DMSO		N.D.			
กลีบดอก	*K. pneumoniae*	0.93 ± 0.25	0.73 ± 0.10	N.D.	N.D.
เกสร		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Gentamycin		1.77 ± 0.06			
DMSO		N.D.			
กลีบดอก	*E. faecalis*	1.30 ± 0.10	1.40 ± 0.69	N.D.	N.D.
เกสร		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Gentamycin		2.53 ± 0.06			
DMSO		N.D.			

หมายเหตุ N.D. = ไม่มีความเข้มข้นใดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้

3. ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรียก่อโรค ของสารสกัดบัวแดง

การทดสอบสารสกัดจากกลีบดอกของบัวแดงด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และเอธิลอะซิเตต สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 *S.aureus* ATCC 29213 *S. epidermidis* ATCC 35984 และ *V. cholerae* ยังพบอีกว่า สารสกัดจากกลีบดอกของบัวแดงด้วยตัวทำละลายเมทานอล

สามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* และ *V. cholerae* สารสกัดกลีบดอกบัวแดงด้วยตัวทำละลายน้ำ สามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้

การทดสอบสารสกัดจากเกสรของบัวแดงด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และเอธิลอะซิเตต สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 *V. cholerae* และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 สารสกัดจากเกสรของบัวแดงด้วยตัวทำละลายเมทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *E. Coli* ATCC 25922 และ *S. epidermidis* ATCC 35984 และสารสกัดเกสรบัวแดงด้วยตัวทำละลายน้ำไม่สามารถยับยั้งเชื้อที่ทดสอบ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดบัวแดงในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดบัวแดงในการฆ่าแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดบัวแดง

แบคทีเรียทดสอบ	ตัวทำละลาย	MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		MBC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
		กลีบดอก	เกสร	กลีบดอก	เกสร
E. coli	เฮกเซน	0.66	<0.02	N.D.	N.D.
ATCC 25922	เอธิลอะซีเตท	0.16	<0.02	N.D.	N.D.
	เมทานอล	N.D.	0.17	N.D.	N.D.
	น้ำ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
S. aureus	เฮกเซน	0.04	N.D.	N.D.	N.D.
ATCC 29213	เอธิลอะซีเตท	0.07	N.D.	N.D.	N.D.
	เมทานอล	N.D.	N.D,	N.D.	N.D.
	น้ำ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
S. epidermidis	เฮกเซน	0.04	N.D.	N.D.	N.D.
ATCC 35984	เอธิลอะซีเตท	002	N.D.	N.D.	N.D.
	เมทานอล	0.04	<0.02	N.D.	N.D.
	น้ำ	0.07	N.D.	N.D.	N.D.
V. cholerae	เฮกเซน	<0.04	0.04	N.D.	N.D.
	เอธิลอะซีเตท	0.02	N.D.	N.D.	N.D.
	เมทานอล	0.02	N.D.	N.D.	N.D.
	น้ำ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
S. typhimurium	เฮกเซน	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	เอธิลอะซีเตท	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	เมทานอล	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	น้ำ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

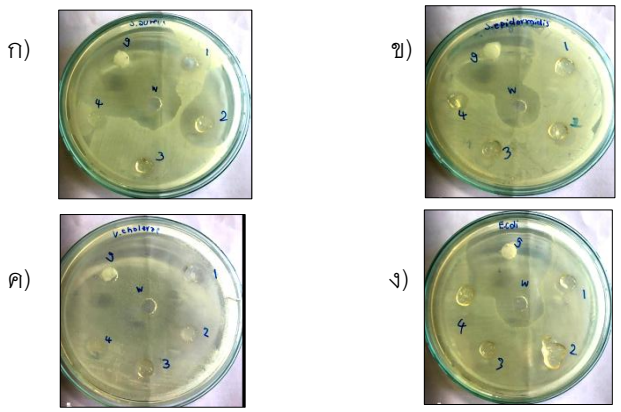
ตารางที่ 3 (ต่อ)

แบคทีเรียทดสอบ	ตัวทำละลาย	MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		MBC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
		กลีบดอก	เกสร	กลีบดอก	เกสร
P. aeruginosa	เฮกเซน	N.D.	1.25	N.D.	N.D.
ATCC 27853	เอธิลอะซีเตท	0.04	N.D.	N.D.	N.D.
	เมทานอล	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	น้ำ	1.19	N.D.	N.D.	N.D.
*K. pneumonia**e***	เฮกเซน	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	เอธิลอะซีเตท	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	เมทานอล	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	น้ำ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
E. faecalis	เฮกเซน	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	เอธิลอะซีเตท	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	เมทานอล	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	น้ำ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

หมายเหตุ N.D. = ไม่มีความเข้มข้นใดที่สามารถฆ่าเชื้อได้

4. ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของเจลล้างมือที่ผสมสารสกัดบัวแดง

จากการหาค่า MIC และ MBC พบว่า สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากกลีบดอกของบัวแดงและสารสกัดเฮกเซนจากเกสรของบัวแดงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 4 ชนิด ได้แก่ *E.coli* ATCC 25922 *S. aureus* ATCC 29213 *S. epidermidis* ATCC 35984 และ *V. cholerae* จึงนำมาเป็นสารสกัดดังกล่าวเป็นส่วนผสมในเจลล้างมือ โดยเพิ่มเข้มข้น จากค่า MIC ที่คำนวณได้คิดเป็น 5 เท่า จากผลการทดสอบ พบว่า ส่วนผสมของกลีบดอกมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด และเจลล้างมือที่มีส่วนผสมของเกสรสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 3 ชนิด คือ *E. Coli* ATCC 25922 *S. epidermidis* ATCC 35984 และ *V. cholerae* แต่ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 29213 ได้ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะการยับยั้งเชื้อ ก) *E. Coli* ATCC 25922 ข) *S. aureus* ATCC 29213 ค) *S. epidermidis* ATCC 35984 และ ง) *V. Cholerea* ของสารทดสอบดังนี้ โดยมีตัวอักษรภาษาอังกฤษและตัวเลขแทนความหมาย ดังนี้

W = เจลตามท้องตลาด ชนิดที่ 1

G = เจลตามท้องตลาด ชนิดที่ 2

1 = เจลล้างมือที่มีส่วนผสมสารสกัดอธิลอะซิเตตจากกลีบดอก ปริมาณ 4.1 mg

2 = เจลล้างมือที่มีส่วนผสมสารสกัดอธิลอะซิเตตจากกลีบดอก ปริมาณ 8.2 mg

3 = เจลล้างมือที่มีส่วนผสมสารสกัดเฮกเซนจากเกสร ปริมาณ 4.1 mg

4 = เจลล้างมือที่มีส่วนผสมสารสกัดเฮกเซนจากเกสร ปริมาณ 8.2 mg

อภิปรายผล

สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำให้ปริมาณสารสกัด (% Yield) สูงที่สุด แสดงให้เห็นว่าในกลีบดอกและเกสรของบัวแดงน่าจะมีสารที่มีขั้วมากกว่าสารที่ไม่มีขั้ว และพบว่า สารสกัดน้ำของกลีบดอกให้ปริมาณสารสกัดที่สูงที่สุด สารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวแดงมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่างกันเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน การศึกษานี้ พบว่า สารสกัดกลีบดอกด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและเอธิลอะซิเตตมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียมากที่สุดถึง 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. faecalis* *E. coli* ATCC 25922 *K. Pneumonia* *P. Aeruginosa* ATCC 27853 *S. aureus* ATCC 29213 *S. epidermidis* ATCC 35984 และ *V. cholerae* แสดงให้เห็นว่า กลุ่มสารในกลีบดอกและเกสรของบัวแดงที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียน่าจะเป็นกลุ่มสารที่ไม่มีขั้วมากกว่ากลุ่มสารที่มีขั้ว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของปิยะวดี และคณะ (2552) พบว่า การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.aureus* จากใบบัวหลงสัตบงกชในชั้นของเฮกเซนให้ผลยับยั้งเชื้อดีที่สุด และพบว่า สารสกัดจากบัวที่มีฤทธิ์สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบส่วนมากมีความต้านทานสูงกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากยังพบการสกัดใบบัว ดอกบัว และเกสร

บัวด้วยตัวทำละลายเฮกเซน พบว่า มี beta–sitosterolc หลังจากนั้นตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทน–เอทานอล ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกใสไม่มีสี มีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 134–136 องศาเซลเซียส และสารที่พบมากที่สุดจะเป็น phenolic flavonoids และ alkaloid

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่า สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากกลีบของบัวแดง และสารสกัดเมทานอลจากเกสรของบัวแดง สามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 35984 ได้ด้วยค่า MIC น้อยที่สุด โดยเชื้อนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก จากข้อมูลข้างต้นทำให้สามารถยืนยันได้ว่าสารสกัดบัวแดง สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ (Wen–Rui et.al. 2014) สอดคล้องกับการทดสอบของ กัญญา และพรพิมล (2558) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากกระเทียม พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้เช่นกันกับพลูคาว ซึ่งสารประกอบส่วนใหญ่ที่พบในกระเทียมนั้นเป็นสารอินทรีย์กำมะถัน ได้แก่ allin allicin และ dially disulfide และมีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบอีกด้วย

จะเห็นได้ว่าเมื่อผสมสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากกลีบดอกของบัวแดงในเจลล้างมือ พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้มากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดทั่วไปตามโรงพยาบาล พบว่า สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากกลีบดอก สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้เช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์เจลทำความสะอาดที่ใช้ทั่วไปตามโรงพยาบาล นอกจากนั้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวแดงมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอาจจะเนื่องมาจากสารสกัดมีสารประกอบเป็นกลุ่มโพลีฟีนอล ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด (บังอร และศศิลักษณ์, 2549) สารประกอบกลุ่มฟีนอลจะทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (บุหรัน, 2545) แบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อสารประกอบโพลีฟีนอล ทำให้สารสกัดของบัวแดงสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ รองเดช และจุลจิตร์ (2556) พบว่า สารสกัดยี่หร่ามีสารประกอบฟีนอลอยู่มาก สารประกอบฟีนอลจะออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ทำให้แบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อสารสกัดยี่หร่ามากกว่าสารสกัดของพืชอื่นๆ โดยมีผลในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพและเกิดการรั่วไหลของสารมีผลทำให้แบคทีเรียถูกทำลาย ดังนั้น จึงสามารถกล่าวได้ว่าสารกลุ่มพอลีฟีนอลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย น่าจะอยู่ในตัวทำละลายเอธิลอะซีเตต หรือชั้นของเฮกเซนในการสกัดบัวแดง นั่นเอง

สรุปผลการวิจัย

จากการสกัดกลีบและเกสรบัวแดงด้วยเฮกเซน เอธิลอะซีเตต เมทานอล และน้ำได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นผลึกเหนียวสีน้ำตาล เมื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยการหาค่า MIC พบว่า สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากกลีบดอกและสารสกัดเฮกเซนจากเกสรบัวแดงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด และเมื่อนำสารสกัดทั้ง 2 ส่วนดังกล่าวมาเป็นส่วนผสมในเจลล้างมือ พบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เช่นเดียวกันกับเจลที่มีในท้องตลาด จึงอาจกล่าวได้ว่าสามารถใช้สารสกัดทดแทนแอลกอฮอล์ในผลิตภัณฑ์เจลล้างมือที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง ธรรมศิริรักษ์ สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย

เอกสารอ้างอิง

กัญญา แปลงโฉม และพรพิมล กาญจนวาศ. (2558). ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากพลูคาว กระเทียม และกระวาน ด้วยเอทานอล. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ,** 1(2), 56–65.

ตรีเพชร กาญจนภูมิ. (2552). **เคมีของสมุนไพร.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิตยาจาร กิตติเดชา และคณะ. (2546). **การป้องกันการติดเชื้อและควบคุมการแพร่กระจายเชื้อ** *Isolation precautions.* กรุงเทพฯ: องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์.

บวรพงศ์ พรชุติ. (2548). เจลล้างมือ. **มหา(นคร)สาร**, 13(4), 24–28.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. (2545). **การศึกษาฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระในผักช้าเลือด.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท (สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์) มหาวิทยาลัยนเรศวร.

บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ์. (2549). **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน.** โครงการพิเศษปริญญาตรี (ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล.

ปิยะวดี เจริญวัฒนะ สุมนาปานสมุทร ดำรงคงสวัสดิ์ และอำนวย เพชรประไพ. (2552). **การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากบัวหลวง.** รายงานวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

รองเดช ตั้งตระการพงษ์ และจุลจิตร์ ตั้งตระการพงษ์. (2556). ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดยี่หร่า. **วารสารวิทยาศาสตร์ แห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี,** 13(2), 40–46.

Cockerill FR, Hindler JA, Wikler MA, Patel JB, Alder J, Powell M, et al. (2012). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard–eleventh edition. **CLSI document M02–A11,** 32(3), 1–31.

Dan–Dan Yin, Ru–Yu Yuan, Qian Wu, Shan–Shan Li, Shuai Shao, *et al.* (2015). Assessment of flavonoids and volatile compounds in tea infusions of water lily flowers and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, 187(6), 20–28.

Wen–Rui D, Liang–Liang Z, Sai–Sai F, Jian–Guo X. (2014). Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Amomum kravanh*. **J Food Prot,** 77(10), 1740–1746.