ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกอลล์จากหญ้าตดหมา

IN VITRO ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF GALL EXTRACTS FROM *PAEDERIA PILIFERA*

ภรภัทร สำอางค์[1*] อนุชิต ภานุมาสวิวัฒน์[2] และรำไพ โกฎสืบ[1]

Pornpat Sam-ang[1*], Anuchit Phanumartwiwath[2] and Rampai Kodsueb[1]

บทคัดย่อ

หญ้าตดหมา (*Paederia pilifera* Hook.f.) เป็นไม้เลื้อยเนื้ออ่อน ลำต้นสีเขียว ใบเดี่ยว อยู่ในวงศ์ Rubiaceae มีสรรพคุณช่วยระบบย่อยอาหาร แก้ไข้ แก้อาการท้องอืดท้องเฟ้อ หญ้าตดหมาบางต้นมีลักษณะบวมเป็นปุ่มปมคล้ายกับเนื้องอกที่เกิดจากการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อภายนอกโดยเฉพาะส่วนบริเวณกิ่งอ่อน เรียกว่า กอลล์ (gall) ในงานวิจัยนี้ได้มีการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดกอลล์จากหญ้าตดหมาซึ่งเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน โดยการสกัดร้อน (Soxhlet extraction) ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล ตามลำดับ ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และวิธี ferric reducing ability power (FRAP) พร้อมวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากนั้นทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี paper disc diffusion แล้วทำการทดสอบต่อเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (ค่า MIC และ MBC) จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนออกฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความสามารถในการรีดิวส์สูงที่สุด ซึ่งมีค่า FRAP เท่ากับ 0.0397 มิลลิโมลสมมูลของ Fe^{2+} ต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 กรัม และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดไดคลอโรมีเทนมีค่าเท่ากับ 81.04±0.016 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนและสารสกัดเฮกเซนออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* โดยสารสกัดทั้งสองมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

[1]Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Muang District, Phitsanulok Province 65000

[2]วิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10330

[2]College of Public Health Sciences, Chulalongkorn University, Pathum Wan District, Bangkok 10330

*corresponding author e-mail: pornpat335@gmail.com

Received: 6 January 2020; Revised: 24 January 2020; Accepted: 8 March 2020

แบคทีเรีย (MBC) เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนและสารสกัดเฮกเซนจากกอลล์ของหญ้าตดหมานั้นมีศักยภาพที่สามารถพัฒนาเป็นสมุนไพรเสริมรักษาโรคที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

คำสำคัญ: หญ้าตดหมา สารสกัดกอลล์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

Abstract

Maile pilain (*Paederia pilifera* Hook.f.) is a climbing softwood, green stem, single leaves belonging to the family Rubiaceae. It has many medicinal properties to help food digestive system, to treat fever and relief of flatulence. Some samples of *P. pilifera* appeared as knots are similar to tumors caused by the growth of the external tissues, particularly the young branches which is called a gall. This research was to study bioactivities of gall extracts from *P. pilifera,* which is new knowledge and has not been reported before, by Soxhlet extraction using hexane, dichloromethane, ethyl acetate and ethanol as solvents, respectively on antioxidant activities by DPPH and FRAP assays and determination of total phenolic contents (TPCs) by Folin-Ciocalteu method. Then, the antibacterial activity against the growth of two pathogenic bacteria, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus,* was studied using the paper disc diffusion assay then further examined for determination of minimum inhibition concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The result showed that the crude dichloromethane extract exhibited the relatively highest antioxidant activity with IC_{50} value of 2.05 mg/mL and its ferric reducing ability of 0.0397 mmol Fe^{2+}/g extract. The crude dichloromethane extract also showed the relatively highest amount of TPCs at 81.04±0.016 mg GAE/g extract. Moreover, the crude dichloromethane extract and crude hexane extract inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* with MBC values of 50 mg/mL of both crude extracts. This finding indicated that the crude dichloromethane and crude hexane gall extracts from *P. pilifera* have potential to be able to develop further as a herbal supplement for the therapeutic antimicrobial activities.

Keywords: *Paederia pilifera*, Gall extract, Antioxidant activity, Antibacterial activity

บทนำ

หญ้าตดหมาเป็นไม้เลื้อยเนื้ออ่อน ลำต้นสีเขียว ใบเดี่ยว ขนสั้น มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Paederia pilifera* Hook.f. โดยมีชื่อเรียกแตกต่างกันตามภูมิภาค ภาคกลาง เรียกว่า ตดหมูตดหมา ภาคเหนือ เรียกว่า หญ้าตดหมา ภาคใต้ เรียกว่า ย่านพาโหม และมีชื่อภาษาอังกฤษว่า Maile pilain จัดอยู่ในวงศ์ Rubiaceae (Wagner et al., 1992; Quang et al., 2002) หญ้าตดหมามีสรรพคุณพื้นบ้านและช่วยในการรักษาป้องกันโรคได้หลากหลาย เช่น ส่วนใบช่วยย่อยอาหาร แก้คัน แก้ไข้ แก้ปวดฟัน ส่วนเถาใช้เป็นยาขับพยาธิ แก้ไข้ตัวร้อน และส่วนรากใช้ต้มกับน้ำดื่มแก้อาการท้องอืดท้องเฟ้อ (Cheung et.al., 1985; Tran, 1987; Kapadia et al., 1996) นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของหญ้าตดหมา ได้แก่ สารสกัดจากส่วนใบและลำต้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัส *Herpes simplex* type 1 (HSV 1) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเริม (Tongpenyai, 2001; Kongkathip et al., 2005) สารสกัดเอทานอลส่วนใบมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Helicobactor pylori* และต้านการอักเสบ (Pham et al., 1996; Wang & Huang, 2005) หญ้าตดหมาบางต้น มีลักษณะบวมเป็นปุ่มปมคล้ายกับเนื้องอกโดยเฉพาะส่วนบริเวณกิ่งอ่อน เรียกว่า กอลล์ (gall) โดยมีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ประเภทเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ *Agrobacterium tumefaciens* เข้าไปสู่เนื้อเยื่อของพืช แล้วสร้างสารทุติยภูมิบางชนิดออกมากระตุ้นให้เซลล์บริเวณที่ได้รับเชื้อมีการแบ่งเซลล์มากกว่าปกติทำให้เกิดปุ่มปมดังกล่าว (Lippincott et al., 1975) ในปัจจุบันมีงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกอลล์จากพืชชนิดอื่นที่สำคัญ เช่น สารสกัดกอลล์ของต้นโอ๊ก *Quercus infectoria* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Nagesh et al., 2012) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Fathabad et al., 2015) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา (Vanga et al., 2017) และสารสกัดกอลล์จากสมอไทย *Terminalia chebula* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (Shankara et al., 2012) เป็นต้น แต่ยังไม่มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพจากกอลล์ของพืชชนิดนี้มาก่อน ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงเป็นเหตุให้คณะผู้วิจัยสนใจศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP พร้อมทั้งหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดกอลล์จากหญ้าตดหมาด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาและผลิตสารต้านจุลินทรีย์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างพืช

ทำการเก็บกอลล์ของหญ้าตดหมา ช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2561 จากอำเภอห้างฉัตร จังหวัดลำปาง จากนั้นทำการตรวจสอบและระบุเอกลักษณ์ของพืชโดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา ธนนพคุณ

มีเลข Voucher specimen PSRU1009 และเก็บรักษาไว้ ณ ห้องเก็บรวบรวมพรรณไม้ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

การเตรียมสารสกัดกอลล์

นำกอลล์มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ผึ่งลมที่อุณหภูมิห้องให้แห้ง แล้วบดให้ละเอียด จากนั้นทำการสกัดร้อนโดยวิธี Soxhlet extraction ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล ตามลำดับ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อการสกัดแต่ละตัวทำละลาย นำสารละลายที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) บรรจุสารสกัดหยาบของตัวทำละลายแต่ละชนิดลงในขวดสีชาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 1 (Figure 1) เพื่อใช้สำหรับทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

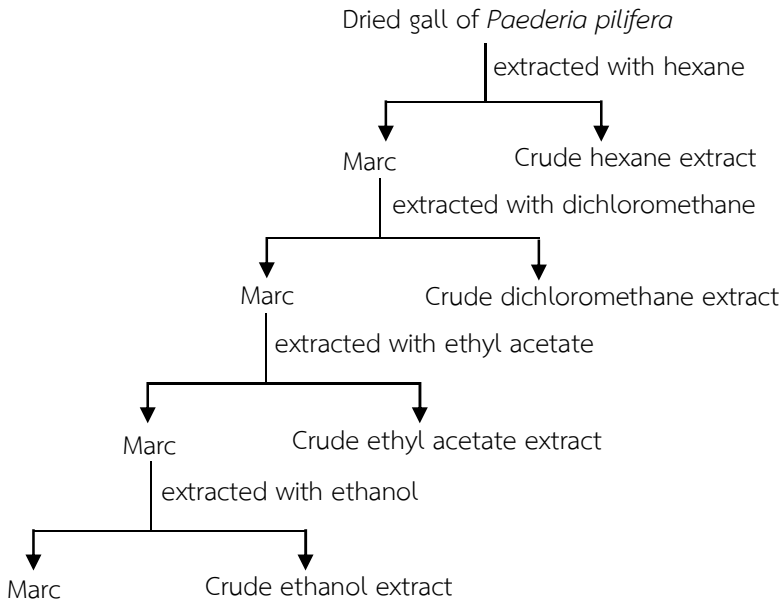

Figure 1 Soxhlet extraction of dried gall of *Paederia pilifera* with different solvents

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Inta et al. (2019) โดยใช้สารบิวทิลเลเตด ไฮดรอกซีโทลูอิน (Butylated hydroxytoluene, BHT) และวิตามินซี (ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน ผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายในเมทานอล) หรือสารสกัดที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน Dimethyl sulfoxide, DMSO) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH 0.3 มิลลิโมลาร์ในเมทานอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่า

การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer จากนั้นคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) จากสูตรดังนี้

$$\% \text{ radical scavenging} = (1-(A_{sample}/A_{control}))*100$$

เมื่อ A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารทดสอบที่ผสมกับ DPPH

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของตัวทำละลายที่ผสมกับ DPPH

คำนวณหาค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ลดลงร้อยละ 50) โดยหาได้จากกราฟระหว่างสารตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นกับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ferric reducing ability power (FRAP)

ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ตามวิธีของ Phengkamsri et al. (2011) ทำการเตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสมสารละลาย 300 มิลลิโมลาร์ อะซิเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer) pH 3.6, 10 มิลลิโมลาร์ ไตรพิริดิวไตรอะซีน (tripyridyltriazine, TPTZ) ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์ เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) อัตราส่วน 10:1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ เตรียมสารสกัดแต่ละตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารสกัดจำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย FRAP reagent 2 มิลลิลิตรที่ผสมกับน้ำ 900 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) คำนวณปริมาณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในรูปมิลลิโมลสมมูลของ Fe^{2+} ต่อกรัมสารสกัดหยาบ (mmol Fe^{2+}/g crude extract)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents)

การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ทำการทดสอบตามวิธีที่ดัดแปลงของ Damsud et al. (2017) ใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน โดยผสมสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับ 10% v/v Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติม 7.5% สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (Gallic acid equivalents, mg GAE/g crude extract)

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (nutrient broth) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำมาเจือจางให้ได้แบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^8 colony forming unit (CFU) ต่อมิลลิลิตร โดยเทียบกับ McFarland 's Standard No. 0.5

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ของสารสกัดด้วยวิธี paper disc diffusion

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยวิธี paper disc diffusion ดัดแปลงจาก Saelee et al. (2018) ใช้ไม้พันสำลีที่ปลอดเชื้อ จุ่มเชื้อที่ใช้ทดสอบที่เตรียมไว้ข้างต้น มาเกลี่ยให้ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton agar (MHA) เตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย จุ่มแผ่นกระดาษกลม (paper disc) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ลงในสารสกัดแล้วทิ้งให้แห้งในอากาศ จากนั้นจึงวางแผ่น paper disc ที่มีสารสกัดลงบนผิวหน้าอาหารที่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบไว้ ใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อและ DMSO เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) และยาปฏิชีวนะ chloramphenicol (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัดบริเวณส่วนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นกระดาษกลมด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ และบันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางเป็นหน่วยมิลลิเมตร

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration, MBC)

เลือกสารสกัดจากตัวทำละลายที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ มาหาค่า MIC โดยวิธี broth dilution ตามวิธีการของ Saelee et al. (2018) และหาค่า MBC โดยวิธี agar dilution ตามวิธีการของ Saelee et al. (2018) โดยนำหลอดที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดจากการหาค่า MIC ไปเพาะเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นค่า MBC

การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าข้อมูลที่วิเคราะห์แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปในการคำนวณทางสถิติ

ผลการวิจัย

การสกัดกอลล์ของหญ้าตดหมาโดยวิธี Soxhlet extraction ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้มีลักษณะเหนียวหนืดสีน้ำตาลเข้ม และมีร้อยละสารสกัดต่อน้ำหนักแห้ง ดังตารางที่ 1 (Table 1) จากการศึกษาพบว่า ตัวทำละลายเอทานอลกับเอทิลอะซิเตตสามารถสกัดสารได้ปริมาณมากและมีค่าร้อยละสารสกัดต่อน้ำหนักแห้งปริมาณใกล้เคียงกัน ในขณะที่ตัวทำละลายเฮกเซนสามารถสกัดสารออกมาได้ปริมาณน้อยที่สุด

Table 1 Appearance and % dry weight of gall crude extracts obtained from *P. pilifera* by Soxhlet extraction using different solvents

Solvents	Appearance of crude extract	Weight of crude extract (g)	% Crude extract/dry weight
Hexane	dark brown viscous	4.13	0.61
Dichloromethane	dark brown viscous	6.23	0.92
Ethyl acetate	dark brown viscous	103.89	15.32
Ethanol	dark brown viscous	113.84	16.79

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดกอลล์จากหญ้าตดหมา

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกอลล์ทั้ง 2 วิธี โดยพบว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดด้วยวิธี DPPH ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.05±0.265 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารสกัดจากตัวทำละลายอื่น ๆ สำหรับวิธี FRAP แสดงผลการทดสอบที่มีความสอดคล้องกับวิธี DPPH โดยมีความสามารถในการรีดิวส์ Fe^{3+} เท่ากับ 0.0397±0.011 มิลลิโมลสมมูลของ Fe^{2+} ต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 กรัม รองลงมาคือ สารสกัดเอทิลอะซิเตต และสารสกัดเฮกเซน ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน สำหรับการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของแต่ละสารสกัดพบว่า สารสกัดไดคลอโรมีเทนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดเท่ากับ 81.04±0.016 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ส่วนสารสกัดอื่น ๆ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในช่วงระหว่าง 42.42 ถึง 59.25 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ดังตารางที่ 2 (Table 2)

Table 2 Total antioxidants and total phenolic compounds of gall crude extracts obtained from *P. pilifera* by Soxhlet extraction using different solvents

Crude extracts	Total antioxidants		Total phenolic compounds
	IC_{50} (mg/mL)	mmol Fe^{2+}/g crude extract	(mg GAE/g crude extract)
Hexane	7.59±0.812[e]	0.0167±0.010[b]	46.93±0.003[b]
Dichloromethane	2.05±0.265[b]	0.0397±0.011[c]	81.04±0.016[d]
Ethyl acetate	3.75±0.115[c]	0.0197±0.009[b]	59.25±0.002[c]
Ethanol	5.86±0.149[d]	0.0029±0.002[a]	42.42±0.003[a]
Ascorbic acid*	0.031±0.010[a]	-	-
BHT*	0.064±0.030[a]	-	-

Remark: * positive control

Different letters on the same column indicate significant differences according to Duncan's test ($p < 0.05$)

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี paper disc diffusion และการตรวจหาค่า MIC และ MBC

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของสารสกัดกอลล์ของหญ้าตดหมาที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี paper disc diffusion ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเฉพาะสารสกัดไดคลอโรมีเทนและสารสกัดเฮกเซนที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ โดยให้ขนาดบริเวณการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) เท่ากับ 6.23±0.17 มิลลิเมตร และ 4.98±0.21 มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* พบว่าสารสกัดทั้งหมดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้

เมื่อนำสารสกัดไดคลอโรมีเทนและสารสกัดเฮกเซนมาตรวจหาค่า MIC และ MBC พบว่า ค่า MIC ของสารสกัดกอลล์ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีการเจือจางทีละสองเท่า (2-fold dilution) ไปจนถึงความเข้มข้น 0.7812 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถดูความขุ่นเพื่ออ่านค่า MIC ได้ เนื่องจากสารสกัดมีสีที่เข้มมาก ซึ่งรบกวนการวัดค่าการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงนำทุกหลอดจากการทดสอบ MIC ไปเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (nutrient agar) เพื่อหาค่า MBC โดยตรง ผลการทดสอบพบว่าในหลอดที่มีเชื้อทดสอบผสมกับสารสกัดไดคลอโรมีเทนและสารสกัดเฮกเซน ที่ระดับความเข้มข้น 200, 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่พบเชื้อเจริญในจานอาหาร แสดงให้เห็นว่าค่าความเข้มข้นที่ระดับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ทั้งหมด ดังตารางที่ 3 (Table 3)

Table 3 Zone of inhibition and minimum bactericidal concentration (MBC) of gall's extracts against *E. coli* and *S. aureus*

Sample	Zone of inhibition (mean ± S.D., mm)		MBC (mg/mL)
	E. coli	*S. aureus*	*S. aureus*
Hexane extract	0	4.98 ± 0.21 [a]	50
Dichloromethane extract	0	6.23 ± 0.17 [b]	50
Ethyl acetate extract	0	0	ND
Ethanol extract	0	0	ND
Distilled water**	0	0	ND
Dimethyl sulfoxide (DMSO)**	0	0	ND
Chloramphenicol*	12.00 ± 0.92 [a]	13.63 ± 0.39 [c]	ND

Remarks: * = positive control, ** = negative control, 0 = no inhibition ND = not determined

Different letters on the same column indicate significant differences according to Duncan's test ($p < 0.05$)

อภิปรายผล

จากการศึกษาผลของการสกัดกอลล์จากหญ้าตดหมาโดยเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากสภาพขั้วต่ำไปหาขั้วสูง ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลมีปริมาณสารสกัดมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 17 ของน้ำหนักแห้ง เนื่องจากพืชสกุล *Paederia* จะมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และ ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (flavonoid glycoside) (Ishikura et al., 1990) ซึ่งเป็นโครงสร้างโมเลกุลที่มีขั้วและมีขนาดใหญ่ สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายเอทานอลส่งผลให้ปริมาณสารสกัดที่ได้มีค่าสูง ในขณะที่สารที่ละลายออกมาขั้วที่ต่ำกว่าส่วนใหญ่จะเป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์พีน (triterpene) β-sitosterol (1), β-sitosterol hexacosanate (2), stigmasterol hexacosanate (3) และ β-stigmasterol (4) เป็นต้น (Ahmad et al., 1991; Kongkathip et al., 2005) ดังภาพที่ 2 (Figure 2) เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH และ FRAP พบว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธีได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับตัวทำละลายอื่น และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวัดปริมาณสารสกัดที่มีหมู่ไฮดรอกซิลซึ่งเป็นสารที่แสดงคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดให้ผลที่สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* โดยวิธี paper disc diffusion พบว่าเฉพาะสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีบริเวณการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) เท่ากับ 4.98±0.21

และ 6.23±0.17 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Basri & Fan (2004) ที่รายงานว่าสารสกัดกอลล์ของต้นโอ๊กมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* เนื่องจากเชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีโครงสร้างของผนังเซลล์ซับซ้อนกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก จะมีเยื่อหุ้มเซลล์สองชั้นและเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีโครงสร้างที่ไม่สมมาตร ประกอบกับเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในเป็นสารฟอสโฟไลปิด ในขณะที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกประกอบด้วยสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก มีประโยชน์ในการช่วยปกป้องเซลล์ (Page, 2012) เมื่อนำสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดไดคลอโรมีเทนที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* มาหาค่า MIC ปรากฏว่าไม่สามารถวัดผลได้ อันเนื่องจากสีของสารสกัดมีสีเข้มมากยากต่อการสังเกตความขุ่น จากนั้นได้ทำการศึกษาหาค่า MBC พบว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนั้น สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ จากการที่เฉพาะสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดไดคลอโรมีเทนเท่านั้นที่แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* อาจเป็นไปได้ว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์พีน จึงไม่พบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อในสารสกัดจากเอทิลอะซิเตตและเอทานอล ตามลำดับ และนอกเหนือไปจากนั้นอีกหนึ่งสาเหตุที่สารสกัดไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ และออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด อาจเนื่องมาจากในสารสกัดหยาบดังกล่าวมีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกอื่น ๆ (ที่ไม่ใช่กลุ่มฟลาโวนอยด์) ซึ่งสามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางจนถึงขั้วน้อยด้วย

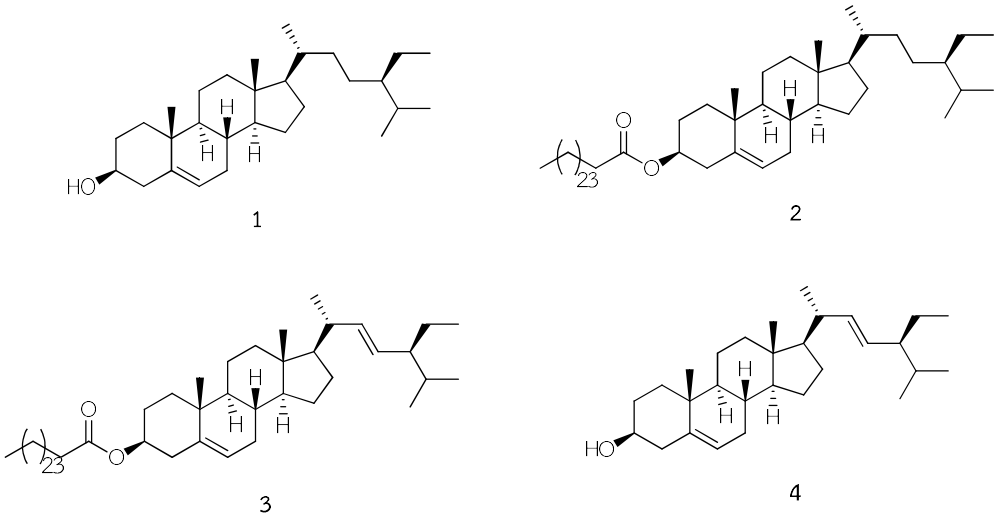

Figure 2 Structures of bioactive triterpene compounds (1-4) isolated from *Paederia* genus

สรุปผลการวิจัย

จากการค้นพบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร ของสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากกอลล์ของหญ้าตดหมา (*Paederia pilifera*) นั้น ทำให้มั่นใจได้ว่าสารสกัดกอลล์จากหญ้าตดหมานั้นมีศักยภาพต่อการนำไปพัฒนาเป็นสมุนไพรเสริมรักษาโรคได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาเคมี และสาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือในการทำวิจัยเป็นอย่างดียิ่ง และขอขอบคุณอาจารย์ ดร.จีราพัสฐ์ สีแจ่ม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่แนะนำจัดหาพืชเพื่อใช้ทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Ahmad MU, Islam MR, Huq E. et al. Chemical investigation of the aerial parts of *Paederia foetida* Linn, *Journal of Bangladesh Academy of Science*. 1991; 15: 19-22.

Cheung S, Ninghon, L. Chinese medical herbs of Hong Kong, *Commercial Press Hong Kong*. 1985; 2: 160-161.

Damsud T, Chanwun T, Srimek N. et al.. Antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities of young ackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) extract, *KKU Science Journal*. 2017; 45(3): 543-550.

Fathabada AE, Shariatifar N, Mardania K. et al. Study on antibacterial and antioxidant activity of oak gall (*Quercus infectoria*) extracts from Iran, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 2015; 14: 44-50.

Inta T, Saelee A, Sam-ang P. et al. Inhibition *Staphylococcus aureus* and antioxidant activity of crude extract from rested celosin (*Celosia cristata)*, *PSRU Journal of Science and Technology.* 2019; 4(2): 34-42.

Ishikura N, Yang SQ, Yoshitama K. et al. Flavonol glycosides from *Paederia scandens* var. *mairei*. *Zeitschrift für Naturforschung, C- A Journal of Bioscience*. 1990; 45: 1081-1084.

Kapadia GL, Sharma SC, Tokuda H. et al. Inhibitory effect of iridoides on Epstein-Barr virus activation by a short-term *in vitro* assay of antitumor promoters, *Cancer letters.* 1996; 102: 223-226.

Kongkathip N, Kongkathip B, Savaspan K. et al. Composition and active compounds with inhibit *Herpes simplex* virus type 1 isolated from *Paederia tomentos, Thailand Patent No. 106131.* 2005.

Lippincott JA, Lippincott BB. The genus *Agrobacterium* and plant tumorigenesis, *Annual review of Microbiology*. 1975; 29: 377-405.

Nagesh L, Sivasamy S, Muralikrishna KS. et al. Antibacterial potential of gall extract of *Quercus infectoria* against *Enterococcus faecalis* an *in vitro* study, *Pharmacognosy Journal*. 2012; 4(30): 47-50.

Page MGP. *The Role of the Outer Membrane of Gram-negative Bacteria in Antibiotic Resistance: Ajax' Shield or Achilles' Heel?. In: Coates A. (eds) Antibiotic Resistance.* Berlin, Heidelberg: Handbook of experimental pharmacology, 211; 2012.

Pham XS, Nguyen, VK, Le, TTH. Chemical composition and antibacterial effect of leaves of *Paederia tomentosa* L, *Tap Chi Duoc Hoc*. 1996; 11: 14-16.

Phengkamsri N, Kantamul C, Towattanakit, P. et al. Antioxidative effect of *alpinia conchigera* rhizome extracts, *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*. 2011; 6(3): 195-201.

Quang DN, Hashimoto T, Tanaka M. et al. Iridoid glucosides from roots of Vietnamese *Paederia scandens*, *Phytochemistry*. 2002; 60: 505-514.

Saelee W, Srisayam M, Phalee W. et al. Effect of egg woman (*Phyllanthus* spp.) crude extracts on inhibition of *Staphylococcus aureus*, *Proceedings of 4th Pibulsongkramvijai*. 2018; 331-338.

Shankara BR, Ramachandra YL, Rajan, SS. et al. *In vitro* antibacterial activity of *Terminalia chebula* leaf gall extracts against some human pathogenic strains, *International Current Pharmaceutical Journal*, 2012; 1(8): 217-220.

Tongpenyai A. Extraction, isolation and biological testing and biological testing for antiviral [*Herpes simplex* (HSV-1)] constituents from *Paederia tomentosa*, *Junior Science Talent Project National Center for Genetic Engineering and Biotechnology*, Bangkok Thailand 31. 2001.

Tran NN. Gop phan vao viec thong ke nhung loai thuc vat coich thuoc ho caphe (Rubiaceae Juss) o Vietnam (Contribution to the enumeration of useful species of the family Rubiaceae juss in Vietnam), *Journal of Biology*. 1987; 9: 40-44.

Vanga S, Pingili M, Tharigoppula S. Phytochemical screening and evaluation of antifungal activity of gall extracts of *Quercus infectoria*, *International Journal Pharmaceutical Sciences and Research,* 2017; 8(7): 3010-3013.

Wagner WL, Herbst DR, Sohmer SH. A manual of the flowering plants of Hawaii, *New Zealand Journal of Botany*. 1992; 30: 119-120.

Wang Y, Huang T. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants, *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 2005; 43: 295-300.