ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชสมุนไพร

ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND ANTIOXIDATION OF MEDICINAL PLANT EXTRACT

ศิวพงษ์ ตันสุวรรณวงค์ ศิริพักตร์ จันทร์สังสา และนวรัตน์ วิริยะเขษม*

Siwapong Tansuwanwong, Siripuk Chansangsa and Nawarat Viriyakhasem*

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชสมุนไพร โดยคัดเลือกพืชสมุนไพรจากที่ใช้ในตำราการแพทย์แผนไทย 3 ชนิด คือ ทองพันชั่ง พลู และราชพฤกษ์ นำมาสกัดด้วยน้ำและ 80% เอทานอล แล้วทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคผิวหนัง *S. aureus* ด้วยวิธี agar disc diffusion ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่า สารสกัดใบพลูด้วย 80% เอทานอล ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด มีขนาดของวงใสที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ 2.45±0.08 เซนติเมตร เมื่อทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) พบว่าค่า MBC/MIC ของสารสกัดใบพลูด้วยน้ำเท่ากับ 0.50 ซึ่งแสดงคุณสมบัติฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดใบพลูและสารสกัดใบราชพฤกษ์ด้วย 80% เอทานอลและสารสกัดใบราชพฤกษ์ด้วยน้ำ มีค่า MBC/MIC 8.01, 16.03 และ 32.05 ตามลำดับ แสดงคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* นอกจากนี้เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทุกชนิดด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดใบพลูด้วยน้ำมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด มีค่า IC_{50} 3.12±0.06 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผลการวิจัยสามารถเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้พืชสมุนไพรรักษาโรคติดเชื้อผิวหนังตามหลักการแพทย์แผนไทย และโอกาสในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาจากพืชสมุนไพร

คำสำคัญ: พืชสมุนไพร โรคผิวหนัง ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระ

วิทยาลัยการแพทย์พื้นบ้านและการแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย 57100

School of Traditional and Alternative Medicine, Chiang Rai Rajabhat University, Muang District, Chiang Rai Province 57100

*corresponding author e-mail: nawarat.vir@crru.ac.th

Received: 14 January 2024; Revised: 12 March 2024; Accepted: 15 March 2024

DOI: https://doi.org/10.14456/lsej.2024.7

Abstract

The study of antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and antioxidation of medicinal plant extract was done by three medicinal plants which selected from Thai traditional medicine textbooks, namely *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz, *Piper betle* L. and *Cassia fistula* L. They were extracted using water and 80% ethanol. The extractions determined antibacterial activity against *S. aureus* by agar disc diffusion at 10 and 100 mg/mL. The results showed the highest activity of 100 mg/mL 80% ethanol extract of *Piper betle* L. leaves to inhibit bacterial growth with an inhibition diameter of 2.45±0.08 cm. The minimum inhibition concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined. The MBC to MIC ratio of *Piper betle* L. leaves water extract was 0.50, which showed the highest bactericidal activity compared with other medicinal plant extract. While the 80% ethanol extract of *Piper betle* L. leaves, *Cassia fistula* L. leaves and water extract of *Cassia fistula* L. leaves showed the MBC to MIC ratio of 8.01, 16.03 and 32.05, respectively. Those represented the bacteriostatic activity. Moreover, the antioxidants of all extracts were detected by a DPPH assay. Water extract of *Piper betle* L. leaves showed the highest antioxidant activity with IC_{50} 3.12±0.06 mg/mL. This research data supported the use of medicinal plants in skin disease treatment by Thai traditional medicine. It also showed the opportunity to develop medicinal plant products.

Keywords: medicinal plant, skin disease, antibacterial, antioxidant

บทนำ

โรคติดเชื้อทางผิวหนังเป็นโรคที่พบได้บ่อยในมนุษย์ทุกเพศและทุกวัย มีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ เชื้อรา ไวรัส และแบคทีเรีย โดยเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถก่อโรคที่มีความรุนแรงแตกต่างกัน ทั้งนี้ผิวหนังของมนุษย์จะมีเชื้อประจำถิ่น (Normal flora) อาศัยอยู่หลายชนิด เชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อยได้แก่ *Staphylococcus epidermis* และ *Staphylococcus aureus* โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียชนิด *S. aureus* ซึ่งพบบริเวณผิวหนังและในโพรงจมูก และเป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ผิวหนังได้บ่อยที่สุด (Mamae et al., 2022) เมื่อมีบาดแผลหรือร่างกายอยู่ในภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ จนเกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อเหล่านี้จะก่อให้เกิดการอักเสบ ปวด บวม แดง (Kobayashi et al, 2015) ตลอดจนเป็นแผลพุพอง ฝีหนอง แผลติดเชื้อ หรือสิว (Janwitayanuchit & Rangseepanurat, 2010; Siri-in & Thiraworawong, 2020) กระบวนการเหล่านี้ส่งผลให้ร่างกายสร้างสารอนุมูลอิสระ (Free radical) เพิ่มมากขึ้น นำไปสู่การลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จนกระทั่งเซลล์ผิวหนังเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น (Oxidative

stress) (Swindle et al., 2015) ปัจจุบันการรักษาโรคผิวหนังที่ติดเชื้อแบคทีเรียสามารถรักษาได้โดยยาต้านจุลชีพทั่วไป แต่เชื้อดื้อยาก็เพิ่มมากขึ้นอันเนื่องมาจากการใช้ปริมาณยาที่สูงขึ้นและการใช้ยาผิดวิธี (Muangkaew et al., 2015) ซึ่งทำให้มีความรุนแรงของโรคเพิ่มมากขึ้น และจำเป็นต้องใช้ยาหลายขนานร่วมกันซึ่งราคาแพงและมีผลข้างเคียงต่อร่างกายสูง ดังนั้น ปัจจุบันกระแสความนิยมใช้คุณสมบัติทางยาจากพืชสมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจและถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์เพิ่มมากขึ้น โดยมีการศึกษาฤทธิ์ของพืชสมุนไพรเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น เป็นโอกาสใช้พืชสมุนไพรทดแทนยาสังเคราะห์เพื่อลดภาระค่าใช้จ่ายยาสำเร็จรูปที่ราคาสูง และอาจก่อผลข้างเคียงในระยะยาว (Supaphon et al., 2022)

องค์ความรู้ของการแพทย์แผนไทยมีบันทึกการวินิจฉัยโรคที่เกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนังและเนื้อเยื่อและแนวทางการรักษาโรคในคัมภีร์ต่าง ๆ ในตำราแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์และตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไปสาขาเวชกรรม อย่างไรก็ตามองค์ความรู้ของการแพทย์แผนไทยในอดีตยังไม่ทราบถึงโรคผิวหนังที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ มีเพียงการบันทึกลักษณะรอยโรคที่ใกล้เคียงกับโรคติดเชื้อทางผิวหนังบางชนิด เช่น คัมภีร์ตักศิลา อธิบายลักษณะไข้เริมน้ำค้างและไข้เริมน้ำข้าว ที่ลักษณะแผลเป็นตุ่มน้ำหรือตุ่มสีขาวขุ่นคล้ายกับโรคเริมในปัจจุบัน (Department of health service support, 2006a) ทั้งนี้มีบันทึกการใช้ตำรับยาที่มีองค์ประกอบของพืชสมุนไพรอยู่หลายตำรับและการใช้สมุนไพรเดี่ยวในการรักษาอาการต่าง ๆ ของโรคผิวหนัง (Department of health service support, 2006b) นอกจากนี้มีงานวิจัยสมุนไพรที่ปรากฏในคัมภีร์วิถีกุฏฐโรคซึ่งเป็นตำราที่ใช้วินิจฉัยโรคที่เกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนังและเนื้อเยื่อ สามารถรวบรวมพืชสมุนไพรได้ถึง 157 ชนิด (Chaloemram, 2020) อย่างไรก็ตามพืชสมุนไพรหลายชนิดยังขาดการศึกษาข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เพื่อสนับสนุนการอธิบายการรักษาโรคทางผิวหนังด้วยการแพทย์แผนไทย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนังชนิด *S. aureus* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคผิวหนังของการแพทย์แผนไทย โดยคัดเลือกพืชสมุนไพรที่ใช้ในตำราการแพทย์แผนไทยและเป็นสมุนไพรที่พบในจังหวัดเชียงราย จำนวน 3 ชนิด คือ 1. ใบทองพันชั่ง ถูกใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับยารักษาโรคผิวหนังในรูปแบบยารับประทานแก้โรคเรื้อน และยาใช้ภายนอกแก้พยาธิตามผิวหนัง 2. ใบพลู มีบันทึกการใช้ใบสดตำผสมเหล้าทาบริเวณที่เป็นลมพิษ หรือดองเหล้าขาวเพื่อรักษากลากและฮ่องกงฟุต 3. ใบราชพฤกษ์ ใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับยารักษาโรคผิวหนังในรูปแบบยารับประทานเพื่อชำระน้ำเหลือง (ของเสีย) ออกจากร่างกาย ข้อค้นพบจากงานวิจัยนี้คาดว่าจะเป็นข้อมูลสนับสนุนองค์ความรู้การใช้พืชสมุนไพรรักษาโรคทางผิวหนังของการแพทย์แผนไทยและเป็นแนวทางการนำพืชสมุนไพรท้องถิ่นมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์รักษาโรคผิวหนังและเพิ่มมูลค่าพืชสมุนไพรต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่าง

ตัวอย่างพืชสมุนไพรจำนวน 3 ชนิดประกอบด้วย ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz) พลู (*Piper betle* L.) และราชพฤกษ์ (*Cassia fistula* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่เพาะปลูกเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคของวิทยาลัยการแพทย์พื้นบ้านและการแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย เก็บตัวอย่างในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2566

2. วิธีการสกัดตัวอย่าง

นำตัวอย่างพืชสมุนไพรโดยใช้ส่วนใบของพืชสมุนไพรตัวอย่างทุกชนิด ซึ่งสอดคล้องกับส่วนที่ใช้ของพืชสมุนไพรที่บันทึกในตำราการแพทย์แผนไทย นำมาล้างให้สะอาด ผึ่งหรืออบให้แห้ง แล้วหั่นและบดให้เป็นผงละเอียด นำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดคือน้ำและ 80% เอทานอล

2.1 การสกัดด้วยน้ำ

ชั่งผงตัวอย่างพืชสมุนไพรอย่างละ 20 กรัม เติมน้ำ 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางและกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 นำสารสกัดแต่ละชนิดไปแช่แข็งแล้วนำเข้าเครื่องระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer) ยี่ห้อ Christ รุ่น Alpha 1-4 LD plus จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ด้วยน้ำ เก็บสารตัวอย่างในภาชนะที่ปิดสนิทแล้วแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การสกัดด้วย 80% เอทานอล

ชั่งผงตัวอย่างพืชสมุนไพรอย่างละ 60 กรัม เติม 80% เอทานอล 300 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 นำสารสกัดแต่ละชนิดไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ (Vacuum rotary evaporator) ยี่ห้อ Heidolph รุ่น Laborata 4000 efficient ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดข้นหนืด เก็บสารตัวอย่างในภาชนะที่ปิดสนิทแล้วแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

คำนวณร้อยละของสารสกัด ดังสูตรนี้

$$\%Yield = (\text{น้ำหนักของสารสกัด}/\text{น้ำหนักของพืชสมุนไพร}) \times 100$$

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วย 80% เอทานอล

3.1 การเตรียมสารสกัดสำหรับทดสอบ

เตรียมสารสกัดพืชสมุนไพร 3 ชนิดที่สกัดด้วยน้ำและสกัดด้วย 80% เอทานอล โดยให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายด้วย 100% Dimethylsulfoxide (DMSO) จากนั้นเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อใช้ในการทดสอบ โดยเจือจาง DMSO ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อเป็นชุดควบคุมการทดสอบ

3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียในการทดลองนี้คือ *S. aureus* นำเชื้อแบคทีเรียเลี้ยงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Tryptic Soy Broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง เมื่อทำการทดสอบให้นำเชื้อมาปรับปริมาณโดยเทียบความขุ่นมาตรฐาน McFarland standard No. 0.5 โดยให้มีปริมาณเชื้อประมาณ $1.5x10^8$ Colony Forming Unit (CFU)/mL

3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี Agar disc diffusion

การทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion ดัดแปลงจากวิธีของ Boripun et al. (2022) ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มในหลอดทดลองที่มีปริมาณเชื้อ *S. aureus* $1.5x10^8$ CFU/mL นำไปป้ายให้ทั่วบนจานอาหารเพาะเชื้อ Mannitol Salt Agar จากนั้นนำแผ่นกระดาษซับวงกลมปราศจากเชื้อที่มีสารสกัดสมุนไพรปริมาตร 5 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อและใช้แผ่นกระดาษซับวงกลมที่มี DMSO ความเข้มข้น 10% และ 100% เป็นตัวควบคุม ทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ในสภาวะใช้ออกซิเจน เมื่อครบเวลาทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่มีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Inhibition zone) โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

3.4 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentrations; MIC) ด้วยวิธี Broth Dilution

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ด้วยวิธี Broth Dilution ดัดแปลงจาก EUCAST (2003) เตรียมสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในเพลทหลุมขนาด 96 หลุมที่ปราศจากเชื้อหลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เชื้อจุลินทรีย์ *S. aureus* ที่เลี้ยงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Tryptic Soy Broth ที่ปรับปริมาณเชื้อเป็น $1.5x10^8$ CFU/mL หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการทดสอบด้วยสาร p-Iodonitrotetrazolium violet (INT) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัด โดยค่า MIC คือความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง

3.5 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) ด้วยวิธี Drop plate

การทดสอบโดยวิธีการ Drop plate ดัดแปลงจาก Visutti (2017) โดยดูดสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Broth dilution ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mannitol

Salt Agar แล้วปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดยสังเกตจากเชื้อไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่สารสกัดความเข้มข้นใดหมายถึงสารสกัดความเข้มข้นดังกล่าวสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ จากนั้นคำนวณหาค่า MBC/MIC (Thomas et al., 2012)

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชสมุนไพร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดัดแปลงจาก Manok & Limcharoen (2015) โดยการเตรียมสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วย 80% เอทานอล ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใส่ลงในเพลทหลุมขนาด 96 หลุมที่ปราศจากเชื้อหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 36 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (n=3) ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยใช้ 95% เอทานอลเป็น blank และเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหา %DPPH Inhibition ดังนี้

$$\%DPPH\ inhibition = [(A_{Control} - A_{Sample}) / A_{Control}] \times 100$$

เมื่อ $A_{Control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ 95% เอทานอลที่ใช้เป็น blank

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิจัยนี้ใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ โดยแสดงผลในรูปแบบค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±SD) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดพืชสมุนไพร

ลักษณะผงบดก่อนนำไปสกัดของใบทองพันชั่ง ใบพลู และใบราชพฤกษ์คือ สีเขียวเข้ม สีน้ำตาลอ่อน และสีเขียวอ่อน ตามลำดับ เมื่อถูกสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและ 80% เอทานอล และทำให้แห้งจะได้สารสกัดที่มีลักษณะต่าง ๆ กัน โดยสารสกัดด้วย 80% เอทานอล จะมีลักษณะข้นหนืดที่มีความเข้มสีของสารสกัดแตกต่างกัน ร้อยละของน้ำหนักแห้งของสารสกัดใบทองพันชั่ง ใบพลู และใบราชพฤกษ์ คือ 6.20, 2.72, และ 16.95 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดด้วยน้ำ มีลักษณะเป็นผลึกผงแห้ง ร้อยละของน้ำหนักแห้งของสารสกัดใบทองพันชั่ง ใบพลู และใบราชพฤกษ์คือ 14.70, 18.10 และ 28.65 ตามลำดับ

2. ผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion

สารสกัดด้วยน้ำจากใบทองพันชั่ง ใบพลู และใบราชพฤกษ์ ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* โดยขนาดของวงที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 0.98±0.04, 1.53±0.18, และ 1.47±0.08 เซนติเมตร ตามลำดับ และสารสกัดสมุนไพรด้วยน้ำทุกชนิดที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ในส่วนสารสกัดด้วย 80% เอทานอลที่

ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจาก ใบทองพันชั่ง ใบพลู และใบราชพฤกษ์ มีขนาดของวงที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 1.78±0.04, 2.45±0.08 และ 1.28±0.04 เซนติเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดจากใบทองพันชั่งและใบพลูด้วย 80% เอทานอลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีขนาดของวงที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 0.97±0.05 และ 1.13±0.05 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากใบราชพฤกษ์ไม่มีฤทธิ์ ทั้งนี้เปรียบเทียบกับตัวควบคุมคือ DMSO 10% และ 100% ซึ่งไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ดังแสดงในตารางที่ 1 (Table 1) และภาพที่ 1 (Figure 1)

Table 1 Average diameter of inhibition zone of water extract and 80% ethanol extract

Medicinal plants	Solvents	Diameter of inhibition zone (cm.)	
		100 mg/mL	10 mg/mL
Rhinacanthus nasutus (L.) Kurz	Water	0.98±0.04	-
	80% Ethanol	1.78±0.04	0.97±0.05
Piper betle L.	Water	1.53±0.18	-
	80% Ethanol	2.45±0.08	1.13±0.05
Cassia fistula L.	Water	1.47±0.08	-
	80% Ethanol	1.28±0.04	-

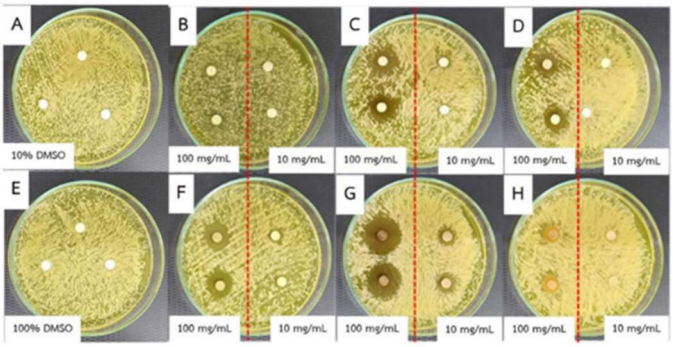

Figure 1 Inhibition zone of water extract (B-D) and 80% ethanol extract (F-H). A,E DMSO B,F *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz. C,G *Piper betle* L. and D,H *Cassia fistula* L.

3. ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentrations; MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration; MBC)

การหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดด้วยน้ำและด้วย 80% เอทานอลต่อเชื้อ *S. aureus* พบว่าสารสกัดด้วยน้ำแสดงค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* อยู่ในช่วง 1.56-50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

และพบว่าสารสกัดใบพลูและใบราชพฤกษ์ด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโดยมีค่า MBC ที่ความเข้มข้น 12.5 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ไม่พบฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. aureus* ในสารสกัดจากใบทองพันชั่ง

เมื่อศึกษาสารสกัดด้วย 80% เอทานอลพบว่าสารสกัดแสดงค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* อยู่ในช่วง 1.56-6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และพบว่าสารสกัดใบพลู และใบราชพฤกษ์มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยมีค่า MBC ที่ความเข้มข้น 12.5 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำไปคำนวณค่า MBC/MIC แล้วพบว่าสารสกัดใบพลูด้วยน้ำมีค่าเท่ากับ 1.00 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 4 บ่งชี้ว่าสารสกัดใบพลูด้วยน้ำมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* (Bactericidal activity) ในขณะที่สารสกัดใบพลูด้วย 80% เอทานอล สารสกัดใบราชพฤกษ์ด้วย 80% เอทานอลและสารสกัดใบราชพฤกษ์ด้วยน้ำมีค่า MBC/MIC เท่ากับ 8.01, 16.03 และ 32.05 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่า 4 บ่งชี้ว่าสารสกัดมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Bacteriostatic activity) (Huang et al., 2021) ดังแสดงในตารางที่ 2 (Table 2)

Table 2 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of water extract and 80% ethanol extract of five medicinal plants against *S. aureus*

Medicinal plants	Solvents	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MBC/MIC ratio	Antibacterial activity
Rhinacanthus nasutus (L.) Kurz	Water	50	-	-	-
	80% Ethanol	6.25	-	-	-
Piper betle L.	Water	12.5	12.5	1.00	Bactericidal
	80% Ethanol	1.56	12.5	8.01	Bacteriostatic
Cassia fistula L.	Water	1.56	50	32.05	Bacteriostatic
	80% Ethanol	3.12	50	16.03	Bacteriostatic

4. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชสมุนไพร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay ในงานวิจัยนี้ ใช้สารต้านอนุมูลอิสระ Trolox (6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) เป็นสารเปรียบเทียบ จากการทดลองพบว่าสารละลาย Trolox มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดของสมุนไพรตัวอย่างทุกชนิด โดยมีค่า IC_{50} 4.79±0.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารสกัดสมุนไพรด้วยน้ำ พบว่า สารสกัดใบทองพันชั่งไม่แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ในขณะที่สารสกัดใบพลูและสารสกัดใบราชพฤกษ์แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.12±0.06 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ IC_{50} 4.01±0.32 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับสารสกัดด้วย 80% เอทานอล พบว่าสารสกัดใบทองพันชั่ง ใบพลูและใบราชพฤกษ์มีค่า IC_{50} 5.72±0.10, 7.40±0.92 และ 5.63±0.44 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยค่า IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพรชนิดเดียวกันระหว่างสกัดด้วยน้ำกับ 80% เอทานอล พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 3 (Table 3)

Table 3 Antioxidant activities of three medicinal plants water extract and 80% ethanol extract

Medicinal plants	IC_{50} (mg/mL) (Mean±SD)	
	Water extract	80% Ethanol
Rhinacanthus nasutus (L.) Kurz	-	5.72±0.10
Piper betle L.	3.12±0.06[a]	7.40±0.92[a]
Cassia fistula L.	4.01±0.32[b]	5.63±0.44[b]
Trolox	4.79±0.12 µg/mL	

Remark [a] Represent statistical difference between water extract and 80% ethanol extract of *Piper betle* L. and [b] Represent statistical difference between water extract and 80% ethanol extract of *Cassia fistula* L. at a significant level of 0.05 ($p < 0.05$)

อภิปรายผล

ตำราการแพทย์แผนไทยมีบันทึกการวินิจฉัยโรคที่เกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง รวมถึงแนวทางการรักษาตามหลักแนวคิดทฤษฎีและวิธีการดูแลรักษา โดยปรากฏอยู่ในคัมภีร์ของตำราแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์และตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเวชกรรมไทย และการใช้ตำรับยาสมุนไพรทั้งยาเดี่ยวและยาตำรับในตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรมไทย โดยแม้ในปัจจุบันจะมีการศึกษาวิจัยรวบรวมชนิดของพืชสมุนไพรและตำรับยาที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคผิวหนังไว้ (Chaloemram, 2020; Chantarapon et al., 2023) แต่รายละเอียดข้อมูลคุณสมบัติของพืชสมุนไพรต่อฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนังยังมีจำกัด ประกอบกับปัจจุบันการดื้อยาจากการใช้ยาเคมีสังเคราะห์เพื่อรักษาโรคติดเชื้อทางผิวหนังเริ่มมีมากขึ้น (Khoka, 2020) ประชาชนจึงเริ่มแสวงหาพืชสมุนไพรเพื่อการดูแลรักษาทดแทนยาเคมีสังเคราะห์โดยอาศัยองค์ความรู้และภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย งานวิจัยนี้ได้ศึกษาทดลองโดยการคัดเลือกตัวอย่างพืชสมุนไพรที่มีบันทึกการใช้เพื่อรักษาโรคผิวหนังในตำราการแพทย์แผนไทย จำนวน 3 ชนิด มาสกัดด้วยน้ำและ 80% เอทานอล โดยการเลือกใช้ตัวทำละลายชนิดน้ำและเอทานอลเนื่องจากให้สอดคล้องกับหลักการปรุงยาด้วยการแพทย์แผนไทยและตัวทำละลายทั้งสอง ยังเป็นตัวทำละลายพื้นฐานที่ใช้ในการสกัดสารและราคาไม่สูง มีความปลอดภัยและกำจัดออกจากสารสกัดได้ง่าย โดยเมื่อนำสารสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดมาทดสอบและเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดใบพลูด้วย 80% เอทานอล มีประสิทธิภาพดีที่สุดต่อการยับยั้งและการฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิด *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังที่พบบ่อย

ที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากสมุนไพรชนิดอื่นที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้อีก 2 ชนิด สอดคล้องกับงานวิจัยของนพมาศ ตระการรังสีและคณะ (Trakranrungsie et al., 2004) ที่พบประสิทธิภาพของพลูครีมที่แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคผิวหนังประเภทเชื้อรา โดยสารสกัดใบพลูด้วย 80% เอทานอล แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และยังสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในผู้ป่วยโรคตาแดง (Lubis et al., 2020) นอกจากนี้สารสกัดพลูยังถูกศึกษาวิจัยฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพอีกหลายชนิด (Kaveti et al., 2011; Yushananta & Ahyanti, 2019; Lao et al., 2022)

เมื่อนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวในอะตอมหรือโมเลกุล มีความว่องไวต่อการทำปฏิกิริยาและสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไป โดยจะเป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องกันไป และสามารถเกิดในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ตลอดเวลา อนุมูลอิสระมีความสามารถทำลายโมเลกุลต่าง ๆ ในร่างกาย เป็นเหตุให้เซลล์ในร่างกายเสื่อมสภาพและตายได้ในที่สุด เป็นเหตุให้อวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายผิดปกติและมีโอกาสนำไปสู่การเกิดโรคต่าง ๆ (Phansawan, 2013) ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความสามารถในการป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดทีฟ เพื่อยับยั้งการเกิดสารอนุมูลอิสระ ซึ่งโดยปกติร่างกายสามารถสร้างสารต้านอนุมูลอิสระได้ ประกอบกับการรับประทานอาหารกลุ่มที่มีวิตามินอี วิตามินซี สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ สารกลุ่มฟีนอล เป็นต้น (Choe & Min DB, 2009; Nimse & Pal, 2015) ทั้งนี้สารสกัดใบทองพันชั่งด้วยน้ำไม่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีเพียงสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย 80% เอทานอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} 5.72±0.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดใบพลูด้วยน้ำกับ 80% เอทานอล พบว่าสารสกัดใบพลูด้วยน้ำ (IC_{50} 3.12±0.06 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แสดงประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดใบพลูด้วย 80% เอทานอล (IC_{50} 7.40±0.92 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบราชพฤกษ์ด้วยน้ำกับ 80% เอทานอล พบว่าสารสกัดใบราชพฤกษ์ด้วยน้ำ (IC_{50} 4.01±0.32 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แสดงประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดใบราชพฤกษ์ด้วย 80% เอทานอล (IC_{50} 5.63±0.44 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพืชชนิดเดียวกันเมื่อใช้ตัวทำละลายในการสกัดต่างกัน จะแสดงประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาเปรียบเทียบสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลของพืชสมุนไพรไทย 13 ชนิด ที่แสดงผลต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน (Chanudom & Tangpong, 2011)

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบพลูด้วยน้ำและ 80% เอทานอลที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดีที่สุด ในขณะที่สารสกัดด้วย 80% เอทานอลของใบทองพันชั่งและใบราชพฤกษ์ สามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แต่แตกต่างกันเพียงความเข้มข้นที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นข้อมูลจากการวิจัยนี้สนับสนุนการอธิบายเหตุผลการตรวจสอบด้วยกระบวนการทาง

วิทยาศาสตร์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังจากพืชสมุนไพรที่ถูกบันทึกการใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนังในตำราการแพทย์แผนไทย ซึ่งมีโอกาสเป็นฐานข้อมูลเพื่อนำไปสู่การพัฒนาพืชสมุนไพรด้วยองค์ความรู้ทางการแพทย์แผนไทยให้เป็นผลิตภัณฑ์รักษาโรคผิวหนังและเป็นทางเลือกในการดูแลรักษาให้แก่ประชาชน เพื่อลดปริมาณการใช้ยาเคมีสังเคราะห์ ตลอดจนเพื่อเพิ่มมูลค่าพืชสมุนไพรไทยให้กับชุมชนในท้องถิ่น

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด *S. aureus* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบทองพันชั่ง ใบพลูและใบราชพฤกษ์ด้วยน้ำและ 80% เอทานอล พบว่า สารสกัดใบพลูด้วยน้ำมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิด *S. aureus* ได้ดีที่สุด ในขณะที่สารสกัดใบพลู ใบราชพฤกษ์ด้วย 80% เอทานอลและสารสกัดใบราชพฤกษ์ด้วยน้ำแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ลดลง ตามลำดับ เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า สำหรับสารสกัดใบพลูด้วยน้ำแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ในขณะที่สารสกัดใบทองพันชั่งด้วย 80% เอทานอลแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระรองลงมา จากผลการวิจัยนี้แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดใบพลูด้วยน้ำในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากสมุนไพรอีก 2 ชนิด ซึ่งผลการวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อสนับสนุนการส่งเสริมการใช้พืชสมุนไพรเพื่อการรักษาโรคติดเชื้อทางผิวหนังตามหลักการแพทย์แผนไทย และแสดงโอกาสพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนัง เพื่อลดความเสี่ยงจากการใช้ยาจากสารเคมีสังเคราะห์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย และขอขอบคุณวิทยาลัยการแพทย์พื้นบ้านและการแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงรายที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้อุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Boripun R, Paopradit P, Prampramote J, Narinthorn R, Intongead S, Sangkanu S, et al. Bactericidal activity of *Piper betle* L. extract against antibiotic resistant *Salmonella* spp. isolated from pig farms in Southern Thailand. Veterinary Integrative Sciences 2022;20(3):557-569.

Chaloemram C. Principles of using medicinal plants in *Withikutdharok* scripture. Journal of Thai Traditional and Alternative Medicine 2020;18(1):147-165.

Chanudom L, Tangpong J. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities from 13 Thai traditional plants. Wichcha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University 2011;30(1):1-11.

Chantarapon P, Bunpean A, Sangjan T, Phuksuk N. A systematic review of herbal medicinal formulas for skin disease treatment with Thai traditional medicine wisdom. Journal of Thai Traditional and Alternative Medicine 2023;21(1):175-185.

Choe E, Min DB. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2009;8(4):345-358.

Department of health service support. Medical arts division. Textbooks of Thai traditional medicine: Medicine 1, Department of Health service support, Ministry of Public health, Nonthaburi; 2006a.

Department of health service support. Medical arts division. Textbooks of Thai traditional medicine: Pharmacy, Department of Health service support, Ministry of Public health, Nonthaburi; 2006b.

European committee for antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) of the European society of clinical microbiology and infectious diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution 2003;9(8):1-7.

Huang XJ, Xiong N, Chen BC, Luo F, Hyang M, Ding ZS, et al. The antibacterial properties of 4, 8, 4', 8'-tetramethoxy (1,1'-biphenanthrene)-2,7,2',7'-tetrol from fibrous roots of *Bletilla striata.* Indian Journal of Microbiology 2021;61(2):195-202.

Janwitayanuchit I, Rangseepanurat W. Medical Bacteria. (2nd ed.). Bangkok: Chulalongkorn Pub; 2010.

Kaveti B, Tan L, Sarnnia, Kuan TS, Baig M. Antibacterial activity of *Piper betle* leaves. International Journal of Pharmacy Teaching & Practices 2011;2(3):129-132.

Khoka A. Antibiotics and antibiotic resistance. Journal of Medicine and Health Sciences 2020;27(2):125-139.

Kobayashi SD, Malachowa N, DeLeo FR. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. The American Journal of Pathology 2015;185:1518–1527.

Lao RCC, Yabes AM, Tobias-Altura M, Pangniban LCR, Makalinao IR. *In vitro* antibacterial and antibiofilm activities of *Piper betle* L. ethanolic leaf extract on *Staphylococcus* ATCC 29213. Acta Medica Philippina 2023;57(12):53-60.

Lubis RR, Marlisa, Wahuni DD. Antibacterial activity of betle leaf (*Piper betle* L.) extract on inhibiting *Staphylococcus aureus* in conjunctivitis patient. American Journal of Clinical and Experimental Immunology 2020;9(1):1-5.

Mamae S, Waema N, Kareng M, Benjamat A, Sriraksa S, Sae-Lim P. Stability evaluation and screening of the extract from Thai herbal formulations for antimicrobial activity against pathogens causing skin diseases. Journal of Traditional Thai Medical Research 2022;8(1):115-128.

Manok S, Limcharoen P. Investigating antioxidant activity by DPPH, ABTs and FRAP assay and total phenolic compounds of herbal extracts in Ya-hom Thepphachit. Advanced Science Journal 2015;15(1):106-117.

Muangkaew W, Kitisin T, Suwanmanee S, Mahakhunkitcharoen Y, Lablertlob N. Antimicrobial activity of nisin on common dermatological pathogens. Journal of Medicine and Health Sciences 2015;22(2):15-23.

Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. RSC Advances 2015;5(35):27986-28006.

Phansawan B. Free radicals, antioxidants and antioxidant activity determination. Thai Science and Technology Journal 2013;21(3):275-286.

Siri-in J, Thiraworawong T. Preliminary study of plant extracts with antibacterial activity against enteric and skin pathogens. EAU Heritage Journal Science and Technology 2020;13(3):99-114.

Supaphon P, Kongplub S, Chankaew S, Dulo U, Jeburaheng A. Evaluation of antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of extracts from seven Thai herbal plants. HCU Journal of Health Science 2022;26(2):146-156.

Swindle EJ, Brown JM, Rådinger, M. DeLeo FR, Metcalfe DD. Interferon-γ enhances both the anti-bacterial and the pro-inflammatory response of human mast cells to *Staphylococcus aureus*. Immunology 2015;146(3):470-485.

Thomas BT, Adeleke AJ, Raheem-Ademola RR, Kolawole R, Musa OS. Efficiency of some disinfectants on bacterial wound pathogens. Life Science Journal 2012; 9(2):752-755.

Trakranrungsie N, Chatchawanchonteera A, Khunkitti W. An in vitro evaluation of *Piper betle* skin cream as an anti-zoonotic dermatophytes. Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference: Animals, Veterinary Medicine, Bangkok (Thailand), 2004.

Visutti M. Antagonistic effect of Staphylococci of extracts from some local plants in Nakorn-Ratchasima province. KKU Science Journal 2017;45(4):805-816.

Yushananta P, Ahyanti M. The effectiveness of betle leaf (*Piper betle* L.) extract as a bio-pesticide for controlled of houseflies (*Musca domestica* L.). Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences 2021;9(E):895-900.