

ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพก่อโรคผิวหนัง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์

ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบโลดทะนงแดง

ANTIMICROBIAL SKIN PATHOGENS, ANTI-OXIDANT AND ANTI-TYROSINASE
ACTIVITIES OF *TRIGONOSTEMON REIDIOIDES* (KURZ) CRAIB CRUDE EXTRACTS

สุภัทสร วันสุทะ* และ อรณิชา ครองยุติ

Supasson Wansutha* and Ornnicha Krongyut

สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

Bachelor of Thai Traditional Medicine Program, Faculty of Science, Udon Thani Rajabhat University

Received: 23 August 2024

Revised: 15 October 2024

Accepted: 17 October 2024

บทคัดย่อ

โลดทะนงแดงเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณถอนพิษ แก้พิษงู แก้ฟกช้ำ เคล็ดบวม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพก่อโรคทางผิวหนัง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์และสารฟีนอลิกของสารสกัด รากโลดทะนงแดง โดยการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพด้วยวิธี broth microdilution และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดเอทานอลจากรากโลดทะนงแดงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพก่อโรค ผิวหนังโดยสามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC10231 ได้ดีที่สุด (MIC: 31.25 mg/mL, MBC: 31.25 mg/mL) รองลงมา คือการยับยั้ง เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (MIC: 250 mg/mL, MBC: 500 mg/mL) ดังนั้นสารสกัดที่ได้จากรากโลดทะนงแดงสามารถ นำมาใช้เป็นสารยับยั้งและฆ่าเชื้อโรคที่ก่อโรคผิวหนังได้ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่า IC_{50} เท่ากับ 623.28 ± 7.37 μ g/mL เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก และยังสามารถ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 809.63 ± 65.22 μ g/mL เปรียบเทียบกับ สารมาตรฐานกรดโคจิกซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) และสาร

* Corresponding author: นางสาวสุภัทสร วันสุทะ

E-mail: Supasson.wa@udru.ac.th

สกัดโสดทะนงแดงยังมีปริมาณสารสำคัญในสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 18.66 ± 0.07 mg QE/g extract และมีปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิก เท่ากับ 10.22 ± 0.13 mg GAE/g extract งานวิจัยนี้จึงเป็นการรายงานผลของสารสกัดโสดทะนงแดงที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางบำรุงผิวได้และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้สมุนไพรในท้องถิ่นนำไปเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรทางเลือกให้กับผู้บริโภคและสร้างมูลค่าทางเชิงพาณิชย์ได้

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพ, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, โสดทะนงแดง

Abstract

Trigonostemon reidioides (Kurz) Craib or Lod-thanong-deang was Thai traditional herb that properties of detoxifying, antivenin, bruise, sprains and swelling. This research aimed to determine antimicrobial, antioxidant, tyrosinase, total flavonoids content and total phenolics content of Lod-thanong-deang. The extracts were prepared by using solvents 95% ethanol. The anti-microorganisms was determined by broth microdilution method and antioxidant activity was determined by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH assay). From the results, it was found that inhibit on 3 strains of microorganisms were *Candida albicans* ATCC10231 (MIC: 31.25 mg/mL, MBC: 31.25 mg/mL), *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (MIC: 250 mg/mL, MBC: 500 mg/mL) respectively Therefore, Lod-thanong-deang extracted inhibition and antimicrobial activity. Antioxidant activity determined by DPPH assay (IC_{50} value of 623.28 ± 7.37 μ g/mL) compared with ascorbic acid. Moreover, it exhibited the strongest tyrosinase inhibition activity (IC_{50} value of 809.63 ± 65.22 μ g/mL) compared with Kojic acid, which was statistically significantly different (p -value < 0.05) and the highest total phenolic and flavonoid content (total flavonoids content to 18.66 ± 0.07 mg QE/g extract and total phenolics content to 10.22 ± 0.13 mg GAE/g extract). This research demonstrates that Lod-thanong-deang is

considered to be an interesting source of bioactive compounds and may be an alternative herb for cosmetic applications for value herbs alternative products for consumers.

Keywords: Anti-oxidant activity, Antimicrobial activity, Anti-tyrosinase activity
Trigonostemon reidioides (Kurz) Craib

บทนำ

โสดทะนงแดงชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Trigonostemon reidioides* (Kurz) Craib จัดอยู่ในวงศ์ EUPHORBIACEAE เป็นสมุนไพรไม้พุ่มขนาดเล็ก มีรากสะสมอาหารพองโต ผิวสีแดงอมม่วง เนื้อสีขาว สามารถพบได้ตามป่าในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และพื้นที่ป่าบ้านน้ำโมง ตำบลน้ำโมง อำเภอบัวชุม จังหวัดหนองคาย ตำรายาไทยใช้ราก มีรสร้อน ฝนน้ำกิน ทำให้อาเจียน เพื่อถอนพิษคนกินยาเบื่อ เมทาพิษเห็ดและหอย แก้กพิษงู แก่เสมหะเป็นพิษ แก่หิด แก่วัณโรค เป็นยาระบาย ฝนเกลือผง หรือคุดหนองถ้าผีแตก แก่ฟกช้ำ เคล็ดบวม แก่ปวดฝี คุมกำเนิด ต้มดื่ม แก่วัณโรค ฝนกับน้ำมะนาว หรือสุรา รับประทานแก้พิษงู ฝนทาแก้ฟกช้ำ เคล็ดขัดยอก (กรมวิชาการ, 2542) และตำรายาพื้นบ้านใช้ราก เข้ายากับน้ำมะนาว ฝนกับน้ำดื่ม แก้ผดผื่นแดง พิษแมงมุม ทำให้อาเจียน ถอนพิษเบื่อเมา เหง้า ฝนทา แก้สิว ฝ้า และฟกช้ำ เคล็ดบวม (กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 2561) และมีรายงานวิจัยพบว่า รากโสดทะนงแดงมีการนำมารักษาผู้ป่วยที่ถูกสัตว์พิษและงูกัดในโรงพยาบาลกาบเชิง และโรงพยาบาลพนมดงรักเฉลิมพระเกียรติ 80 พรรษา จังหวัดสุรินทร์ โดยการใช้ตำรับยาโสดทะนงแดง จำนวน 22 ราย พบว่าหลังจากได้รับยาสมุนไพร ผู้ป่วยจำนวน 17 ราย ร้อยละ 77.3 ไม่ได้รับยาแก้ปวด เนื่องจากไม่มีอาการปวดแผลและทุกรายไม่มีอาการแทรกซ้อนหรือเสียชีวิต (ดวงแก้ว ปัญญา และ ฤกษ์ชัย คตสุข, 2561) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง ด้วยการให้สมุนไพรโสดทะนงแดงและฉีดพิษงูเข้าหนูทดลองพบว่าสารสกัดโสดทะนงแดง สามารถช่วยยืดอายุการตายของหนูได้ (Utsintong et al., 2009) โดยสารจากโสดทะนงแดงสามารถช่วยจับกับโปรตีนพิษงูได้จริง (พรพิมล พลคำ และคณะ, 2561)

สารสำคัญของรากโสดทะนงแดงประกอบด้วยสาร trigonostemone, lotthanongine, redioides A, redioides B, redioides C, redioides D, redioides E, diterpenoid

ซึ่งเป็นสารสำคัญซึ่งสกัดได้จากส่วนของรากโสดของนางแดงมีคุณสมบัติต้านจุลชีพและแก้อักเสบ (Jayasuriya et al., 2004) ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าวผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญของการนำโสดของนางแดงมาศึกษาคุณสมบัติต้านจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคทางผิวหนังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคผิวหนังอักเสบ และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ของโสดของนางแดงในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (จินดาพร คงเดช, 2551) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิโดซันอนุมูลอิสระหรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (Birben et al., 2012) ซึ่งเราต้องเผชิญกับมลภาวะต่างๆ รวมทั้งรังสี แสงแดด ฝุ่นควัน เป็นต้นกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระส่งผลให้เกิดริ้วรอย ผิวหมองคล้ำ ฝ้า และโรคทางระบบผิวหนัง ดังนั้นสรรพคุณบำรุงผิวของโสดของนางแดงจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งในการนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรแบบที่เรีย *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่อาศัยอยู่บริเวณเยื่อของร่างกายปกติ เมื่อผิวหนังมีบาดแผลและมีสิ่งแปลกปลอมเชื้อจะสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ และทำให้เกิดโรคได้ทั้งจากการที่เชื้อกระจายไปตามกระแสเลือดหรือเชื้อทำลายเนื้อเยื่อเฉพาะที่ทำให้เกิดการอักเสบที่ผิวหนัง (กรมควบคุมโรค, 2556) แบคทีเรีย *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลเครื่องมือทางการแพทย์ และทำให้เกิดการติดเชื้อได้ผิวหนัง อาการต่อมขนอักเสบ (folliculitis) มีอาการผิวหนังแดงเป็นผื่นแดงขึ้นตามตัว เป็นฝี (Itah et al., 2005) และ *C. albicans* เป็นเชื้อรากลุ่มยีสต์ที่พบอยู่ในช่องปาก ในช่องคลอด ก่อโรคที่ผิวหนังจะทำให้มีผื่นแดง คัน ลามออกเป็นวงเล็กๆ บริเวณที่พบผื่นได้บ่อยคือ ใต้ราวนม ขาหนีบ ซอกกันซอกรักแร้ ซอกคอและซอกนิ้ว บางครั้งพบรูขุมขนอักเสบและตุ่มหนองร่วมด้วย (Peters et al., 2010)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิโดซันอนุมูลอิสระหรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระในภาวะปกติร่างกายของมนุษย์มีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระโดยการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุลและอีกส่วนได้จากร่างกายรับประทานเข้าไปจำพวกวิตามิน เบต้าแคโรทีน และสารกลุ่มแคโรทีนอยด์รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ส่วนใหญ่พบจากพืช (Carlsen et al., 2010) เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในธรรมชาติทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการสร้างเม็ดสี (melanin) โดยในเซลล์ผิวหนังเมลานินมีหน้าที่สำคัญในการป้องกันผิวหนังจากแสงแดด แต่ถ้า

มีการผลิตเมลานินมากเกินไปจนอาจก่อให้เกิดโรคความผิดปกติของสีผิวได้ ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจะสามารถช่วยลดปริมาณเมลานินที่มากเกินไปได้ (Chan et al., 2008) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากรากโศดทะนงแดงเพื่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรบำรุงผิว ได้แก่ การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพก่อโรคทางผิวหนัง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดโศดทะนงแดง เพื่อยืนยันฤทธิ์ของสมุนไพรในท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพสามารถนำไปเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรทางเลือกให้กับผู้บริโภคและสร้างมูลค่าเชิงพาณิชย์ได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร

เก็บสมุนไพรโศดทะนงแดง (*Trigonostemon reidioides* (Kurz) Craib) ส่วนรากสดจากป่าชุมชน บ้านน้ำโมง อำเภอบ้านดง จังหวัดหนองคาย มาล้างทำความสะอาดโดยล้างน้ำสะอาด 1 รอบ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 1 รอบ และหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ผึ่งลมที่อุณหภูมิห้องให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง และบดให้ละเอียดนำไปสกัดด้วยวิธีการหมัก (maceration) ดัดแปลงจาก Sharma et al. (2018) ด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยใช้อัตราส่วน 1:5 ส่วน ประกอบด้วยผงรากโศดทะนงแดง 1 กิโลกรัม ต่อตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 5 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (what man no.1) แยกส่วนกากแล้วนำมาสกัดซ้ำอีก 3 ครั้ง จากนั้นนำส่วนสารสกัดที่ละลายออกมากับตัวทำละลายที่แยกได้จากการกรองนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) คำนวณหาร้อยละผลผลิตของสารสกัด (%yield) แล้วเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำการศึกษาฤทธิ์ต่อไป

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพก่อโรคผิวหนัง

2.1 การเตรียมเชื้อจุลชีพ

แบคทีเรีย *S. aureus* ATCC25923 ทำการทดลองโดยการเชียโคลนินของเชื้อจาก stock เชื้อในอาหาร Mueller Hinton agar (MHA; ยี่ห้อ Himedia™, ประเทศ India) ลงในอาหาร Tryptic soy broth (TSB; ยี่ห้อ Himedia™, ประเทศ India) บ่มอุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อลงในอาหาร TSB อีก 1 รอบ บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แบคทีเรีย *P. aeruginosa* ATCC27853 ทำการทดลองโดยการเขี่ยโคลนเชื้อของเชื้อจาก stock เชื้อในอาหาร Mueller Hinton agar (MHA; ยี่ห้อ Himedia™, ประเทศ India) ลงในอาหาร Tryptic soy broth (TSB; ยี่ห้อ Himedia™, ประเทศ India) บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic jar) จากนั้นเขี่ยเชื้อลงในอาหาร TSB อีก 1 รอบ บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC10231 ทำการทดลองโดยการเขี่ยโคลนของเชื้อจาก stock เชื้อในอาหาร Sabouraud Dextrose agar (SDA; ยี่ห้อ Himedia™, ประเทศ India) ลงในอาหาร Sabouraud Dextrose broth (SDB; ยี่ห้อ Himedia™, ประเทศ India) บ่มอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic jar) จากนั้นเขี่ยเชื้อลงในอาหาร SDB อีก 1 รอบ บ่มอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 การทดสอบความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration : MIC)

ทำการทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี Broth dilution method ดัดแปลงจาก Balouiri et al. (2016) โดยทำการเจือจางสารสกัดหยาบรากโลดทะนงแดงอย่างเป็นลำดับ ส่วน (Two-fold dilution) ซึ่งมีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90 และ 1.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดละลายด้วย DMSO ความเข้มข้น 1% เติมลงใน 96 Well plate ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร และเติมเชื้อทดสอบโดยวัดปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.5×10^8 CFU/mL (0.5 MacFarland standard) เจือจางกับอาหาร MHB สำหรับการทดสอบในแบคทีเรีย และอาหาร SDB สำหรับการทดสอบในเชื้อรา โดยเติมเชื้อปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และเชื้อราที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำจานเพาะเชื้อมาตรวจสอบการเจริญของเชื้อซึ่งค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อบนหลุมอาหาร โดยมียาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (Tetracyclines) เป็นตัวควบคุม (control)

2.3 การทดสอบความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Minimum Bactericidal Concentration: MBC)

ทำการทดสอบด้วยวิธี Streak plate method ดำเนินต่อจากวิธี Broth dilution method จากการทดสอบ MIC นำความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการทดสอบ โดยการนำหลุมใสของ MIC มาเชย (streak) ลงบนหน้าอาหารแข็ง โดยอาหาร MHA สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย จากนั้นนำไปบ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และอาหาร SDA สำหรับเลี้ยงเชื้อรา นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ โดยค่า MBC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ทำให้ไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อในจานอาหารที่ทดสอบ

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดัดแปลงจาก Chu et al. (2000) โดยเตรียมสารสกัดโพลีฟีนอลในเมทานอลใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 78.625-5000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ละลายในเมทานอล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและทำปฏิกิริยาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยมีสารละลาย ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) เทียบกับกลุ่มควบคุม แล้วพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและ %inhibition เพื่อให้ได้สมการเส้นตรงและสัมประสิทธิ์เชิงเส้น (r^2) และเทียบหาค่า IC_{50} ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นร้อยละ 50 ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ การคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระได้จาก

$$\%inhibition = (A_{\text{ควบคุม}} - A_{\text{ทดสอบ}}) / A_{\text{ควบคุม}} \times 100$$

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี Dopachrome method ดัดแปลงจากวิธี Chan et al. (2008) นำสารสกัดรากชะงอกในน้ำความเข้มข้น DMSO 30% เจือจางสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายไฮโดรเจนเพอซเฟดบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (pH 6.8) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เอนไซม์ไทโรซิเนส

1.84 Units ผสมให้เข้ากันและ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนเติม สารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และทำปฏิกิริยาบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ช่วง ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (microplate reader) ใช้ Kojic acid เป็นสารมาตรฐาน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนสจาก

$$\text{Tyrosinase inhibition activity (\%)} = [(A_{\text{ควบคุม}} - B_{\text{ทดสอบ}}) / A_{\text{ควบคุม}}] \times 100$$

5. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมด (Total flavonoid content)

การหาปริมาณสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric ดัดแปลงจาก Chang et al. (2002) โดยเตรียมสารสกัดรากโศดทนงแดงความเข้มข้นตั้งแต่ 62.5-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากทำปฏิกิริยาแล้วจึงนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 437 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกับความเข้มข้นของสารสกัด โดยใช้เคอร์ซีติน (Quercetin: QE) เป็นสารมาตรฐาน แล้วจึงหาค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้น (r^2) เพื่อให้ได้กราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน จึงนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดแทนค่าในสมการเส้นตรงและคำนวณหาปริมาณของฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมด โดยรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลกับเคอร์ซีตินต่อกรัมสารสกัด (mg QE/g extract) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

6. การหาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด (Total phenolic content)

การหาปริมาณสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu reagent ดัดแปลงจาก Singleton & Rossi (1965) โดยเตรียมสารสกัดรากโศดทนงแดงในความเข้มข้นตั้งแต่ 62.5-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมสาร Folin-ciocalteu ความเข้มข้น 50% ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เติมสารละลาย โซเดียมคาบอเนต ความเข้มข้น 20% ปริมาตร 125 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกับความเข้มข้นของสารสกัด โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid:

GAE) เป็นสารมาตรฐาน แล้วจึงหาค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้น (r^2) เพื่อให้ได้กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก จึงนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดแทนค่าในสมการเส้นตรงและคำนวณหาปริมาณของฟีนอลิกรวมทั้งหมด โดยรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลกับกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g extract) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดสอบทำซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ ($n=3$) แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\text{mean} \pm \text{SD}$) และเปรียบเทียบกับความแตกต่างทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแต่ละกลุ่มโดยใช้สถิติ One Sample T-Test โปรแกรม SPSS โดยพิจารณาความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อ $p\text{-value} < 0.05$

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบรากโลดทะนงแดง

จากการสกัดสารสำคัญรากโลดทะนงแดงด้วยวิธีการหมักด้วยตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้รากโลดทะนงแดง (ตารางที่ 1) มีลักษณะสีน้ำตาลแดงเข้ม เหนียวหนืด มีกลิ่นฉุนเฉพาะตัว มีตะกอน พบว่า %yield ของสารสกัดรากทะนงแดง คือ 8.33% (v/v) มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ารากโลดทะนงแดงที่บดละเอียดเมื่อสกัดโดยแช่ในตัวทำละลายเอทานอลแล้วกรองเฉพาะส่วนใสและทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) พบว่าสารสกัดเอทานอลจากรากทะนงแดงมี %yield เท่ากับ 2.46% (w/w) (พรรณี หนูชื้อตรง และคณะ, 2551) ซึ่งกระบวนการในการสกัดสารสำคัญ ระยะเวลาในการแช่สมุนไพรแต่ละท้องถิ่นและตัวทำละลาย อาจแตกต่างกันทำให้ %yield แตกต่างกันได้ ซึ่งการสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นการแยกสารอาศัยหลักการละลายระหว่างตัวทำละลายกับสารสำคัญในสมุนไพรของการละลายความมีขั้ว (polarity) ของทั้งตัวทำละลายและสารสำคัญ (รัตน อินทรานุปรกรณ์, 2547) เอทานอลเป็นตัวทำละลายตัวทำละลายกึ่งมีขั้ว (semipolar solvent) จึงสามารถละลายสกัดสารสำคัญของพืช ได้แก่ tannins, polyphenols, polyacetylenes, flavonols, terpenoids, sterols, alkaloids (Pandey and Tripathi, 2014)

ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิตของสารสกัด (% yield)

ตัวอย่าง	น้ำหนักของสารสกัดหยาบ (ml)	ร้อยละของผลผลิต (v/v)	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัด
รากโลดทะนงแดง	416.27	8.33	สีน้ำตาลแดงเข้ม เหนียวหนืด มีกลิ่นฉุนเฉพาะตัว มีตะกอน

หมายเหตุ: ใช้ตัวทำละลาย ปริมาตร 5000 มิลลิลิตร

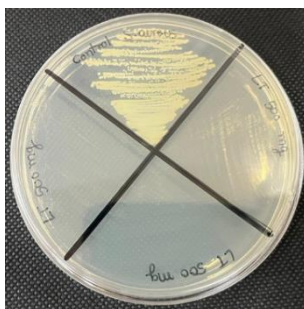
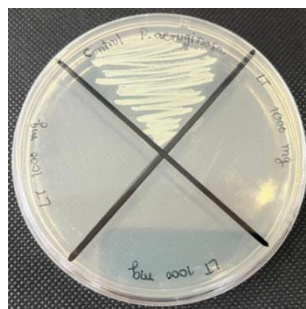
2. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพก่อโรคผิวหนังของสารสกัดหยาบรากโลดทะนงแดง

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพก่อโรคผิวหนังด้วยการหาความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุด ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) และความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบรากโลดทะนงแดงสามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC25923, *P. aeruginosa* ATCC27853 และ *C. albicans* ATCC10231 แสดงค่า MIC เท่ากับ 250, 250 และ 31.25 mg/ml ตามลำดับ และค่า MBC เท่ากับ 500, 500 และ 31.25 mg/ml ตามลำดับ พบว่าสารสกัดหยาบรากโลดทะนงแดงสามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ATCC10231 ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ *S. aureus* ATCC25923 และแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ATCC27853 ซึ่งยาปฏิชีวนะ tetracyclines กลุ่มควบคุมแสดงค่า MIC และ MBC ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.25-5 mg/ml (ตารางที่ 2) รายงานก่อนหน้านี้ได้ศึกษาสารสกัดโลดทะนงแดงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก พบว่าสารสกัดโลดทะนงแดงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* แสดงค่า MIC เท่ากับ 12.5 mg/mL และค่า MBC เท่ากับ 25.0 mg/mL และยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* แสดงค่า MIC และ MBC เท่ากับ 6.25 mg/mL (Sangdee et al., 2021) สารสกัดรากโลดทะนงแดงสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสารสำคัญกลุ่มไตรปีนอยด์ของสารสกัดรากโลดทะนงแดง ได้แก่ rediocide C และ rediocide G สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อโรคติดเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* แสดงค่า MIC เท่ากับ 3.84 μ M (Kaemchantuek et al., 2017) ดังนั้นสารสำคัญที่ได้จากรากโลดทะนงแดงจึงมีความสำคัญสามารถนำมาพัฒนาเป็นยายับยั้งเชื้อจุลชีพและฆ่าเชื้อจุลชีพที่ก่อโรคได้

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพก่อโรคผิวหนัง

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (mg/ml)					
	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>	
	ATCC25923		ATCC27853		ATCC10231	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
สารสกัด LT	250	500	250	500	31.25	31.25
Tetracyclines	1.25	5	1.25	5	1.25	2.5

หมายเหตุ: LT คือ สารสกัดรากโลดทะนงแดง, ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

(A) *S. aureus* ATCC25923(B) *P. aeruginosa* ATCC27853(C) *C. albicans* ATCC10231

รูปที่ 1 แสดงผล MBC ของความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อจุลชีพ

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบโลดทะนงแดง

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบโลดทะนงแดงด้วยวิธี DPPH assay โดยมีกรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบโลดทะนงแดงแสดงค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ เท่ากับ $623.28 \pm 7.37 \mu\text{g/mL}$ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ $6.00 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) (ตารางที่ 3) สารอนุมูลอิสระ DPPH เป็นสารอนุมูลอิสระรูปแบบเสถียรในตัวทำละลายเมทานอล สารละลายมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515 - 517 นาโนเมตร เมื่อสาร DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสีของสารละลายสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้

เป็นมาตรฐาน (Chu et al., 2000) จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method โดยมีกรดโคจิกเป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบโลดทะนงแดงแสดงค่า IC_{50} ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เท่ากับ $809.63 \pm 65.22 \mu\text{g/mL}$ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดโคจิก แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ $11.78 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) (ตารางที่ 3) งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดหยาบโลดทะนงแดงสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ เท่ากับ $23.27 \pm 0.65\%$ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบโลดทะนงแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เหมาะสำหรับการพัฒนาเป็นเวชสำอาง ลดริ้วรอย ความหมองคล้ำ และเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตัวอย่าง	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนส IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
สารสกัดรากโลดทะนงแดง	809.63 ± 65.22^b	502.17 ± 7.99^b
ascorbic acid	6.00 ± 0.05^a	-
kojic acid	-	11.78 ± 0.14^a

หมายเหตุ: ^{a,b}ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างของฤทธิ์ต่างๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$)

4. ปริมาณของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และสารกลุ่มฟีนอลิก

จากการทดสอบหาปริมาณสารของสารสกัดหยาบโลดทะนงแดงในกลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric โดยมีสารเคอร์ซีตินเป็นสารมาตรฐาน และสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu reagent โดยมีกรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบโลดทะนงแดงปริมาณของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เท่ากับ $18.66 \pm 0.07 \text{ mg QE/g extract}$ และมีปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิก เท่ากับ $10.22 \pm 0.13 \text{ mg GAE/g extract}$ (ตารางที่ 4) สารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยทำหน้าที่ในการหน่วงเหนี่ยวหรือเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) จึงช่วยหยุดปฏิกิริยาถูกโซ่

ของอนุมูลอิสระได้ (Chu et al., 2000) และคุณสมบัติด้านจุลชีพและแก้อักเสบได้ (Jayasuriya et al., 2004) โลดทะนงแดงประกอบด้วยสารสำคัญในกลุ่ม diterpenoids, triterpenoids, sesquiterpenoids, alkaloids, lignans, flavonoids, coumarins และ steroids ซึ่งสารสำคัญที่พบในรากโลดทะนงแดง ได้แก่ trigonostemone, lotthanongine, rediocides A, rediocides B, rediocides C, rediocides D, rediocides E, diterpenoid และจากการวิจัยในครั้งนี้พบว่าโลดทะนงแดงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพก่อโรคทางผิวหนัง ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้ในอนาคต

ตารางที่ 4 ปริมาณของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และสารกลุ่มฟีนอลิก

สารสำคัญ	ปริมาณของสารกลุ่มสารสำคัญในสารสกัด
สารกลุ่มฟลาโวนอยด์รวม	18.66 ± 0.07 mg QE/g extract
สารกลุ่มฟีนอลิกรวม	10.22 ± 0.13 mg GAE/g extract

หมายเหตุ: GAE = Gallic acid, QE = Quercetin

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเอทานอลจากรากโลดทะนงแดงที่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพก่อโรคผิวหนังโดยสามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพได้ โดยยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ATCC10231 ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ *S. aureus* ATCC25923 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ดังนั้นสารสกัดที่ได้จากรากโลดทะนงแดงสามารถนำมาใช้เป็นสารยับยั้งและฆ่าเชื้อโรคที่ก่อโรคผิวหนังได้ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ และยังมีปริมาณสารสำคัญในสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และมีปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิกอีกด้วย งานวิจัยนี้จึงเป็นการรายงานผลของสารสกัดโลดทะนงแดงที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางบำรุงผิวได้และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้สมุนไพรในท้องถิ่นนำไปเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรทางเลือกให้กับผู้บริโภคและสร้างมูลค่าทางเชิงพาณิชย์ได้ แต่ต้องมีการวิจัยเพิ่มเติมในขั้นตอนวิธีการสกัดสารสำคัญ การศึกษาด้านพิษวิทยา (Toxicity) และการวิจัยในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และการศึกษาทางคลินิกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (กองทุน ววน.) ประจำปีงบประมาณ 2566 และคณะวิทยาศาสตร์ ศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อการวิจัยและพัฒนาท้องถิ่น สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย และขอบคุณผู้ร่วมโครงการวิจัยที่ได้ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานทำให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

- กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. (2561). สมุนไพรแก้แมลงสัตว์กัดต่อย. *วารสารกรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก*, 1(4), 1-10.
- กรมควบคุมโรค. (2556). *ตำราวัคซีนและการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค*. มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.
- กรมวิชาการ. (2542). *คัมภีร์แพทยศาสตร์สงเคราะห์ภูมิปัญญาทางการแพทย์และมรดกทางวัฒนธรรมของชาติ*. องค์การคำครุสภา.
- จินดาพร คงเดช. (2551). *การผลิตสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชเพื่อใช้ในเครื่องสำอาง*. (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี).
- ดวงแก้ว ปัญญาภู และ กฤษณะ คตสุข. (2561). โลดทะนงแดงสมุนไพรแก้พิษงู. *วารสารกรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก*, 1(4), 11-20.
- พรรณี หนูชื่อตรง, ดวงเดือน เมฆสุริยนทร และ บุญรัตน์ จันทรทอง. (2551). *กลไกความเป็นพิษของสารสกัดโลดทะนงแดงในเซลล์เอ็มบริโอฟิสิบเกา*. (รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พรพิมล พลคำ, ศรินทร์ ทองธรรมชาติ, ทองสุข พละมา, มนขวัน วังกลางกูร และ สุขนา วานิช. (2561). *การศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนของพืชสมุนไพรต้านพิษแมลงสัตว์กัดต่อย ด้วยวิธี Electrophoresis*. (รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์). มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.

รัตน์ อินทรานุปกรณ์. (2547). การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร.

กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S.K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79.

Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ Journal*, 5(1), 9-19.

Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., & Holte, K. (2010). The total antioxidant content of than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, 9(3), 1-11.

Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Wong, L. F., Lianto, F. S., Wong, S. K., Lim, K. K., Joe, C. E. & Lim, T. Y. (2008). Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*, 109, 477-483.

Chang, Q., Zuo, Z., Harrison, F., & Chow, M. S. S. (2002). Hawthorn. *Journal of Clinical Pharmacology*, 42(6), 605-612.

Chu, Y.H., Chang, C. L., & Hsu, H. F. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 561-566.

Itah, A. & Essien, J. (2005). Growth profile and hydrocarbon clastic potential of microorganisms isolated from Tarballs in the Bight of Bonny, Nigeria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(7), 1317-1322.

Jayasuriya, H., Zink, D. L., Borris, R. P. Nanakorn, W., Beck, H. T., Balick, M. J., Goetz, M. A., Gregory, L., Shoop, W. L., & Singh, S. B. (2004). Redioides B-E, potent insecticides from *Trigonostemon reidioides*. *Journal of Natural Products*, 67(2), 228-231.

- Kaemchantuek, P., Chokchaisiri, R., Prabpai S., Kongsaree, P., Chunglok, W., Utaipan, T., Chamulitrat, W., & Suksamrarn, A. (2017). Terpenoids with potent antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* from *Trigonostemon reidioides* roots. *Tetrahedron*, 73(12), 1594-1601.
- Pandey, A. & Tripathi, S. (2014). Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(5), 115-119.
- Peters, B.M., Jabra-Rizk, M.A., Scheper M.A., Leid, J. G., Costerton, J. W., & Shirtliff, M. E. (2010). Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* - *Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(3), 493–503.
- Sangdee, A., Sangdee, K., Bunchalee, P., & Seephonkai, P. (2021). Antibacterial activity and mechanism of action of trigonostemone against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Tropical Biomedicine*, 38(4), 484-490.
- Sharma, B. R., Kumar, V., Gat, Y., Kumar, N., Parashar, A., Pinakin, D. J. (2018). Microbial maceration: a sustainable approach for phytochemical extraction. *3 Biotech*, 8(9), 401. doi: 10.1007/s13205-018-1423-8.
- Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144.
- Utsintong, M., Talley, T. T., Taylor, P. W., Olson, A. J., & Vajragupta, O. (2009). Virtual Screening Against α -Cobratoxin. *Journal of Biomolecular Screening*, 14(9), 1109–1118.