

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยากพรากหนอนตายหยาก

ณพัฐอร บัวฉวน^{1*} เสกพร ต้นศรีประภาศิริ²

Received : May 5, 2022

Revised : October 5, 2022

Accepted : October 7, 2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยากพรากหนอนตายหยาก โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอลและเมทานอล พบว่า สารสกัดหยากพรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงมีปริมาณเท่ากับ 16.12 ± 0.53 mg GAE/g และ 23.19 ± 0.69 QE/g ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABST และ FRAP assay พบว่าสารสกัดหยากพรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 13.21 ± 0.38 mg/mL 6.45 ± 0.41 mg/mL 182.18 ± 0.28 μ mol/g extract และการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* TISTR746 พบว่า สารสกัดหยากพรากหนอนตายหยากในตัวทำละลายเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* TISTR746 ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยบริเวณที่ยับยั้งอยู่ที่ 8.54 ± 0.87 มิลลิเมตร ซึ่งสารสกัดหยากพรากหนอนตายหยากในตัวทำละลายเฮกเซนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้อย่างสมบูรณ์โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ระหว่าง 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ข้อมูลการศึกษานี้จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการพัฒนาสมุนไพรพื้นบ้านให้เกิดมูลค่าต่ออุตสาหกรรมการรักษาต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย หยากพรากหนอนตายหยาก สารสกัดหยาก

¹ อาจารย์ประจำหลักสูตร สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
อีเมล: napattaorn@vru.ac.th

² อาจารย์คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ อีเมล: sekporn@vru.ac.th

* ผู้นิพนธ์หลัก อีเมล: napattaorn@vru.ac.th

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF CRUDE EXTRACT FROM THE ROOTS
OF *STEMONA COLLINSAE* CRAIBNapattaorn Buachoon^{1*} Sekporn Tansriprasiri²

ABSTRACT

This research aimed to study total phenolic content, total flavonoid content, antioxidant activity, and antimicrobial activity of crude extract from the roots of *Stemona collinsae* Craib extracted by 4 different solvents: hexane, ethyl acetate, ethanol, and methanol. It was found that crude extract from the roots of *Stemona collinsae* Craib had the total phenolic content and total flavonoid content of 16.12 ± 0.53 mg GAE/g and 23.19 ± 0.69 QE/g respectively. According to the test of antioxidant activity using DPPH ABTS and FRAP assay methods, the crude extract from the roots of *Stemona collinsae* Craib extracted by ethanol had the highest antioxidant activity; EC₅₀ of 13.21 ± 0.38 mg/mL 6.45 ± 0.41 mg/mL 182.18 ± 0.28 μ mol/g extract. The study on antimicrobial activity on *Staphylococcus aureus* TISTR746 showed that the hexane-extracted crude extract from the roots of *Stemona collinsae* Craib was the most effective at inhibiting *Staphylococcus aureus* TISTR746, with the average zone of inhibition area of 8.54 ± 0.87 millimeters. The crude extract from the roots of *Stemona collinsae* Craib extracted by hexane could completely inhibit the growth of bacteria, MIC and MBC values ranged between 25 and 50 mg/mL. The study results shall be considered basic knowledge for developing local herbs to establish value added to medical treatment industry in the future.

Keywords: Antioxidant activity, Antimicrobial activities, *Stemona collinsae* Craib, Crude extract

¹ Lecturer of Chemistry Program, Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage, e-mail: napattaorn@vru.ac.th

² Lecturer of Faculty of Industrial Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage, e-mail: sekporn@vru.ac.th

* Corresponding author, e-mail: napattaorn@vru.ac.th

บทนำ

สารต้านอนุมูลอิสระถือว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจาก อนุมูลอิสระประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิด ที่ทำหน้าที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และ ไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำ และสารประกอบที่ละลาย ในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (Singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (Synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (บุหริน พันธุ์สรรค์, 2556; ณพัชร บัวฉวน, 2558)

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดในร่างกายมีหน้าที่ปกป้องร่างกายปกป้องรังสียูวีและเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย อีกทั้งยังมีหน้าที่ในการรักษาสมดุลของน้ำ และอุณหภูมิในร่างกายอีกด้วย ในกรณีที่มีการบาดเจ็บที่ผิวหนังเป็นบริเวณกว้าง และลึกนั้น ผลที่ตามมาคือการเสียสมดุลต่าง ๆ ของร่างกายตามมาเช่นการสูญเสียน้ำจากการระเหยออกจากบาดแผลจนอาจจะทำให้เกิดการสูญเสียน้ำในร่างกายเป็นสาเหตุให้เกิดการช็อกได้ หากปล่อยทิ้งไว้ไม่ได้รับการรักษาอย่างรวดเร็วอาจทำให้การหายของแผลเกิดเป็นแผลเป็นนูนและดิ่งรังในที่สุด นอกจากนี้การรักษาบาดแผลที่ใช้เวลานานยังเพิ่มโอกาสทำให้เกิดการติดเชื้อและทำให้แผลแย่ลงไปอีก ซึ่งผิวหนังของมนุษย์นั้นจะมีเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นอาศัยอยู่หลายชนิดโดยชนิดที่พบบ่อย ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* บนผิวหนังของมนุษย์ซึ่งสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังชั้นตื้นหรือติดเชื้อที่รุนแรงได้ (นิธิ ตั้งศิริทรัพย์, 2555) สาเหตุที่สำคัญและพบบ่อยที่สุดถึงร้อยละ 80 ของโรคผิวหนัง เช่น โรคผิวหนังอักเสบจากสารระคายเคือง โรคผิวหนังอักเสบจากภูมิแพ้ โรคลมพิษ โรคผิวหนังอักเสบจากสารร่วมกับแสง และยังพบปัจจัยทางชีวภาพทำให้เกิดโรคผิวหนังติดเชื้อจากแบคทีเรีย โรคผิวหนังจากเชื้อรา โรคผิวหนังจากเชื้อไวรัสและโรคผิวหนังจากพยาธิ (พิชญพรพรค ทองสุข และคณะ, 2555) และจากการศึกษาพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* สามารถถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยหลายชนิด (อัฐญาพร ชัยชมภู และณฤมล ทองไว, 2555)

หนอนตายหยาก (*Stemona collinsae* Craib.) เป็นไม้พุ่มกึ่งเลื้อยในตระกูล Stemonaceae หัวเป็นพวงคล้ายกระชายขึ้นในป่าทั่ว ๆ ไปมีมากแถบภาคกลางและภาคเหนือในประเทศไทยพบอย่างน้อย 7 ชนิดซึ่งแต่ละท้องถิ่นเรียกชื่อแตกต่างกันไป รากของหนอนตายหยากมีฤทธิ์ฆ่าหนอนชาวบ้านจึงนำไปใส่ไหปลาร้าเพื่อฆ่าแมลง เป็นไม้เถาเลื้อยลูกเลื้อยพันต้นไม้อื่น เถากลมสีเขียว มีรากอยู่ใต้ดินคล้ายกระชาย เป็นไม้เลื้อยใบเดี่ยว รากออกเป็นกระจุก ใบ ออกเรียงสลับ ใบรูปหัวใจ กว้าง 4-6 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร โคนใบเว้า ปลายใบเรียวแหลมเส้นใบแตกออกจากโคนใบ ขนานกันไปทางด้านปลายใบ แผ่นใบเป็นคลื่น ขอบใบเรียบหรือบิด เป็นคลื่น เล็กน้อย ก้านใบยาว ดอก เป็นดอกเดี่ยว ออกตามซอกใบ ดอกสีแดงเข้ม กลีบดอกมี 4 กลีบ กลีบดอก ด้านนอกมีสีเขียวปนเหลืองโคนกลีบดอกติดกัน ผล ลักษณะเป็นฝัก ปลายแหลม ขนาดกว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 3 เซนติเมตร ในรากหนอนตายหยากจะพบกลุ่มสารสำคัญ ได้แก่ Stemonine, Stemonidine, IsoStemonidine, Isotuberostemonine, Tuberostemonine, Hypotuberostemonine, Oxtuberostemonine, Protostemonine เป็นต้น ส่วนสารอื่น ๆ ที่พบ เช่น stemonacetal, stemonal, stemonone, rotenoid compound จากการทดลองกับสัตว์ทดลองพบว่า สมุนไพรหนอนตายหยากสามารถ

ยับยั้งการไอของสัตว์ทดลองได้ และมีฤทธิ์กระตุ้นประสาทส่วนกลางของระบบหายใจ ทำให้การหายใจได้ผลช้าลง สารสกัดที่ได้จากหนอนตายหยากรามีฤทธิ์ฆ่าพยาธิหรือเชื้อโรคได้หลายชนิด จากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันกับหนูถีบจักรทดลอง ด้วยการป้อนสารสกัดจากรากในขนาด 0.25-80 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ และขนาด 10 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลาหนึ่งเดือน ไม่พบความเป็นพิษของสารสกัดหนอนตายหยากร ทั้งนี้เนื่องจากยังไม่พบงานวิจัยที่นำสารสกัดรากหนอนตายหยากรมาทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และจากข้อมูลข้างต้นของสารสำคัญที่ส่วนใหญ่จะถูกพบในรากและมีการนำสารสำคัญในรากหนอนตายหยากรมาใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากร และเป็นข้อมูลพื้นฐาน ในการนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ในสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากร
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากร
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากร

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำตัวอย่างรากหนอนตายหยากร จากตำบลนาดี อำเภอนาดี จังหวัดปราจีนบุรี ช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2564 มาทำความสะอาดและนำมาตากให้แห้ง จากนั้นนำมาบดหยาบ และนำรากหนอนตาย หยากรจำนวน 500 กรัม แล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอลและเมทานอล โดยใช้ตัวทำละลายชนิดละ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการแช่เย็น (Maceration) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายโดยใช้เครื่องกรองแบบสุญญากาศ และนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 °C จะได้เป็นสารสกัดหยาบชั้นเอทานอล ซึ่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบแต่ละตัวทำละลายที่ได้ และเก็บตัวอย่างไว้เพื่อตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากรากหนอนตายหยากร

การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบ (%w/w) = (น้ำหนักสารสกัดหยาบ × 100)/น้ำหนักแห้ง

1. การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากร

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Slinkard, & Singleton (1997) นำสารละลายตัวอย่างแต่ละชนิดมาอย่างละจำนวน 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายฟอร์ลิน 500 ไมโครลิตร เขย่า และ เติมสารละลาย 20 % Na_2CO_3 1,000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร โดยทำการชั่งสารละลายมาตรฐานแกลลิก 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นเจือจางด้วยเอทานอล ให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิตรในขวดปรับปริมาตร ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) (เตรียมสารละลายมาตรฐานเหมือนสารละลายตัวอย่าง และเตรียม Blank โดยใช้ น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน

กรดแกลลิก โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำและหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานแกลลิก (mg GAE /g extract)

2. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบรากหนอนตายอยากร

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoids content) เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Prommuak, D-Eknamkul, & Shotipruk, (2008) นำสารละลายตัวอย่างแต่ละชนิดมาอย่างละจำนวน 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 1% $AlCl_3$ ปริมาตร 1,800 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader การเตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีตินที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เตรียมสารละลายมาตรฐานเหมือนสารละลายตัวอย่าง และเตรียม Blank โดยใช้ น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำและหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานเคอร์ซีติน (mg QE /g extract)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical scavenging activity) โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Zhu et al. (2006) โดยเตรียมสารสกัดตัวอย่างแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 50-300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นหรือสารละลายมาตรฐานปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.1 โมล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยใช้ BHT, BHA, Vitamin C และ α -Tocopherol เป็นสารมาตรฐานทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้วิเคราะห์หาร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (% inhibition DPPH) โดยคำนวณจากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [(Abs_{Control} - Abs_{Sample}) \times 100] / Abs_{Control}$$

นำค่า % radical scavenging activity มาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาค่า EC_{50}

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS radical scavenging activity) โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Re et al. (1999)

โดยเตรียมสาร ABTS ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมล ผสมกับ potassium persulfate (KPS) ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมล (2:1) ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 ชั่วโมง นำมาเจือจางและ วัดค่าการดูดกลืนแสงให้มีความเท่ากับ 0.700 ± 0.020 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เตรียมสารสกัดตัวอย่างแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 50-300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำสารละลายของสารสกัดตัวอย่างแต่ละชนิดมา 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงให้มีความเท่ากับ 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยใช้ BHT, BHA, Vitamin C และ α -Tocopherol เป็นสารมาตรฐานทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้วิเคราะห์หาร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (% Inhibition ABTS) โดยคำนวณจากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [(Abs_{Control} - Abs_{Sample}) \times 100] / Abs_{Control}$$

นำค่า % radical scavenging activity มาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาค่า EC_{50}

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Benzie & Strain, (1996) เตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสม Acetate buffer pH 3.5 มิลลิโมลาร์ $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ และ สารละลาย TPTZ ใน 40 มิลลิโมลาร์ HCl อัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ

ทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำเตรียมสารสกัดตัวอย่างแต่ละชนิดมาเติมสาร FRAP reagent ดังนี้

A (Test sample) : สารสกัดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ผสม FRAP reagent 9 มิลลิลิตร

B (Blank) : สารสกัดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ผสม Acetate buffer 9 มิลลิลิตร

C (Control) : Ethanol 1 มิลลิลิตร ผสม FRAP reagent 9 มิลลิลิตร

หลังจากนั้นนำสาร A B และ C มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณค่าการดูดกลืนแสงจากสมการ

$$ABS = A - B - C$$

คำนวณความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (FRAP value) โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของ Ferrous sulfate ($FeSO_4$) แสดงค่าในรูปของมิลลิโมลาร์สมมูลของ Fe^{2+} ต่อกรัมสารสกัด (mM Fe^{2+} equivalent/g sample extract)

5. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยาก

5.1 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากโดยวิธีการ Agar well diffusion method ดัดแปลงวิธีการของ Balouiri et al., (2016); Bagul, & Sivakumar, (2016) โดยนำสารสกัดตัวอย่างมาทดสอบทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *S. aureus* TISTR746 นำเชื้อแบคทีเรียเลี้ยงในอาหาร Mueller Hinton broth ทำการบ่มเชื้อ 24 ชั่วโมง และปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ประมาณ 10^8 cfu/ml โดยทำการเทียบกับ McFarland standard # 0.5 ทำการกระจายเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Mueller Hinton agar เจาะหลุมโดยใช้ Cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร และนำสารสกัดตัวอย่างแต่ละตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (Zone of inhibition) ที่เกิดขึ้นในหน่วยมิลลิเมตร เปรียบเทียบกับ DMSO ความเข้มข้นที่ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ และสารปฏิชีวนะมาตรฐานสำหรับแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ Streptomycin และ Tetracycline ทำการประเมินผลการยับยั้งของสารสกัด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.2 การศึกษาความเข้มข้นขั้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibition Concentration; MIC)

การศึกษาความเข้มข้นขั้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Tube dilution method (Balouiri et al., 2016; Lalitha, 2004) นำสารสกัดแต่ละตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น (1.562, 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ด้วยอาหาร Mueller Hinton broth เติมเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR746 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (v/v) นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบผลในการยับยั้ง โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารที่ผ่านการบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไปขีดเชื้อแบบง่ายลงบนผิวหน้าอาหารแข็งและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำจานเพาะเชื้อมา ตรวจสอบการเจริญ โดยค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อบนจานอาหาร ทั้งนี้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.3 การศึกษาค่าความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC)

การศึกษาค่าความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Plate dilution ดัดแปลงวิธีการของ Bagul, & Sivakumar, (2016); Jorgensen, & Ferraro, (2009) โดยนำความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างแต่ละตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมาใช้ในการทดสอบ นำสารสกัดตัวอย่างมาทำการเจือจางลงในอาหาร Mueller Hinton broth เพาะเชื้อแบคทีเรียโดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาตรวจสอบผลการทำลายเชื้อทดสอบโดยการกระจายเชื้อบนผิวอาหาร Mueller Hinton agar ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรีย ตรวจสอบการเจริญของเชื้อและอ่านค่า MBC โดยค่า MBC ที่อ่านได้คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ทำให้ไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อในจานอาหารที่ทดสอบ ทั้งนี้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ผลการวิจัยและอภิปราย

1. ผลการสกัดสารจากรากหนอนตายหยาก

จากการนำรากหนอนตายหยากมาทำให้แห้ง ทำการบดให้ละเอียด และชั่งน้ำหนัก 500 กรัม แล้วทำการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอล และเมทานอล โดยแช่ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการกรองและระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้เป็นส่วนสกัดหยากที่มีลักษณะข้นเหนียว และพบว่าสารสกัดจากรากหนอนตายหยากจากตัวทำละลายทั้ง 4 มีน้ำหนักสารสกัดหยากและร้อยละสารสกัดหยาก ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 น้ำหนักและร้อยละของสารสกัดหยากจากรากหนอนตายหยากในตัวทำละลายแต่ละชนิด

ชนิดตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัดหยาก (กรัม)	ร้อยละสารสกัดหยาก (กรัม)
n-hexane	24.21	4.84
ethyl acetate	20.82	4.16
ethanol	25.68	5.13
methanol	22.12	4.42

จากตารางที่ 1 เมื่อนำรากหนอนตายหยากไปทำการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอล และเมทานอล พบว่า สารสกัดหยากจากรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีน้ำหนักสารสกัดหยากสูงที่สุด (25.68 กรัม) คิดเป็นร้อยละสารสกัดหยาก 5.13 กรัม รongลงมาคือ สารสกัดหยากจากรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (24.21 กรัม) ตัวทำละลายเมทานอล(22.12 กรัม) และตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (20.82 กรัม) คิดเป็นร้อยละสารสกัดหยาก 4.84 4.42 และ 4.16 กรัม ตามลำดับ

2. ผลการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบราก หนอนตายหยากในตัวทำละลายแต่ละชนิด

จากการนำสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอล และเมทานอล และนำไปหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่า สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีสารปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (16.12 ± 0.53 mg GAE/g extract) และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด (23.19 ± 0.69 mg QE/g extract) รองลงมาคือ สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมีสารปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 15.45 ± 0.24 mg GAE/g extract และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 22.61 ± 0.82 mg QE/g extract สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีสารปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 14.95 ± 0.68 mg GAE/g extract และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 20.43 ± 0.18 mg QE/g extract และสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีสารปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 14.39 ± 0.56 mg GAE/g extract และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 19.39 ± 0.35 mg QE/g extract ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบราก
หนอนตายหยากในตัวทำละลายแต่ละชนิด

สารสกัดหยาบจากพืช	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g extract)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g extract)
Crude n-hexane	15.45 ± 0.24	22.61 ± 0.82
Crude ethyl acetate	14.39 ± 0.56	19.39 ± 0.35
Crude ethanol	16.12 ± 0.53	23.19 ± 0.69
Crude methanol	14.95 ± 0.68	20.43 ± 0.18

การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABST และ FRAP assay และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบโดยวิธีการ Agar well diffusion method ของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอล และเมทานอล จากการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีน้ำหนักสารสกัดหยาบสูงที่สุด และเมื่อทำการปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดพบว่า สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีความเป็นขี้ผึ้งจึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีสภาพขี้ผึ้งที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิกจะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขี้ผึ้ง ดังนั้นเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นขี้ผึ้งแตกต่างกันจึงได้ปริมาณฟีนอลิกที่แตกต่างกัน (Loudon, 2002) และผลการวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยของวสันต์ สุมนิธิ์ และคณะ (2557) และงานวิจัยของธนศักดิ์ แซ่เลี้ยว และคณะ (2551) สารสกัดหยาบที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลพบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด และจะพบว่าการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เพราะทั้งสารประกอบฟีนอลิกต่างก็เป็นสารอินทรีย์เหมือนกันที่จะเกิดการละลายตามหลักการละลายกันได้

(Like dissolves like) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้สำหรับสกัดสารฟีนอลิกทั้งหมดได้แก่ เมทานอล เอทานอล และตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน เอทิลอะซิเตท นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกยังสามารถละลายในน้ำได้ นอกจากนี้ในการหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีขั้ว ดังนั้นเมื่อใช้เอทานอลในการสกัดจึงได้ปริมาณฟลาโวนอยด์สูง เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงและมีไฮโดรเจนที่สามารถแตกตัวได้สูง (Loudon, 2002) ผลจากการทดลองหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีปริมาณสูงซึ่งสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เนื่องจากสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในกลุ่มของสารฟีนอลิกจากผลการทดลองที่ได้พบว่า มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในช่วง 16.12–14.39 mg GAE/g extract และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในช่วง 23.19–19.39 mg QE/g extract โดยมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Boonjira et al., (2018) ที่ทำการศึกษากปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่า สารสกัดรากหนอนตายหยากมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 15.58 mg GAE/g extract และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในช่วง 22.12 mg QE/g extract

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอล และเมทานอล ด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP assay พบว่า สารสกัดหยากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH assay มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 13.21 ± 0.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี ABTS assay สารสกัดหยากหนอนตายหยาก มีค่า EC_{50} เท่ากับ 6.45 ± 0.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบความสามารถเป็นตัวรับอิเล็กตรอนของสารสกัดหยากหนอนตายหยาก เท่ากับ 182.18 ± 0.28 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยากหนอนตายหยาก รองลงมาคือ สารสกัดหยากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 13.89 ± 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี ABTS assay สารสกัดหยากหนอนตายหยาก มีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.39 ± 0.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบความสามารถเป็นตัวรับอิเล็กตรอนของสารสกัดหยากหนอนตายหยาก เท่ากับ 204.29 ± 0.22 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด สารสกัดหยากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 14.06 ± 0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี ABTS assay สารสกัดหยากหนอนตายหยาก มีค่า EC_{50} เท่ากับ 8.52 ± 0.79 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบความสามารถเป็นตัวรับอิเล็กตรอนของสารสกัดหยากหนอนตายหยาก เท่ากับ 221.68 ± 0.22 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ สารสกัดหยากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 14.54 ± 0.43 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี ABTS assay สารสกัดหยากหนอนตายหยาก มีค่า EC_{50} เท่ากับ 9.11 ± 0.47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบความสามารถเป็นตัวรับอิเล็กตรอนของสารสกัดหยากหนอนตายหยาก เท่ากับ 243.38 ± 0.31 ไมโครโมลต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 แสดงว่า สารสกัดหยากหนอนตายหยาก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานได้แก่ BHT BHA Vitamin C และ α -Tocopherol

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP assay ของสารสกัดหยาบ รากหนอนตายหยากในตัวอย่างแต่ละชนิด

การทดสอบ	DPPH assay EC ₅₀ (mg/mL)	ABTS assay EC ₅₀ (mg/mL)	FRAP assay ($\mu\text{mol/g extract}$)
สารมาตรฐาน			
BHT	13.56 $\pm$ 0.32	8.45 $\pm$ 0.35	222.45 $\pm$ 0.24
BHA	13.76 $\pm$ 0.75	8.79 $\pm$ 0.22	218.39 $\pm$ 0.48
Vitamin C	13.60 $\pm$ 0.40	8.72 $\pm$ 0.35	209.80 $\pm$ 0.68
α -Tocopherol	12.83 $\pm$ 0.63	6.21 $\pm$ 0.39	168.22 $\pm$ 0.63
สารสกัด			
Crude n-hexane	13.89 $\pm$ 0.25	7.39 $\pm$ 0.38	204.29 $\pm$ 0.22
Crude ethyl acetate	14.54 $\pm$ 0.43	9.11 $\pm$ 0.47	243.38 $\pm$ 0.31
Crude ethanol	13.21 $\pm$ 0.38	6.45 $\pm$ 0.41	182.18 $\pm$ 0.28
Crude methanol	14.06 $\pm$ 0.21	8.52 $\pm$ 0.79	221.68 $\pm$ 0.22

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH ABTS และ FRAP assay) ของสารสกัดหยาบ รากหนอนตายหยาก พบว่าสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Boonjira et al., (2018) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการสกัดรากหนอนตายหยากด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดรากหนอนตายหยากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 0.118 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และผลการทดลองยังพบว่าสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่พบว่าสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลในการสกัดมีปริมาณสูงที่สุด เนื่องจากเอทานอลเป็นตัวละลายมีขั้วและมีไฮโดรเจนที่สามารถแตกตัวได้ทำให้มีความสามารถในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเป็นสารที่ขั้ว (Loudon, 2002) ซึ่งมีรายงานที่แสดงให้เห็นว่า ความมีขั้วของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดอาจมีผลต่อการละลายของสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compound) ที่มีฤทธิ์เป็นสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้มากยิ่งขึ้น (Mohsen, & Ammar, 2009) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่มีขั้วจะละลายได้ดีในเฮกเซน นอกจากนี้สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้วมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบในพืช โดยทั้งสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ (นันทวัน บุญยะประภัศร และคณะ, 2545) ซึ่งมีผลในการทำงานเกี่ยวกับปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เนื่องจากสารทั้ง 2 ชนิดนี้จัดเป็นสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้

จากผลการทดสอบ จะพบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะพบว่ามีความสัมพันธ์กัน โดยถ้าสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงและมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูง สารสกัดจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้นด้วยเช่นกัน เนื่องจากเนื่องจากสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารในกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (ลือชัย บุตุคุป, 2555)

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยาก

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอล และเมทานอล โดยเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *S. aureus* TISTR746 ทำการเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐานได้แก่ สเตรปโตมัยซิน และ เตตราซัยคลีน ทำการทดสอบโดยวิธีการ Agar well diffusion method ใช้สารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยในการทดสอบการยับยั้งจะดูบริเวณที่แบคทีเรียถูกยับยั้งและการเกิดบริเวณโซนใสที่สุด ซึ่งพบว่า สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากในตัวทำละลายเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR746 โดยมีค่าเฉลี่ยบริเวณที่ยับยั้งแบคทีเรียเท่ากับ 8.54 ± 0.87 มิลลิเมตร มากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากในตัวทำละลายเอทานอล ตัวทำละลายเมทานอล ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท โดยมีค่าเฉลี่ยบริเวณที่ยับยั้งแบคทีเรียเท่ากับ 8.52 ± 0.28 , 8.28 ± 0.27 และ 7.03 ± 0.42 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากในตัวทำละลายแต่ละชนิด

การทดสอบ	ผลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด (Inhibition zone, mm $\pm$ SD)
สารปฏิชีวนะมาตรฐาน	
Streptomycin	13.95 ± 0.49
Tetracycline	22.35 ± 0.52
สารสกัดจากพืช	
Crude n-hexane	8.54 ± 0.87
Crude ethyl acetate	7.03 ± 0.42
Crude ethanol	8.52 ± 0.28
Crude methanol	8.28 ± 0.27

ตารางที่ 5 ค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) และค่า Minimal bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากในตัวทำละลายแต่ละชนิด

สารสกัดจากพืช	<i>S. aureus</i> TISTR746	
	MIC	MBC
	(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
Crude n-hexane	25	50
Crude ethyl acetate	50	50
Crude ethanol	50	50
Crude methanol	50	50

จากตารางที่ 5 จากการทดลองเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากในตัวทำละลาย 4 ชนิด โดยเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *S. aureus* TISTR746 ทำการเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐานได้แก่ สเตรปโตมัยซิน และ เตตราไซคลิน โดยจะพบว่าเชื้อ *S. aureus* TISTR746 เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดการอักเสบ ในการทดสอบจะทำการทดสอบด้วยวิธีการ Agar well diffusion method แล้ววัดโซนการยับยั้งพบว่า สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากในตัวทำละลายเฮกเซนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR746 ได้อย่างสมบูรณ์โดยมีค่า MIC ของสารสกัดอยู่ที่ 25-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากในตัวทำละลายเฮกเซนมีฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC ของสารสกัดอยู่ที่ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากในตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตท เอทานอล และเมทานอล พบว่า สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบได้ โดยมีค่า MIC ของสารสกัดอยู่ที่ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการทดสอบหาค่า MBC ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR746 ได้ พบว่าสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR746 ได้ ซึ่งผลจากการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากสามารถที่จะยับยั้งเชื้อที่ทำให้เกิดการอักเสบได้ และจากการศึกษาของ นาทยา มนต์รี และคณะ (2014) ที่ทำการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากหนอนตายหยากต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชบางชนิดคือ *P. deliense*, *P. parasitica*, และ *F. oxysporum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) พบว่า อาหารที่ผสมสารสกัดจากหนอนตายหยากทุกระดับความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 3 ชนิด โดยที่ระดับความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. parasitica* ได้ 100 % ที่ระยะเวลา 4 วัน ระดับความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. deliense* และ *F. oxysporum* ได้ 100 % ที่ระยะเวลา 1 และ 5 วันตามลำดับ

สรุป

การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABST และ FRAP assay และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบโดยวิธีการ Agar well diffusion method ของสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูง และพบว่าสารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และ สารสกัดหยาบรากหนอนตายหยากในตัวทำละลายเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR746 ได้ ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาต่อยอดนำไปต่อยอดเพื่อศึกษาในโมเดลทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป เช่น การยับยั้งแบคทีเรีย การต้านอัลไซเมอร์และการยับยั้งมะเร็ง

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาในส่วนอื่นของหนอนตายหยากด้วย เช่น ใบ รวมถึงการศึกษาสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบของหนอนตายหยาก รวมทั้งศึกษาในส่วนฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วย เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมยาในลำดับต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ณพัชร บัวฉวน. (2558). สารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากชะเอมไทย. **วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 10(2), 78-95.
- ธนศักดิ์ แซ่เลี้ยว, ศศิธร จันทนวางกูร และวรรณิ จิรภาคย์กุล. (2551). ผลของตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันของกระชายเหลือง (*Boesenbergia pandurata*). การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร (538-545). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นัตยา มนต์รี, ชนิกานต์ ขวัญช่วย และ พรประพา คงตระกูล. (2557). ผลของสารสกัดหยาบจากหนอนตายหยากต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชบางชนิด. **แก่นเกษตร**, 42(3), 649-653.
- นิตี ตั้งศิริทรัพย์. (2555). การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกกล้วยหอมดิบต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อสิวและการติดเชื้อผิวหนังที่พบได้บ่อย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- นันทวัน บุญยะประภัศร, วิมล ศรีสุข, อรุณญา จุติวิบูลย์สุข, ประพินศรา สอนเล็ก, วิไลวรรณ ทองใบน้อย, วงศ์สถิต ฉั่วกุล, Fong, H.S., Pezzuto, J. และ Kosmeder, J., (2545). ผักพื้นบ้านในป่าชายเลน. **วารสารสมุนไพร**, 9(1), 1-12.
- บุหรัน พันธุ์สุรงค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 21(3), 275-286.
- พิชญา พรรคทองสุขและคณะ. (2555). แนวทางการวินิจฉัยโรคและภัยจากการประกอบอาชีพเบื้องต้นสำหรับหน่วยบริการสาธารณสุข. กลุ่มสื่อสารสาธารณะและพัฒนา พฤติกรรมสุขภาพ สำนักงานโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

- ลือชัย บุตรคุป. (2555). สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม**, 31(4), 443-455.
- วสันต์ สุมินทิลี, ปณิดา บรรจงสินศิริ, จันทนา ไพบูรณ์ และวรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์. (2557). กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) สาหร่ายหุ่น (*Sargassum oligocystum*) และสาหร่ายเขากวาง (*Gracilaria changii*). **วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม**, 9(1), 63-75.
- อัฐยาพร ชัยชมภูและณณมล ทองไว. (2555). การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดโดยใช้สารสกัดสมุนไพรพื้นบ้าน. 28-30 มกราคม 2558 การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 8 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. (หน้า 792-801). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Bagul, U.S. and Sivakumar, S. M. (2016). Antibiotic susceptibility testing: a review on current practices. **International Journal of Pharmaceutics**, 6(3), 11-17.
- Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibensouda, K.S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 6(2), 71-79.
- Benzie IFF, & Strain JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, 239(1), 70-76.
- Boonjira Rutnakornpituk Chatchai Boonthip Waraporn Sanguankul Pimtawan Sawangsup and Metha Rutnakornpituk. (2018). Study in total phenolic contents, antioxidant activity and analysis of Glucosinolate compounds in cruciferous vegetables. **Naresuan University Journal: Science and Technology**, 26(2), 27-37.
- Jorgensen, J.H. and Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical Infectious Diseases**, 49(11), 1749-1755.
- Lalitha, M.K. (2004). **Manual on antimicrobial susceptibility testing. Guide lines for antimicrobial susceptibility testing**. Pennsylvania: Twelfth Informational Supplement. pp. 6-20.
- Loudon, G. Mark. (2002). **Organic Chemistry 4th**. Oxford University Press.
- Mohsen, S. M. and Ammar, A. S. M. (2009). Total phenolic content and antioxidant activity of corn tassel extract. **Food chemistry**, 112(3), 595-598.
- Prommuak, C., D-Eknamkul, W. & Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from thai silk waste and antioxidant activity of extract. **Separation and Purification Technology**, 62(2), 444-448.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999), Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26(9-10), 1231-1237.
- Slinkard, K., & Singleton, V.L. (1997). Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, 28(1), 49-55.

Zhu, K., Zhou, H. & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**, 41(6), 1296-1302.