

ผลของชนิดตัวทำละลายต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจาก *Tradescantia Fluminensis*ณพัฐอร บัวฉุน^{1*}

Received : July, 17, 2025

Revised : February 6, 2026

Accepted : March 9, 2026

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เปรียบเทียบผลของตัวทำละลายต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจาก หญ้าไผ่น้ำ (*Tradescantia fluminensis*) โดยเป็นการสกัดด้วยเทคนิคอัลตราโซนิคที่ใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล เมทานอล และอะซิโตน ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (26.51 ± 0.44 mg GAE/g extract) และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (33.71 ± 0.50 mg QE/g extract) สูงที่สุด รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ($IC_{50} = 10,530 \pm 0.43$ μ g/mL) สารสกัดเอทานอลและเมทานอลยังมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* ได้ดีที่สุดใน MIC = 7,810 μ g/mL และแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบอย่างมีนัยสำคัญ ($IC_{50} = 22.20 \pm 0.10$ μ g/mL) โดยมีอัตราการรอดของเซลล์มากกว่า 90% ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง โดยเฉพาะเอทานอล เหมาะสมสำหรับการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านแบคทีเรีย และต้านการอักเสบจากหญ้าไผ่น้ำซึ่งมีศักยภาพสำหรับพัฒนาการเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพรไทยในอนาคต

คำสำคัญ: ความเป็นพิษของเซลล์ ฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หญ้าไผ่น้ำ

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ อีเมล: napattaom@vru.ac.th

* ผู้นิพนธ์หลัก อีเมล: napattaom@vru.ac.th

EFFECT OF SOLVENT TYPE ON THE BIOACTIVITY OF CRUDE EXTRACT FROM TRADESCANTIA FLUMINENSIS

Napattaorn Buachoon^{1*}

Abstract

This study evaluated solvent effects on bioactive compound extraction from *Tradescantia fluminensis* using ultrasound-assisted extraction. Three solvents (ethanol, methanol, acetone) were compared for their extraction efficiency and biological activities. Ethanolic extract showed highest total phenolic (26.51 ± 0.44 mg GAE/g) and flavonoid (33.71 ± 0.50 mg QE/g) contents, with maximum antioxidant activity ($IC_{50} = 10,530 \pm 0.43$ μ g/mL). Both ethanol and methanol extracts demonstrated optimal antibacterial activity against Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* (MIC = 7,810 μ g/mL) and significant anti-inflammatory properties ($IC_{50} = 22.20 \pm 0.10$ μ g/mL) while maintaining cell viability above 90%. Results indicate that solvent polarity significantly influences bioactive compound recovery, with ethanol providing optimal extraction of therapeutic compounds from *T. fluminensis*. The results highlight the potential of this plant species as a valuable source of bioactive compounds for the development of phytopharmaceutical products and functional health applications.

Keywords: Cytotoxicity, Antimicrobial activity, Anti-microbial activity, Antioxidant activity,
Tradescantia fluminensis

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

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

บทนำ

พืชสมุนไพรได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในฐานะแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่มีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นยาและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ โดยองค์การอนามัยโลกรายงานว่า ประชากรโลกมากกว่า 80% ยังคงพึ่งพาการรักษาด้วยพืชสมุนไพรเป็นหลัก (World Health Organization, 2019) ในบริบทของการแพทย์สมัยใหม่ การค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) จากพืชกลายเป็นกลยุทธ์สำคัญในการพัฒนายาใหม่ที่มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในยุคที่เชื้อก่อโรคมียาเพิ่มมากขึ้นและผลข้างเคียงจากยาสังเคราะห์กลายเป็นปัญหาสำคัญ (Cragg & Newman, 2013) ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชในเขตร้อนชื้น โดยเฉพาะในประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ถือเป็นขุมทรัพย์ทางชีวเคมีที่ยังไม่ได้รับการสำรวจอย่างครบถ้วน ตามการประมาณการของนักวิทยาศาสตร์ พืชในภูมิภาคนี้มีศักยภาพในการให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายและมีความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะถิ่น ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นพบยาใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง (Newman & Cragg, 2020) อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพืชสมุนไพรในภูมิภาคนี้ยังมีข้อจำกัด โดยเฉพาะการศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชที่มีการใช้ในแพทย์พื้นบ้านพืชในสกุล *Tradescantia* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Tradescantia fluminensis* หรือที่รู้จักกันในชื่อสามัญว่า หน้ำไก่ เป็นพืชที่มีการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวาง แม้ว่าจะเป็นพืชพื้นเมืองของภูมิภาคอเมริกาใต้ แต่ปัจจุบันพบการแพร่กระจายไปทั่วโลกในเขตร้อนและกึ่งร้อน รวมถึงประเทศไทย (USDA Plant Database, 2021) ในประเทศไทย พืชชนิดนี้มักพบได้ทั่วไปในพื้นที่ที่มีความชื้นสูงและร่มเงา เช่น ริมลำธาร ไร่ร้าง หรือในสวนที่มีการดูแลรักษา

จากการสำรวจข้อมูลทางวิชาการและการใช้ในแพทย์พื้นบ้าน พบว่า *T. fluminensis* ถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้าน โดยเฉพาะสำหรับบรรเทาอาการอักเสบ ลดบวม และรักษาแผลภายนอก (Souza et al., 2012) ทั้งนี้ การศึกษาเบื้องต้นของ Waweru et al. (2017) รายงานว่าสารสกัดจากใบ *T. fluminensis* มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองอย่างมีนัยสำคัญ และยังแสดงศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระตามรายงานของ Butnariu et al. (2022) อย่างไรก็ตาม การศึกษาเหล่านี้ยังมีข้อจำกัดในด้านความครอบคลุมและความเข้าใจเชิงลึกเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารออกฤทธิ์ จากการศึกษา พบว่า ยังไม่มีการศึกษาวิจัยที่มุ่งเน้นการเปรียบเทียบผลของชนิดตัวทำละลายต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจาก *T. fluminensis* ที่พบในประเทศไทยอย่างครอบคลุม โดยเฉพาะการศึกษาที่เชื่อมโยงระหว่างวิธีการสกัด องค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพเข้าด้วยกัน ซึ่งถือเป็นช่องว่างที่สำคัญในองค์ความรู้ปัจจุบัน

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในพืช เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) อัลคาลอยด์ (alkaloids) และเทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) เป็นกลุ่มสารที่มีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย จากการศึกษาของ Bravo (1998) และ Shahidi & Yeo (2016) พบว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านจุลชีพ และต้านเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นฤทธิ์ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ อย่างไรก็ตาม ปริมาณและชนิดของสารออกฤทธิ์เหล่านี้ที่สามารถสกัดได้จากพืชขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ โดยชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดถือเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลสูงสุด เนื่องจากตัวทำละลายแต่ละชนิดมีค่าขั้ว (polarity) และคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกัน จึงมีความสามารถในการละลายและสกัดสารประกอบที่มีคุณสมบัติทางเคมีต่างกันออกมา (Sasidharan et al., 2011) ดังนั้นการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพในการสกัดและคุณภาพของสารสกัดที่ได้ (Azmir et al., 2013)

ด้วยเหตุนี้ งานวิจัยนี้จึงศึกษาเปรียบเทียบวิเคราะห์ผลของชนิดตัวทำละลายต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจาก *T. fluminensis* ในบริบทของพืชที่พบในประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างจากหมู่ 4 ตำบลดาวเรือง อำเภอเมืองสระบุรี จังหวัดสระบุรี และเลือกจากแปลงที่มีอายุ 1 ปี และเลือกเก็บส่วนใบที่นับจากใบบนสุดมา 3 ใบ เลือกใบที่ 4-8 ซึ่งอาจมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างจากพืชชนิดเดียวกันในภูมิภาคอื่นเนื่องจากปัจจัยแวดล้อม สภาพอากาศ และสภาพดิน และการศึกษาที่ใช้แนวทางแบบองค์รวม (holistic approach) ที่เชื่อมโยงการตรวจสอบพิษเคมีเบื้องต้น การวิเคราะห์เชิงปริมาณสารออกฤทธิ์หลัก และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเข้าด้วยกัน โดยจะทำการตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญ วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจะครอบคลุมทั้งฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อก่อโรคทั่วไป ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเป็นฤทธิ์ที่มีความสำคัญสูงในการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเติมเต็มช่องว่างทางองค์ความรู้เกี่ยวกับศักยภาพทางเภสัชวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีของ *T. fluminensis* ในบริบทของพืชไทย และเป็นแนวทางสำคัญในการคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหาร หรือผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อไป และช่วยส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากพืชท้องถิ่นอย่างยั่งยืน และอาจนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีมูลค่าเพิ่มสูง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเศรษฐกิจชุมชนและประเทศในระยะยาว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของชนิดตัวทำละลายต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บและการเตรียมตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างหญ้าไผ่น้ำโดยเก็บทั้งต้น จากหมู่ 4 ตำบลดาวเรือง อำเภอเมืองสระบุรี จังหวัดสระบุรี ในเดือนกันยายน 2567 และยืนยันเอกลักษณ์พืชโดยกรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร โดยคัดเลือกเฉพาะต้นที่มีอายุ 1 ปี และเลือกเก็บส่วนใบที่นับจากใบบนสุดมา 3 ใบ เลือกใบที่ 4-8 ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นและอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่ จากนั้นบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพรไฟฟ้า (Powder Grinder) รุ่น ECO-0150 (SGE) ความเร็วรอบ 25,000 r/m และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh เพื่อให้ได้ผงพืชแห้ง

การสกัดสารด้วยวิธีอัลตราโซนิก

สกัดสารจากผงพืชแห้งด้วยเทคนิค Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) ดัดแปลงจาก Kumar et al. (2021) โดยชั่งผงพืช 10 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ เติมน้ำเอทานอล 100 mL ต่อหนึ่งรอบการสกัด (อัตราส่วนของแข็ง:ของเหลว = 1:10 w/v ต่อรอบ) ใช้เครื่องอัลตราโซนิก (Branson Sonifier 250) ที่ความถี่ 40 kHz กำลัง 250 W อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที ต่อรอบ จากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบางและกรองซ้ำด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 เศษกากเดิมถูกสกัดซ้ำอีก 4 รอบด้วยตัวทำละลายใหม่ 100 มิลลิลิตรต่อรอบ ภายใต้สภาวะเดียวกัน (ดังนั้น รวม 5 รอบ $\times$ 100 mL = 500 mL ของเอทานอลสำหรับชุดเอทานอลในอัตราส่วนภาพรวมของแข็ง:ของเหลวตลอดกระบวนการเท่ากับ 1:50 w/v) ทำการรวมสารสกัดใสจากทั้ง 5 รอบ ระเหยตัวทำละลายด้วย rotary evaporator ภายใต้เงื่อนไขควบคุม (ความดัน 175 mbar, ความเร็ว

รอบ 121 rpm, อุณหภูมิอ่างน้ำ 45 องศาเซลเซียส) ให้ได้สารสกัดหยาบ ซึ่งน้ำหนักสารสกัดเพื่อนำไปคำนวณร้อยละผลได้ (% Yield)

$$\% \text{ Yield} = (\text{น้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ (g) / น้ำหนักผงตัวอย่างแห้งเริ่มต้น (g)}) \times 100$$

ทำซ้ำขั้นตอนทั้งหมดโดย เปลี่ยนตัวทำละลายเป็นเมทานอล (100 มล./รอบ $\times$ 5 รอบ = 500 mL รวม ในอัตราส่วนรวม 1:50 w/v) และอะซิโตน (100 mL /รอบ $\times$ 5 รอบ = 500 mL รวม อัตราส่วนรวม 1:50 w/v) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดระหว่างตัวทำละลาย

การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นในสารสกัดหยาบหญ้าไผ่น้ำมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุการมีอยู่ของสารสำคัญ 9 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แอนทราควิโนน (anthraquinones) คูมาริน (coumarins) ซาโปนิน (saponins) แทนนิน (tannins) โพลบาแทนนิน (phlobatannins) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) สเตียรอยด์ (steroids) และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides) โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน ซึ่งวิธีการทดสอบได้ดัดแปลงจากระเบียบวิธีของ Koleva et al. (2002) และ Ayoola et al. (2008) การทดสอบแต่ละครั้งดำเนินการซ้ำ 3 ครั้ง

1. การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม ละลายใน 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าและกรอง นำสารละลายที่ได้มาเติมกรดแอมโมเนียมและหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3 หยด เขย่าอีกครั้งและนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำเป็นเวลา 3 นาที การเปลี่ยนสีสารละลายเป็นสีเหลืองเข้ม แสดงว่าพบ ฟลาโวนอยด์ โดยใช้สารมาตรฐาน Quercetin เป็น positive control

2. การตรวจสอบแอนทราควิโนน (anthraquinones)

ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมสารละลาย 10% H_2SO_4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าและอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 3 นาที จากนั้นกรองและนำสารละลายที่ได้มาเติมสารละลาย 10% NH_3 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า การปรากฏของสีชมพูแดงในสารละลาย แสดงว่าพบ แอนทราควิโนน โดยใช้สารมาตรฐาน Aloin เป็น positive control

3. การตรวจสอบคูมาริน (coumarins)

ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม ละลายใน 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าและกรอง นำสารละลายที่ได้มาเติมสารละลาย 6M NaOH ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า การเกิดสีเหลืองเข้มในสารละลาย แสดงว่าพบ คูมาริน โดยใช้สารมาตรฐาน Coumarin เป็น positive control

4. การตรวจสอบซาโปนิน (saponins)

ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร อุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที แล้วเขย่าอย่างรุนแรง การเกิดฟองยาวที่คงอยู่ แสดงว่าพบ ซาโปนิน โดยใช้สารมาตรฐาน Diosgenin เป็น positive control

5. การตรวจสอบแทนนิน (tannins)

ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร อุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที จากนั้นกรองและนำสารละลายที่ได้มาเติมสารละลาย 1% FeCl_3 จำนวน 3 หยด เขย่า การเปลี่ยนสีของสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำ แสดงว่าพบ แทนนิน โดยใช้สารมาตรฐาน Tannic acid เป็น positive control

6. การตรวจสอบโพลบาแทนนิน (phlobatannins)

ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร อุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองและนำสารละลายที่ได้มาเติมสารละลาย 10% HCl ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำอีก 5 นาที

การปรากฏของสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำ แสดงว่าพบ โพลีฟีนอล โดยใช้สารมาตรฐาน Catechin เป็น positive control

7. การตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์ (terpenoids)

ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม ละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าและกรอง นำสารละลายที่ได้มาเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 หยด การเกิดวงแหวนสีน้ำตาลบริเวณรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริก แสดงว่าพบ เทอร์ปีนอยด์ โดยใช้สารมาตรฐาน Limonene เป็น positive control

8. การตรวจสอบสเตียรอยด์ (steroids)

ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม ละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าและกรอง นำสารละลายที่ได้มาเติมกรดกลacialแอซิดิก (glacial acetic acid) 3 หยด เขย่า จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 หยด การปรากฏของสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียวในสารละลาย แสดงว่าพบ สเตียรอยด์ โดยใช้สารมาตรฐาน Cholesterol เป็น positive control

ในการแปลผลการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นในสารสกัดหยาบหญ้าไผ่จะทำการเปรียบเทียบสีหรือตะกอนที่เกิดขึ้นกับสารที่เป็น positive control

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบหญ้าไผ่ ดำเนินการด้วย วิธี Folin-Ciocalteu โดยมีการปรับปรุงจาก Singleton et al. (1999) ทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างแต่ละตัวทำละลายและสารละลายมาตรฐาน โดยชั่งสารสกัดหยาบหญ้าไผ่แต่ละตัวทำละลาย 10 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 99% และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 10 มิลลิลิตร สำหรับสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid, GA) เตรียมในเอทานอล 99% ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างแต่ละตัวทำละลาย หรือสารละลายมาตรฐานปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร ตามด้วย Folin-Ciocalteu reagent 0.2 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (7.5% Na_2CO_3) 2 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากันและนำไปบ่มทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 60 นาที หลังจากบ่มครบเวลา ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงและการคำนวณ โดยนำสารละลายที่เตรียมไว้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Libra S70 สำหรับชุดควบคุม (blank) ใช้เป็นน้ำกลั่นแทนสารสกัดหรือสารมาตรฐาน จากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ จะนำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของกรดแกลลิก เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบตัวอย่างจากสมการกราฟมาตรฐาน โดยรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม น้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg GAE/g extract) ทั้งนี้ การทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้งสำหรับแต่ละตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบหญ้าไผ่ ดำเนินการตามวิธี Aluminum Chloride Colorimetric Assay ทำการปรับปรุงจาก Prommuak et al. (2008) เตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน โดยชั่งสารสกัดหยาบหญ้าไผ่ที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดปริมาณ 10 มิลลิกรัม จากนั้นละลายในเอทานอล 99% และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 10 มิลลิลิตร ในส่วนของสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน (quercetin, QE) เตรียมในเอทานอล 99% ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขั้นตอนการวิเคราะห์ทำการปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ (10% AlCl_3) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยการเติมสารละลายกรดอะซิติก (10% CH_3COOH) 0.5 มิลลิลิตร

และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตร ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงและการคำนวณ โดยนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์รุ่น Libra S70 สำหรับชุดควบคุม (blank) ใช้เป็นน้ำกลั่นแทนสารสกัดหรือสารมาตรฐาน จากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ จะนำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของเคอร์ซีติน เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบตัวอย่าง โดยรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg QE/g extract) ทั้งนี้ การทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้งสำหรับแต่ละตัวอย่าง

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ดำเนินการโดยปรับปรุงจาก Prommuak et al. (2008) โดยเตรียมสารละลายสารมาตรฐาน ได้แก่ BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene), และ แอลฟา-โทโคฟีรอล (α -tocopherol) และเตรียมสารสกัดหยาบตัวอย่างแต่ละตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้น 25, 50, 250, 500, และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขั้นตอนการทดลองเปิดสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (ในแอ็บโซลูทเอทานอล) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและบ่มทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากการบ่ม นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Libra S70 โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

การคำนวณหา % Radical Scavenging จากสูตร

$$\% \text{ radical scavenging} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}}] \times 100$$

โดย A_{Control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เพียงอย่างเดียว

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

ค่าที่ได้จาก % radical scavenging จะถูกนำมาใช้คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% หรือค่า IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) โดยพล็อตจากกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับ % radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพ

การประเมินฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของสารสกัดหยาบจากหญ้าไผ่น้ำแต่ละตัวทำละลาย โดยใช้วิธี Agar Diffusion Method ซึ่งดัดแปลงจาก Boussaada et al., 2008 และ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines, (2025) เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 12715 และ *Bacillus subtilis* TISTR 1449 แบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 8739 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 และเชื้อรา (Fungi) ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 10231 และ *Aspergillus niger* DMST 15538 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) และเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด หลังจากนั้น เตรียมเชื้อจุลชีพให้มีค่าความขุ่นมาตรฐานเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland standard (ประมาณ 1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร สำหรับแบคทีเรีย และ 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร สำหรับเชื้อรา) ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพ โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Agar (MHA) สำหรับแบคทีเรีย และ

Potato Dextrose Agar (PDA) สำหรับเชื้อรา ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ปั่นให้อาหารแข็งตัว จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อจุ่มลงในสารแขวนลอยเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วปาดให้ทั่วผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างสม่ำเสมอ และปล่อยให้แห้งเป็นเวลา 10-15 นาที เจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ Puncher ขนาด 6 มิลลิเมตร แล้วเติมสารสกัดหยาบจากหญ้าไผ่น้ำแต่ละตัวทำละลายและ แต่ละความเข้มข้น (50, 100, 500, 1000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม สำหรับชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) ใช้ยาปฏิชีวนะมาตรฐาน (chloramphenicol สำหรับแบคทีเรีย และ fluconazole สำหรับเชื้อรา) และชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ใช้ตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมสารสกัด และ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย และ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมงสำหรับเชื้อรา หลังจากบ่มครบเวลา วัดขนาดของวงใสที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ (zone of inhibition) รอบหลุมสารสกัด โดยใช้เวอร์เนียร์คาลิเปอร์ และบันทึกผลเป็นหน่วยมิลลิเมตร (mm) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งสำหรับสารสกัดและสารควบคุมแต่ละชนิด

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (minimum inhibition concentration; MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (minimum bactericidal concentration; MBC)

การประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจาก *T. fluminensis* ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ดำเนินการโดยใช้วิธี Tube Dilution Method สำหรับการหาค่า MIC และ Plate Dilution Method สำหรับการหาค่า MBC ซึ่งดัดแปลงจากระเบียบวิธีมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Guidelines (2025)

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC)
โดยเตรียมสารละลายสารสกัดหยาบ ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นสูง จากนั้นทำการเจือจางแบบอนุกรม (serial dilution) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสม (nutrient broth สำหรับแบคทีเรีย และ potato dextrose broth สำหรับเชื้อรา) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ เช่น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เติมสารแขวนลอยเชื้อจุลินทรีย์ (ที่ปรับความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland standard) ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดที่มีสารสกัดเจือจางอยู่ โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อประมาณ 5×10^5 CFU/มิลลิลิตร สำหรับแบคทีเรีย และ 1×10^4 CFU/มิลลิลิตร สำหรับเชื้อรา เตรียมชุดควบคุมดังนี้

Positive control หลอดที่มีเชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ (ไม่มีสารสกัด)

Negative control หลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อและสารสกัด (ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์)

Sterility control หลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว

นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด (37 องศาเซลเซียส, 18-24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย และ 25-30 องศาเซลเซียส, 24-48 ชั่วโมงสำหรับเชื้อรา) หลังจากบ่มครบเวลา สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยตาเปล่า (ความขุ่น) ค่า MIC คือความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ โดยหลอดทดลองไม่มีความขุ่น

การศึกษาค่าความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration; MBC)

หลังจากการหาค่า MIC แล้วหลอดทดลองที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ (ใส) และหลอดที่แสดงความขุ่นต่ำที่สุด (ความเข้มข้นถัดจาก MIC) จะถูกนำมาใช้ต่อในการหาค่า MBC โดยวิธี Plate Dilution Method โดยทำการดูดสารละลายจากหลอดทดลองเหล่านี้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เหมาะสม (nutrient agar สำหรับแบคทีเรีย และ potato dextrose agar สำหรับเชื้อรา) นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด หลังจากบ่มครบเวลา สังเกตการ

เจริญเติบโตของโคโลนีเชื่อบนจานเพาะเชื้อ ค่า MBC คือความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ ซึ่งสังเกตได้จากการที่ไม่มีการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื่อบนจานเพาะเชื้อ ทำการทดลอง 3 ซ้ำสำหรับแต่ละสารสกัดและเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยวิธียับยั้งการหลั่ง Nitric Oxide

การประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดหยาบ โดยทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการหลั่ง nitric oxide (NO) จากเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้น โดยดัดแปลงจาก Marcinkiewicz et al. (1995), Park et al. (1995) และ Green et al. (1982) ทำการเตรียมเซลล์และสารละลายตัวอย่าง โดยใช้เซลล์มาโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่เสริมด้วย Fetal bovine serum (FBS) 10% และ antibiotics (penicillin-streptomycin) 1% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศ 5% CO₂ และเตรียมสารสกัดหยาบและสารมาตรฐาน (dexamethasone เป็นสารควบคุมเชิงบวก) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 96 หลุม (96-well plate) ที่ความหนาแน่น 1×10^5 เซลล์/หลุม บ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะติดพื้นผิว หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก และเติมสารสกัดหรือสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในแต่ละหลุม พร้อมกับเติม lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อกระตุ้นให้เซลล์หลั่ง NO (ยกเว้นหลุมควบคุมเชิงลบที่ไม่เติม LPS และสารสกัด) สำหรับชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ใช้เซลล์ที่ได้รับ LPS อย่างเดียว แต่ไม่มีสารสกัดหรือสารมาตรฐาน ชุดควบคุมเซลล์ (cell control) ใช้เซลล์ที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว บ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศ 5% CO₂ หลังจากการบ่มครบ 24 ชั่วโมง เก็บส่วนใสเหนือตะกอนเซลล์ (supernatant) จากแต่ละหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ Griess reagent โดยเติม Griess reagent (ประกอบด้วย 1% Sulfanilamide ใน 5% phosphoric acid และ 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride) ในอัตราส่วนที่เหมาะสม บ่มปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader สร้างกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรต์ (sodium nitrite) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณ NO ที่หลั่งออกมาในแต่ละหลุม คำนวณปริมาณ NO ที่หลั่งออกมาในแต่ละหลุม โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานโซเดียมไนไตรต์ จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง NO ของสารสกัดและสารมาตรฐานเทียบกับชุดควบคุมที่กระตุ้นด้วย LPS โดยไม่มีสารสกัด

$$\% \text{ Inhibition} = [(NO_{\text{control}} - NO_{\text{sample}}) / NO_{\text{control}}] \times 100$$

โดย NO_{control} คือ ปริมาณ NO ที่หลั่งจากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียว

NO_{sample} คือ ปริมาณ NO ที่หลั่งจากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และได้รับสารสกัดหรือสารมาตรฐาน

ค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการหลั่ง NO ได้ 50% หรือ IC₅₀ (Inhibitory Concentration 50%) จากกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับ % Inhibition การทดลองทั้งหมดดำเนินการ 3 ซ้ำ

การทดสอบอัตราการรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT Assay

การประเมินอัตราการรอดของเซลล์ของสารสกัดหยาบ โดยใช้วิธี (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) MTT Assay ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวัดความมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) และการแพร่กระจายของเซลล์ (cell proliferation) โดยอาศัยหลักการที่เอนไซม์

mitochondrial dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนเกลียว MTT ที่มีสีเหลืองไปเป็นผลึก Formazan ที่มีสีม่วงไม่ละลายน้ำ ซึ่งสามารถวัดได้ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยดัดแปลงจาก Mosmann (1983) และ Carmichael et al. (1987)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Human leukemic cell line) K562 เป็นกลุ่มควบคุม โดยเซลล์เหล่านี้จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่เสริมด้วย Fetal bovine serum (FBS) 10% และ antibiotics (penicillin-streptomycin) 1% จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศ 5% CO₂ ทำการเตรียมสารสกัดหยาบและสารมาตรฐาน (doxorubicin เป็นสารควบคุมเชิงบวก) ในความเข้มข้นต่างๆ (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, และ 1.95 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยละลายในตัวทำละลาย DMSO (dimethyl sulfoxide) และเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในหลุมทดลองไม่เกิน 0.1% ซึ่งเป็นระดับที่ไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ ทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ K562 ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 96 หลุม (96-well plate) ที่ความหนาแน่น 5×10^3 เซลล์/หลุม บ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะติดพื้นผิว (สำหรับเซลล์ที่เกาะติด) และปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม หลังจากบ่มเซลล์แล้ว ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกอย่างระมัดระวัง และเติมสารสกัดหรือสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ ลงในแต่ละหลุม พร้อมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ สำหรับชุดควบคุมเซลล์ (cell control) จะใช้เซลล์ที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว และสำหรับชุดควบคุมตัวทำละลาย (solvent control) จะใช้เซลล์ที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมกับตัวทำละลาย DMSO ในความเข้มข้นเท่ากันกับที่ใช้ในสารสกัด นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มต่อเป็นเวลา 24, 48 หรือ 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศ 5% CO₂ เมื่อครบระยะเวลาการบ่ม ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี FBS หรือเกลือบัพเฟอร์ PBS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ที่มีชีวิตสามารถเปลี่ยน MTT ไปเป็นผลึก formazan สีม่วงได้ หลังจากนั้น ดูดสารละลาย MTT ออก และเติมสารละลายละลายผลึก formazan (DMSO) ปริมาตร 100-200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เขย่าจานเพาะเลี้ยงเบาๆ บนเครื่องเขย่า (Plate shaker) ประมาณ 10-15 นาที เพื่อละลายผลึก formazan ให้สมบูรณ์ ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader คำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ (% Cell viability) โดยเทียบกับชุดควบคุมเซลล์ (ที่ไม่มีสารสกัด) ตามสูตร

$$\% \text{ Cell viability} = (A_{\text{Sample}}/A_{\text{Control}}) \times 100$$

โดย A_{Sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ได้รับสารสกัด

A_{Control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ในชุดควบคุม (ที่ไม่ได้รับสารสกัด)

จากค่า % Cell Viability ที่ได้จะถือว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อค่าร้อยละการรอดชีวิตน้อยกว่า 80% การทดลองทั้งหมดจะดำเนินการ 3 ซ้ำสำหรับแต่ละสารสกัดและสารมาตรฐาน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยใช้วิธี One-way Analysis of Variance (ANOVA) และ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) เพื่อประเมินความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลอง (treatment) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการสกัดสารจากหญ้าไผ่น้ำ

การเตรียมสารสกัดหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ โดยนำส่วนของพืชมาผ่านกระบวนการอบแห้งและบดละเอียด จากนั้นจึงทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกัน ได้แก่ เอทานอล เมทานอล และอะซิโตน เพื่อให้ได้สารประกอบหลากหลายชนิดออกมา วิธีการสกัดที่เลือกใช้คือ การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (ultrasonic-assisted extraction) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตและลดระยะเวลาการสกัด หลังจากการสกัด สารละลายที่ได้จะถูกนำไปกรองเพื่อแยกกากพืชออก จากนั้นจึงทำการระเหยตัวทำละลายออกภายใต้สภาวะสุญญากาศด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบที่ปราศจากตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด (เอทานอล, เมทานอล และอะซิโตน) มีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวข้นเหนียวสีน้ำตาลใกล้เคียงกัน สำหรับปริมาณของสารสกัดหยาบที่ได้ ซึ่งแสดงในรูปของน้ำหนัก และ % ของสารสกัดหยาบ (Yield) สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 น้ำหนัก และ % ของสารสกัดหยาบจากหญ้าไผ่น้ำที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างชนิด

ชนิดของตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g)	% สารสกัดหยาบ (yield)
เอทานอล	4.02	40.2
เมทานอล	3.64	36.4
อะซิโตน	3.01	30.1

จากตารางที่ 1 สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล ให้ผลผลิตสูงสุด โดยมี % ของสารสกัดหยาบเท่ากับ 40.2% รองลงมาคือสารสกัดจาก เมทานอล ซึ่งให้ผลผลิต 36.4% และน้อยที่สุดคือสารสกัดจากอะซิโตน ที่ให้ผลผลิต 30.1%

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ให้ร้อยละผลผลิตสารสกัดหยาบจาก *T. fluminensis* สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับหลักการที่ว่าชนิดและความมีขั้ว (polarity) ของตัวทำละลายมีอิทธิพลอย่างมากต่อประสิทธิภาพในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืช (Sasidharan et al., 2011) โดยทั่วไปแล้ว ตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางถึงสูง เช่น เอทานอลและเมทานอล มักเป็นที่นิยมในการสกัดสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วและพบมากในพืชสมุนไพร และมีส่วนสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด (Azmir et al., 2013; Bravo, 1998) การที่เอทานอลให้ผลผลิตสูงสุดอาจบ่งชี้ว่าสารประกอบหลักที่มีปริมาณมากใน *T. fluminensis* มีคุณสมบัติการละลายที่ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกับเอทานอล อย่างไรก็ตาม แม้ว่าเมทานอลจะให้ผลผลิตรองลงมา แต่ยังคงเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารจากพืชหลากหลายชนิด เนื่องจากมีความสามารถในการละลายสารประกอบทั้งที่มีขั้วและไม่มีขั้วได้ในระดับหนึ่ง (Azmir et al., 2013) ส่วนอะซิโตนซึ่งมีความมีขั้วต่ำกว่า อาจไม่เหมาะกับการสกัดสารที่มีอยู่ในปริมาณมากในพืชชนิดนี้ ซึ่งส่วนใหญ่อาจเป็นสารที่มีขั้วสูงกว่า จึงส่งผลให้ร้อยละผลผลิตต่ำที่สุด ความแตกต่างของร้อยละผลผลิตที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดไม่เพียงสะท้อนถึงประสิทธิภาพในการสกัดโดยรวม แต่อาจบ่งชี้ถึงความแตกต่างในองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดด้วย (Azmir et al., 2013) ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันไปในแต่ละสารสกัด

ผลการทดสอบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้น

ผลการทดสอบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้นเป็นการประเมินเชิงคุณภาพ (qualitative test) โดยการสังเกตการเกิดสี (color reaction) หรือ การเกิดตะกอน (precipitation) ซึ่งบ่งชี้การมีอยู่ของกลุ่มสารสำคัญในสารสกัด โดยเปรียบเทียบกับ positive control ผลที่แสดงปฏิกิริยาเชิงบวก (positive result) หมายถึง มีการเปลี่ยนแปลงของสี หรือตะกอนตรงตามที่ระบุในวิธีทดสอบ ส่วนผลที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (negative result) หมายถึง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีหรือตะกอน แสดงว่าไม่พบสารกลุ่มนั้นในตัวอย่างสารสกัดที่ทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การตรวจสอบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากหญ้าไผ่ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างชนิด

ชนิดของตัวทำละลาย	ฟลาโวนอยด์	แอนทราควิโนน	คูมาริน	ซาโปนิน	แทนนิน	โพลีฟีนอล	เทอร์ปีนอยด์	สเตียรอยด์	คาร์ดิแอกไกลโคไซด์
เอทานอล	+	+	-	+	+	-	+	+	+
เมทานอล	+	+	-	+	+	-	+	+	+
อะซิโตน	+	+	-	+	+	-	+	+	+

หมายเหตุ: - หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ + หมายถึง ตรวจสอบพบ

จากตารางที่ 2 แสดงการตรวจสอบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากหญ้าไผ่ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างชนิดกัน โดยพบสารฟลักซ์เคมี 7 ชนิด ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดหยาบจากหญ้าไผ่ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างชนิดกัน การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดทำได้โดยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานได้สมการกราฟมาตรฐาน $y = 0.0053x + 0.012$ ($R^2 = 0.998$) ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดเอทานอลจากหญ้าไผ่มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด (26.51 ± 0.44 mg GAE/g extract) รองลงมา คือ เมทานอล (24.27 ± 0.11 mg GAE/g extract) และอะซิโตน (22.45 ± 0.36 mg GAE/g extract) ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaczorová et al (2021) ที่พบว่า ตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง (moderate polarity) เช่น เอทานอล ให้ผลดีในการสกัดสารฟีนอลิก เนื่องจากสามารถละลายทั้งสารประกอบที่มีขั้วมากและขั้วน้อยได้ดีกว่า ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงหรือต่ำสุด

สำหรับปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดดำเนินการด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric assay โดยใช้เคอซีตินเป็นสารมาตรฐาน ได้สมการกราฟมาตรฐาน $y = 0.0096x + 0.010$ ($R^2 = 0.997$) พบว่า สารสกัดหยาบจากหญ้าไผ่ อยู่ระหว่าง 28.20 ± 0.68 ถึง 33.71 ± 0.50 mg QE/g extract โดยเอทานอลให้ค่าสูงสุด (33.71 ± 0.50 mg QE/g extract) ความแตกต่างของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณ

ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอาจเกิดจากหลายปัจจัย เช่น สภาพภูมิอากาศ ดิน ฤดูกาลในการเก็บตัวอย่าง ตัวทำละลาย และวิธีการสกัดซึ่งส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อผลลัพธ์ (Tungmunthum et al., 2021; Butnariu et al., 2022)

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical พบว่า สารสกัดจากหญ้าไผ่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง $10,530 \pm 0.43$ ถึง $13,520 \pm 0.42$ $\mu\text{g/mL}$ โดยสารสกัดที่ใช้เอทานอลมีฤทธิ์สูงที่สุด ($10,530 \pm 0.43$ $\mu\text{g/mL}$) เมื่อเปรียบเทียบกับเมทานอล ($12,650 \pm 0.20$ $\mu\text{g/mL}$) และอะซิโตน ($13,520 \pm 0.42$ $\mu\text{g/mL}$) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT ($9,330 \pm 0.12$ $\mu\text{g/mL}$) BHA ($10,730 \pm 0.25$ $\mu\text{g/mL}$) และ α -tocopherol ($13,130 \pm 0.25$ $\mu\text{g/mL}$) อย่างชัดเจน ผลดังตารางที่ 3 การที่สารสกัดเอทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ค่า IC_{50} ต่ำที่สุด) มีความสอดคล้องกับปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอาจแสดงให้เห็นว่า สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์เป็นสารสำคัญที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Tungmunthum et al., 2021)

สำหรับตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด พบว่า เอทานอล (polarity index ≈ 5.2) ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง สามารถละลายและสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งชนิดที่มีขั้วสูงและขั้วต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rafi et al. (2020) ที่ระบุว่าสารฟีนอลิกมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางได้ดี ในขณะที่ เมทานอล (polarity index ≈ 5.1) มีค่าความเป็นขั้วใกล้เคียงกับเอทานอล จึงให้ผลการสกัดในระดับที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม เอทานอลมักแสดงประสิทธิภาพที่ดีกว่าในการสกัดสารฟลาโวนอยด์บางชนิดซึ่งมีโครงสร้างค่อนข้างไม่ชอบน้ำ (partially non-polar flavonoid aglycones) ส่วนอะซิโตน (polarity index ≈ 5.1 – 5.4) เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอลและเมทานอล ส่งผลให้สามารถสกัดสารประกอบที่มีขั้วต่ำได้ดี แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าในการละลายสารฟีนอลิกที่มีขั้วสูง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้ต่ำกว่า

จากการศึกษางานวิจัยจะ พบว่า ความเหมาะสมของตัวทำละลาย โดยเฉพาะค่า polarity index มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อปริมาณสารฟลิกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืช (Kaczorová et al., 2021) ดังนั้น ตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง เช่น เอทานอลและเมทานอล จึงเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากพืชที่มีองค์ประกอบทางฟลิกษเคมีที่หลากหลาย ทั้งนี้ ประสิทธิภาพของการสกัดยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น เช่น อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบการสกัด ซึ่งต้องได้รับการปรับให้เหมาะสมร่วมกันเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุดและคงคุณภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีที่สุด

ตารางที่ 3 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากหญ้าไผ่ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างชนิด

ชนิดของตัวทำละลาย	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g extract)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g extract)	DPPH assay IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
เอทานอล	26.51 ± 0.44^a	33.71 ± 0.50^a	10530 ± 0.43^a
เมทานอล	24.27 ± 0.11^b	30.72 ± 0.17^b	12650 ± 0.20^b
อะซิโตน	22.45 ± 0.36^c	28.20 ± 0.68^c	13520 ± 0.42^c

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion พบว่า สารสกัดเอทานอลมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดที่ทดสอบ รองลงมาคือ เมทานอลและอะซิโตน ตามลำดับ โดยเฉพาะต่อ *Staphylococcus aureus* ATCC 12715 ซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุดที่สุด (เอทานอล: 5.10 ± 0.04 mm, เมทานอล: 4.13 ± 0.06 mm, อะซิโตน: 3.28 ± 0.15 mm) รองลงมาคือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (เอทานอล: 3.10 ± 0.06 mm) และ *Bacillus subtilis* TISTR 1448 (เอทานอล: 3.07 ± 0.02 mm) ในขณะที่ *Escherichia coli* ATCC 8739 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งน้อยที่สุด (เอทานอล: 1.04 ± 0.02 mm) เมื่อเทียบกับสารปฏิชีวนะมาตรฐาน Chloramphenicol สำหรับเชื้อราทั้งสองชนิด *Candida albicans* ATCC 10231 และ *Aspergillus niger* DMST 15538 ไม่แสดง ฤทธิ์ในการยับยั้งต่อสารสกัดทั้งสามชนิด (NA) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจาก *T. fluminensis* มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียมากกว่าเชื้อรา เมื่อเทียบกับสารปฏิชีวนะมาตรฐาน Fluconazole ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากหญ้าไผ่ น้ำที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างชนิด

ชนิดตัวทำละลาย	ผลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด (Inhibition zone, mm.± SD)					
	<i>S. aureus</i> ATCC 12715	<i>B. subtilis</i> TISTR 1449	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>A. niger</i> DMST 15538
เอทานอล	5.10 ± 0.04^a	3.07 ± 0.02^a	1.04 ± 0.02^a	3.10 ± 0.06^a	NA	NA
เมทานอล	4.13 ± 0.06^b	2.07 ± 0.04^b	0.56 ± 0.04^b	2.49 ± 0.17^b	NA	NA
อะซิโตน	3.28 ± 0.15^c	1.66 ± 0.08^c	0.32 ± 0.08^c	2.09 ± 0.05^c	NA	NA

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

NA : ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

ประสิทธิภาพของสารสกัดเอทานอลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมีแนวโน้มสัมพันธ์กับปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่พบในระดับสูง ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด และผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Takó et al., 2020 และ Mehmood et al., 2022 ที่พบว่า ปริมาณโพลีฟีนอล และ ฟลาโวนอยด์สูง จะสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ดีขึ้น โดยเฉพาะในสกุล *Tradescantia* เช่น *T. zebrina* ซึ่งพบว่า สารสกัดเอทานอล-น้ำ มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (73.07 ± 0.78 mg EAG/g) และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด (24.34 ± 0.68 mg EC/g) และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยมีค่า Inhibition zone เท่ากับ 8.0 ± 0.00 mm และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* โดยมีค่า Inhibition zone เท่ากับ 8.5 ± 1.40 mm (Ramos-Arcos et al., 2023) นอกจากนี้ Ghomari et al. (2019) รายงานว่า เอทานอล-น้ำ เป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากโอบมะกอก (*Olea europaea* L.) ได้สูงกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ที่พบว่า เอทานอลสามารถละลายสารประกอบได้ทั้งที่มีขั้วและไม่มีขั้ว

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อ gram-positive bacteria (*S. aureus* และ *B. subtilis*) มีความไวต่อสารสกัดมากกว่าเชื้อ gram-negative bacteria (*E. coli* และ *P. aeruginosa*) อย่างมีนัยสำคัญ ความแตกต่างนี้เกิดจากโครงสร้างผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Oulahal & Degraeve (2022) ที่อธิบายว่า ความแตกต่างนี้เกิดจากโครงสร้างผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน โดยเชื้อแกรมบวกมีผนังเซลล์ประกอบด้วย

ชั้น peptidoglycan ที่หนา (ประมาณ 20–80 nm) และไม่มีชั้น outer membrane จึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกซึมผ่านและออกฤทธิ์ได้ง่ายกว่า ในขณะที่เชื้อแกรมลบมีชั้น outer membrane และมี lipopolysaccharides (LPS) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันการซึมผ่านของสารออกฤทธิ์จากพืช (Santos-Buelga et al., 2018; Oulahal & Degraeve, 2022) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน chloramphenicol ตามเกณฑ์ของ Clinical and Laboratory Standards Institute (2025) พบว่า สารสกัดเอทานอลจาก *T. fluminensis* มีประสิทธิภาพประมาณ 20–25 % ต่อ *S. aureus* และ 4–5 % ต่อ *E. coli* เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานที่มีค่า inhibition zone อยู่ที่ 18–25 mm และ 21–27 mm ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ประสิทธิภาพของสารสกัดธรรมชาติยังต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ แต่ยังมีผลสำคัญในเชิงการค้นคว้าและพัฒนาเป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียจากธรรมชาติ (Ramos-Arcos et al., 2023; Takó et al., 2020)

นอกจากนี้ การที่สารสกัดไม่แสดงฤทธิ์ต่อเชื้อรา *C. albicans* และ *A. niger* อาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลิกจะมีประสิทธิภาพสูงต่อเชื้อแบคทีเรียมากกว่าเชื้อรา และเชื้อราเป็นยูคาริโอต (eukaryote) ที่มีโครงสร้างซับซ้อนกว่า โดยมีชั้นผนังเซลล์ประกอบด้วย chitin และ β -glucan ซึ่งมีความทนทานต่อสารออกฤทธิ์จากพืช อีกทั้งเซลล์ของเชื้อรามีขนาดใหญ่และซับซ้อนกว่าแบคทีเรีย (Manso et al., 2022) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ *T. fluminensis* ในการเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียธรรมชาติ โดยเฉพาะเชื้อแกรมบวกที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อทางคลินิกที่สำคัญ แม้ประสิทธิภาพจะต่ำกว่ายาปฏิชีวนะสังเคราะห์ แต่มีข้อได้เปรียบด้านความปลอดภัย การลดโอกาสเกิดการดื้อยา และความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งทำให้มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เภสัชกรรมธรรมชาติสำหรับการรักษาการติดเชื้อผิวหนังและบาดแผลในอนาคต

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

ชนิดตัวทำละลาย	<i>S. aureus</i> ATCC 12715		<i>B. subtilis</i> TISTR 1449		<i>E. coli</i> ATCC 8739		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027		<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>A. niger</i> DMST 15538	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)
เอทานอล	7810 $\pm$ 0.62 ^a	62500 $\pm$ 1.25 ^a	15630 $\pm$ 0.45 ^a	62500 $\pm$ 0.90 ^a	31250 $\pm$ 0.55 ^a	62500 $\pm$ 0.95 ^a	7810 $\pm$ 0.42 ^a	62500 $\pm$ 1.05 ^a	NA	NA	NA	NA
เมทานอล	7810 $\pm$ 0.40 ^a	62500 $\pm$ 0.85 ^a	15630 $\pm$ 0.38 ^a	62500 $\pm$ 0.85 ^a	31250 $\pm$ 0.58 ^a	62500 $\pm$ 0.90 ^a	7810 $\pm$ 0.40 ^a	62500 $\pm$ 0.95 ^a	NA	NA	NA	NA
อะซิโตน	7810 $\pm$ 0.49 ^a	62500 $\pm$ 1.05 ^a	15630 $\pm$ 0.50 ^a	62500 $\pm$ 0.92 ^a	31250 $\pm$ 0.62 ^a	62500 $\pm$ 1.00 ^a	7810 $\pm$ 0.43 ^a	62500 $\pm$ 0.97 ^a	NA	NA	NA	NA

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

NA : ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

จากตารางที่ 5 ผลการศึกษา ค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) ทั้งสารสกัดเอทานอล เมทานอล และอะซิโตนมีค่า MIC และ MBC ต่อ *B. subtilis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* อยู่ในช่วง 7,810 – 31,250 $\mu\text{g/mL}$ โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งบ่งชี้ว่า สารสกัดทั้งสามมีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพในระดับใกล้เคียงกัน โดยสารสกัดเอทานอลมีประสิทธิภาพสูงสุด ต่อเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดที่ทำการทดสอบ โดยมีค่า MIC และ MBC ต่ำที่สุด ต่อ *S. aureus* ATCC 12715 สารสกัดเอทานอลมีค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 7,810 และ 62,500 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ต่อ *B. subtilis* TISTR 1448 มีค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 15,630 และ 62,500 $\mu\text{g/mL}$ รองลงมาคือ *P. aeruginosa* ATCC 9027 มีค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 7,810 $\mu\text{g/mL}$ และ 62,500 $\mu\text{g/mL}$ และ *E. coli* ATCC 8739 มีค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 31,250 $\mu\text{g/mL}$ และ 62,500 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับสารสกัดเมทานอลและอะซิโตน พบว่า มีประสิทธิภาพที่ต่ำกว่า โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 15,630–31,250 $\mu\text{g/mL}$ และค่า MBC อยู่ที่ 62,500 $\mu\text{g/mL}$

ต่อเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ สำหรับเชื้อรา *C. albicans* ATCC 10231 และ *A. niger* DMST 15538 ไม่แสดงการยับยั้งต่อสารสกัดทั้ง 3 ชนิด (NA) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบ disc diffusion ที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดสารต้านแบคทีเรียจาก *T. fluminensis* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ghomari et al. (2019) และ Takó et al. (2020) ที่ระบุว่า สารละลายเอทานอล-น้ำมีคุณสมบัติในการละลายสารประกอบฟีนอลิกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งในกลุ่มสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ส่งผลให้สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ได้ในปริมาณสูง และมีผลโดยตรงต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด ค่า MIC ที่ต่ำที่สุดของสารสกัดเอทานอลต่อเชื้อ *S. aureus* (78,100 µg/mL) แสดงให้เห็นถึงความไวของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกต่อสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Ramos-Arcos et al. (2023) ที่รายงานว่าสารสกัดไฮโดร-แอลกอฮอล์จาก *T. zebrina* แสดงค่า MIC ต่อ *S. aureus* อยู่ในช่วง 8,000–10,000 µg/mL โดยมีแนวโน้มของฤทธิ์ต้านเชื้อใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบกับพืชสมุนไพรชนิดอื่น พบว่า *T. fluminensis* แสดงประสิทธิภาพในระดับที่น่าพอใจ โดยมีค่า MIC ใกล้เคียงกับโหระพา (*Ocimum basilicum*, 6–10 µg/mL) และสูงกว่าขมิ้น (*Curcuma longa*, 8,000–12,000 µg/mL) แต่ยังคงต่ำกว่ากระเทียม (*Allium sativum*, 2,000–4,000 µg/mL) (Mehmood et al., 2022) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของพืชในสกุล *Tradescantia* ในการเป็นแหล่งสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพได้อย่างมีประสิทธิภาพ ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดเอทานอลอาจเกิดจากการทำงานร่วมกันของสารออกฤทธิ์หลัก ได้แก่ quercetin-3-O-glucoside, อนุพันธ์ของ kaempferol และ chlorogenic acid ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีรายงานว่ามียับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์และการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (El-Hawary et al., 2020; Takó et al., 2020) โดยเฉพาะกลุ่ม quercetin derivatives สามารถจับกับโครงสร้าง peptidoglycan ของแบคทีเรียแกรมบวกและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ penicillin-binding proteins (PBPs) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเชื่อมโยงสายโพลีเปปไทด์ในกระบวนการสร้างผนังเซลล์ (Cushnie & Lamb, 2011) ส่งผลให้การสร้างผนังเซลล์ถูกยับยั้งและนำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด

จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลจาก *T. fluminensis* แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะต่อเชื้อแกรมบวก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานเกี่ยวกับสารประกอบฟีนอลิกจากพืชที่มีศักยภาพด้านการต้านจุลชีพ โดยเป็นไปได้ว่า สารออกฤทธิ์ในสารสกัดอาจรบกวนโครงสร้างหรือสมดุลบางประการของเซลล์จุลชีพ อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาเชิงกลไกเพิ่มเติมเพื่อยืนยันกระบวนการออกฤทธิ์ที่แท้จริง ผลลัพธ์นี้สะท้อนให้เห็นว่า *T. fluminensis* อาจเป็นแหล่งสารต้านจุลชีพธรรมชาติที่มีศักยภาพ และสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพหรือเครื่องสำอางเชิงชีวภาพได้ในอนาคต ภายใต้การประเมินประสิทธิภาพและความปลอดภัยที่ครบถ้วนในขั้นต่อไป

ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ และอัตราการรอดของเซลล์

ผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ และอัตราการรอดของเซลล์ของสารสกัดจาก *T. fluminensis* พบว่า สารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ด้านการอักเสบสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 22.20 ± 0.10 µg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน dexamethasone และมี % ความมีชีวิตรอดของเซลล์สูงที่สุด (92.26 ± 0.51) รองลงมาคือ สารสกัดเมทานอล ($IC_{50} = 26.17 \pm 0.49$ µg/mL, % ความมีชีวิตรอด = 88.26 ± 0.27) และอะซิโตน ($IC_{50} = 28.31 \pm 0.23$ µg/mL, % ความมีชีวิตรอด = 81.19 ± 0.90) ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบสูง (ค่า IC_{50} ต่ำ) จะมีความปลอดภัยต่อเซลล์สูงด้วย (% ความมีชีวิตรอดสูง) แสดงถึงความจำเพาะในการออกฤทธิ์ (selectivity) ของสารสกัดต่อกระบวนการอักเสบ โดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ

ตารางที่ 6ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และ % ความมีชีวิตรอดของเซลล์ของสารสกัดหยาบจากหญ้าไผ่ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างชนิด

ชนิดของตัวทำละลาย	ฤทธิ์ต้านการอักเสบ IC ₅₀ (µg/mL)	% ความมีชีวิตรอดของเซลล์
เอทานอล	22.20 ± 0.10 ^a	92.26 ± 0.51 ^a
เมทานอล	26.17 ± 0.49 ^b	88.26 ± 0.27 ^b
อะซิโตน	28.31 ± 0.23 ^c	81.19 ± 0.90 ^c

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบสูงมักมีความปลอดภัยต่อเซลล์สูง แสดงถึงความจำเพาะของการออกฤทธิ์ (selectivity) ต่อกระบวนการอักเสบโดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ประสิทธิภาพดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ El-Hawary et al. (2020) ซึ่งพบว่าสารสกัดใบ *Tradescantia spp.* มีองค์ประกอบหลักเป็น quercetin-3-O-glucoside, kaempferol derivatives และ chlorogenic acid ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งตัวกลางการอักเสบ (inflammatory mediators) เช่น nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) และ cytokines สำคัญ (IL-6, TNF- α) เป็นไปได้ว่าอาจเป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) และ lipoxygenase (LOX) โดยไม่ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ปกติ (Takó et al., 2020) และค่า cell viability ที่สูงของสารสกัดเอทานอล (92.26%) เมื่อเทียบกับค่าการยับยั้งการอักเสบ (IC₅₀ = 22.20 µg/mL) แสดงถึง ช่วงความปลอดภัยทางชีวภาพ (therapeutic window) ที่กว้าง ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของสารที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เภสัชกรรมหรือเครื่องสำอางเชิงสุขภาพเพื่อลดการอักเสบจากธรรมชาติได้ในอนาคต

สรุป

จากการศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากหญ้าไผ่ พบว่าจากการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล เมทานอล และอะซิโตน พบว่า เอทานอลให้ผลผลิตสารสกัดสูงสุดที่ 40.2% รองลงมาคือเมทานอลที่ 36.4% และอะซิโตนที่ 30.1% แสดงให้เห็นถึงความสามารถของเอทานอลในการสกัดสารประกอบจากเนื้อเยื่อพืชได้ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นแนวโน้มว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่ตรวจพบ โดยสารสกัดเอทานอลมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดที่ 26.51 mg GAE/g และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดที่ 33.71 mg QE/g เมื่อเทียบกับเมทานอลและอะซิโตนที่มีค่าต่ำกว่าตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเอทานอลมีค่า IC₅₀ ต่ำที่สุดที่ 10,530 µg/mL มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในขณะที่เมทานอลและอะซิโตนมีค่า IC₅₀ ที่ 12,650 และ 13,520 µg/mL ตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียยืนยันแนวโน้มเดียวกัน โดยสารสกัดเอทานอล แสดงฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดต่อเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดที่ทดสอบ โดยเฉพาะต่อ *S. aureus* ที่มี inhibition zone ถึง 5.10 mm และมีค่า MIC ต่ำที่สุดที่ 78,100 µg/mL ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทานอลก็แสดงประสิทธิภาพสูงสุด โดยมีค่า IC₅₀ ที่ 22.20 µg/mL ซึ่งดีกว่าเมทานอลและอะซิโตนอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่า สารสกัดเอทานอลมีความปลอดภัยต่อเซลล์ด้วย

โดยมี % ความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ 92.26 แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะในการออกฤทธิ์โดยไม่ส่งผลเสียต่อเซลล์ปกติ จากผลการศึกษาทั้งหมด สารสกัดเอทานอลจากหญ้าไผ่น้ำพบว่ามีศักยภาพด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต้านเชื้อแบคทีเรีย และต้านการอักเสบสูงที่สุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายอื่น อย่างไรก็ตาม แม้ว่าสารสกัดจะมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด แต่ค่า MIC/MBC ยังมีค่าสูง สะท้อนให้เห็นว่าสารสกัด ยังไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียในเชิงคลินิกโดยตรง เนื่องจากต้องการความเข้มข้นสูงเพื่อออกฤทธิ์ อย่างไรก็ตาม ผลลัพธ์ที่ได้ยังคงมีความสำคัญทางวิชาการ โดยชี้ให้เห็นว่า หญ้าไผ่น้ำมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ซึ่ง อาจนำไปต่อยอดในรูปแบบผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ หรือเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการแยกบริสุทธิ์สารออกฤทธิ์เฉพาะ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดความเข้มข้นที่ต้องใช้ นอกจากนี้ ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ต่ำและ % ความมีชีวิตของเซลล์สูงแสดงให้เห็นว่าเป็นสารที่มีความปลอดภัยต่อการประยุกต์ใช้ในงานด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพหรือเวชสำอาง ดังนั้น แม้ว่าฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในเชิงการเป็นยาอาจยังไม่เพียงพอ แต่สารสกัดเอทานอลจากหญ้าไผ่น้ำยังคงมีศักยภาพสูงในด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและ การใช้ประโยชน์เชิงสุขภาพ โดยอาจต้องมีการแยกกึ่งบริสุทธิ์หรือพัฒนาสูตรร่วมกับสารเสริมฤทธิ์อื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การวิจัยต่อไปควรมุ่งเน้นการ แยกส่วน (fractionation) และ แยกบริสุทธิ์ (isolation) เพื่อคัดเลือกร่องประกอบที่มีฤทธิ์เด่น พร้อมทั้งวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญด้วยเทคนิคขั้นสูง เช่น LC-MS/MS, NMR เพื่อพิสูจน์โครงสร้างและทำความเข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลได้อย่างแม่นยำ นอกจากนี้ ควรมีการประเมินความปลอดภัยอย่างครอบคลุม ทั้งความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) ความเป็นพิษเรื้อรัง (chronic toxicity) และ การก่อกลายพันธุ์ (mutagenicity) เพื่อให้มั่นใจว่าสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับใช้ภายนอกได้อย่างปลอดภัย ก่อนก้าวสู่การทดสอบทางคลินิกในขั้นต่อไป การพัฒนาหญ้าไผ่น้ำเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจึงเป็นแนวทางที่มีศักยภาพสูง ทั้งในด้านการเพิ่มมูลค่าพืชท้องถิ่น การส่งเสริมสุขภาพประชาชน และการสนับสนุนอุตสาหกรรมเภสัชกรรมไทยให้เติบโตอย่างยั่งยืน ซึ่งจะเกิดขึ้นได้เมื่อมีการแยกและระบุสารสำคัญอย่างชัดเจน พร้อมทั้งผ่านการประเมินความปลอดภัยอย่างเป็นระบบ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์เครื่องมือ และสถานที่สำหรับการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

Ayoola, G. A., Coker, H. A. B., Adesegun, S. A., Adepoju-Bello, A. A., Obaweya, K., Ezennia, E. C., & Atangbayila, T. O. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1019–1024.

<https://doi.org/10.4314/tjpr.v7i3.14686>

- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Boussaada, O., Ammar, S., Saidana, D., Chriaa, J., Chraif, I., Daami, M., Helal, A. N., & Mighri, Z. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* DC. **Microbiological Research**, 163(1), 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.02.010>
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, 56(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Butnariu, M., Quispe, C., Herrera-Bravo, J., Fernández-Ochoa, Á., Emamzadeh-Yazdi, S., Adetunji, C. O., Memudu, A. E., Otlewska, A., Bogdan, P., Antolak, H., Tamimi, K., Baghalpour, N., Mahroo Bakhtiyari, J., Sen, S., Acharya, K., Segura-Carretero, A., de la Luz Cádiz-Gurrea, M., Lim, S. H. E., Pentea, M., . . . Sharifi-Rad, J. (2022). A review on *Tradescantia*: Phytochemical constituents, biological activities, and health-promoting effects. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, 27(6), 197. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2706197>
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., & Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Research**, 47(4), 936–942.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2025). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. (35th ed.; CLSI document M100).
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1830(6), 3670–3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 38(2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014>
- El-Hawary, S. S., Mahmoud, I. I., Faisal, A. M., Osman, S. M., Sleem, A. A., Morsy, F. A., & Sabry, M. M. (2020). Comparative HPLC-PDA-MS/MS tentative identification of polyphenolics from the leaf extracts of three selected *Tradescantia* species and their in vivo hepatoprotective activity. **Tropical Journal of Natural Product Research**, 4(11), 926–935.

- Ghomari, O., Sounni, F., Massaoudi, Y., Ghanam, J., Kaitouni, L. B. D., Merzouki, M., & Benlemlih, M. (2019). Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity. **Biotechnology Reports**, 23, e00347. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00347>
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, 126(1), 131–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Kaczorová, D., Karalija, E., Dahija, S., Bešta-Gajević, R., Parić, A., & Čavar Zeljković, S. (2021). Influence of extraction solvent on the phenolic profile and bioactivity of two *Achillea* species. **Molecules**, 26(6), 1601. <https://doi.org/10.3390/molecules26061601>
- Koleva, I. I., van Beek, T. A., Linssen, J. P., de Groot, A., & Evstatieva, L. N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, 13(1), 17–23. <https://doi.org/10.1002/pca.611>
- Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, 70, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- Manso, T., Lores, M., & de Miguel, T. (2022). Antimicrobial activity of polyphenols and natural polyphenolic extracts on clinical isolates. **Antibiotics**, 11(1), 46. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010046>
- Marcinkiewicz, J., Grabowska, A., Bereta, J., & Stelmaszynska, T. (1995). Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. **Journal of Leukocyte Biology**, 58(6), 667–674. <https://doi.org/10.1002/jlb.58.6.667>
- Mehmood, A., Javid, S., Khan, M. F., Ahmad, K. S., & Mustafa, A. (2022). In vitro total phenolics, total flavonoids, antioxidant and antibacterial activities of selected medicinal plants using different solvent systems. **BMC Chemistry**, 16, 64. <https://doi.org/10.1186/s13065-022-00858-2>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, 83(3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

- Oulahal, N., & Degraeve, P. (2022). Phenolic-rich plant extracts with antimicrobial activity: An alternative to food preservatives and biocides. **Frontiers in Microbiology**, 12, 753518. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.753518>
- Park, E., Schuller-Levis, G., & Quinn, M. R. (1995). Taurine chloramine inhibits production of nitric oxide and TNF-alpha in activated RAW 264.7 cells by mechanisms that involve transcriptional and translational events. **Journal of Immunology**, 154(9), 4778–4784.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.02.020>
- Rafi, M., Meitary, N., Septaningsih, D. A., & Bintang, M. (2020). Phytochemical profile and antioxidant activity of Guazuma ulmifolia leaves extracts using different solvent extraction. **Indonesian Journal of Pharmacy**, 31(3), 171–180. <https://doi.org/10.22146/ijp.598>
- Ramos-Arcos, S. A., López-Martínez, S., Velázquez-Martínez, J. R., Gómez-Aguirre, Y. A., Cabañas-García, E., Morales-Bautista, C. M., & Hernandez-Gallegos, M. A. (2023). Phytochemicals and bioactivities of Tradescantia zebrina Bosse: A southern Mexican species with medicinal properties. **Journal of Food and Nutrition Research**, 11(9), 564–572. <https://doi.org/10.12691/jfnr-11-9-2>
- Santos-Buelga, C., González-Paramás, A. M., Dueñas, M., & Escribano-Bailón, M. T. (2018). **Anthocyanins and other flavonoids as natural antimicrobials**. In A. M. Grumezescu (Ed.), *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. (pp. 1–45). Academic Press.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, 8(1), 1–10.
- Shahidi, F., & Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. **Molecules**, 21(9), 1216. <https://doi.org/10.3390/molecules21091216>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Souza, J. N. S., Silva, E. M., Loir, A., Rees, J. F., Rogez, H., & Larondelle, Y. (2012). Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. **Food Chemistry**, 106(1), 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.011>

- Takó, M., Kerekes, E. B., Zambrano, C., Kotogán, A., Papp, T., Krisch, J., & Vágvölgyi, C. (2020). Plant phenolics and phenolic-enriched extracts as antimicrobial agents against food-contaminating microorganisms. **Antioxidants**, 9(2), 165. <https://doi.org/10.3390/antiox9020165>
- Tungmunnithum, D., Drouet, S., Lorenzo, J. M., & Hano, C. (2021). Green extraction of antioxidant flavonoids from pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) seeds and its antioxidant potentials using ultrasound-assisted methodology. **Molecules**, 26(24), 7557. <https://doi.org/10.3390/molecules26247557>
- USDA Plant Database. (2021). **Tradescantia fluminensis Vell.** Natural Resources Conservation Service.
- Waweru, W. R., Osuwat, L. O., & Mureithi, C. W. (2017). Analgesic and anti-inflammatory activity of *Tradescantia fluminensis* leaves extract. **The Journal of Phytopharmacology**, 6(1), 34–37. <https://doi.org/10.31254/phyto.2017.6105>
- World Health Organization. (2019). **WHO global report on traditional and complementary medicine 2019.**