pharmacy practice SWU

พื้นที่สานเสวนาการปฏิบัติและวิจัยทางเภสัชกรรมและบริการสุขภาพ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ อ.องครักษ์ จ.นครนายก 26120

Space for dialogue on practice & research on pharmacy & health care service

Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University
Editor: charoen@g.swu.ac.th
Website: http://ejournals.swu.ac.th/index.php/dphcp

Dialogue healthcare service

**วีระศักดิ์ สามี[1]*, ชุติมา กิติทัศน์เศรณี[1], สุภชา สกุลมานิต[1] และ ฤทธิ์ วัฒนชัยยิ่งเจริญ[2]**

[1] สาขาวิชาเภสัชเคมี
[2] สาขาวิชาชีวเภสัชศาสตร์
[1,2] คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ อ.องครักษ์ จ.นครนายก 26120

* ติดต่อผู้นิพนธ์: weerasak@g.swu.ac.th

**เสวนาสารเภสัชกรรมและบริการสุขภาพ 2557;1(4):99-104**

นิพนธ์ต้นฉบับ

# ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากดอกไม้ในประเทศไทย

## บทคัดย่อ

**วัตถุประสงค์:** การวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพจากสารสกัดเอทานอลของดอกไม้ 30 ชนิดในประเทศไทย **วิธีการศึกษา:** ทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 5 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Aspergillus niger* และ *Candida albican* ด้วยวิธี Agar disc diffusion และ microbroth dilution **ผลการศึกษา:** สารสกัดจากดอกไม้ที่ความเข้มข้นสูงสุด (333 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ โดยเกิด inhibition zone ต่อเชื้อ *S. aureus, B. subtilis* และ *E. coli* แต่ไม่พบฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อเชื้อ *S. typhimurium, P. aeruginosa, A. niger* และ *C. albican* ส่วนสารสกัดที่มีฤทธิ์สูงสุดในการยับยั้งเชื้อ S. aureus คือ สารสกัดจากดอกทรงบาดาลและหางนกยูงไทย โดยมีค่า MIC เท่ากันคือ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดจากดอกบัวหลวงมีฤทธิ์สูงสุดในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *E. coli* ที่ค่า MIC เท่ากันทั้งสองเชื้อคือ 1,200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร **สรุป:** พบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากดอกไม้หลายชนิดที่ความเข้มข้นสูงสุด สารสกัดจากดอกบัวหลวงให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงที่สุดต่อเชื้อ *B. subtilis* และ *E. coli*

**คำสำคัญ:** ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ฤทธิ์ต้านจุลชีพ, สารสกัดเอธานอล, ดอกไม้, ประเทศไทย

**เสวนาสารเภสัชกรรมและบริการสุขภาพ 2557;1(4):99-104**

Original Article

# Antimicrobial Activity of Flower Extracts in Thailand

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate antimicrobial activities of the ethanol extracts of 30 Thai flowers against pathogenic bacteria and fungi. **Methods:** The pathogenic microorganisms included 5 strains of bacteria, namely *Bacilus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*, and 2 strains of fungi, specifically, *Aspergillus niger* and *Candida albican*. The crude extracts were examined for antimicrobial activity using agar disc diffusion and microbroth dilution methods. **Results:** Most flower extracts, with their highest concentrations (333 mg/ml), exhibited antimicrobial properties against *S. aureus*, *B. subtilis* and *E. coli*, but not against *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *A. niger* or *C. albican*. The extracts of *Senna surattensis* and *Caesulpinia pulcherrima* both demonstrated the highest inhibition effect against *S. aureus* at a comparable MIC of 300 µg/ml. The highest antimicrobial effect was found in *Nelumbo nucifera* extract with an MIC of 1,200 µg/ml against *B. subtilis* and *E. coli*. **Conclusion:** Antibacterial activities were found in various flower extracts at their highest concentrations. *Nelumbo nucifera* extract exhibited the highest antibacterial activity against *B. subtilis* and *E. coli*.

**Keywords:** antibacterial, antimicrobial, ethanol extract, flower, Thailand

## บทนำ

ประเทศไทยตั้งอยู่ในประเทศเขตร้อนชื้นทำให้มีสภาพสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเติบโตของจุลชีพ จึงมักพบปัญหาการติดเชื้อและเกิดโรคระบาดหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อที่ก่อโรคในคน ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella* sp. เป็นเชื้อสาเหตุของอาการอุจจาระร่วง *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. เป็นเชื้อสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ส่วน *Aspergillus niger* และ *Candida albican* เป็นเชื้อราฉวยโอกาส[1] *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อก่อโรคที่ผิวหนังและ *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อฉวยโอกาส[2] เป็นต้น แม้ว่าอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับยาจะมีการพัฒนาตำรับยาปฏิชีวนะใหม่ ๆ เพื่อรองรับปัญหาดังกล่าว แต่ตัวยาที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นจากกระบวนการทางเคมี อาจมีสารปนเปื้อนเกิดขึ้นในระหว่างขั้นตอนการสังเคราะห์ยา ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายในคนได้ ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงหันมาให้ความสนใจในการศึกษาวิจัยการนำพืชสมุนไพรมาใช้เป็นยาเพิ่มมากขึ้นและเป็นแนวทางใหม่ในการค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ[3,4]

สำหรับประเทศไทยมีผู้ศึกษาวิจัยด้านนี้เพิ่มขึ้น เนื่องจากเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อนชื้นจึงทำให้มีความหลากหลายของสายพันธุ์พืชที่สามารถนำมาศึกษาได้ โดยพืชแต่ละชนิดมีฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน เช่น กานพลูแก้อาการท้องอืดช่วยขับลม คำฝอยช่วยละลายไขมันในเลือด ชะเอมแก้ไอขับเสมหะ ฟ้าทะลายโจรแก้ไข้ ฝรั่งใช้รักษาภาวะท้องร่วงและบิด กาหลงลดความดันโลหิต เทียนบ้านใช้รักษาอาการน้ำกัดเท้า มะเกลือขับพยาธิ ทองพันชั่งรักษากลากเกลื้อนขิงแก้อาการคลื่นไส้อาเจียน เป็นต้น[5]

รายงานการวิจัยส่วนใหญ่เน้นการศึกษาสารสำคัญจากส่วนราก ลำต้น และใบของพืช ซึ่งข้อมูลส่วนของดอกมีน้อยมาก ในต่างประเทศมีการนำสารสกัดจากดอกโรสมารี (*Rosmarinus officinalis*) มาใช้เป็นสารกันเสียในเครื่องสำอางเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน[6] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพจากดอกไม้ในประเทศไทยจำนวน 30 ชนิด เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาชนิดและเอกลักษณ์ของสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพจากดอกไม้ และเป็นแนวทางในการเลือกสารสกัดจากดอกไม้เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ต่าง ๆ เช่น ใช้เป็นสารกันเสียในตำรับเครื่องสำอาง อีกทั้งยังอาจใช้เป็นแนวทางพัฒนาโครงสร้างของสารสำคัญเพื่อประโยชน์ทางเภสัชกรรมต่อไป

## วิธีการศึกษา

### วัสดุและสารเคมี

**จุลชีพที่นำมาทดสอบ**

1. เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่

| | |
|---|---|
| Gram negative | *Escherichia coli* ATCC 25922 |
| | *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 |
| | *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 |
| Gram positive | *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P |
| | *Bacillus subtilis* ATCC 2977 |

2. เชื้อรา ได้แก่

| | |
|---|---|
| | *Candida albican* ATCC 10231 |
| | *Aspergillus niger* ATCC 11414 |

### วิธีการทดลอง

**1. การสกัดสารสำคัญจากดอกไม้**

1. นำดอกไม้ทั้ง 30 ชนิดมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง หรือใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง โดยแยกเอาเฉพาะส่วนกลีบดอกและเกสรมาอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 50 – 55 °C หรือจนกว่าจะแห้ง
2. นำส่วนของพืชแห้งมาบดเป็นผง ชั่งน้ำหนักผงใส่ใน flask ขนาด 250 มล. เติม 95% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:7 หมักครั้งละ 7 วัน จำนวน 3 ครั้ง
3. นำ flask สารสกัดไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที และนำมากรองแยกสารสกัดออกด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายไประเหยเอาตัวทำละลายออกให้หมด โดยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50 °C
4. ชั่งน้ำหนักสารสกัดเข้มข้นที่ได้แล้วบันทึกน้ำหนักที่ได้ เก็บสารสกัดในขวดสีชาที่มีฝาเกลียวปิดและเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

**2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity)[7]**

**2.1 การเตรียมเชื้อ**

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB), Tryptic soy agar (TSA), Saboraud dextrose agar (SDA) และ Mueller-Hinton agar (MHA) โดยละลายในน้ำกลั่นแล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ºC นาน 15 นาที
2. ถ่ายเชื้อมาตรฐานจาก stock culture ลงใน TSB แล้วนำไป incubate เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง
3. นำเชื้อจาก TSB มา streak บน TSA plate เพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์หรือ pure culture แยกเอาโคโลนีเดี่ยว
4. ทำ subculture เชื้อโดยนำ loop เขี่ยเชื้อที่ต้องการมา steak บน slant แล้วนำไป incubate เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง
5. นำ loop เขี่ยเชื้อใส่ลงใน TSB นำไป incubate 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเทียบความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ McFarland solution No. 0.5 (การเตรียมสารละลาย McFarland solution No. 0.5 โดยใช้สารละลาย barium chloride 1.125% (w/v) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ sulfuric acid 0.36 N จำนวน 99.5 มิลลิลิตร)[4] โดยเจือจางด้วย TSB

**2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี agar disc diffusion[8]**

1. เตรียม agar plate โดยใช้ Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซ็นติเมตร โดยเท TSA ที่ autoclave แล้ว ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ตั้งไว้ให้แข็งตัว
2. นำสารละลายเชื้อ (เทียบความขุ่นของเชื้อเท่ากับ McFarland solution No. 0.5) spread บน agar plate โดยใช้ cotton swab ชุบสารละลายเชื้อ แล้วกระจายให้ทั่วผิวหน้า TSA จนสารละลายหมด
3. เตรียมสารสกัดจากดอกไม้ตัวอย่างโดยชั่งน้ำหนักชนิดละ 0.1 กรัมละลายด้วย 95% เอทานอล 200 ไมโครลิตร ใน microcentrifuge tube นำไป sonicate 20 นาที ให้สารสกัดละลายได้ดี
4. ดูดสารละลายของสารสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ปล่อยลงใน paper disc (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.9 เซ็นติเมตร ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว) รอจนแห้ง วาง paper disc บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมงโดยทำ negative และ positive control ด้วย paper disc ที่จุ่มด้วยตัวทำละลาย และยาปฏิชีวนะตามลำดับ
5. อ่านผล antibacterial activity และ antifungal activity โดยวัด inhibition zone และบันทึกผลในหน่วยมิลลิเมตร

**2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี microbroth dilution[9]**

1. เตรียมสารละลายเชื้อ (เทียบความขุ่นของเชื้อเท่ากับ McFarland solution No 0.5) และสารละลายสี tetrazolium เติมลงใน TSB ในอัตราส่วน 5:5:90 เขย่าผสมให้เข้ากัน

จากนั้นนำไปหยอดลงใน 96 microwell plate โดยแต่ละหลุมให้มีปริมาตร 100 ไมโครลิตร

2. เตรียมสารสกัดตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 19,200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และทำให้เจือจางในอัตราส่วน 1:2 ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 9,600, 4,800, 2,400, 1,200, 600, 300 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ
3. แต่ละ 96 microwell plate ประกอบด้วย positive control, negative control และ sample โดย positive control จะเติมสารละลายของตัวยาลงไป 100 ไมโครลิตร ส่วน negative control เติม media อีก 100 ไมโครลิตร และ sample ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ อย่างละ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง
4. บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้น หากเชื้อมีการเจริญเติบโตสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดง เพราะใน mitochondria ของสิ่งมีชีวิตมี enzyme dehydrogenase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน tetrazolium sodium เป็น formazan ซึ่งมีสีแดงและไม่ละลายน้ำ หากสารที่ทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้สารละลายจะไม่เกิดสี
5. พิจารณาค่า MIC (Minimum inhibitory concentration[10] จากเข้มข้นแรกที่ไม่เกิดสีแดง

หมายเหตุ: สี 2,3,5–tetrazolium sodium 1% เตรียมโดย 1% ของ 2,3,5–tetrazolium sodium + 10% glucose ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

**2.4 การหาค่า MBC (Minimum bactericidal concentration)[11]**

1. เก็บสารละลายในหลุมที่ใสไม่มีสีแดงมา streak ลงบน agar plate
2. นำไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง
3. พิจารณาค่า MBC จากสารละลายความเข้มข้นที่ไม่มีเชื้อขึ้น (โดยศึกษาค่า MBC เฉพาะเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli*)

## ผลการศึกษา

**1. การเตรียมสารสกัด**

จากการสกัดสารจากดอกไม้ 30 ชนิด โดยใช้ absolute ethanol ด้วยวิธี Maceration โดยหมักครั้งละ 7 วันเป็นจำนวน 3 ครั้ง แล้วรวมสารสกัดจากการหมักทั้งสามเข้าด้วยกัน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกให้ได้สารสกัดหยาบแห้ง พบว่าได้ปริมาณ % yield ดังตารางที่ 1 โดยสารสกัดจากดอกไม้ที่มีปริมาณสูงสุด 5 อันดับแรกคือ แพงพวยฝรั่ง (แดง) รำเพย บานบุรี พวงชมพู และพุดซ้อน ตามลำดับ โดยมีค่า % yield ดังนี้ 43.89, 43.43, 43.03, 42.50 และ 41.96% ตามลำดับ และที่มี % yield น้อยที่สุดคือ ชุมเห็ดเทศ (6.47%)

**2. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี agar disc diffusion**

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้น โดยนำสารสกัดที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารที่สกัดได้จากดอกไม้ คือ 333 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายใน absolute ethanol มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี agar disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* เทียบกับยามาตรฐาน tetracycline 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมี inhibition zone = 17.8 มิลลิเมตร พบว่าสารสกัดเอทานอลจากดอกกุหลาบ

**ตารางที่ 1** แสดงปริมาณของสารสกัดหยาบจากดอกไม้แต่ละชนิด

| No. | ดอกไม้ | ชื่อวิทยาศาสตร์ | Yield (%) |
|---|---|---|---|
| 1 | กันเกรา | *Fagraea fragrans* Roxb. | 24.30 |
| 2 | กุหลาบมอญ | *Rosa damacerna* | 24.23 |
| 3 | เก๊กฮวย | *Chrysanthemum indicum* L. | 37.13 |
| 4 | ทรงบาดาล | Senna surattensis | 26.76 |
| 5 | เข็ม (เหลือง) | *Ixora coccinea* | 31.59 |
| 6 | เข็ม (แดง) | *Ixora coccinea* | 24.70 |
| 7 | คำฝอย | *Carthamus tinctorius* L. | 20.11 |
| 8 | แค (ขาว) | *Sesbania grandiflora* | 38.41 |
| 9 | แค (แดง) | *Sesbania grandiflora* | 29.20 |
| 10 | จำปี | *Michelia alba* DC. | 9.84 |
| 11 | ชบา | *Hibiscus rosa-sinensis* L. | 26.63 |
| 12 | ช้องนาง | *Thunbergia repens* L. | 26.25 |
| 13 | ชุมเห็ดเทศ | *Cassia alata* L | 6.47 |
| 14 | ดาวกระจาย | *Cosmos* spp. | 31.80 |
| 15 | ทองหลาง | *Erythrina variegata* L. | 11.73 |
| 16 | บัวหลวง | *Nelumbo nucifera* | 14.85 |
| 17 | บานบุรี | *Allamanda catharica* L. | 43.03 |
| 18 | บานไม่รู้โรย | *Limunium sinuafuam* | 6.92 |
| 19 | ประดู่ | *Pterocarpus macrocarpus* Kurtz | 17.59 |
| 20 | พวงชมพู | *Antigonon leptopus* Hook. & Arn | 42.50 |
| 21 | พุดซ้อน | *Tabernaemontana divaricata* | 41.96 |
| 22 | แพงพวยฝรั่ง (ขาว) | *Catharanthus roseus* | 41.42 |
| 23 | แพงพวยฝรั่ง (แดง) | *Catharanthus roseus* | 43.89 |
| 24 | มะลิ | *Jasminum Sambac* (L.) Aiton | 14.33 |
| 25 | รางจืด | *Thunbergia laurifolia* Linn. | 38.68 |
| 26 | รำเพย | *Thevetia peruviana* | 43.43 |
| 27 | สุพรรณิการ์ | *Cochlospermum vitifolium* | 20.90 |
| 28 | หางนกยูงไทย | *Caesalpinia pulcherrima* | 31.03 |
| 29 | อัญชัน | *Clitoria ternatea* L. | 24.95 |
| 30 | รัก (ม่วง) | *Calotropis gigantea* L. | 15.29 |

ทรงบาดาล เข็มแดง จำปี ชุมเห็ดเทศ บัวหลวง พวงชมพู แพงพวยฝรั่งดอกสีแดง รำเพย และหางนกยูงไทย สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อดังกล่าวได้ โดยมี inhibition zone ขนาด 10.5, 11.0, 10.5, 15.0, 13.0, 16.5, 10.5, 11.0, 11.5 และ 12.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ พบว่าสารสกัดเอทานอลจากดอกไม้ชนิดอื่นมีฤทธิ์ต้านเชื้อดังกล่าวเพียงเล็กน้อยและไม่สามารถวัดเป็นขนาดได้ชัดเจน ได้แก่ กันเกรา เก๊กฮวย คำฝอย แคแดง ดาวกระจาย ทองหลาง และบานบุรี

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* เทียบกับยามาตรฐาน norfloxacin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมี inhibition zone 18.0 มม. พบว่าสารสกัดเอทานอลจาก ดอกกันเกรา เข็ม

แดง จำปี ชุมเห็ดเทศ บัวหลวง และหางนกยูง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวได้ โดยมี inhibition zone ขนาด 9.8, 10.0, 12.0, 20.0, 11.5 และ 11.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังมีสารสกัดเอทานอลจากดอกไม้ชนิดอื่นที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อดังกล่าวได้แต่เพียงเล็กน้อยและไม่สามารถวัดได้ ได้แก่ เก็กฮวย คำฝอย แคแดง ทองหลาง และพวงชมพู

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* เมื่อเทียบกับยามาตรฐาน tetracycline 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมี inhibition zone เท่ากับ 19.0 มิลลิเมตร พบว่าสารสกัดเอทานอลจากดอกกันเกราและบัวหลวง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวได้ โดยมี inhibition zone เท่ากับ 9.5 และ 12.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa, Candida albican* และ *Aspergillus niger* เมื่อเทียบกับยามาตรฐาน norfloxacin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร neomycin 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร clotrimazole 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ clotrimazole 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่มี inhibition zone เท่ากับ 20.0, 19.5, 28.5 และ 22.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ ไม่พบว่าสารสกัดจากดอกไม้มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพทั้งสี่ที่ความเข้มข้นดังกล่าว ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 2

### 3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี microbroth dilution method

จากการทดลองเมื่อนำสารสกัดที่ความเข้มข้น 19,200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ละลายใน 10% DMSO มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพต่าง ๆ เพื่อหาค่า MIC และ MBC ด้วยวิธี microdilution โดยเลือกทำเฉพาะสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตจากการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี agar disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* เทียบกับยามาตรฐาน tetracycline 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากดอก

**ตารางที่ 2** แสดง Inhibition zone ของสารสกัดจากดอกไม้ 30 ชนิดต่อเชื้อจุลชีพทั้ง 7 ชนิด

| No. | สารสกัด | Inhibition zone ใน agar disc diffusion (มม.) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *S. aureus* | *B. subtilis* | *E. coli* | *S. typhimurium* | *P. aeruginosa* | *C. albican* | *A. niger* |
| 1 | กันเกรา | + | 9.8 | 9.5 | - | - | - | - |
| 2 | กุหลาบ | 10.5 | - | + | - | - | - | - |
| 3 | เก็กฮวย | + | + | - | - | - | - | - |
| 4 | ทรงบาดาล | 11.0 | - | - | - | - | - | - |
| 5 | เข็ม (เหลือง) | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | เข็ม (แดง) | 10.5 | 10.0 | - | - | - | - | - |
| 7 | คำฝอย | + | + | + | - | - | - | - |
| 8 | แค (ขาว) | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | แค (แดง) | + | + | - | - | - | - | - |
| 10 | จำปี | 15.0 | 12.0 | - | - | - | - | - |
| 11 | ชบา | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | ช้องนาง | - | - | - | - | - | - | - |
| 13 | ชุมเห็ดเทศ | 13.0 | 20.0 | - | - | - | - | - |
| 14 | ดาวกระจาย | + | - | - | - | - | - | - |
| 15 | ทองหลาง | + | + | - | - | - | - | - |
| 16 | บัวหลวง | 16.5 | 11.5 | 12.5 | - | - | - | - |
| 17 | บานบุรี | + | - | + | - | - | - | - |
| 18 | บานไม่รู้โรย | - | - | + | - | - | - | - |
| 19 | ประดู่ | - | - | - | - | - | - | - |
| 20 | พวงชมพู | 10.5 | + | - | - | - | - | - |
| 21 | พุดซ้อน | | - | + | - | - | - | - |
| 22 | แพงพวยฝรั่ง (ขาว) | - | - | - | - | - | - | - |
| 23 | แพงพวยฝรั่ง (แดง) | 11.00 | - | - | - | - | - | - |
| 24 | มะลิ | - | - | + | - | - | - | - |
| 25 | รางจืด | - | - | + | - | - | - | - |
| 26 | รำเพย | 11.5 | - | - | - | - | - | - |
| 27 | สุพรรณิการ์ | - | - | - | - | - | - | - |
| 28 | หางนกยูงไทย | 12.0 | 11.5 | - | - | - | - | - |
| 29 | อัญชัน | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 | รักม่วง | - | - | + | - | - | - | - |
| **ยามาตรฐาน** | | **17.8** | **18.0** | **19.0** | **20.0** | **19.5** | **28.5** | **19.0** |

หมายเหตุ: (-) ไม่พบ Inhibition zone

(+) พบ Inhibition zone เล็กน้อย หรือวัดไม่ได้

กุหลาบ ทรงบาดาล เข็มแดง จำปี ชุมเห็ดเทศ บัวหลวง พวงชมพู แพงพวยฝรั่งดอกสีแดง รำเพย และหางนกยูงไทย มีค่า MIC เท่ากับ 600, 300, 2,400, 4,800, 2,400, 2,400, 2,400, 9,600, 1,200 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า MBC เท่ากับ 9,600, 4,800, 9,600, มากกว่า 9,600, มากกว่า 9,600, 2,400, 9,600, มากกว่า 9,600, 9,600 และ 9,600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* เทียบกับยามาตรฐาน tetracycline 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากดอกกันเกราและบัวหลวง มีค่า MIC เท่ากับ 4,800 และ 1,200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า MBC เท่ากับ มากกว่า 9,600 และ 9,600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. Subtilis* ซึ่งทำการศึกษาเฉพาะ MIC ไม่ได้ศึกษา MBC เทียบกับยามาตรฐาน norfloxacin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากดอกกันเกรา เข็มแดง จำปี ชุมเห็ดเทศ บัวหลวง และหางนกยูงไทย มีค่า MIC เท่ากับ 2,400, 9,600, 4,800, 1,200, 1,200 และ 4,800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 3** แสดงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากดอกไม้ 30 ชนิดต่อเชื้อจุลชีพ 3 ชนิด

| No. | สารสกัด | MIC (มคก./มล.) | | | MBC (มคก./มล.) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *S. aureus* | *E. coli* | *B. subtilis* | *S. aureus* | *E. coli* |
| 1 | กันเกรา | - | 4,800 | 2,400 | - | > 9,600 |
| 2 | กุหลาบมอญ | 600 | - | - | 9,600 | - |
| 3 | เก๊กฮวย | - | - | - | - | - |
| 4 | ทรงบาดาล | 300 | - | - | 4,800 | - |
| 5 | เข็ม (เหลือง) | - | - | - | - | - |
| 6 | เข็ม (แดง) | 2,400 | - | 9,600 | 9,600 | - |
| 7 | คำฝอย | - | - | - | - | - |
| 8 | แค (ขาว) | - | - | - | - | - |
| 9 | แค (แดง) | - | - | - | - | - |
| 10 | จำปี | 4,800 | - | 4,800 | > 9,600 | - |
| 11 | ชบา | - | - | - | - | - |
| 12 | ช้องนาง | - | - | - | - | - |
| 13 | ชุมเห็ดเทศ | 2,400 | - | 1,200 | > 9,600 | - |
| 14 | ดาวกระจาย | - | - | - | - | - |
| 15 | ทองหลาง | - | - | - | - | - |
| 16 | บัวหลวง | 2,400 | 1,200 | 1,200 | 2,400 | 9,600 |
| 17 | บานบุรี | - | - | - | - | - |
| 18 | บานไม่รู้โรย | - | - | - | - | - |
| 19 | ประดู่ | - | - | - | - | - |
| 20 | พวงชมพู | 2,400 | - | - | 9,600 | - |
| 21 | พุดซ้อน | - | - | - | - | - |
| 22 | แพงพวยฝรั่ง (ขาว) | - | - | - | - | - |
| 23 | แพงพวยฝรั่ง (แดง) | 9,600 | - | - | > 9,600 | - |
| 24 | มะลิ | - | - | - | - | - |
| 25 | รางจืด | - | - | - | - | - |
| 26 | รำเพย | 1,200 | - | - | 9,600 | - |
| 27 | สุพรรณิการ์ | - | - | - | - | - |
| 28 | หางนกยูงไทย | 300 | - | 4,800 | 9,600 | - |
| 29 | อัญชัน | - | - | - | - | - |
| 30 | รัก (ม่วง) | - | - | - | - | - |

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีการทดลอง 3 ส่วน คือ การเตรียมสารสกัด การทดสอบหาฤทธิ์ต้านจุลชีพโดย agar disc diffusion method และการทดสอบหาฤทธิ์ต้านจุลชีพโดย microbroth dilution method

ในการเตรียมสารสกัด พบว่าสารสกัดเอทานอลของดอกไม้ที่มีปริมาณ % yield สูงสุด คือ แพงพวยฝรั่งดอกแดง (43.89%) และที่มีปริมาณน้อยที่สุดคือ ชุมเห็ดเทศซึ่งมีปริมาณ % yield เป็น 6.47% จากการสกัดสารพบว่าปริมาณสารสกัดเอทานอลของดอกไม้แต่ละชนิดมีปริมาณที่แตกต่างกัน โดยหากมีสารที่สามารถละลายในเอทานอลได้เป็นปริมาณมากจะส่งผลให้มีปริมาณสารที่สกัดได้สูง

ผลของการทดสอบหาฤทธิ์ต้านจุลชีพโดย agar disc diffusion method พบว่าสารสกัดเอทานอลของดอกไม้ทั้ง 30 ชนิด ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *A. niger, C. albican, P. aeruginosa* และ *S. typhimurium* ส่วนสารสกัดจากดอกบัวหลวงสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *B. subtilis*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) ทั้งนี้เนื่องจากในดอกบัวหลวงมีสารสำคัญที่มีโครงสร้างหลากหลายทั้ง flavonoids, alkaloids และ tannins[12] สำหรับสารสกัดจากดอกชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* ได้ดี โดยมี inhibition zone กว้าง 20 มิลลิเมตร ซึ่งอาจเนื่องจากชุมเห็ดเทศมีสารสำคัญกลุ่ม flavonoids และ antraquinones ในปริมาณสูง[14]

ในการทดสอบหาฤทธิ์ต้านจุลชีพโดย microbroth dilution method พบว่าสารสกัดเอทานอลจากดอกทรงบาดาลและดอกหางนกยูงไทยมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยมีค่า MIC ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งดอกทรงบาดาลมีสารสำคัญในกลุ่ม tannins และ terpenoids ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ส่วนดอกหางนกยูงไทยมีปริมาณสารสำคัญกลุ่ม flavonoids ในปริมาณสูง[14]

จากการทดลองฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพเบื้องต้นในสารสกัดเอทานอลของดอกไม้ 30 ชนิดโดยวิธี agar disc diffusion นำมาทดสอบหาค่า MIC และ MBC โดยวิธี microbroth dilution พบสารสกัดของดอกไม้หลายชนิด มีความสามารถในการยับยั้งจุลชีพต่าง ๆ จากการเกิด inhibition zone ได้ชัดเจน แต่เมื่อนำมาทดสอบหาค่า MIC และ MBC โดยวิธี microbroth dilution สารสกัดเหล่านั้นบางชนิดอาจไม่สามารถหาค่า MIC หรือ MBC ในช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบได้ เนื่องจากสารสกัดอาจต้องใช้ความเข้มข้นที่มากกว่า 9,600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จึงสามารถสังเกตเห็นผลฤทธิ์ยับยั้งหรือฆ่าจุลชีพได้ นอกจากนี้ การสารสกัดเหล่านี้นำมาทดลองโดยวิธี agar disc diffusion ซึ่งใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายได้ แต่เมื่อนำมาทดสอบโดยวิธี microbroth dilution ไม่สามารถใช้เอทานอลในการทดสอบได้ เนื่องจากเชื้อจุลชีพจะสัมผัสกับเอทานอลโดยตรงทำให้ยับยั้งการเจริญของจุลชีพ ดังนั้นจึงไม่สามารถทราบได้ว่าการยับยั้งเชื้อจุลชีพเกิดจากสารสกัดหรือ

เอทานอล จึงจำเป็นต้องใช้ 10% DMSO เป็นตัวทำละลายแทน ซึ่งการใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน อาจจะส่งผลต่อการละลายของสารสำคัญในสารสกัดได้ อาจทำให้ผลการทดลองจาก 2 วิธีนี้ไม่สอดคล้องกัน เช่น ดอกบัวหลวงมี inhibition zone ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด (16.5 มิลลิเมตร) แต่มีค่า MIC สูงกว่าสารสกัดจากดอกทรงบาดาลและหางนกยูงไทยที่มี inhibition zone น้อยกว่า (11.0 และ 12.0 มิลลิเมตร) นอกจากนี้ ระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลองทั้ง 2 วิธีที่แตกต่างกันนั้น อาจทำให้ได้ผลการทดลองต่างกัน เนื่องจากวิธี agar disc diffusion ใช้ความเข้มข้นของสารทดสอบที่มากกว่าวิธี microbroth dilution จึงทำให้สามารถเห็นผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี agar disc diffusion ได้ดีกว่าวิธี microbroth dilution

นอกจากนี้ ในการสังเกตผลการยับยั้งเชื้อจุลชีพต้องอาศัยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี 2,3,5–tetrazolium sodium โดยหากสารสกัดไม่มีฤทธิ์จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีโดยจะเปลี่ยนจากสีเดิมของสารสกัดเป็นสีแดง และเนื่องจากงานวิจัยนี้ไม่ได้ศึกษาเพื่อระบุสารสำคัญจากสารสกัดเอทานอลของดอกไม้แต่ละชนิด แต่มีรายงานการวิจัยก่อนหน้าเกี่ยวกับสารเหล่านี้ในส่วนอื่นของพืช เช่น ในบัวหลวงส่วนส่วนราก เกสร และทั้งต้น พบสารกลุ่ม alkaloid[12,13] ในใบชุมเห็ดเทศพบสารกลุ่ม flavonoid และ terpenoid[14] และในดอกหางนกยูงไทยพบสารกลุ่ม flavonoid[15] ซึ่งกลไกของสารสำคัญดังกล่าว คือ terpenoids สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนภายในเซลล์ และสาร flavonoids สามารถเกิด adhesion กับเชื้อจุลชีพและเกิด complex กับ cell wall[16] เป็นต้น

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากดอกไม้ทั้ง 30 ชนิด พบว่าดอกทรงบาดาลและดอกหางนกยูงไทยมีค่า MIC ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ดังนั้นดอกไม้สองชนิดนี้มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อ โดยการนำไปสกัดแยกสารสำคัญพิสูจน์เอกลักษณ์ และศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ของสารเดี่ยวเพื่อพิสูจน์ว่าสารสำคัญชนิดใดที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด และนำโครงสร้างทางเคมีของสารที่มีฤทธิ์ดีที่สุดไปเป็นต้นแบบในการดัดแปลงโครงสร้างและสังเคราะห์อนุพันธ์ให้มีฤทธิ์ดีขึ้นไปอีก สำหรับดอกบัวหลวงซึ่งสามารถรับประทานได้และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ควรศึกษาความสามารถในการเป็นสารกันเสียในอาหารหรือเครื่องสำอางเพิ่มเติม เพื่อลดการใช้สารสังเคราะห์เป็นสารกันเสียในอาหารหรือเครื่องสำอางในอนาคต

## References


1. Mekasuwanpradit T, Monthakantikul P, Suthiseesung C, Archananuparp S (eds.). Pharmacotherapy, 2nd ed. Bangkok. Holisting Publishing, 2007. (in Thai)
2. Suwanpinit N. Pathogenic bacteria. Bangkok. Department of Biology, Srinakharinwirot University, 2001. (in Thai)
3. Damnakkaew K, Rujiwipat W. Annual epidemiological surveillance report, 2003. Bureau of Epidemiology, Ministry of Public Health, Thailand. 2003. (in Thai)
4. Joyce ECB, Rebeca PM, Lidiane NB, et al. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(4):387-390.
5. Plant Genetic Conservation Project Office. Plant Genetic Conservation Project under the Royal Initiative of her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn. (Accessed on Jun. 7, 2007, at http://www.rspg.thaigov.net/index.htm) (in Thai)
6. Cosmeticsinfo.org. Rosmarinus Officinalis (Rosemary) extract. (Accessed on Nov. 21, 2015, at http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/rosmarinus-officinalis-rosemary-extract)
7. Moesdarsono M, Yulinah E, Kusmardiyani. Antimicribial activity of various extracts prepared from *Sesbania grandiflora* bark, International Congress and 49th Annual Meeting of the Society of Medicinal Plant Research. September 2001. Germany.
8. NCCLS. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests: Approved standard. NCCLS publication M2-A5. Villanova, USA. NCCLS, 1993.
9. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard 5th Ed. NCCLS document M7-A5. Wayne, USA. NCCLS, 2000.
10. Gattringer R, Nicks M, Ostertag R, et al. Evaluation of MIDITECH automated colorimetric MIC reading for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:651-659.
11. Johnson MT. Basic bacterial culture and identification. Indian University School of Medicine. (Accessed on Nov. 27, 2007, at http://web.indstate.edu/thcme/micro/basic.html)
12. King Mongkut University of Technology-Thonburi. Thai herbs. (Accessed on Jun. 13, 2007, at http://202.44.14.219/thaiherbkmutt/benefit/info.php?id=15) (in Thai)
13. Smithsonian Institute. Medicinal plants of the Guiana. (Accessed on Dec. 25, 2007, at www.mnh.si.edu/biodiversity/bdg/medicinal/MedPlantsGui1.pdf)
14. Faculty of Pharmacy, Prince of Songkhla University. Southern Center of Thai Traditional Medicine. (Accessed on Jul. 25, 2007, at http://herbal.pharmacy.psu.ac.th)
15. Boonyaprapassorn N, Chokchaicharoenporn O. Thai traditional herbs (1). Bangkok. Prachachon, 1997. (in Thai)
16. Rojas A, Hernandez L, Pereda MR, Mata R. Screening of antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 1992; 35:275-283.