

อภิธานนาการ

สัญญาเลขที่ R2562B091

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์



สำนักหอสมุด

ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ผิวหนังและความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจาก
กะเม็ง (*Eclipta prostrata* Linn.) และว่านพระฉิม (*Dioscorea bulbifera*
Linn.) และการตรวจวิเคราะห์สารโดยใช้เทคนิค Liquid chromatography
tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. รศ.ดร.ดลฤดี สวงวนเสริมศรี

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัย

นเรศวร

2. ผศ.ดร.นลิน วงศ์ขัตติยะ

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

3. รศ.น.สพ. ดร.พันธุ์ชนะ สวงวนเสริมศรี

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

1. รศ.ดร. พรรณนิกา ฤตวิรุฬห์

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัย

นเรศวร

สนับสนุนโดย

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร	
วันลงทะเบียน	21 มี.ค. 2565
เลขทะเบียน	1049741
เลขเรียกหนังสือ	3 PL 106

๑๖๑๕

2565

งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ 2562

Executive summary

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ของกะเม็งและว่านพระฉิมในการต้านแบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง และวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังรวมทั้ง methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ด้วยวิธี microdilution method และ agar disc diffusion พบว่าสารสกัดจากกะเม็งและว่านพระฉิมออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ สารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียถูกวิเคราะห์ด้วย Thin layer chromatography และนำมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี chromatography จากนั้นจึงวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์นั้นโดยวิธี Nuclear Magnetic Resonance (NMR) พบว่าสารบริสุทธิ์ของว่านพระฉิมที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียคือ flavanthrinin นอกจากนี้พบว่าค่าความเป็นพิษต่อเซลล์จากวิธี MTT assay ของสารสกัดจากกะเม็งและว่านพระฉิมอยู่ในระดับต่ำที่ค่า IC_{50} 0.1 และ 0.06 mg/ml ตามลำดับ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่ากะเม็งและว่านพระฉิมสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังในอนาคตได้

Abstract

The aims of this study are to evaluate the antibacterial effects *Eclipta prostrata* Linn. and *Dioscorea bulbifera* Linn., cytotoxicity and its active compound against skin pathogens including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The agar diffusion assay, minimal inhibitory concentration and minimal inhibitory concentration assay were tested for inhibitory effects. Gas chromatography-mass spectrophotometry was performed to analyze the chemical composition. Thin layer chromatography (TLC) and bioautography were tested to separate and indicate the active antibacterial compounds. The bioactive chemical compounds identified by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectral analysis. The cytotoxicity of the extracts on Vero cells was evaluated by MTT assay. The extract of *Eclipta prostrata* Linn. and *Dioscorea bulbifera* Linn. showed higher antibacterial activity against Gram positive than Gram negative bacteria. The isolation and purification of *Dioscorea bulbifera* Linn. from TLC was subjected to NMR for the structure elucidation of the isolated compound. The compound was named flavantrinin. The extract of *Eclipta prostrata* Linn. and *Dioscorea bulbifera* Linn. had relatively low cytotoxicity with IC₅₀ of 0.1 and 0.06 mg/ml, respectively. The extract of *Eclipta prostrata* Linn. and *Dioscorea bulbifera* Linn showed strong antibacterial activity against Gram positive including MRSA. It was concluded that the extract of *Dioscorea bulbifera* Linn has antibacterial activity and contains a bioactive compound named as flavantrinin.. Our results suggest that the application of *Eclipta prostrata* Linn. and *Dioscorea bulbifera* Linn may facilitate a future strategy for controlling and potentially treatment of skin pathogenic bacteria.

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังของกะเม็งและว่านพระฉิม และวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังรวมทั้ง methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) วิธีที่ใช้ในการศึกษาผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ agar diffusion assay, minimal inhibitory concentration และ minimal inhibitory concentration assay นอกจากนี้ใช้ Gas chromatography-mass spectrophotometry ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของกะเม็งและว่านพระฉิม และใช้ Thin layer chromatography และ bioautography ในการทดสอบและแยกชนิดสารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ สารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนำมาวิเคราะห์ชนิดของสารนั้นด้วย Nuclear Magnetic Resonance (NMR) และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดทดสอบใน Vero cells ด้วย MTT assay ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากกะเม็งและว่านพระฉิมออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ สารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียถูกวิเคราะห์ด้วย TLC-bioautography และนำมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี chromatography จากนั้นจึงวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์โดยวิธี NMR พบว่าสารนั้นคือ flavanthrinin นอกจากนี้สารสกัดจากกะเม็งและว่านพระฉิมมีความเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ในระดับที่ค่า IC₅₀ 0.1 และ 0.06 mg/ml ตามลำดับ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่ากะเม็งและว่านพระฉิมสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังได้

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

การแพทย์แผนไทยมีการนำพืชสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ มานานมีการบันทึกตั้งแต่สมัยกรุงศรีอยุธยา เป็นมรดกภูมิปัญญาที่เกิดขึ้นจากการเข้าใจธรรมชาติอย่างลึกซึ้งของบรรพบุรุษไทย และได้มีการถ่ายทอดสืบมามายังรุ่นลูกรุ่นหลาน แม้ว่าจะมีการนำการดูแลสุขภาพด้วยการแพทย์แผนตะวันตกเข้ามาตั้งแต่รัชสมัยรัชกาลที่ 5 แต่โรคบางอย่างก็ไม่อาจรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพหรือในขณะรักษาอาจทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยตกต่ำลง ในระบบสุขภาพ การแพทย์แผนไทยเป็นสิ่งที่อยู่คู่กับสังคมไทยอย่างแนบแน่น ทำให้ประชาชนพึ่งพาตนเองได้อย่างยั่งยืน สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง เช่น แผล ฝี หนอง มีการใช้สมุนไพรหลายตัวมาเข้าตำรับยาที่ใช้รักษาแผล ฝี หนอง หนึ่งในนั้นได้แก่ กะเม็ง (*Eclipta prostrata* Linn.) กะเม็งเป็นพืชจำพวกหญ้า พบได้ทั่วไป มีรสเปรี้ยว ใช้เป็นยาห้ามเลือด บำรุงไต แก้บิด ถ่ายเป็นมูกเลือด แก้ลำไส้อักเสบ ตับอักเสบ เรื้อรัง โรคผิวหนังผื่นคัน รักษาผมร่วงก่อนวัย มีการใช้กะเม็งทั้งต้นในการรักษาแผลที่ผิวหนัง แผลกดทับ และแผลเรื้อรัง มีงานวิจัยพบว่ากะเม็งมีฤทธิ์บำรุงตับ มีสารต้านอนุมูลอิสระ แก่พิษงู ต้านการอักเสบ แก้ไข้ ลดไขมัน ยับยั้งเชื้อไวรัส และเชื้อแบคทีเรียได้ (Chung et al., 2017) นอกจากนี้กะเม็งแล้วยังมีว่านพระฉิม (*Dioscorea bulbifera* Linn) ว่านพระฉิมเป็นพืชจำพวกเถา มีหัวใต้ดิน ในตำรายาไทยใช้หัวใต้ดินเป็นยาขับปัสสาวะ แก้บิด แก้ลำไส้อักเสบ แก่ริดสีดวงทวาร บำรุงธาตุ แก้ น้ำเหลืองเสีย ขับพยาธิ เจริญอาหาร แก้ปวดท้อง ท้องอืด เป็นยาขม ยาเย็น ขับน้ำนม ใช้ปิดแผล แก่อักเสบ พอกแก้สิว มีงานวิจัยพบว่าว่านพระฉิมมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ ลดน้ำตาลในเลือด ต้านการอักเสบ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Gao et al., 2002; Ghosh et al., 2012; Ghosh et al., 2013)

สำหรับความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียมักเกิดจากผนังเส้นเลือดแตกถูกทำให้แตกออกหรือแตกเอง บาดแผลที่เกิดขึ้นหากมีการดูแลรักษาไม่ดีพออาจเกิดการติดเชื้อขึ้นได้ สาเหตุหลักเกิดจากการมีเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังในปริมาณมาก ประกอบกับสภาวะบริเวณผิวหนังเอื้อต่อการเจริญของเชื้อ ได้แก่ ผิวหนังมีความชื้นมาก มีการอุดตันของหลอดเลือด บริเวณผิวหนัง ภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ เนื้อเยื่อปกคลุมถูกทำลายทำให้เชื้อแบคทีเรียแทรกตัวเข้าไปข้างใต้ผิวหนังได้ นอกจากนี้ผิวหนังติดเชื้อยังมีสาเหตุมาจากสาเหตุอื่น ๆ ได้อีกได้แก่ แผลกดทับ แผลติดเชื้อ รื้อรัง แผลไฟไหม้ โรคเบาหวาน นำมาซึ่งปัญหาที่ใหญ่ขึ้น หรืออาจร้ายแรงจนอาจถึงแก่ชีวิตได้ โดยเฉพาะ

พะอย่างยิ่งในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ปัจจุบันพบว่ามีมากขึ้นในหลายประเทศทั่วโลก มักพบในวัยผู้ใหญ่ และประชากรโลกมีแนวโน้มที่จะเป็นโรคนี้อีกมากขึ้นเรื่อยๆ ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีปัญหาทางสุขภาพ หลายอย่างที่ต้องมีการดูแลอย่างต่อเนื่อง และค่าใช้จ่ายที่ให้กับการรักษาที่มีมูลค่าสูง ปัญหาการ เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังจึงเป็นปัญหาหลักอย่างหนึ่ง ที่ต้องมีการระมัดระวังในผู้ป่วยกลุ่มนี้เป็นอย่าง มาก เนื่องจากการการหายของแผลในผู้ป่วยเบาหวานมักใช้เวลานานกว่าคนทั่วไป ทำให้มีโอกาสติด เชื้อที่ผิวหนังได้ง่าย ส่งผลให้เกิดแผลเรื้อรังมากขึ้น และผู้ป่วยมีอัตราการตายที่เพิ่มมากขึ้นอัน เนื่องมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียนอกจากนี้ในการรักษาการติดเชื้อที่ผิวหนังอาจใช้เวลานาน ส่งผลให้ เกิดการดื้อยาของเชื้อซึ่งเป็นปัญหาของการรักษา แบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังที่พบบ่อย ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น ปัจจุบันนี้ 90% ของ Staphylococci, Pneumococci และ Enterococci ที่แยกได้จากผู้ที่ติดเชื้อที่มีอาการรุนแรงเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พบว่ามีอุบัติการณ์การเพิ่มขึ้นของเชื้อ methicillin - resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Claassen-Weitz et al., 2016) (Mehraj et al., 2016) นอกจากนี้แบคทีเรียที่เป็นปัญหา เชื้อดื้อยาตัวอื่นๆ ได้แก่ multidrug resistance (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* และ MDR *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumonia* (Suwantararat and Carroll, 2016)

ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังรวมทั้งเชื้อดื้อยาจากสารสกัด กะเม็งและว่านพระฉิม ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังในหลอดทดลอง และตรวจวิเคราะห์ชนิด ของสารที่อยู่ในสารสกัดกะเม็งและว่านพระฉิม เพื่อนำเอาองค์ความรู้ที่ได้มาพัฒนาต่อยอดในการใช้ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

การตรวจเอกสาร

กะเม็ง (*Eclipta prostrata* Linn.) เป็นพืชล้มลุก มีรสเปรี้ยว ชุ่มเย็น ใช้ใส่แผลสดห้ามเลือด รักษาเมรั้ง แก้หืด หลอดลมอักเสบ แก้ไข้ บำรุงไต แก้อาเจียนเป็นเลือด ไอเป็นเลือด ปัสสาวะเป็นเลือด ลำไส้อักเสบ ตับอักเสบเรื้อรัง กลาก กลิ่น คั้นในร่มผ้า รักษาผมหงอกก่อนวัย แก้คอตีบหนองใน ตกขาว เป็นต้น มีงานวิจัยพบว่ากะเม็งสามารถแก้ความเป็นพิษที่ตับ ที่เกิดจากการทำให้เซลล์ตับเป็นพิษ ด้วยสารพิษบางชนิดได้ผลดี มีรายงานว่ากะเม็ง มีฤทธิ์แก้ไข้ และแก้แพ้ในหนูถีบจักร และหนูขาวอีกด้วย (Chung et al., 2017) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าสารสกัดจากกะเม็งยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของ saponin ที่สกัดได้จากใบกะเม็งมีผลยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* (Karthikumar et al., 2007) (Khanna and Kannabiran, 2008) แต่ยังไม่พบรายงานฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคมิวหนึ่งโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อดื้อยา

ว่านพระฉิม (*Dioscorea bulbifera* Linn.) เป็นไม้เถาล้มลุก ในตำรายาไทย หัวใต้ดิน ทำให้สุกรับประทานได้ เป็นยาขับปัสสาวะ แก้บิด แก้ลำไส้อักเสบ แก่ริดสีดวงทวาร บำรุงธาตุ แก่น้ำเหลืองเสีย ขับพยาธิ เจริญอาหาร แก้ปวดท้อง ท้องอืด เป็นยาขม ยาเย็น ขับน้ำนม หรือหั่นเป็นแผ่นบางๆ ใช้ปิดแผล แก้อักเสบ ชาวเขาใช้ ราก ตำเป็นยาพอกแก้สิ่ว ผื่น ฝี หัว ผานตากแห้ง ประุงเป็นอาหารแป้ง และกินเป็นยาแก้โรคกระเพาะ หัวสด นำมาทุบแล้วนำไปใส่แผลให้สุนัข ใบและยอดอ่อน กินเป็นผักสด หรือผักลวก หัวย่อยเผาไฟกินเนื้อในเป็นอาหาร มีงานวิจัยพบว่าว่านพระฉิมมีฤทธิ์ต้านเมรั้ง ต้านอนุมูลอิสระ ลดน้ำตาลในเลือด ต้านการอักเสบ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* และ *M. smegmatis* รวมทั้งสามารถยับยั้งแบคทีเรียดื้อยาได้แก่ *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Gao et al., 2002; Ghosh et al., 2012; Ghosh et al., 2013) (Kuet et al., 2012) ในปัจจุบันมีการใช้ว่านพระฉิมในโรงพยาบาลที่มีส่วนของแพทย์แผนไทยเช่นโรงพยาบาลอุ้มทอง จังหวัดสุพรรณบุรี มีการทำเป็นยาทาในรูปแบบเจลใช้ในการรักษาแผลติดเชื้อเบาหวานหรือแผลกดทับซึ่งได้ผลดีมาก ทั้งนี้การทดสอบยืนยันในส่วนของกลุ่มแบคทีเรียติดเชื้อที่ผิวหนังที่สำคัญทั้งหมด จะทำให้ช่วยยืนยันคุณค่าของสมุนไพรไทยมากยิ่งขึ้น อีกทั้งการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ต่อไป

พืชทั้งสองชนิดนี้มีความน่าสนใจในการศึกษาในแง่ของฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันมาเป็นเวลานาน มีสรรพคุณหลากหลาย รวมทั้งมีการใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในปัจจุบันอีกด้วย แต่หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคผิวหนังยังมีไม่เพียงพอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยังไม่มีการศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ของพืชทั้งสองนี้ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียติดเชื้อที่ผิวหนัง รวมทั้งยังไม่มีรายงานผลการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับความเข้มข้นที่มีผลในการต้านเชื้อ การศึกษาถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ของสารสกัด จะทำให้ทราบและระบุชนิดของสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ข้อมูลเหล่านี้จะนำไปสู่การพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อควบคุมแบคทีเรียเป้าหมายได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้จึงเป็นการรวบรวมข้อมูลและศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียติดเชื้อที่ผิวหนังของสารสกัดกะเม็งและว่านพระฉิม ทดสอบความเป็นพิษเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ และพิสูจน์เอกลักษณ์ขององค์ประกอบของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จะทำให้ทราบถึงศักยภาพของพืชเหล่านี้ในการยับยั้งเชื้ออย่างชัดเจน และเป็นแนวทางไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียติดเชื้อที่ผิวหนัง เพิ่มคุณค่าให้กับพืชในประเทศ และนำไปสู่การพึ่งพาตนเองได้อย่างยั่งยืนต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกะเม็งและว่านพระฉิมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียติดเชื้อที่ผิวหนัง
2. ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ผิวหนัง
3. ตรวจสอบวิเคราะห์ชนิดของสารที่อยู่ในสารสกัดกะเม็งและว่านพระฉิมโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS
4. เผยแพร่ความรู้เกี่ยวกับการใช้สมุนไพรสู่ชุมชน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างพืช

กะเม็ง (*Eclipta prostrata* Linn.) (EP) แห่ง ชื่อจากร้านสมุนไพรท่าพระจันทร์ กรุงเทพมหานคร เมื่อเดือนตุลาคม พ.ศ.2561 ว่านพระฉิม (*Dioscorea bulbifera* Linn.) (DB) ชื่อ จากอำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ.2562 พืชทั้งสองได้นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2. แบคทีเรียและสภาวะการเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ได้มาจาก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวง สาธารณสุข ได้แก่

1. *Staphylococcus aureus* DMST 8840
2. Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20651
3. *Staphylococcus epidermidis* DMST 3547
4. *Staphylococcus epidermidis* DMST 4343
5. *Streptococcus pyogenes* DMST 30563
6. *Pseudomonas aeruginosa* DMST 4739

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบจะถูกทำการเพาะเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Brain Heart Infusion agar (BHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำการทดลอง

3. การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดสาร

ตัวอย่างพืชสดนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำให้สะอาด หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ตากแห้ง และอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน บดตัวอย่างด้วยเครื่องปั่นให้ชิ้นพืชมีขนาดเล็กลงก่อนนำไปสกัดสารด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ hexane, dichloromethane, ethylacetate, methanol, ethanol, distilled water กะเม็ง (EP) สกัดด้วยวิธีแช่ตัวอย่างพืชในตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน ให้มีการเขย่าทุกวันๆละ 4 ครั้งเพื่อการสกัดที่สมบูรณ์ นำสารสกัดที่ได้ไปกรอง

ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำกากตัวอย่างพืชใส่ในภาชนะเดิม เติมตัวทำละลายชนิดเดิม เข้าไปอีกครั้งในปริมาตรที่เท่าเดิม ทำการสกัดซ้ำ 3 รอบ รวมสารสกัดทั้งหมดเข้าด้วยกันนำไประเหย ตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้วนำไป freeze dry เพื่อระเหยตัวทำละลาย ออกอีกครั้ง ก่อนนำไปทำการหาลอยละการผลิต การทดสอบการต้านฤทธิ์แบคทีเรีย และการพิสูจน์ เอกลักษณะของสารเคมีที่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อไป

4. การทดสอบการต้านฤทธิ์แบคทีเรีย

4.1 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion assay (CLSI, 2009)

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาปรับให้มีความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 แล้วนำเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วมา ป้ายลงบนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ด้วย sterile cotton swab หยดสารสกัดจากพืช ปริมาตร 10 μ l ลงบนแผ่น paper disc (Machrey-Nagel, Germany) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรจากนั้นวางแผ่น paper disc ลงบนอาหาร MHA นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บข้อมูลโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง (Inhibition zone)

4.2 วิธีการตรวจสอบค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ด้วยวิธี Micro Dilution Broth (CLSI, 2009)

วิธีการทดสอบ MIC เป็นการหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของ เชื้อได้ ทำใน 96-well microplate U bottom โดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 50 μ l หลุม ที่ 2 ไปจนถึงหลุมที่ 12 เติมตัวอย่าง ปริมาตร 100 μ l ลงในหลุมที่ 1 จากนั้นทำการเจือจางด้วยวิธี Two-fold dilution ไปจนถึงหลุมที่ 11 แล้วทิ้งไป นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ปรับให้มีความขุ่นให้ เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 แล้วเจือจางต่ออีก 100 เท่า โดยดูดสารละลายเชื้อ ที่ปรับให้มีความขุ่นแล้วปริมาตร 100 μ l ลงในอาหาร MHB 10 ml เติมเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว ปริมาตร 50 μ l ลงในทุกหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หลังจากบ่มเชื้อแล้วเติม p-iodonitrotetrazolium chloride ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/mL ปริมาตร 40 μ l ลงไปใน microplate ทุกหลุม จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 30 นาที ถ้าหากมีเชื้อ แบคทีเรียเจริญสีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู สังเกตผลและบันทึกผลค่าความเข้มข้นที่น้อย ที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

จากนั้นทำการทดสอบค่า MBC (ให้ทำก่อนการเติมสารละลายเติม p-iodonitrotetrazolium chloride) โดยนำสารละลายจากหลุมที่เห็นการเจริญเติบโตของเชื้อปริมาณ 10 μ l ไปเพาะลงบนอาหาร MHA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกค่า MBC โดยความเข้มข้นต่ำสุดของ สารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ จะไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA

5. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

5.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

ละลายสารสกัดจากพืชด้วย methanol หยดสารละลายพืชลงบน TLC แผ่นบาง (Silica gel 60 F₂₅₄ หนา 0.25 mm.) (Merck, Germany) ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ Chloroform: Methanol: H₂O ในอัตราส่วน 8: 2: 0.2 mL จุ่มแผ่น TLC ลงในวัฏภาคเคลื่อนที่ที่อยู่ใน TLC chamber จนมีการเคลื่อนที่ของวัฏภาคเคลื่อนที่จนเกือบถึงขอบด้านบนของแผ่น TLC แล้วนำแผ่น TLC ออกจาก TLC chamber ตั้งทิ้งไว้ในตู้ดูดควันจนกระทั่งวัฏภาคเคลื่อนที่ระเหยไปหมด ตรวจสอบที่กแถบสีที่ปรากฏขึ้นภายใต้แสงขาว แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร หรือพ่นด้วย acetic acid: sulfuric acid: anisaldehyde (98:1:1) แล้ววางบน hotplate จนปรากฏแถบสี

5.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียบนโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (TLC bioautography)

เมื่อต้องการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้บนแผ่น TLC ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสามารถทำได้โดยแยกสารสกัดจากพืชบนแผ่น TLC จำนวน 2 แผ่น โดยใช้แผ่นที่ 1 เป็นตัวอ้างอิง แล้วใช้แผ่นที่ 2 เป็นแผ่นทดสอบการมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย โดยนำแผ่น TLC ที่แยกสารได้แล้วมาระเหยวัฏภาคเคลื่อนที่ออกไปจนหมดใน fume hood แล้วใช้สารละลายแบคทีเรียใน MHA อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเทรดทับลงบนแผ่น TLC แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พ่นทับด้วย Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide Biochemi 0.01g/mL (PanReac AppliChem, Germany) สังเกตดูบริเวณที่ไม่มีสีคือบริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย นำบริเวณที่การยับยั้งนี้ไปเทียบกับแผ่น TLC แผ่นที่ 1 ที่ไม่ได้รดเชื้อจะทราบได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีบริเวณใดที่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

5.3 การแยกสารด้วย column chromatography

การแยกสารด้วยวิธี column chromatography ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมเก็บ fractions ที่ออกมาจากคอลัมน์ ทดสอบองค์ประกอบทางเคมีของแต่ละ fraction ด้วยการทำโครมาโตกราฟีแผ่นบาง และทดสอบหาส่วนที่มีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียบนโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (TLC bioautography) เมื่อพบ fraction ที่มีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียแล้วจึงนำ fraction นั้นๆมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี column chromatography อีกครั้ง แล้วจึงแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยการใช้ preparative TLC

5.4 การแยกสารด้วย preparative TLC

การแยกสารด้วย preparative TLC Silica gel 60 F₂₅₄ หนา 1.5 มิลลิเมตร (Sigma-Aldrich, USA) วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม จนกระทั่งได้สารที่ต้องการ ใช้มีดขูดบริเวณที่ต้องการมาเอาสารที่ต้องการออกโดยการแช่ใน ethylacetate/methanol กรองเอา silicagel ออกโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 (Whatman, UK) นำสารละลายที่ได้ไประเหยออกด้วย rotary evaporator ตูดใส่ vial ทำให้แห้งอีกครั้งในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก ละลายในสารที่เดินในตัวทำละลายที่เหมาะสม แล้วใส่ในหลอด NMR (NMR sample tube) เพื่อนำไปวิเคราะห์สารด้วยวิธี NMR ต่อไป

5.5 การวิเคราะห์โครงสร้างสารบริสุทธิ์

สารที่แยกได้บริสุทธิ์นำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย ¹H-NMR, ¹³C-NMR

6. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cell cytotoxicity)

6.1 เซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ใช้ African green monkey kidney epithelial Vero cells ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.ศุขธิดา อุบล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยเลี้ยง Vero cells ใน *Dulbecco's Modified Eagle Medium* ที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO₂ อาหารนี้มีการเติม 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin 100 units และ streptomycin/ml 100 µg/ml. (DMEM, FBS และ penicillin/streptomycin; GibcoBRL Biochemicals, Grand Island, NY, USA).

6.2 การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดย 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide assay (MTT assay)

ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้สารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนจาก column chromatography จากกะเม็งและว่านพระฉิม ใน Vero cell lines เลี้ยงเซลล์ (2.5×10^5 cells/mL) ใน 96-well micro-titer plate เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย PBS และทดสอบเซลล์กับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารสกัดออก ล้างเซลล์ด้วย PBS เติม MTT (5 mg/mL) 50 μ L ป่มใน 5% CO₂ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม solubilizing agent DMSO 150 μ L ลงไป วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร คำนวณเซลล์รอดชีวิตจากสมการ

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{sample OD}}{\text{control OD}} \times 100$$

และความเข้มข้นที่ยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ 50% (IC₅₀) คำนวณโดย graphpad Prism 6.0 software



ผลการทดลอง

1 ผลการสกัดสารจากกะเม็งและว่านพระฉิมด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ผลการสกัดกะเม็งและว่านพระฉิมด้วยตัวทำละลาย 6 ชนิด ได้แก่ hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol, ethanol และ น้ำ แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการสกัดสารจากกะเม็งและว่านพระฉิมด้วยวิธี soxhlet

Solvent	กะเม็ง			ว่านพระฉิม		
	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละผลผลิต	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละผลผลิต
Hexane	50.03	0.0928	0.18	100	0.1596	0.15
Dichloromethane	50.04	1.2977	2.59	100	0.4855	0.48
Ethyl acetate	50.02	2.0579	4.11	100	5.3856	5.38
Methanol	50.06	2.9273	5.84	100	9.6014	9.06
ethanol	50.06	2.3906	4.77	100	5.6424	5.64
H ₂ O	50.26	5.5717	11.09	100	11.0302	11.03

2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดกะเม็งและว่านพระฉิม

2.1 ผลการทดลอง Agar disc diffusion ของสารสกัดกะเม็ง (EP) และว่านพระฉิม (DB)

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 6 ชนิดด้วยวิธี agar disc diffusion โดยสารสกัดจากตัวทำละลายต่างๆจากกะเม็งและว่านพระฉิมแสดงดังตารางที่ 2 จากตารางจะเห็นว่าสารสกัดหยาบกะเม็งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียค่อนข้างน้อย แต่เมื่อนำสารสกัดหยาบมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่า ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น (14 mm) เช่นเดียวกับสารสกัดว่านพระฉิมที่มีแนวโน้มที่ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของสารสกัด

ตารางที่ 2 ผลการต้านแบคทีเรียของสารสกัดกะเม็ง (EP) และว่านพระนิม (DB) ด้วยวิธี agar disc diffusion

Solvent	Inhibition zone (mm)					
	<i>S. aureus</i> 8840	<i>MRSA</i> 20651	<i>S. epidermidis</i> 3547	<i>S. epidermidis</i> 4343	<i>Strep. pyogenes</i> 30563	<i>P. aeruginosa</i> 4739
EP						
Hexane	6	6	6	6	6	6
Dichloromethane	6	6	6	6	6	6
Ethyl acetate	6	6	6	6	6	6
Methanol	6	6	6	6	6	6
Ethanol	6	6	6	6	6	6
H ₂ O	6	6	6	6	6	6
Partially purified methanol extract	6	6	6	6	14.00±0.15	6
Tetracycline	27.00±0.29	7.02±0.24	26.04±0.66	6	39.76±0.32	12.11±0.49
DB						
Hexane	6	6	6	6	6	6
Dichloromethane	6	6	6	6	6	6
Ethyl acetate	6.47±0.23	6.54±0.40	6.12	6.36±0.53	9.52±0.37	6
Methanol	6.75±0.15	11.29±0.29	6.79±0.08	10.48±0.36	6.53±0.47	6
Ethanol	7.24±0.54	12.83±0.85	7.31	11.15±0.08	6.85±0.38	6
H ₂ O	6.77±0.24	8.15±0.61	6.97	6.98±0.77	6	6
Partially purified ethyl acetate extract	10.08±0.07	10.76±0.23	10.28±0.14	10.28±0.24	21.25±0.33	6

Tetracycline	26.97±0.79	7.29±0.03	26.04±0.66	6±0	36.06±0.67	10.97±0.72
--------------	------------	-----------	------------	-----	------------	------------

2.2 ผลการทดสอบ MIC และ MBC ของสารสกัดกะเม็ง (EP) และว่านพระฉิม (DB)

สารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์บางส่วนจากกะเม็ง (EP) และว่านพระฉิม (DB) แสดงดังตาราง
ที่ 3 ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นเมื่อทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น



ตารางที่ 3 ค่า MIC ของสารสกัดกะเม็ง (EP) และว่านพระฉิม (DB)

Solvent				MIC (mg/ml)		
	<i>S. aureus</i> 8840	<i>MRSA</i> 20651	<i>S. epidermidis</i> 3547	<i>S. epidermidis</i> 4343	<i>Strep. pyogenes</i> 30563	<i>P. aeruginosa</i> 4739
Crude EP						
Hexane	3.12	6.25	25	12.5	25	12.5
Dichloromethane	3.12	12.5	12.5	12.5	25	6.25
Ethyl acetate	3.12	1.56	3.12	0.78	3.12	1.56
Methanol	3.12	3.12	3.12	1.56	3.12	1.56
Ethanol	3.12	3.12	3.12	1.56	3.12	1.56
H ₂ O	3.12	1.56	1.56	1.56	3.12	6.25
Partially purified EP from methanol	0.78	1.56	1.56	1.56	0.02	0.78
Tetracycline	0.01	0.03	0.12	0.02	0.02	0.06
Crude DB						
Hexane	25	25	25	12.5	25	12.5
Dichloromethane	25	25	25	12.5	25	12.5
Ethyl acetate	0.78	1.56	1.56	0.78	3.12	1.56
Methanol	3.12	1.56	1.56	1.56	0.78	0.78
Ethanol	1.56	1.56	1.56	1.56	0.78	0.78
H ₂ O	3.12	1.56	1.56	1.56	3.12	3.12
Partially purified DB from ethyl acetate extract	0.04	0.04	0.02	0.04	0.01	0.78
Tetracycline	0.01	0.03	0.02	0.12	0.02	0.06

สารสกัดหยาบของกะเม็งและว่านพระฉิมที่สกัดโดยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (hexane, dichloromethane, ethylacetate, methanol, ethanol และ น้ำ) พบว่า มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่างกัน (ตารางที่ 3) เนื่องจากตัวทำละลายที่แตกต่างกันนั้นมีความสามารถในการละลายสารเคมีที่อยู่ในพืชออกมาได้ต่างชนิดกัน หลักการพิจารณาการเลือกสารสกัดหยาบเพื่อการศึกษาขั้นต่อไปมี

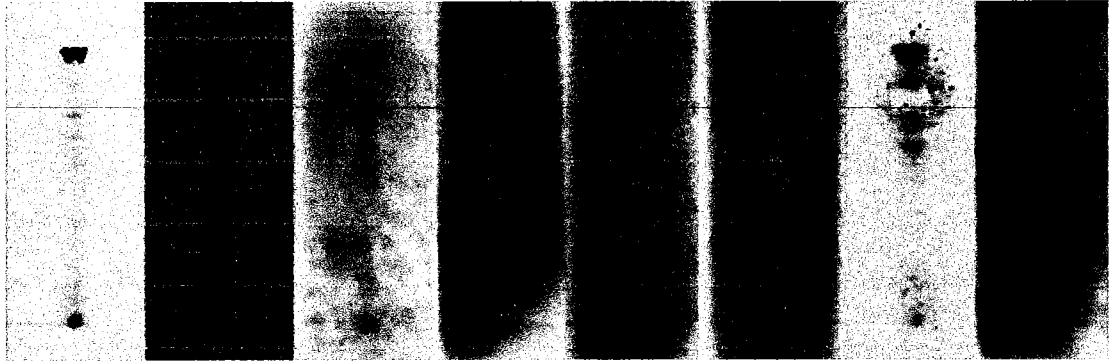
เกณฑ์การเลือก 2 ประการ คือ 1)เลือกจากสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ดีและ 2) เลือกองค์ประกอบทางเคมีที่ต้านแบคทีเรียเห็นได้ชัดเจน แต่สารอื่นปนมาน้อยจากการดูผลด้วยวิธี TLC และ TLC bioautograph

จากผลการทดลองจึงเลือกสารสกัดหยาบกะเม็งที่สกัดใน methanol และสารสกัดหยาบว่านพระฉิมที่สกัดใน ethyl acetate มาทำการศึกษาเพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีที่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในขั้นตอนต่อไป

3 การแยกองค์ประกอบจากสารสกัด กะเม็ง ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

3.1 การทดสอบเบื้องต้นในการแยกองค์ประกอบทางเคมีและทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังจากกะเม็ง

ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบกะเม็งชั้น methanol ต่อแบคทีเรียทดสอบ 6 ชนิดด้วยวิธี TLC แสดงดังภาพที่ 1 จากภาพ TLC และ TLC bioautograph พบว่าสารสกัดหยาบกะเม็งมีฤทธิ์การต้านแบคทีเรียแกรมบวกได้ (*S. aureus*, *S. epidermidis* และ *Strep. pyogenes*) แต่ไม่พบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียแกรมลบ (PA 4739) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี TLC bioautograph ทั้งนี้เนื่องจาก วิธี TLC bioautograph นั้นใช้ตัวอย่างสารที่ทดสอบได้ในปริมาณน้อยๆ และเป็นสิ่งที่สังเกตว่า สารสกัดหยาบกะเม็งนี้สามารถต้านเชื้อ MRSA ซึ่งเป็นเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะได้ บริเวณยับยั้งที่เห็นบนแผ่น TLC ของเชื้อ Staphylococci เป็นบริเวณเดียวกัน (SA 8840, MRSA 20651, SE 3547 และ SE4343) แต่บริเวณยับยั้งของเชื้อ Streptococci (SP 30563) เป็นตำแหน่งที่ต่างกัน ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีที่ยับยั้งเชื้อทั้งสองกลุ่มนี้จึงเป็นสารเคมีที่ต่างชนิดกัน



Visible light UV light SA 8840 MRSA 20651 SE 3547 SE 4343 SP 30563 PA 4739

ภาพที่ 1 TLC (visible light และ UV light) และ TLC bioautograph ของสารสกัดหยาบ
กะเม็งต่อแบคทีเรียทดสอบ 6 ชนิด

3.2 การแยกและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดกะเม็ง

3.2.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี chromatography

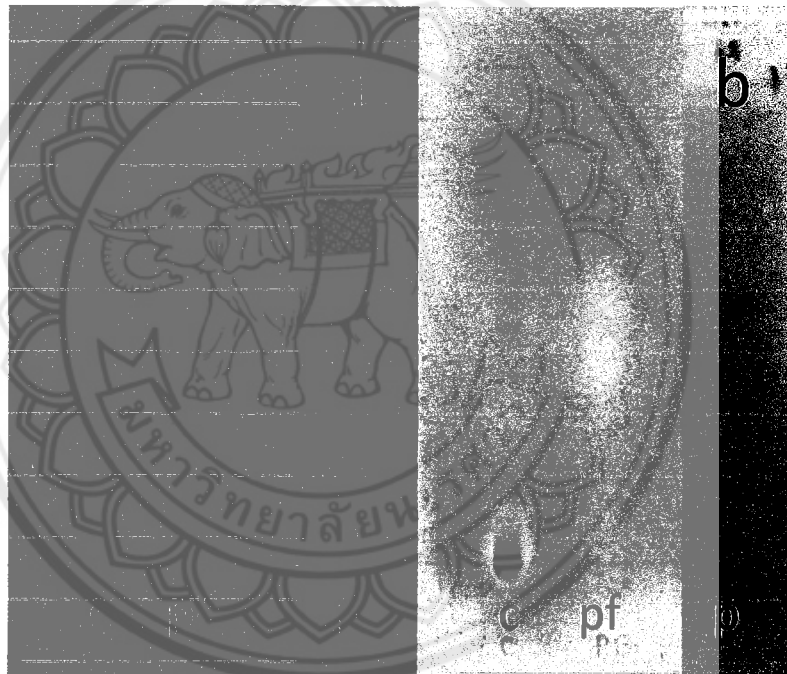
การแยกองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนังจากสารสกัดหยาบ
กะเม็ง ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ การแยกสารด้วยวิธี column chromatography ครั้งที่ 1,
ครั้งที่ 2 และ การแยกสารด้วยวิธี preparative TLC

การแยกสารด้วย column chromatography ครั้งที่ 1 เป็นการแยกสารสกัดหยาบกะเม็ง
โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ 2 ระบบ ระบบที่ 1 วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย ethyl acetate และ
hexane โดยมีการเพิ่มปริมาณ ethyl acetate ตั้งแต่ 5-100% ใน hexane ระบบที่ 2 ใช้ methanol
และ ethyl acetate โดยมีการเพิ่มปริมาณ methanol ตั้งแต่ 5-100% ใน ethyl acetate และเก็บ
fraction เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย พบว่า fraction ที่ 8 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (ภาพที่
2)

การแยกสารด้วย column chromatography ครั้งที่ 2 เป็นการแยก fraction จาก column
chromatography ครั้งที่ 1 ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (fraction 8) มีการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ โดยมีการ

เพิ่มปริมาณ ethyl acetate ตั้งแต่ 5-50% ใน hexane และเก็บ fraction เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์
การต้านแบคทีเรีย พบว่า fraction ที่ 19-20 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

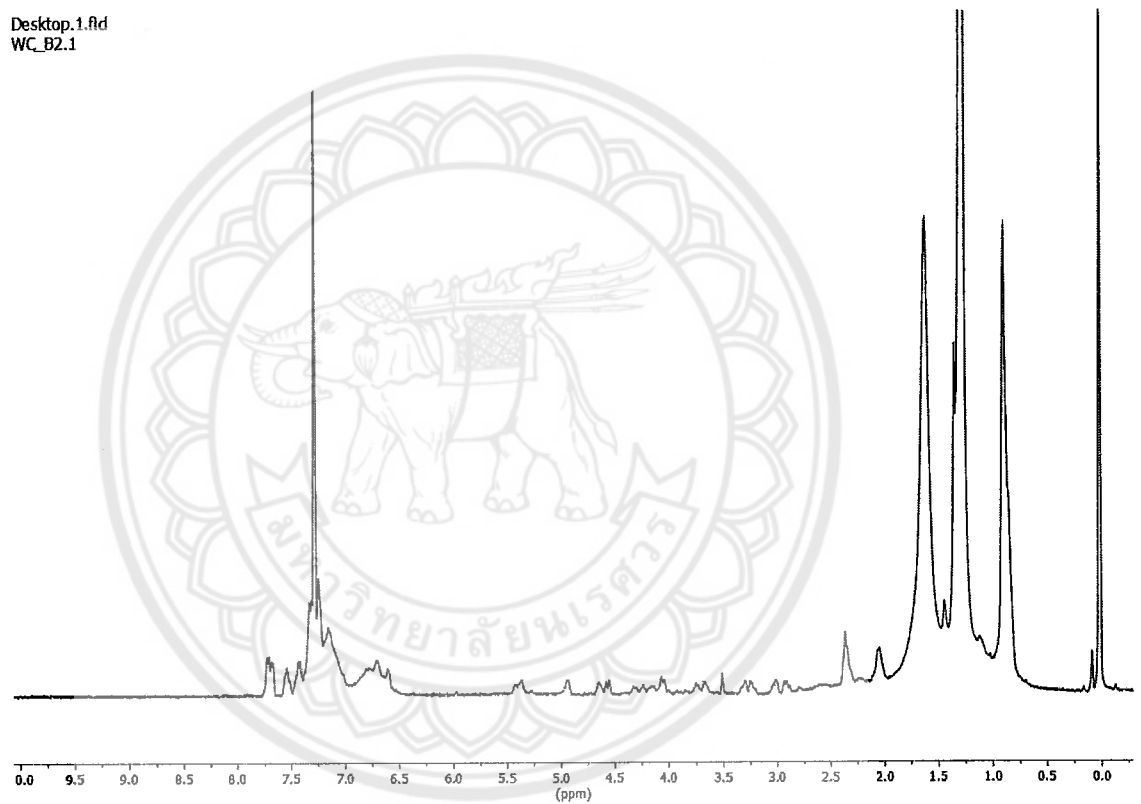
การแยกสารด้วย preparative TLC โดยนำ fraction 19-20 จาก column chromatography ครั้งที่ 2 ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมาแยกบนแผ่น preparative TLC เพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ โดยใช้ Dichloromethane: Ethyl acetate: Hexane (5:30:65) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จนกระทั่งได้สารบริสุทธิ์และนำไปวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธี NMR (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 TLC ใต้แสง UV (a) และ bioautography (b) ของสารสกัดหยาบกะเม็ง (c), สารบริสุทธิ์บางส่วน (pf) และสารบริสุทธิ์ (p)

3.2.2 การวิเคราะห์สารบริสุทธิ์

เมื่อได้สารบริสุทธิ์จากการแยกด้วยวิธี preparative TLC แล้ว ชุดสารบริสุทธิ์ที่อยู่บนแผ่น preparative TLC แล้วแยกสารออกจาก silica gel โดยการละลายใน ethyl acetate และ methanol จากนั้นกรองเอา silica gel ออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ระเหยสารละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator และนำไปวิเคราะห์สารนั้นด้วยวิธี NMR ต่อไป จากการวิเคราะห์ด้วย NMR ได้ผล spectrum ดังภาพที่ 3 อย่างไรก็ตามสารบริสุทธิ์ที่แยกมาได้นี้มีปริมาณน้อยเกินไป จึงไม่สามารถทำการวิเคราะห์ชนิดของสารได้

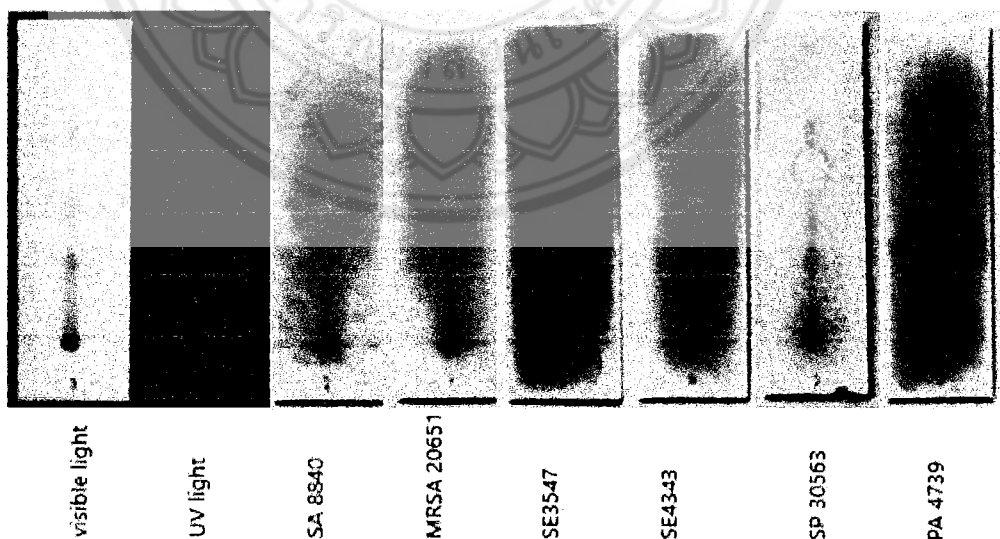


ภาพที่ 3 spectrum ของสารออกฤทธิ์ด้านแบคทีเรียจากกะเม็ง

4. การแยกองค์ประกอบจากสารสกัด ว่านพระฉิม ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

4.1 การทดสอบเบื้องต้นในการแยกองค์ประกอบทางเคมีและทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังจากว่านพระฉิม

ในการทดสอบแยกองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดหยาบว่านพระฉิมด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแผ่นบาง พบว่า ในสารสกัดหยาบมีองค์ประกอบทางเคมีอยู่หลายชนิด ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการหาสารที่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนัง 5 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, MRSA, *S. epidermidis*, *Strep. pyogenes* และ *Pseu. aeruginosa* พบว่า สารสกัดหยาบของว่านพระฉิมสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*, MRSA, *S. epidermidis* และ *Strep. pyogenes*) ได้ดี แต่สามารถตรวจสอบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (*Pseu. aeruginosa*) ได้น้อย (ตารางที่ 3) และจากแยกองค์ประกอบทางเคมีและการทดสอบการต้านแบคทีเรียบนแผ่น TLC พบว่า บริเวณของสารเคมีที่ออกฤทธิ์ที่ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus*, MRSA และ *S. epidermidis* ได้นั้นอยู่ตำแหน่งเดียวกัน (ภาพที่ 1) สารเคมีที่ออกฤทธิ์ที่ยับยั้ง *Strep. pyogenes* เป็นสารอีกชนิดหนึ่ง (ภาพที่ 4) แต่ไม่พบการต้าน *Pseu. aeruginosa* อาจเนื่องจากสารสกัดที่ใช้ทดสอบบนแผ่น TLC ไม่สามารถใช้ในปริมาณและความเข้มข้นที่มาก ๆ ได้ ในการทดสอบบนแผ่น TLC จากผลการทดลองที่ได้ครั้งนี้ จึงเลือกที่จะทำการแยกและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus*, MRSA และ *S. epidermidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยในการติดเชื้อทางผิวหนังด้วยวิธีโครมาโตกราฟีต่อไป



ภาพที่ 4 TLC ของสารสกัดหยาบว่านพระฉิมและการต้านแบคทีเรีย

4.2 การแยกและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียจากสารสกัดว่านพระฉิม

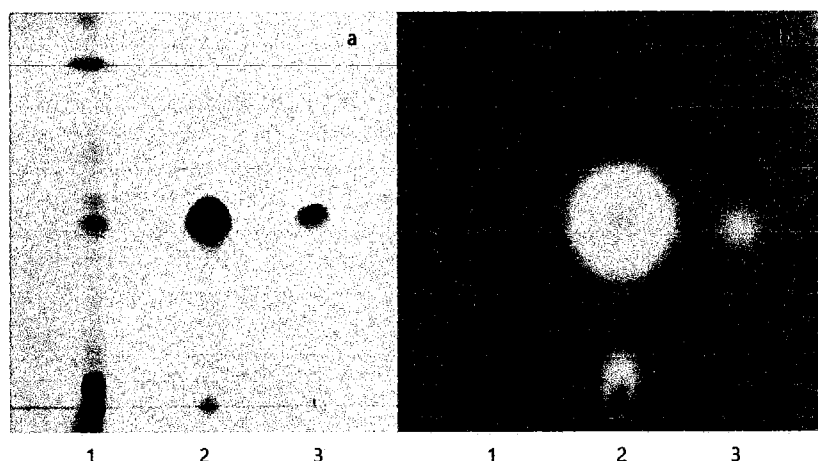
4.2.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี chromatography

การแยกองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนังจากสารสกัดว่านพระฉิม ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ การแยกสารด้วยวิธี column chromatography ครั้งที่ 1, ครั้งที่ 2 และ การแยกสารด้วยวิธี preparative TLC

การแยกสารด้วย column chromatography ครั้งที่ 1 เป็นการแยกสารสกัดว่านพระฉิม โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ 2 ระบบ ระบบที่ 1 วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย ethyl acetate และ hexane โดยมีการเพิ่มปริมาณ ethyl acetate ตั้งแต่ 5-100% ใน hexane ระบบที่ 2 ใช้ methanol และ ethyl acetate โดยมีการเพิ่มปริมาณ methanol ตั้งแต่ 5-100% ใน ethyl acetate และเก็บ fraction เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย พบว่า fraction ที่ 13 และ 14 มีฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย

การแยกสารด้วย column chromatography ครั้งที่ 2 เป็นนำ fraction จาก column chromatography ครั้งที่ 1 ที่มีฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย (fraction 13 และ 14) มากแยก โดยมีการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ระบบเดียวกันกับการแยกสารด้วยวิธี column chromatography ครั้งที่ 1 และเก็บ fraction เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย พบว่า fraction ที่ 11-17 มีฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย (ภาพที่ 5)

การแยกสารด้วย preparative TLC โดยนำ fraction 11-17 จาก column chromatography ครั้งที่ 2 ที่มีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียมาแยกบนแผ่น preparative TLC เพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ โดยใช้ Dichloromethane:Ethyl acetate:Hexane (5:20:75) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จนกระทั่งได้สารบริสุทธิ์ (ภาพที่ 5) และนำไปวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธี NMR

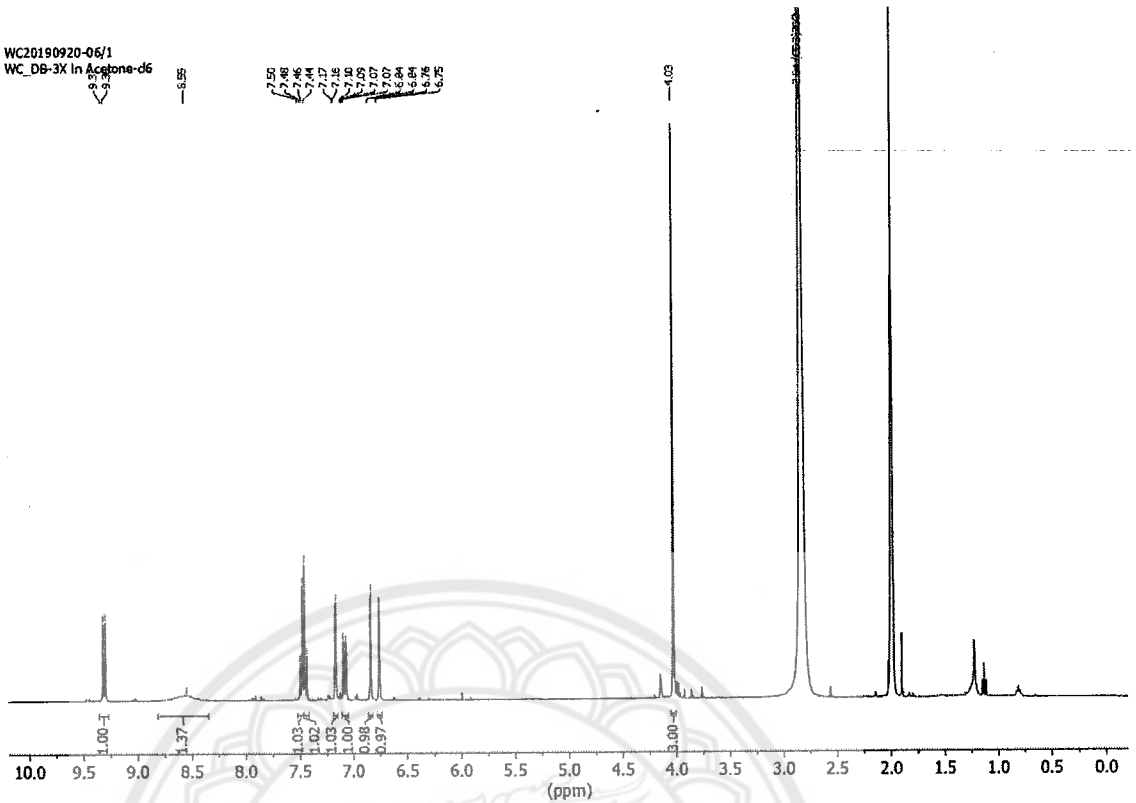


ภาพที่ 5 การแยกสารสกัดว่านพระฉิมด้วย TLC (a); และการทดสอบการต้าน *Staphylococcus aureus* DMST 8840 (b); crude extract (1); partially purify extract จาก column 2 (2); และ สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก Preparative TLC (3)

4.2.2 การวิเคราะห์สารบริสุทธิ์

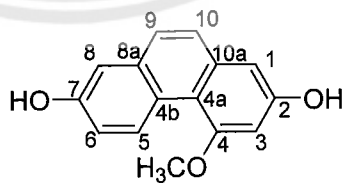
เมื่อได้สารบริสุทธิ์จากการแยกด้วยวิธี preparative TLC แล้ว จุดสารบริสุทธิ์ที่อยู่บนแผ่น preparative TLC แล้วแยกสารออกจาก silica gel โดยการละลายใน ethyl acetate และ methanol จากนั้นกรองเอา silica gel ออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ระเหยสารละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator และนำไปวิเคราะห์สารนั้นด้วยวิธี NMR ต่อไป จากการวิเคราะห์ด้วย NMR ได้ผล spectrum ดังภาพที่ 6 และ 7

WC20190920-06/1
WC_DB-3X In Acetone-d6



ภาพที่ 6 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากว่านพระฉิม ในตัวทำละลาย acetone

จากการเปรียบเทียบข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากงานวิจัยนี้ และสาร flavanthrinin ที่มีการค้นพบแล้ว (Leong et al., 1997; Majumber et al., 1990) ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า ข้อมูลของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากงานวิจัยนี้ มีความเหมือนกับข้อมูลดังกล่าว จึงสรุปได้ว่าสารบริสุทธิ์จากว่านพระฉิมที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียนี้คือ flavanthrinin ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง ดังภาพที่ 7



Flavanthrinin

ภาพที่ 7 สูตรโครงสร้างของ flavanthrinin ที่แยกได้จากว่านพระฉิม

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้กับ flavanthrinin

ตำแหน่ง	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่แยกได้ จากว่านพระฉิม (<i>Dioscorea bulbifera</i> L.)	Flavanthrinin (2,7-dihydroxy-4- methoxyphenanthrene) (Leong et al., 1997)
	δ $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD)	δ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD)
1	6.84 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H)	6.90 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H)
2	-	-
3	6.76 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H)	6.82 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H)
4	-	-
4a	-	-
4b	-	-
5	9.31 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H)	9.37 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, 1H)
6	7.08 (dd, $J = 9.3, 2.8$ Hz, 1H)	7.14 (1H, dd, $J = 2.7, 9.3$ Hz, 1H)
7	-	-
8	7.17 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H)	7.23 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, 1H)
8a	-	-
9	7.49 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H)	7.55 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 1H)
10	7.45 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H)	7.51 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 1H)
10a	-	-
OCH_3	4.03 (br s, 3H)	4.09 (s, 3H)
2, 7-OH	8.55 (br s, 2H),	8.502H, br s, 2-OH and 7-OH)

5. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อ Vero cell lines ของสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์
บางส่วนจากกะเม็งและว่านพระฉิม พบว่า ค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบกะเม็งและว่านพระฉิมมีค่า
เท่ากับ 0.10 ± 0.02 mg/ml and 0.25 ± 0.14 mg/ml ตามลำดับ ส่วนสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนของ
กะเม็งและว่านพระฉิมมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.06 ± 0.01 mg/ml and 0.36 ± 0.11 mg/ml ตามลำดับ

ว ลล
100
01/11/25
2563



วิจารณ์ผลการทดลอง

1049741

สำนักหอสมุด

21 มี.ค. 2565

งานวิจัยนี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของกะเม็งและว่านพระฉิมในการต้านแบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง เนื่องจากพบบันทึกในตำรายาพื้นบ้านว่ามีการใช้พืชทั้งสองชนิดนี้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับผิวหนัง จากผลการทดลองพบว่า จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนัง สารสกัดหยาบของกะเม็งและว่านพระฉิมมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แต่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับกับรายงานของที่สารสกัดหยาบขึ้นเอธานอลจากว่านพระฉิมมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Adeosun et al., 2016) ในงานวิจัยนี้พบว่า เมื่อทำสารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธี column chromatography พบว่าสารบริสุทธิ์บางส่วนนี้มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ดีขึ้น

การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์นั้น ตรวจสอบได้ด้วยวิธี TLC และบนแผ่น TLC เดียวกันนี้ยังสามารถนำมาตรวจสอบได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีใดที่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (TLC bioautography) ด้วยวิธีเหล่านี้จึงสามารถใช้เป็นแนวทางในการตรวจสอบและแยกสารบริสุทธิ์ออกจากสารสกัดหยาบได้ งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่สามารถระบุสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Staphylococci) จากว่านพระฉิมได้ ซึ่งได้แก่ flavanthrinin (2,7-dihydroxy-4-methoxyphenanthrene) นอกจากนี้จะพบ flavanthrinin ใน *Dioscorea bulbifera* จากงานวิจัยนี้แล้ว ก็ยังพบว่ามีรายงานในงานวิจัยอื่นเช่นกัน (Teponno et al., 2006; Kuete et al., 2012) และยังมีรายงานว่าพบ flavanthrinin หรือสารกลุ่ม phenanthrene ในกล้วยไม้อีกด้วย (Leong et al., 1997; Guo et al., 2016) Flavanthrinin เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งส่วนที่เป็น lipophilic flavonoid มีกลไกในการต้านแบคทีเรียเป็นการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และการสร้างผนังเซลล์ (Pandey and Kumar, 2013)

การประเมินฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของกะเม็ง พบว่ากะเม็งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียปานกลาง ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อทำให้สารบริสุทธิ์ แต่เมื่อนำ fraction ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมาทำให้บริสุทธิ์ กลับพบว่าไม่สามารถตรวจสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียได้ อาจเนื่องมาจากปริมาณของสารออกฤทธิ์มีน้อยจนเกินไป หรือสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียนั้นจำเป็นต้องอาศัยสารอื่นในการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียร่วมด้วย (synergy) ดังนั้นจึงไม่สามารถตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารบริสุทธิ์ได้ จากผลงานวิจัย จะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบจากว่านพระฉิม ประกอบด้วย flavanthrinin ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทดสอบในกลุ่ม Staphylococci ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เชื้อกลุ่มนี้เป็นเชื้อสำคัญ

ในการเกิดโรคติดเชื้อทางผิวหนังที่พบบ่อย อีกทั้งสารสกัดจากว่านพระฉิมนี้ยังสามารถต้านเชื้อดื้อยา MRSA ได้อีกด้วย สารสกัดจากว่านพระฉิมจึงมีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ แต่อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องการพัฒนาขั้นตอนการแยกสารออกฤทธิ์ เพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ที่พร้อมจะนำมาใช้ได้ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการสกัดและแยกสารออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ผิวหนังจากกะเม็ง และว่าน พระฉิม พบว่า พืชทั้งสองสามารถต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ผิวหนังได้ โดยฤทธิ์การต้านเชื้อเพิ่มขึ้นเมื่อสารออกฤทธิ์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น สารออกฤทธิ์ของพืชทั้งสองมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ สารออกฤทธิ์ต้าน Staphylococci และสารออกฤทธิ์ต้าน Streptococci ของพืชทั้งสองเป็นสารคนละชนิดกัน สารออกฤทธิ์ต้าน Staphylococci จากกะเม็งแสดงฤทธิ์การต้านเชื้อเมื่อมีสารหลายชนิดปนกัน แต่เมื่อแยกเป็นสารเดี่ยวแล้วมาสามารถตรวจพบฤทธิ์การต้านเชื้อ สันนิษฐานว่าสารออกฤทธิ์การต้านเชื้อเป็นแบบ synergy สารออกฤทธิ์ต้าน Staphylococci จากว่านพระฉิมคือ flavanthrinin

เอกสารอ้างอิง

Adeosun OM, Arotupin AJ, Toba OA, Adebayo AA. 2016. Antibacterial activities and phytochemical properties of extracts of *Dioscorea bulbifera* Linn (air potato) tubers and peels against some pathogenic bacteria. *The Journal of Phytopharmacology*. 5(1): 20-26.

Chung IM, Rajakumar G, Lee JH, Kim SH, Thiruvengadam M. 2017. Ethnopharmacological uses, phytochemistry, biological activities, and biotechnological applications of *Eclipta prostrata*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(13):5247-5257.

Claassen-Weitz S, Shittu AO, Ngwarai MR, Thabane L, Nicol MP, Kaba M. 2016. Fecal Carriage of *Staphylococcus aureus* in the Hospital and Community Setting: A Systematic Review. *Front Microbiol* 7:449.

Ghosh S, Ahire M, Patil S, Jabgunde A, Bhat Dusane M, Joshi BN, Pardesi K, Jachak S, Dhavale DD, Chopade BA. 2012. Antidiabetic Activity of *Gnidia glauca* and *Dioscorea bulbifera*: Potent Amylase and Glucosidase Inhibitors. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012:929051.

Ghosh S, Derle A, Ahire M, More P, Jagtap S, Phadatore SD, Patil AB, Jabgunde AM, Sharma GK, Shinde VS, Pardesi K, Dhavale DD, Chopade BA. 2013. Phytochemical analysis and free radical scavenging activity of medicinal plants *Gnidia glauca* and *Dioscorea bulbifera*. *PLoS One* 8(12):e82529.

Ghosh S, Parihar VS, More P, Dhavale DD, Chopade BA. 2015. Phytochemistry and therapeutic of medicinal plant: *Dioscorea bulbifera*. *Medicinal Chemistry*. 5: 4. Doi: 10.4172-2161-04444.1000259.

Guo JJ, Dai BL, Chen NP, Jin LX, Jiang FS, Ding ZS, Qian CD. 2016. The anti-*Staphylococcus aureus* activity of the phenanthrene fraction from fibrous roots of *Bletilla striata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16:491. DOI 10.1186/s12906-016-1488-z

Karthikumar S, Vigneswari K, Jegatheesan K. 2007. Screening of antibacterial and antioxidant activities of leaves of *Eclipta prostrata* (L). *Scientific Research and Essays* 2(4):101-104.

Khanna VG, Kannabiran K. 2008. Antimicrobial activity of saponin fractions of the leaves of *Gymnema sylvestre* and *Eclipta prostrata*. *World J Microbiol Biotechnol* 24:2737–2740.

Klongkumnuankarn P, Busaranon K, Chanvorachote P, Sritularak B, Jongbunprasert V, Likhitwitayawuid K. 2015. Cytotoxic and antimigratory activities of phenolic compounds from *Dendrobium brymerianum*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. Volume 2015, Article ID 350410, 9 pages. Doi: 10.1155/2015/350410.

Kuete V, Teponno RB, Mbaveng AT, Tapondjiou, Meyer JJM, Barboni L, Lall N. 2012. Antibacterial activities of the extracts, fractions and compounds from *Dioscorea bulbifera*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12: 228. doi:10.1186/1472-6882-12-228.

Leong YW, Kang CC, Harrison LJ, Powell AD. 1997. Phenanthrenes, Dihydrophenanthrenes and bibenzyls from the orchid *Bulbophyllum vaginatum*. *Phytochemistry*. 44(1): 157-165.

Liu H, Tsim KWK, Chou GX, Wang JM, Ji LL, Wang ZT. 2011. Phenolic compounds from the rhizomes of *Dioscorea bulbifera*. *Chemistry and Biodiversity*. 8: 2110-2116.

Mehraj J, Witte W, Akmatov MK, Layer F, Werner G, Krause G. 2016. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community. *Curr Top Microbiol Immunol* 398:55-87.

Pandey AK, Kumar S. 2013. Chemistry and biology activities of flavonoids: An overview. *Scientific World Journal*; 162750.

Suwantarat N, Carroll KC. 2016. Epidemiology and molecular characterization of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in Southeast Asia. *Antimicrob Resist Infect Control* 5:15.

Teponno RB, Tapondjou AL, Djoukeng JD, Abou-Mansour E, Tabacci R, Tane P, Lontsi D, Park HJ. 2006. Isolation and NMR assignment of a Pennogenin glycoside from *Dioscorea bulbifera* L. var *sativa*. *Natural Product Science*. 12(1): 62-66.

โครงการบริการวิชาการในงานสัปดาห์วิทยาศาสตร์

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เรื่อง พิษเป็นยา ระหว่างวันที่ 19-20 สิงหาคม 2562



โครงการบริการวิชาการในงานสัปดาห์วิทยาศาสตร์ จัดที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา
เรื่อง พิษเป็นยา จัดระหว่างวันที่ 19-20 สิงหาคม 2562 นี้การจัดนิทรรศการแสดงความรู้เกี่ยวกับการ
ใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพร และการใช้กะเม็งและว่านพระฉิมมาประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์น้ำมันว่าน
พระฉิมและกะเม็ง

น้ำมัน ไพล ว่านพระฉิม กะเม็ง

สรรพคุณ แก้ปวดเมื่อย แก้อักเสบ ผื่นคันจากแมลงสัตว์กัดต่อย สมานแผล

ส่วนผสม

1. น้ำมันสมุนไพโร 1300 มิลลิลิตร
(ไพล 1 กก. ขมิ้นชัน 1 กก.กะเม็ง 100 กรัม ว่านพระฉิม 100 กรัม หุงในน้ำมันมะพร้าว)
2. พิมเสนน้ำ 600 มิลลิลิตร
(เมนทอล 300 กรัม การบูร 300 กรัม พิมเสน 100 กรัม)
3. น้ำมันแก้ว 300 มิลลิลิตร

ผสม 1, 2 และ 3 ให้เข้ากัน แล้วบรรจุในขวด

1. ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.)
รส ผาด ชื่น เอียน
สรรพคุณ เหง้า ขับโลหิตร้ายทั้งหลายให้ตกเสีย ขับระดูสตรี แก้ฟกช้ำ เคล็ดบวม ขับลมใน
ลำไส้ ขับระดู แก้กูกเสียด แก้ปวดท้อง บิดเป็นมูกเลือด ช่วยสมานแผล สมานลำไส้ แก้
ลำไส้อักเสบ แก้มุตกิตระดูขาว ขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้ปวดท้อง แก้ท้องผูก แก้
อาเจียน แก้ปวดฟัน แก้เคล็ดขัดยอก แก้โรคผิวหนัง แก้ฝี ทาเคลือบแผลป้องกันการติดเชื้อ
ดูดหนอง สมานแผล แก้ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ เป็นยาชาเฉพาะที่ ใช้ป้องกันเล็บถอด และใช้ต้ม
น้ำอาบหลังคลอด
2. ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.)
รส ขม ผาด เผื่อน เผ็ดเล็กน้อย
สรรพคุณ ใช้ภายใน ช่วยเจริญอาหาร ยาบำรุงธาตุ ฟอกเลือด แก้ท้องอืดเฟ้อ แน่น จุกเสียด
ลดน้ำหนัก ปวดประจำเดือน ประจำเดือนมาไม่ปกติ อากาโรคีซ่าน แก้ท้องเสีย แก้บิด รักษา

มะเร็งลาม ใช้ภายนอก ช่วยลดอาการฟกช้ำบวม สมานแผลสดและแผลถลอก แก้เคล็ดขัด
ยอก แก้ น้ำกัดเท้า แก้ชันนะตุ แก้กลากเกลื้อน แก้โรคผิวหนังผื่นคัน สมานแผล รักษาฝี แผล
พุพอง ลดอาการแพ้ อักเสบจากแมลงสัตว์กัดต่อย

3. กะเม็ง (*Eclipta prostrata* L.)

รส เปรี้ยว ชุ่ม เย็น

สรรพคุณ ใช้ทำให้เลือดเย็น ห้ามเลือด บำรุงไต แก้อาเจียนเป็นเลือด กระจายเลือด เป็นหนอง
ใน ปัสสาวะเป็นเลือด เป็นบิด ถ่ายเป็นเลือด ลำไส้อักเสบ ตับอักเสบเรื้อรัง โรคผิวหนังผื่นคัน
จากการทำนา โรคผิวหนังเรื้อรัง บาดแผลจากของมีคม และทำให้คิ้วหนวดตกดำ

4. ว่านพระฉิม (*Dioscorea bulbifera* L.)

หัวใต้ดิน ทำให้สุกรับประทานได้ เป็นยาขับปัสสาวะ แก้บิด แก้ลำไส้อักเสบ แก่ริดสีดวงทวาร
บำรุงธาตุ แก่น้ำเหลืองเสีย ขับพยาธิ เจริญอาหาร แก้ปวดท้อง ท้องย่อย เป็นยาขม ยาเย็น
ขับน้ำมัน หรือหั่นเป็นแผ่นบางๆ ใช้ปิดแผล แก้อักเสบ



นอกจากนี้ยังได้นำเสนอผลงานวิจัยบางส่วนในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง “ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ผิวหนังของสารสกัดจากกะเม็ง (*Eclipta prostrata* Linn.) และว่านพระฉิม (*Dioscorea bulbifera* Linn.)” ในปัจจุบันโรคผิวหนังเป็นโรคที่สามารถรักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะ แต่บางครั้งยาปฏิชีวนะนั้นทำให้เกิดการดื้อยามากขึ้น สมุนไพรจึงเป็นทางเลือกที่นำมาใช้ โดยที่เลือกมา ได้แก่ กะเม็ง และว่านพระฉิม โดยพืชทั้งสองมีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียติดเชื้อที่ผิวหนัง โดยทำการสกัดสารจากกะเม็ง และว่านพระฉิม ด้วย Methanol และ Ethyl acetate ตามลำดับ นำสารสกัดมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ผิวหนัง ได้แก่ *Staphylococcus aureus* DMST 8840, Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20651, *Staphylococcus epidermidis* 2 สายพันธุ์ คือ DMST 4343 และ DMST 3547, *Streptococcus pyogenes* DMST 30563, *Pseudomonas aeruginosa* DMST 4739 และ *Escherichia coli* DMST 4212 ด้วยวิธี disc diffusion และ broth dilution ผลการศึกษาพบว่าในการทดสอบด้วย disc diffusion สารสกัดจากว่านพระฉิมมีฤทธิ์ยับยั้ง MRSA DMST 20691 และ *S. epidermidis* DMST 4343 ด้วยขอบเขตการยับยั้งจากสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วน 11.37 ± 0.40 mm และ 13.03 ± 0.86 mm ตามลำดับ และกะเม็งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST 8840 ด้วยขอบเขตการยับยั้งจากสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วน 20.53 ± 0.71 mm และพบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในการทดสอบด้วยวิธี broth dilution พบว่าสารสกัดจากว่านพระฉิมให้ผลการยับยั้งได้ดีทุกเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเชื้อ *S. aureus* DMST 8840 (MIC/MBC = 0.15/0.38 mg/ml) ได้ดีที่สุด และกะเม็งให้ผลการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* DMST 4343 (MIC/MBC = 0.38/>50 mg/ml) และ *P. aeruginosa* DMST 4739 (MIC/MBC = 0.38/>50 mg/ml) ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *S. pyogenes* DMST 30563 (MIC/MBC = 1.56/1.56 mg/ml) และ *E. coli* DMST 4212 (MIC/MBC = 0.75/>50 mg/ml) ดังนั้นสรุปได้ว่าสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนว่านพระฉิม มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST 8840 ได้ดีที่สุด และสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนจากกะเม็ง มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* DMST 4343 และ *P. aeruginosa* DMST 4739 ได้ดีที่สุด จึงมีความเป็นไปได้ว่าจะสามารถนำสารสกัดจากกะเม็งและว่านพระฉิมไปพัฒนาใช้ในการรักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย และควรมีการทดสอบถึงความเป็นพิษต่อเซลล์เพื่อจะได้นำไปใช้ได้อย่างปลอดภัย

มะเร็งลาม ใช้ภายนอก ช่วยลดอาการฟกช้ำบวม สมานแผลสดและแผลถลอก แก้เคล็ดขัด
ยอก แก้น้ำกัดเท้า แก้ชันนะตุ แก้กกลากเกลื้อน แก้โรคผิวหนังผื่นคัน สมานแผล รักษาฝี แผล
พุพอง ลดอาการแพ้ อักเสบจากแมลงสัตว์กัดต่อย

3. กะเม็ง (*Eclipta prostrata* L.)

รส เปรี้ยว ชุ่ม เย็น

สรรพคุณ ใช้ทำให้เลือดเย็น ห้ามเลือด บำรุงไต แก้อาเจียนเป็นเลือด กระจายเลือด เป็นหนอง
ใน ปัสสาวะเป็นเลือด เป็นบิด ถ่ายเป็นเลือด ลำไส้อักเสบ ตับอักเสบเรื้อรัง โรคผิวหนังผื่นคัน
จากการทำนา โรคผิวหนังเรื้อรัง บาดแผลจากของมีคม และทำให้คิ้วหนวดตกดำ

4. ว่านพระฉิม (*Dioscorea bulbifera* L.)

หัวใต้ดิน ทำให้สุกรับประทานได้ เป็นยาขับปัสสาวะ แก้บิด แก้ลำไส้อักเสบ แก่ริดสีดวงทวาร
บำรุงธาตุ แก่น้ำเหลืองเสีย ขับพยาธิ เจริญอาหาร แก้ปวดท้อง ท้องย่อย เป็นยาขม ยาเย็น
ขับน้ำมัน หรือหั่นเป็นแผ่นบางๆ ใช้ปิดแผล แก้อักเสบ



น้ำมันวุ้นพระฉิม กะเม็ง

Thai Herbal Oil

สสวคณ.

แก้ปวดเมื่อย แก้อักเสบ
ฟื้นคืนจากแมลงสัตว์ กัดต่อย สมานแผล

ไพล (Zingiber cassumunar Roxb.)
สา ผาด ขึ้น เอียน

สรรพคุณ เหง้า ขั้วโลหิตรัยั้งหลายไฟตกเสียน ชันระดูสตรี้ แก้กฟกช้ำ
เคสัดบวม ชันลมในเส้าไต ชันระดู แก้กจุกเสียด แก้กปวดท้อง ผิดเป็นเมือกเลือด
ช่วยสมานแผล สมานเส้าไต แก้กสาได้อักเสบ แก้กมุกกิดวะดูชวา ชันลม แก้ก
ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้กปวดท้อง แก้กท้องผูก แก้กอาเจียน แก้กปวดฟัน แก้กเสียด
ขัดขอก แก้กโรคผิวหนัง แก้กที่ทาเคสือบแผล ปกป้องการติดเชื้อ จุกหนอง
ลมามแผล แก้กปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ เป็นยาชาเฉพาะที่ ใช้ป้องกันเส็บกด
และใช้ตำน้ำอาบหลังคลอด



ขมิ้นชัน (Curcuma longa L.)
สา ขม ผาด เผื่อน เฟิดเล็กน้อย

สรรพคุณ ใช้ภายใน ช่วยเจริญอาหาร ยาบำรุงธาตุ ฟอกเลือด แก้กท้องอืดเฟ้อ แน่น
จุกเสียด ลดน้ำหนัก ปวดประจำ เดือนประจำเดือนมาไม่ปกติ อาการรังไข่ช้ำ แก้กท้องเสีย
แก้กบิด รักษาแผลเรื้อรัง
ใช้ภายนอก ช่วยลดอาการฟกช้ำบวม สมานแผลสด และแผลลุดอก แก้กเคสัดขัดขอก
แก้กน้ำกัดเท้า แก้กชันนะตุ แก้กกลากเกลื้อน แก้กโรคผิวหนังคันคัน สมานแผล รักษาฝี แผลพุ
พอง ลดอาการแพ้ยักเสจากแมลงสัตว์กัดต่อย



กะเม็ง (Eclipta prostrata L.)
สา เปรี๊ยะ ชุ่ม เอียน

สรรพคุณ ใช้ทำให้เลือดเย็น ห้ามเลือด ปารุงไต แก้กอาเจียนเป็นเลือด
กระอักเลือด เป็นหนองใน ปลดลภาวะเป็นเลือด เป้เปิด ด่ายเป้เลือด สำได้
อักเสบ ต้นอักเสบเรื้อรัง โรคผิวหนังคันคันจากการฟานา โรคผิวหนังเรื้อรัง
บาดแผลจากของมีคม และทำให้ผิวหนังลุดคลำ



วุ้นพระฉิม (Dioscorea bulbifera L.)

สรรพคุณ หัวโตคิน ฟาให้ลุดรับประทวนได้ เป็นยาขับปัสสาวะ แก้กบิด
แก้กสาได้อักเสบ แก้กเสียดงหวาว ปารุงธาตุ แก้กไฟหลั่งเสียน ชันพยาธิ เจริญ
อาหาร แก้กปวดท้อง ท้องอืด ยับเยาชม ยาเย็น ชันไฟไหม้ หรือทำเป้นแก้ม
บางๆ ใช้ปิดแผลแก้กอักเสบ



ส่วนผสม

1. น้ำมันสมุนไพร 1300 มิลลิลิตร
(ไพล 1 กก. ขมิ้นชัน 1 กก. กะเม็ง 100 กรัม วุ้นพระฉิม 100 กรัม หุงในน้ำมันพระ ๒)
2. พิมเสนน้ำ 600 มิลลิลิตร
(เมนทอล 300 กรัม การบูร 300 กรัม พิมเสน 100 กรัม)
3. น้ำมันแก้ว 300 มิลลิลิตร

ผสมให้ 1,2 และ 3 ให้เข้ากันแล้วบรรจุในขวด



นอกจากนี้ยังได้นำเสนอผลงานวิจัยบางส่วนในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง “ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ผิวหนังของสารสกัดจากกะเม็ง (*Eclipta prostrata* Linn.) และว่านพระฉิม (*Dioscorea bulbifera* Linn.)” ในปัจจุบันโรคผิวหนังเป็นโรคที่สามารถรักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะ แต่บางครั้งยาปฏิชีวนะนั้นทำให้เกิดการดื้อยามากขึ้น สมุนไพรจึงเป็นทางเลือกที่นำมาใช้ โดยที่เลือกมา ได้แก่ กะเม็ง และว่านพระฉิม โดยพืชทั้งสองมีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียติดเชื้อที่ผิวหนัง โดยทำการสกัดสารจากกะเม็ง และว่านพระฉิม ด้วย Methanol และ Ethyl acetate ตามลำดับ นำสารสกัดมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ผิวหนัง ได้แก่ *Staphylococcus aureus* DMST 8840, Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20651, *Staphylococcus epidermidis* 2 สายพันธุ์ คือ DMST 4343 และ DMST 3547, *Streptococcus pyogenes* DMST 30563, *Pseudomonas aeruginosa* DMST 4739 และ *Escherichia coli* DMST 4212 ด้วยวิธี disc diffusion และ broth dilution ผลการศึกษาพบว่าในการทดสอบด้วย disc diffusion สารสกัดจากว่านพระฉิมมีฤทธิ์ยับยั้ง MRSA DMST 20691 และ *S. epidermidis* DMST 4343 ด้วยขอบเขตการยับยั้งจากสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วน 11.37 ± 0.40 mm และ 13.03 ± 0.86 mm ตามลำดับ และกะเม็งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST 8840 ด้วยขอบเขตการยับยั้งจากสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วน 20.53 ± 0.71 mm และพบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในการทดสอบด้วยวิธี broth dilution พบว่าสารสกัดจากว่านพระฉิมให้ผลการยับยั้งได้ดีทุกเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเชื้อ *S. aureus* DMST 8840 (MIC/MBC = 0.15/0.38 mg/ml) ได้ดีที่สุด และกะเม็งให้ผลการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* DMST 4343 (MIC/MBC = 0.38/>50 mg/ml) และ *P. aeruginosa* DMST 4739 (MIC/MBC = 0.38/>50 mg/ml) ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *S. pyogenes* DMST 30563 (MIC/MBC = 1.56/1.56 mg/ml) และ *E. coli* DMST 4212 (MIC/MBC = 0.75/ >50 mg/ml) ดังนั้นสรุปได้ว่าสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนว่านพระฉิม มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST 8840 ได้ดีที่สุด และสารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนจากกะเม็ง มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* DMST 4343 และ *P. aeruginosa* DMST 4739 ได้ดีที่สุด จึงมีความเป็นไปได้ว่าจะสามารถนำสารสกัดจากกะเม็งและว่านพระฉิมไปพัฒนาใช้ในการรักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย และควรมีการทดสอบถึงความเป็นพิษต่อเซลล์เพื่อจะได้นำไปใช้ได้อย่างปลอดภัย



ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ผิวหนัง ของสารสกัดจากกะเม็ง (*Eclipta prostrata* Linn.) และว่านพระนิม (*Dioscorea bulbifera* Linn.)

กัญญา วัฒนวิทย์¹, อรุณรัตน์ วัฒนวิทย์², อธิชาพร คุ้มชู³, นภัฏชัชฎา วัฒนวิทย์⁴, อธิชาพร วัฒนวิทย์⁵
¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพมหานคร 10600
² ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพมหานคร 10600
³ Corresponding author: E-mail: kknueeas@nu.ac.th

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันโรคผิวหนังเป็นโรคที่สามารถเกิดขึ้นได้กับทุกเพศทุกวัย ซึ่งสามารถรักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะทั่วไป แต่ถ้าเป็นเชื้อที่ยากจะมีความรุนแรงสูงจึงต้องใช้ยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นสูงกว่า

สมุนไพรซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจทางการแพทย์มากขึ้น โดยสมุนไพรที่เราเลือกมาใช้ ได้แก่ กะเม็ง และว่านพระนิม โดยกะเม็ง ตามตำราการแพทย์แผนไทยจะนำส่วน ราก มาทำยาเพื่อใช้รักษาแผลอักเสบ และรักษาโรคผิวหนังจากการติดเชื้อ ส่วนว่านพระนิม ตามตำราไทยจะนำหัว มาเคี้ยวให้ได้น้ำนำมาใช้เพื่อยานวดแก้ปวด หรือนำมางูใช้ปิดแผลแก้ยักเสบ

สรรพคุณของกะเม็ง

ทั้งที่เป็นยาฟ้าคลมาคอดตีบ ขับถ่ายเป็นเลือด ใช้บำบัดยาพอกแผลห้ามเลือด ใบและดอกต้มลดความร้อน แก้ปวดฟัน รากใช้ต้มหรือคั้นน้ำดื่มหลังคลอดบุตร แก้ท้องขาว และโรคโลหิตจาง ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส ฤทธิ์อนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ระงับปวด ฤทธิ์ลดระดับไขมันคอเลสเตอรอล ฤทธิ์ลดความดันโลหิต (ศูนย์วิจัยและพัฒนาสมุนไพร สรรพกร.2554)

สรรพคุณของว่านพระนิม

ตำรายาไทยหัวได้ดินทำให้ลูกบิปรระทานได้เป็นยาขับปัสสาวะ แก้บิด แก้ท้องอืดเสบ แก้ริดสีดวงทวาร บำรุงธาตุ แก้ไอหืดหอบ ขับพยาธิ เจริญอาหาร เป็นยาขมยาเย็น ขับน้ำนม หรือใช้เป็นแม่โขงๆ ใช้ปิดแผล แก้ยักเสบ ตำเป็นยาพอก แก้ฝี แก้ไฟ (Phargarden.2553)

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษากำหนดแบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง โดยวิธี agar disc diffusion และเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง (MBC) โดยวิธี broth microdilution

วิธีการทดลอง

1. สารสกัดจากกะเม็งและว่านพระนิม (Plant Extract)
2. การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพโดยวิธี Agar disc diffusion
3. หาค่า MIC และ MBC ด้วยวิธี Broth microdilution

ผลการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อก่อโรคผิวหนัง โดยวิธี Agar Disc Diffusion



สารสกัด	ชนิดเชื้อ	ขนาดของสารสกัด (mg/disc)	
		1	2
Eclipta prostrata	E. coli	+	+
	S. aureus	+	+
Dioscorea bulbifera	E. coli	+	+
	S. aureus	+	+

การหาค่า MIC และค่า MBC ด้วยวิธี Broth Microdilution

จากการศึกษาการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อก่อโรคผิวหนังของสารสกัดจากกะเม็งและว่านพระนิม พบว่าค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่เท่ากับ 100 mg/ml โดยวิธีสารสกัด 1 mg/disc มีค่า MIC และค่า MBC ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังที่ 7 ชนิด (MRSA DMST 20691 และ S. epidermidis DMST 4343) ได้เท่ากับค่าสารสกัดว่านพระนิมไว้

สารสกัด	ชนิดเชื้อ	ค่า MIC (mg/ml)		ค่า MBC (mg/ml)	
		1	2	1	2
Eclipta prostrata	E. coli	100	100	100	100
	S. aureus	100	100	100	100
Dioscorea bulbifera	E. coli	100	100	100	100
	S. aureus	100	100	100	100

จากการหาค่า MIC และค่า MBC ด้วยวิธี Broth Microdilution พบว่า สารสกัดจากว่านพระนิมไปยับยั้งการเติบโตของ (partial purifier) E. coli สายพันธุ์ S. aureus DMST 8840, MRSA DMST 20691, S. epidermidis DMST 3547 และ S. pyogenes DMST 30653 ได้ดีกว่าสารสกัดกะเม็ง

สรุปผลการศึกษา (Conclusion)

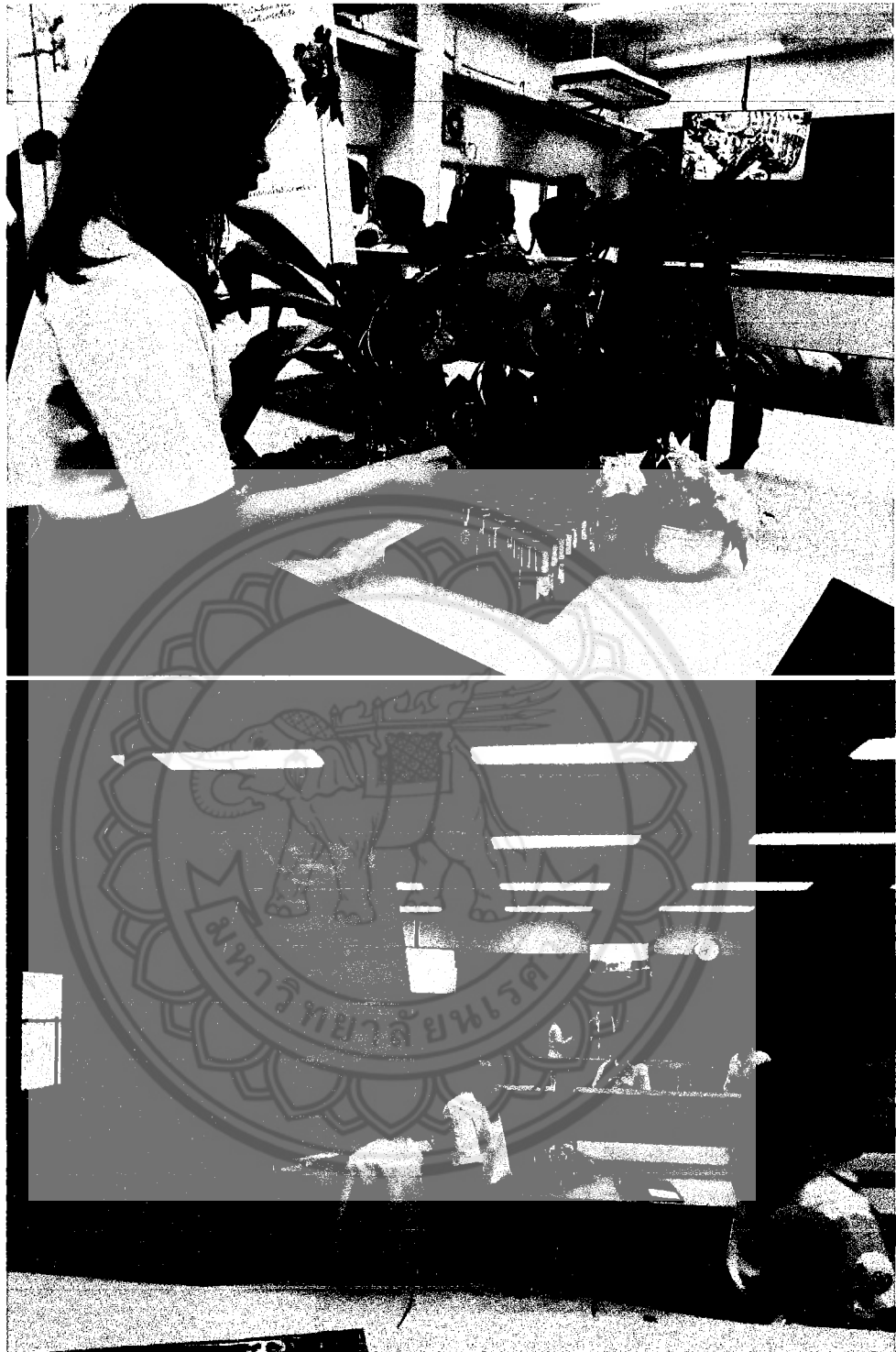
สารสกัดจากว่านพระนิม มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้ง S. aureus DMST 8840, MRSA DMST 20691, S. epidermidis DMST 3547 และ S. pyogenes DMST 30653 ได้

จึงมีความเป็นไปได้ว่าจะสามารถนำสารสกัดจากว่านพระนิมไปพัฒนาใช้ในการรักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย และแผลที่เกิดจากการติดเชื้อจากแบคทีเรียคือ MRSA และเชื้อที่หายากอื่นๆ ได้









ภาคผนวก

1. อนุสิทธิบัตร เรื่อง ผลิตภัณฑ์ดับกลิ่นปากสมุนไพร และกระบวนการผลิตสิ่งนั้น เลขที่คำขอ 190300081



1. ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการมา	ผลที่ได้รับตลอดโครงการ
<p>1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกะเม็งและว่านพระฉิมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียติดเชื้อที่ผิวหนัง</p> <p>2. ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ผิวหนัง</p> <p>3. ตรวจสอบวิเคราะห์ชนิดของสารที่อยู่ในสารสกัดกะเม็งและว่านพระฉิม โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS</p> <p>4. เผยแพร่ความรู้เกี่ยวกับการใช้สมุนไพรสู่ชุมชน</p> <p>6. รวบรวมผลการทดลอง และเขียนรายงาน</p>	<p>1. หาตัวอย่างพืช และสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ และศึกษาลักษณะทางโครมาโตกราฟีจากสารสกัดหยาบ ด้วยเทคนิค TLC</p> <p>2. ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี bioautograph แล้วนำสารสกัดหยาบมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี chromatography จากนั้นนำสารบริสุทธิ์มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย</p> <p>3. ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ผิวหนัง</p> <p>4. พิสูจน์เอกลักษณ์ขององค์ประกอบที่ออกฤทธิ์ด้วยวิธี LC-MS/MS และทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด</p> <p>5. เผยแพร่ความรู้สู่ชุมชน</p>	<p>ได้ดำเนินการตามแผนที่วางไว้</p>	<p>1. โครงการบริการวิชาการในงานสัปดาห์วิทยาศาสตร์ภาคีชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เรื่อง พืชเป็นยา ระหว่างวันที่ 19-20 สิงหาคม 2562</p> <p>2. อนุสิทธิบัตร เรื่อง ผลิตภัณฑ์ดับกลิ่นปากสมุนไพรและกระบวนการผลิตสิ่งนั้น เลขที่คำขอ 190300081</p>