# ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบมะหาด
# Antibacterial Activity of Crude Extract from *Artocarpus lakoocha* Roxb. ex Buch.-Ham. Leaves.

**จาตุรงค์ จงจีน และ ศศิธร ธงชัย**[1]
**Jongjeen, J. and Thongchai S.**[1]

## Abstract

Effect of crude extracts from leaves of *Artocarpus lakoocha* inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* was monitored using maceration extract with 95% ethanol at ratio of 1:5 (w/v), 37$^{\circ}$C. Results showed that the crude extract from fresh leaves at 400 mg/ml could inhibit the growth of *B. subtilis* and *E. coli* which the maximum inhibition area was 23±8.15 mm and 18.5±7.90 mm, respectively, but not in *S. aureus*. Extracts from dried leaves at 400 mg/ml were able to inhibit *E. coli* and *B. subtilis* which the maximum inhibition area was 19.00±12.63 and 16.5±6.99 mm, respectively. Crude extracts from *A. lakoocha* fresh and dried leaves could exhibit the lowest inhibitory concentration (MIC) at 12.5 mg/ml. which resulted in statistically significant differences ($P \leq 0.05$). Results of this study show that crude extract from leaves of *A. lakoocha* could be a potential natural extract for bacteria inhition.
**Keywords:** Bacteria, Crude extract, *Artocarpus lakoocha* leaves

## บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะหาดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* โดยนำตัวอย่างใบสดและแห้งมาสกัด ด้วยเอทานอล 95% อัตราส่วน 1:5 (w/v) อุณหภูมิ 37$^{\circ}$C พบว่าสารสกัดจากใบมะหาดสดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด ที่ความเข้มข้น 400 mg/ml (บริเวณยับยั้ง 23±8.15 มิลลิเมตร) รองลงมาคือ *E. coli* (บริเวณยับยั้ง 18.5±7.90 มิลลิเมตร) แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ ส่วนสารสกัดจากใบแห้งสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด ที่ความเข้มข้น 400 mg/ml (บริเวณยับยั้ง 19.00±12.63 มิลลิเมตร) รองมาคือ *B. subtilis* (บริเวณยับยั้ง 16.5±6.99 มิลลิเมตร) แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ นอกจากนี้สารสกัดหยาบจากใบมะหาดสดและแห้งให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) 12.5 mg/ml. ซึ่งผลที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และจากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบมะหาดซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้
**คำสำคัญ :** แบคทีเรีย สารสกัดหยาบ ใบมะหาด

## คำนำ**

ปัจจุบันโรคภัยไข้เจ็บที่พบมักจะเกิดขึ้นจากปัจจัยหลายอย่าง ทั้งจากความเป็นอยู่ของมนุษย์และสภาพแวดล้อมที่เป็นสาเหตุ วิวัฒนาการของเชื้อโรคที่มีการกลายพันธุ์โดยเกิดจากการดื้อยาของเชื้อโรคทำให้มีโรคชนิดใหม่เกิดขึ้นมีทั้งจากภายนอกและภายใน สำหรับโรคภายนอกที่พบบ่อยคือ แผล ฝี หนอง แผลเรื้อรังและแผลพุพอง ซึ่งมีสาเหตุจากการติดเชื้อที่สามารถก่อให้เกิดการอักเสบตามมา เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค คือ เชื้อกลุ่ม *Staphylococus* sp. *Streptococus* sp. และ *Pseudomonas* sp. และยาที่ใช้ในการรักษาส่วนมากจัดเป็นกลุ่มยาปฏิชีวนะ (สุจิตรา และคณะ, 2539) ปัจจุบันทั่วโลกให้ความสนใจกับพืชสมุนไพรเป็นอย่างมากทั้งด้านอุตสาหกรรมอาหาร ยาและเครื่องสำอาง สารสกัดจากพืชสมุนไพรเป็นสารจากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติต้านการเกิดมะเร็ง บรรเทาอาการอักเสบ ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ ที่สำคัญไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและอนามัยของผู้บริโภค มะหาดจัดเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ที่มีสรรพคุณในการต้านจุลินทรีย์และช่วยขับพยาธิได้ โดยการใช้ส่วนต่างๆ มาแปรรูปหรือสกัดสารที่มีอยู่ภายใน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากมะหาดที่มีอยู่ในท้องถิ่นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ดื้อยา (MRSA) *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นด้านเภสัชกรรมในอนาคต

[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชัฏอุบลราชธานี อ.เมือง จ.อุบลราชธานี 34000
[1]Department of Biology, Faculty of Science, Ubon Ratchathani Rajabhat University, Ubon Ratchathani 34000, Thailand

## อุปกรณ์และวิธีการ**

**ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ**

เก็บตัวอย่างใบมะหาดจากพื้นที่ปกปักพันธุ์กรรมพืชภายในศูนย์การเรียนรู้วิทยาเขตเขื่องใน มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ตำบลก่อเอ้ อำเภอเขื่องใน จังหวัดอุบลราชธานี นำมาล้างทำความสะอาด หั่นให้มีขนาดเล็ก ทำการสกัดแบบสดและแบบแห้ง โดยการสกัดแบบแห้งให้นำไปอบที่ 45°C จากนั้นนำมาสกัดด้วยวิธีแช่ยุ่ย (Maceration technique) โดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 95% เป็นตัวทำละลาย อัตราส่วน 1:5 (w/v) เป็นเวลานาน 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำมากรองแล้วระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จนได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) เก็บในขวดสีชาอุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

**การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดด้วยวิธี Agar disc diffusion**

เตรียมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 100 200 และ 400 mg/ml โดยละลายสารสกัดหยาบด้วย DMSO 0.1% เตรียมเชื้อทดสอบ บนอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมง ทำการย้ายเชื้อทดสอบลงในอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) นำไปเขย่าในตู้บ่มเชื้อ (Incubator shaker) 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียทดสอบเข้าสู่ระยะ Log phase นำมาเตรียมเชื้อที่มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ซึ่งมีความเข้มข้นแบคทีเรียประมาณ $1.5 \times 10^8$CFU/ml จากนั้นทำการ Swab เชื้อลงบนอาหาร MHA จากนั้นหยดสารสกัดแบบสดและแบบแห้งลงในแผ่น disc ในแต่ละความเข้มข้นคือ 100 200 และ 400 mg/ml หลุมละ 100 µl ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมจะเลือกใช้ยาปฏิชีวนะ Tetracycline ความเข้มข้น 250 µg/ml และ DMSO เข้มข้นที่ 100% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดทำการอ่านผลโดยวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบหลุม (Inhibition zone) (อ้างจาก วารีรัตน์, 2557)

**การหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Minimal inhibitory concentration (MIC) และการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ Minimal bactericidal concatenation (MBC) และวิธี Drop plate**

นำสารสกัดมาทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี Broth microdilution (โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้น 400 200 100 50 25 12.5 6.5 mg/ml) โดยทำการเติมเชื้อทดสอบจากหลอดที่ 3 ถึงหลอดที่ 9 หลอดละ 10 µl จากนั้นเติมสารสกัดหยาบจากใบมะหาดจากหลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 9 หลอดละ 10 µl โดยหลอดที่ 1 เติมอาหารเปล่า 90 µl เติมอาหารเหลว MHB จากหลอดที่ 1 ถึงหลอดที่ 9 ทำการเจือจางแบบสองเท่า (Two-fold dilution) ในหลอดจากหลอด ที่ 3 ไปจนถึงหลอดที่ 9 แล้วดูดทิ้ง 10 µl นำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยหลอดที่ 1 เป็นอาหาร MHB อย่างเดียว หลุมที่ 2 เป็นอาหาร MHB และเชื้อทดสอบ ในการแปลผลการทดสอบหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจะมีลักษณะใสความเข้มข้นของหลุมนี้ถือว่าเป็นค่า MIC (mg/ml) และทำการทดสอบหาค่า MBC) ด้วยวิธี Drop plate บนอาหาร MHA ขนาด 10 µl ทิ้งให้แห้งบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การแปลผลค่า MBC คือหลุมที่ไม่มีรอยเชื้อเจริญบนผิวหน้าอาหาร แสดงว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (อ้างจาก วารีรัตน์, 2557)

## ผลการวิจัย**

**ลักษณะของสารสกัดหยาบจากใบมะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb. ex Buch.-Ham.) พบว่า**ใบมะหาดสดและแห้งที่สกัดด้วยวิธี maceration ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% มีลักษณะหนืดเหนียว กึ่งแข็ง สีเขียวเข้ม และมีปริมาณสารร้อยละผลผลิตที่ได้ (% Yield) เท่ากับ 12.5 และ 11.4 ตามลำดับ**ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยา (MRSA) *E. coli* และ *B. subtilis* ของสารสกัดหยาบใบมะหาดแบบสดและแบบแห้ง ด้วยวิธีทดสอบ Agar disc diffusion**

พบว่าสารสกัดหยาบใบมะหาดแบบสดที่ระดับความเข้มข้น 400 mg /ml สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ได้ดีที่สุด โดยมี inhibition zone เท่ากับ 23.00±8.15 mm รองลงมาคือ *E. coli* ให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดสดที่ 100 mg/ml. โดยมี inhibition zoneg เท่ากับ 18.50±7.91 mm) โดยสารสกัดสดจากใบมะหาดไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยา (MRSA) ส่วนสารสกัดแห้งที่ระดับความเข้มข้น 400 mg /ml ให้ผลยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด (บริเวณการยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 19±12.635 mm) รองลงมาคือ *B. subtilis* (บริเวณการยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 16.5±6.998 mm) แต่สารสกัดแห้งไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยา (MRSA) ได้ดัง Table 1 นอกจากนี้ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบมะหาดแบบสดและแบบแห้งที่นำมาทำการศึกษามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้น ซึ่งระดับความเข้มข้นที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียคือ 400 mg/ml

**Table 1 inhibition zone of antibacterial activity**

| crude extracts | concentration | Inhibition zone (mm) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | *S. aureus* (MRSA) | *E. coli* | *B. subtilis* |
| fresh leaf extract | 100 | NZ | 15±6.53 | 11.5±7.43 |
| | 200 | NZ | 18±7.70 | 19±7.56 |
| | 400 | NZ | 18.5±7.90 | 23±8.15 |
| | DMSO 100% | NZ | NZ | NZ |
| | Tetracycline 250 mg/ml | 26±1.41 | 25±0.35 | 17.5±0.70 |
| dry leaf extract | 100 | NZ | 17±9.49 | 15.5±8.38 |
| | 200 | NZ | 18±10.70 | 16±7.49 |
| | 400 | NZ | 19±12.63 | 16.5±6.99 |
| | DMSO 100% | NZ | NZ | NZ |
| | Tetracycline 250 mg/ml | 25±1.41 | 30±1.41 | 18.5±0.70 |

NZ = no inhibition zone

เมื่อนำสารสกัดจากใบมะหาดสดและแห้ง มาทดสอบค่า MIC ด้วยวิธี Broth microdilution โดยทำการเจือจางสารสกัดหยาบลงทีละสองเท่า (Serial two fold dilution) จากระดับความเข้มข้น 400 200 100 50 25 12.5 และ 6.25 mg/ml สังเกตุความขุ่นของเชื้อ พบว่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญอยู่ที่ 12.5 mg/ml และเมื่อทำการทดสอบค่า MBC ด้วยวิธี Drop plate บนอาหาร MHA พบว่าสารสกัดหยาบใบมะหาดสดและแห้งไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

## วิจารณ์ผล

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบมะหาดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารสกัดจากใบสดและใบแห้งมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อที่แตกต่างกัน ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ยังไม่มีการทำให้สารบริสุทธิ์ โดยคาดว่ามีกลุ่มของสารสำคัญในใบมะหาดที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อทดสอบอยู่หลายชนิด ดังนั้นงานวิจัยนี้เป็นการรายงานเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากใบมะหาดต่อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ โดยพบว่าสารสกัดจากใบสดที่สกัดโดยเอทานอล 95% ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 200 mg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีกว่ายาปฏิชีวนะ Tetracycline 250 mg/ml ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวกของการศึกษานี้ และสอดคล้องกับการศึกษาของ คคนางค์ รัตนานิคม (2562) ซึ่งได้ศึกษาสารสกัดจากมะหาด โดยใช้ตัวทำลาลายต่างชนิดกัน และพบว่าสารสกัดจากมะหาดที่ใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียนในการทดสอบได้ดีกว่ายาปฏิชีวนะ amoxicillin ซึ่งเป็นกลุ่มยาปฏิชีวนะที่ใช้ต้านแบคทีเรียแกรมบวกเช่นกัน และสอดคล้องกับการศึกษาของ มณฑล วิสุทธ (2560) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของพืชท้องถิ่นที่พบในจังหวัดนครราชสีมาพบว่า สารสกัดใบมะหาด สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 โดยมีบริเวณยับยั้ง 8.12± 0.37 mm. อย่างไรก็ตามในการศึกษาสารสกัดจากใบมะหาดยังต้องมีการศึกษาให้ครบคลุมถึงทุกส่วนของมะหาด รวมทั้งการใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อไป

## สรุป**

ร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบใบมะหาดสดและใบมะหาดแห้งใน โดยทำการสกัดในอัตราส่วน 1:5 ได้ปริมาตรร้อยละผลผลิตที่ได้ (% Yield) เท่ากับ 12.50 และ 11.40 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดใบมะหาดสดที่ระดับความเข้มข้น 400 mg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้โดยมีบริเวณยับยั้งที่ 23.00±8.15 mm และสารสกัดจากใบมะหาดแห้งที่ความเข้มข้น 400 mg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้โดยมีบริเวณยับยั้งที่ 19.00±12.64 mm โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ที่ระดับความเข้มข้น 12.5 mg/ml

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ในความดูแลของมหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยและผู้ช่วยวิจัยทุกท่าน ที่ได้อำนวยความสะดวกในการจัดหาอุปกรณ์ต่างๆ และดำเนินงานด้วยดีมาโดยตลอด

**เอกสารอ้างอิง****

คคนางค์ รัตนานิคม นิคม ศรีกะชาและยุภาพร ขันนาเลา, 2562, ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ของสารสกัดมะหาด, วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, ปีที่ 17 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน 2562, หน้าที่ 54-62.

วารีรัตน์ หนูหีต, 2557, การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนบนผิวสัมผัสโดยใช้สารสกัดจากพืชตระกูลขิง, วิทยานิพนธ์การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สุจิตรา วีรวรรณ อมรศรี ชุณหรัศมี และศรีศุภลักษณ์ สิงคาลวณิช, 2539, โรคผิวหนังเด็ก. กรุงเทพฯ, โฮลิสติก พับลิชชิ่ง

Jorgensen, J.H., Turnidge, J.D. and Washington, J.A., 1999 Antibacterial Susceptibility Test: Dilution and Disk Diffusion Methods, Manual, 7th ed. of Clinical Microbiology, Washing DC: America Society Micro Biology, 42-1526