ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบตีนเป็ดน้ำและใบตีนเป็ดทราย

Antibacterial and Antioxidant Activities of *Cerbera manghas* and *C. odollam* Leaf Extracts

ผาณตา เอี้ยวซิโป[1,2]* แวววลี โชคแสวงการ[1,2] ชฎาพร พรมแดน[1] และ พิมพ์หทัย นิลเกษม[1]

Panata Iawsipo[1,2]*, Waeowalee Choksawangkarn[1,2], Chadaporn Promdan[1] and Pimhatai Nilkasam[1]

[1] *ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[2] *ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[1] *Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University*

[2] *Center of Excellence for Innovation in Chemistry Faculty of Science, Burapha University*

Received : 11 June 2017

Accepted : 29 June 2017

Published online : 17 July 2017

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในพืชและสัตว์ และต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบตีนเป็ดทรายและตีนเป็ดน้ำ จากการทดสอบพบว่า *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* เป็นแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญด้วยส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต (EA) ได้มากที่สุด โดย EA จากใบตีนเป็ดน้ำ (65.27%) มีฤทธิ์ที่ดีกว่าใบตีนเป็ดทราย (48.23%) อีกทั้ง EA ยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยสามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุด (EC_{50} = 0.55±0.03 mg/mL) และรีดิวซ์ Fe^{3+} ได้ดีที่สุด (2.08±0.42 มิลลิกรัมวิตามินซีสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด) แต่มีความสามารถในการจับกับไอออน Fe^{2+} ได้น้อยกว่าส่วนสกัดเฮกเซน นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งสองจะแปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกหรือฟลาโวนอยด์รวม ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของสารประกอบทั้งสองในการเป็นกลุ่มสารออกฤทธิ์ ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดจากใบตีนเป็ดน้ำในการพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และเกษตรกรรมต่อไป

คำสำคัญ : ใบตีนเป็ดทราย ใบตีนเป็ดน้ำ ต้านแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระ

***Corresponding author. E-mail** : panata@go.buu.ac.th

Abstract

Aim of this research is to evaluate antibacterial activity of *C. manghas* and *C. odollam* leaf extracts against plant and animal pathogens, and also antioxidant activities. Using turbidimetric assay, *X. campestris* pv. *vesicatoria*. growth showed the highest reduction by ethyl acetate extract (EA) of *C. odollam* (65.27%) than that of *C. manghas* (48.23%). EA also exhibited the highest antioxidant activity by scavenging DPPH radical with the EC_{50} of 0.55±0.03 mg/mL and had the strongest reducing ability (2.08±0.42 mg ascorbic acid equivalent/g extract). However, hexane extract (Hex) was found to be the best Fe^{2+} chelator. Moreover, bioactivity assays revealed positive correlation with total phenolic and flavonoid contents of the extracts, indicating that both compounds take into account for these activities. Our findings suggest that *C. odollam* leaf extracts are useful for future development for medical and agricultural purposes.

Keywords : *Cerbera manghas*, *Cerbera odollam*, antibacterial, antioxidant

บทนำ

แม้ว่าความก้าวหน้าทางการแพทย์จะมีมากขึ้น แต่ด้วยวิถีชีวิตในปัจจุบันที่เต็มไปด้วยความเครียด ทำให้จำนวนผู้ป่วยในแต่ละปียังคงเพิ่มขึ้นตามลำดับ สาเหตุของความเจ็บป่วยส่วนใหญ่เกิดจากความไม่สมดุลของอนุมูลอิสระในร่างกาย จนเกิดเป็นโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น (Ames *et al.,* 1993) หรืออาจเกิดจากการติดเชื้อจุลชีพ เช่น แบคทีเรีย หรือไวรัสที่ปะปนมากับสิ่งแวดล้อมรอบตัว ซึ่งองค์การอนามัยโลกได้ชี้ให้เห็นว่า ในปัจจุบันเชื้อแบคทีเรียต่างๆ มีการดื้อยาเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) *Klebsiella pneumoniae* และ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาลและสังคมทั่วไป (World Health Organization, 2014) ไม่เว้นแม้แต่เชื้อ *Xanthomonas* ซึ่งก่อโรคในพืชหลายชนิดรวมถึงข้าวที่เป็นพืชเศรษฐกิจของไทย ก็พบการดื้อต่อสารเคมีและยาปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้นด้วย (Xu *et al.,* 2013) ทำให้การใช้ยาชนิดเดิมและในปริมาณเท่าเดิมไม่สามารถกำจัดแบคทีเรียเหล่านี้ได้

ดังนั้น การค้นหาสารที่สามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้จึงเป็นเรื่องที่ท้าทายสำหรับนักวิจัย อีกทั้งในปัจจุบันผู้คนสนใจที่จะใช้สมุนไพรใกล้ตัวในการบรรเทาอาการเจ็บป่วยต่างๆ มากขึ้น เพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ยาเคมีและลดค่าใช้จ่าย ทำให้มีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากธรรมชาติออกมามากมาย (Chan *et al.,* 2007; Rattanasena, 2012)

ตีนเป็ดทราย (*C. manghas*) และตีนเป็ดน้ำ (*C. odollam*) เป็นพืชในวงศ์ Apocynaceae พบได้ในประเทศแถบเอเชียใต้ รวมถึงประเทศไทย ส่วนต่างๆ ของพืชทั้งสองถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรในการรักษาโรค ซึ่งบางโรคเกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ เช่น โรคผิวหนัง หลอดลมอักเสบ โรคไขข้อ แก้ไข้และริดสีดวงทวาร เป็นต้น (Quattrocchi, 2012) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดเอทานอลจากใบตีนเป็ดทรายและตีนเป็ดน้ำมีความสามารถในการต้านแบคทีเรียได้ (Somwang & Wanichwatanadecha, 2015; Wanichwatanadecha *et al.,* 2015) แต่ยังไม่เคยมีรายงานถึงกลุ่มของสารออกฤทธิ์

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารทุติยภูมิที่พบในพืชหลายชนิด และมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ (Pandey & Rizvi, 2009) โดยจะหน่วงเหนี่ยวหรือเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้เกิดการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ สารประกอบฟีนอลิกรวมถึงฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากพืช ยังพบว่ามีคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียได้ด้วย

(Orhana *et al*., 2010; Sengul *et al.,* 2010) และปริมาณสารประกอบทั้งสองมักแปรผันตรงกับฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของสารสกัด (Xiaoyong *et al.,* 2014)

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืชและสัตว์ ของสารสกัดจากใบตีนเป็ดทรายและใบตีนเป็ดน้ำที่แยกด้วยตัวทำละลายต่างกัน รวมถึงหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ว่ามีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ทั้งสองหรือไม่ โดยมุ่งหวังว่าผลที่ได้จะเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยเพิ่มคุณค่าและสนับสนุนการนำตีนเป็ดน้ำและตีนเป็ดทรายไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และภาคเกษตรกรรม ลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ เพิ่มการเข้าถึงยาให้กับประชาชนทั่วไป และลดการใช้สารเคมีในการกำจัดโรคพืชอันจะช่วยลดมลพิษที่เกิดกับสิ่งแวดล้อมได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดจากใบตีนเป็ดทรายและตีนเป็ดน้ำ

ใบพืชถูกเก็บจากภายในมหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี ในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2558 และได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์พืชโดยอาจารย์เบญจวรรณ ชิวปรีชา จากมหาวิทยาลัยบูรพา การสกัดสารสกัดหยาบเอทานอล (Crude) จะทำตามวิธีที่ระบุไว้ใน Somwang & Wanichwatanadecha (2015) โดยใบพืชจะถูกอบที่อุณหภูมิ 50 °C และนำมาบดให้ละเอียด จากนั้นนำผงใบไปแช่ในสารละลายเอทานอลกลั่น 95% (ใบพืช 1 กรัม : เอทานอล 10 มิลลิลิตร) ทำการสกัด 3 รอบ รอบละ 5 วัน กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator สารสกัด Crude ที่ได้จะถูกนำไปสกัดแยกส่วนด้วยวิธี liquid-liquid extraction ด้วยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ จะได้เป็น ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน (Hex) ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (EA) และส่วนสกัดย่อยน้ำ (AQ) ทำการระเหยแห้งเช่นเดียวกันกับ Crude และเก็บสารสกัดทั้งหมดที่ได้ที่อุณหภูมิ –20 °C เพื่อรอการทดสอบต่อไป

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Turbidimetric method

เชื้อ *X. campestris* pv. *malvacearum* (*Xcm*), *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) *S. aureus* และ *E. coli* จะถูกเจือจางตามวิธีของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012) และทำการทดสอบตามวิธีที่ระบุไว้ใน Somwang & Wanichwatanadecha (2015) โดยใช้อาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) เจือจางเชื้อให้มีค่า OD_{600} ประมาณ 0.1 (ประมาณ 10^8 CFU/mL) จากนั้นเจือจางเชื้อลงอีก 100 เท่าด้วย MHB แล้วนำไปผสมกับสารสกัดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายตามต้องการ (ปริมาตรรวม 100 µL) ในไมโครเพลท บ่มเชื้อ *Xanthomonas* ที่ 30 °C และบ่ม *S. aureus* และ *E. coli* ที่ 37 °C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่า OD_{600} โดยใช้อาหารเหลว MHB เป็น blank สำหรับกลุ่มเชื้อที่ไม่เติมสารสกัด และใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นเท่ากันเป็น blank สำหรับกลุ่มเชื้อที่เติมสารสกัด ใช้ยา Chloramphenical (ความเข้มข้น 0.0025 mg/mL) เป็นตัวควบคุมผลบวก และกำหนดให้เชื้อที่เลี้ยงในอาหารผสม 1% DMSO (ตัวทำละลายของสารสกัด) มีค่าเปอร์เซ็นต์การเจริญ (%Growth) เท่ากับ 100%

3. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC)

การหาค่า MIC จะเตรียมเช่นเดียวกันกับข้อ 2 แต่ในการทดสอบจะใช้ไมโครเพลทแบบ 96 หลุมชนิดก้นตัวยู (U bottom) (Wanichwatanadecha et al., 2015) โดยค่า MIC จะหาได้จากการสังเกตตะกอนของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้น

หลังการบ่มในสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.5, 1, 2 และ 4 mg/mL) ซึ่งค่าความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดที่ไม่สามารถสังเกตเห็นตะกอนของเชื้อแบคทีเรียได้ด้วยตาเปล่า คือค่า MIC

4. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic content) และสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoid content)

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Singleton *et al.*, 1999) จะทำโดยละลายสารสกัดด้วย DMSO แล้วผสมสารสกัด 25 µL ในน้ำกลั่น 100 µL และสารละลาย Folin–Ciocalteu 30 µL เขย่าให้เข้ากัน บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติม 7% (w/v) Na_2CO_3 250 µL และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 600 µL ตั้งไว้ในที่มืดอีก 90 นาที จากนั้นนำไปวัดค่า OD_{765} นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก และรายงานผลในรูปของมิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด

สำหรับการหาสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมจะดัดแปลงจากวิธีของ Saeed *et al.* (2012) โดยนำสารสกัดที่เตรียมข้างต้น 100 µL มาผสมกับน้ำกลั่น 400 µL จากนั้นเติม 5% (w/v) $NaNO_2$ 30 µL บ่มในที่มืด 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติม 10% (w/v) $AlCl_3$ 30 µL บ่มในที่มืดอีก 5 นาที และเติม 1 M NaOH 200 µL ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 mL บ่มในที่มืดอีก 5 นาที และนำไปวัดค่า OD_{510} นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของเควอร์เซตินและรายงานผลในรูปของกรัมเควอร์เซตินสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.1 การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH

วิธีทำดัดแปลงมาจาก Molyneux (2006) โดยเตรียมสารสกัดละลายใน DMSO ให้มีความเข้มข้น 0.25- 4 mg/mL จากนั้นผสมสารตัวอย่างหรือตัวควบคุม 100 µL กับ 0.2 M DPPH ในเมทานอล ปริมาตร 50 µL ทำในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่า OD_{517} ซึ่งความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH คำนวณได้จากสมการ

$$\% \, inhibition = \frac{(A_{control} - A_{blank}) - (A_{sample} - A_{blank\,sample})}{(A_{control} - A_{blank})} \times 100 \qquad (1)$$

5.2 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

เตรียมสารละลาย FRAP จากสารผสมระหว่าง 0.28 mM sodium acetate pH 3.6: 10 mM tripyridyltriazine (TPTZ) ใน 40 mM HCl: 20 mM $FeCl_3.6H_2O$ ในอัตราส่วน 10: 1:1 ผสมสารละลาย FRAP 180 µL กับสารสกัดเข้มข้น 1 mg/mL (ใน DMSO) 20 µL บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่า OD_{596} ซึ่งจะแปรผันตรงกับปริมาณ Fe(II)-TPTZ แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการรีดิวซ์ของสารตัวอย่าง แสดงผลในรูปของมิลลิกรัมวิตามินซีสมมูลต่อกรัมของสารสกัด (Benzie and Strain, 1999)

5.3 การทดสอบความสามารถในการจับกับโลหะ

การทดสอบจะใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Carter (1971) โดยผสมสารสกัดเข้มข้น 1 mg/mL (เตรียมใน 15% DMSO) ใน 100 mM Na acetate buffer, pH 4.9 ปริมาตร 500 µL กับสารละลาย 0.01% (w/v) $FeCl_2$ 60 µL จากนั้น

เติม 40 mM Ferrozine 25 µL แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที การเกิดสารเชิงซ้อนของไอออน Fe^{2+} และ Ferrozine สามารถติดตามได้จากการเปลี่ยนแปลงค่า OD_{562} โดยมี 10 mM EDTA เป็นตัวควบคุมผลบวก ความสามารถในการจับกับโลหะของสารตัวอย่าง สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\% \, chelation = \frac{(A_{control} - A_{blank}) - (A_{sample} - A_{blank\,sample})}{(A_{control} - A_{blank})} \times 100 \qquad (2)$$

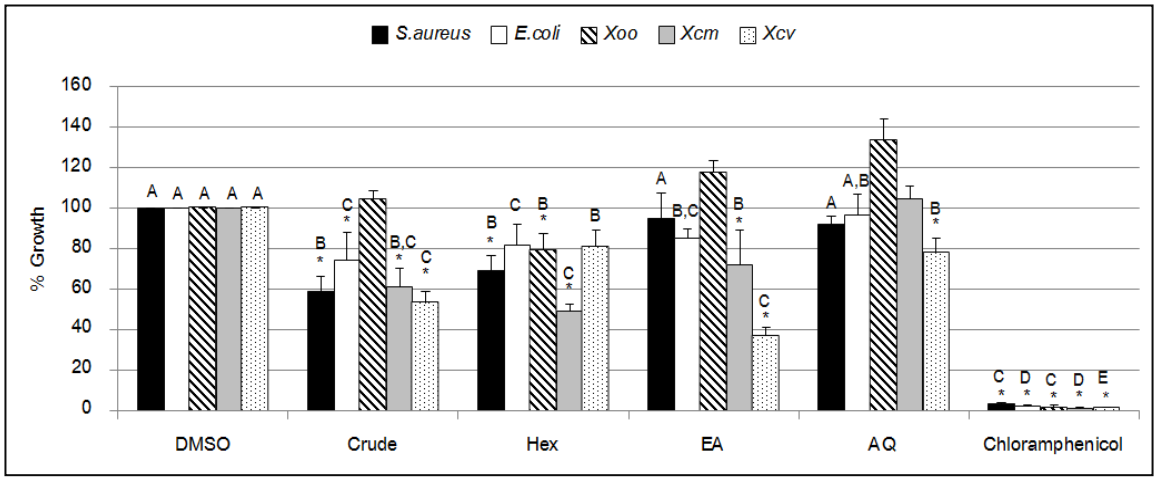
6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ ความแตกต่างของชุดข้อมูลที่ $p < 0.05$ ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี one-way หรือ two-way ANOVA ด้วยโปรแกรม Minitab17

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

สารสกัดจากใบตีนเป็ดทรายสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ผสมและไม่ผสมสารสกัดจากใบตีนเป็ดทราย โดยใช้ Crude 2 mg/mL และส่วนสกัดย่อยต่างๆ ที่ 1 mg/mL พบว่าสารสกัด Crude มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ 4 สายพันธุ์ โดยยับยั้งเชื้อ *Xcv* ได้มากที่สุดถึง 46.91±5.74% รองลงมาคือเชื้อ *S. aureus* (41.18±7.29%), *Xcm* (39.04±9.01%) และ *E. coli* (25.61±13.73%) ตามลำดับ แต่ไม่มีผลกับการเจริญของเชื้อ *Xoo* (ภาพที่ 1) สำหรับฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของส่วนสกัดย่อยต่างๆ พบว่า Hex มีฤทธิ์ที่หลากหลายที่สุด คือสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากกว่า 20% ถึง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Xcm* (50.75±3.30%), *S. aureus* (31.20±7.83%) และ *Xoo* (20.84±7.89%) แต่ส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ที่ดีที่สุดคือ EA ซึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xcv* ได้มากที่สุดถึง 63.10±4.22% ในขณะที่ส่วนสกัดย่อย AQ ไม่แสดงฤทธิ์ดังกล่าว



ภาพที่ 1 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียเมื่อได้รับสารสกัดใบตีนเป็ดทรายเปรียบเทียบกับตัวควบคุม จากการทดสอบแบบ Turbidimetric method ความแตกต่างในการเจริญของเชื้อแต่ละชนิดระหว่างกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับสารทดสอบแสดงด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษบนแท่งกราฟที่แตกต่างกัน (A-F) ($p<0.05$) และ * แสดงถึงเชื้อที่ถูกยับยั้งการเจริญได้มากกว่า 20% (เชื้อที่มีการเจริญมากกว่า100% จะไม่นำมาคิดนัยสำคัญทางสถิติ)

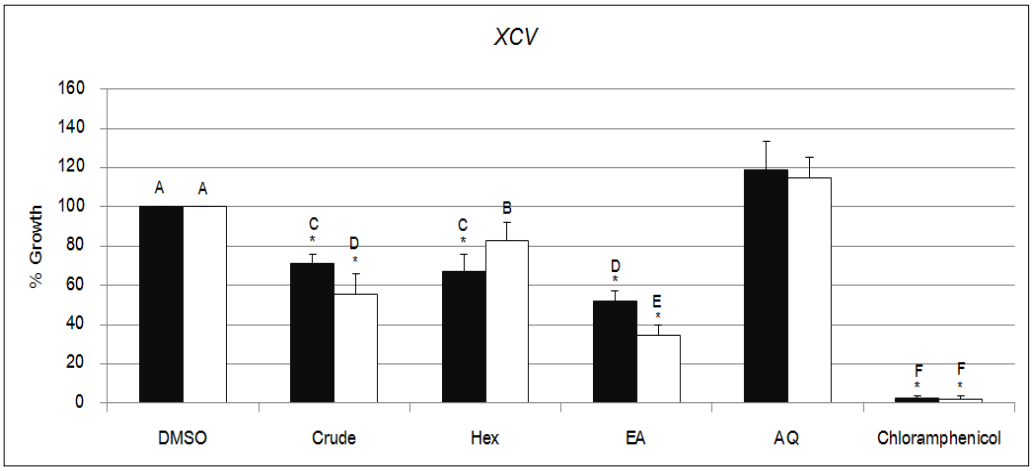
ค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 1 โดยสารสกัด Crude และส่วนสกัดย่อย Hex และ EA จะมีค่า MIC ของเชื้อต่างๆ อยู่ในช่วง 2 – 4 mg/mL สำหรับส่วนสกัดย่อย AQ ไม่สามารถหาค่า MIC ในช่วงความเข้มข้นของสารที่ทดสอบได้ (N/A) เนื่องจากไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

ตารางที่ 1 ค่า MIC (mg/mL) ของสารสกัดใบตีนเป็ดทรายต่อเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรีย / สารสกัด	*S. aureus*	*E. coli*	*Xoo*	*Xcm*	*Xcv*
Crude	4	4	4	2	2
Hex	2	2	2	2	2
EA	2	N/A	4	4	2
AQ	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

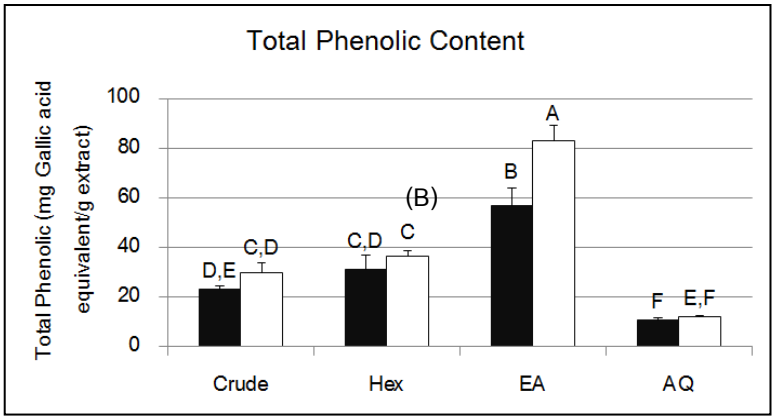
สารสกัดจากใบตีนเป็ดน้ำสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xcv* ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบตีนเป็ดทรายและแปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

เนื่องจากการเจริญของเชื้อ *Xcv* ถูกยับยั้งได้มากที่สุด (ภาพที่ 1) ดังนั้นเชื้อ *Xcv* จึงถูกเลือกมาทดสอบเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ระหว่างสารสกัดจากใบตีนเป็ดทรายและใบตีนเป็ดน้ำ ผลการทดสอบพบว่า ส่วนสกัด EA จากพืชทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xcv* ได้ดีกว่าสารสกัดชนิดอื่นๆ (ภาพที่ 2) และ EA จากใบตีนเป็ดน้ำมีฤทธิ์ที่ดีกว่า EA จากใบตีนเป็ดทราย โดยยับยั้งได้ 65.27% และ 48.23% ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์นี้แปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่พบในสารสกัด (ภาพที่ 3A) โดย EA จะมีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด และ EA จากใบตีนเป็ดน้ำจะมีปริมาณสูงกว่า EA จากใบตีนเป็ดทราย แต่ฤทธิ์นี้ไม่สัมพันธ์กับปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (ภาพที่ 3B) แสดงให้เห็นว่า สารประกอบฟีนอลิกน่าจะเป็นกลุ่มสารออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Xcv* เช่นเดียวกันกับที่เคยมีรายงานถึงฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคพืช *Xylella fastidiosa* (Maddox *et al.*, 2010)

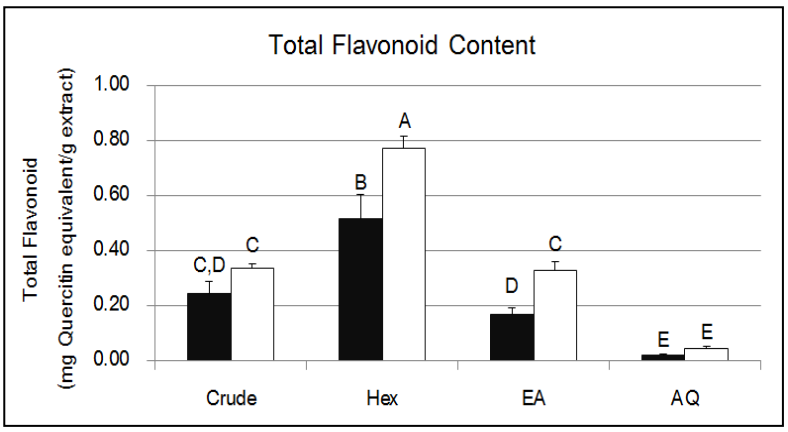


ภาพที่ 2 การเจริญของเชื้อ *Xcv* เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากใบตีนเป็ดทราย (■) และตีนเป็ดน้ำ (□) ที่ความเข้มข้นของ Crude เท่ากับ 2 mg/mL และส่วนสกัดย่อย 1 mg/mL อักษรภาษาอังกฤษบนแท่งกราฟที่แตกต่างกัน (A-F) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการเจริญของเชื้อ *Xcv* ที่ได้รับสารทดสอบชนิดต่างๆ ที่ $p<0.05$

(A)



(B)



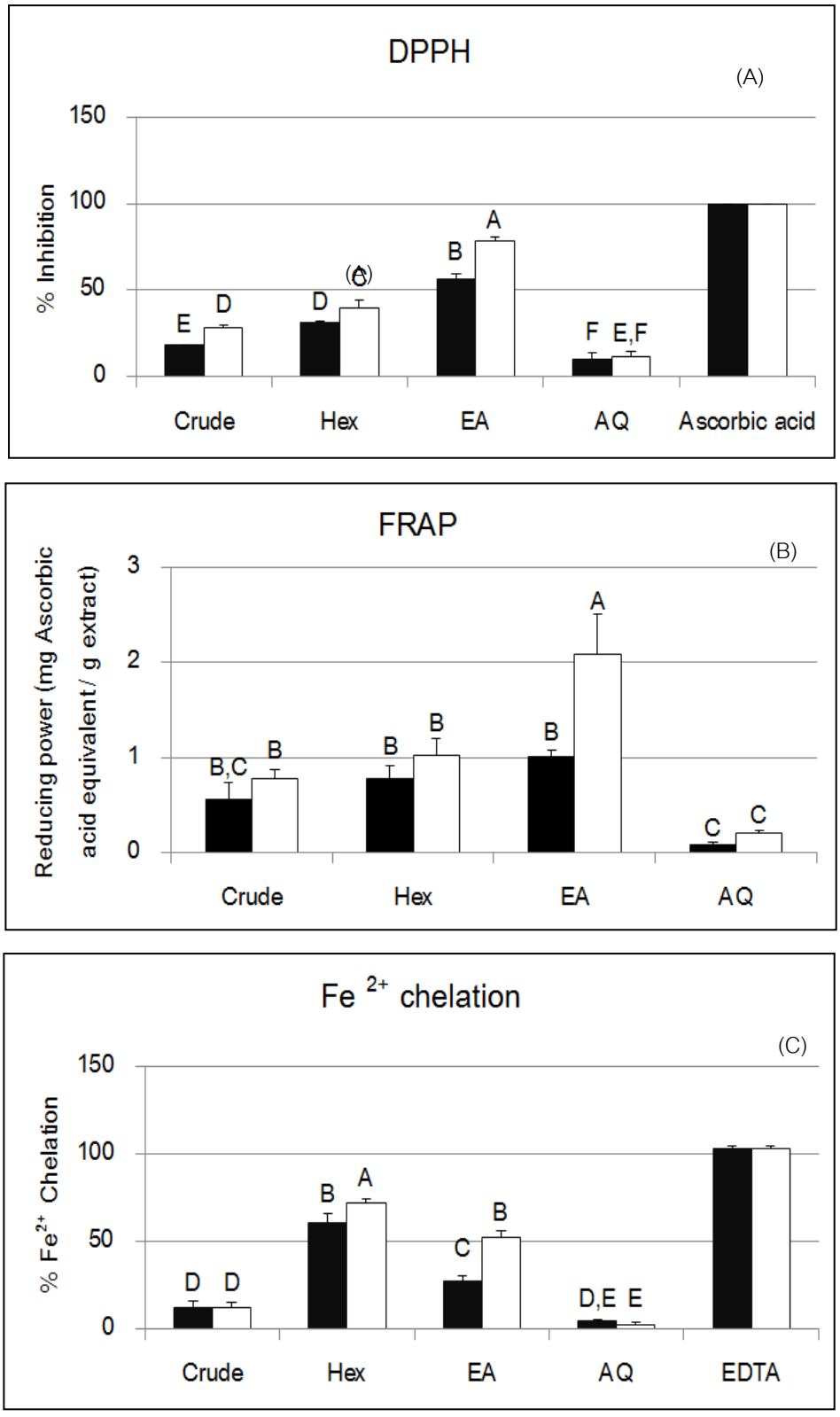
ภาพที่ 3 ปริมาณ (A) สารประกอบฟีนอลิกรวมและ (B) สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดต่างๆ จากใบตีนเป็ดทราย (■) และใบตีนเป็ดน้ำ (□) ตัวอักษรภาษาอังกฤษบนแท่งกราฟที่แตกต่างกัน (A-F) แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกหรือฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสารสกัดแต่ละชนิด ($p<0.05$)

สารสกัดใบตีนเป็ดน้ำสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดใบตีนเป็ดทรายและแปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกหรือฟลาโวนอยด์รวม

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระผ่านกลไกการให้อะตอมไฮโดรเจน การรีดิวซ์ และการจับกับไอออนของ Fe^{2+} ของสารสกัดถูกทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay, FRAP assay และ Fe^{2+} chelation assay ตามลำดับ ผลการทดสอบพบว่า ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL สารสกัดทุกชนิดของใบตีนเป็ดน้ำสามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้ดีกว่าใบตีนเป็ดทราย (ภาพที่ 4A) และส่วนสกัดย่อยจากพืชทั้งสองชนิดมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน (EA > Hex > AQ) อีกทั้งยังพบว่าความสามารถนี้แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดด้วย เมื่อพิจารณาส่วนสกัดจากพืชทั้งสองชนิด พบว่าส่วนสกัด EA จากใบตีนเป็ดน้ำมีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยมีค่า EC_{50} ต่ำที่สุดอยู่ที่ 0.55±0.03 mg/mL (ตารางที่ 2) ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Osei-Djarbeng et al. (2014) ซึ่งรายงานว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากใบ *Funtumia elastica* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Apocynaceae เช่นเดียวกัน มีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่น

เมื่อพิจารณาความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัด พบว่า Crude จากใบตีนเป็ดน้ำสามารถให้อิเล็กตรอนแก่ Fe^{3+} ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบตีนเป็ดทราย (ภาพที่ 4B) และส่วนสกัด EA จากพืชทั้งสองเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีกว่า Hex และ AQ ตามลำดับ โดย EA จากใบตีนเป็ดน้ำมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงถึง 2.08±0.42 มิลลิกรัมวิตามินซีสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด ซึ่งผลที่ได้มีแนวโน้มเช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Sathishkumar & Baskar (2012) ที่ระบุว่าส่วนสกัดน้ำจากใบพืชในวงศ์ Apocynaceae (*Tabernaemontana heyneana*) มีความสามารถในการรีดิวซ์ที่น้อยกว่าสารสกัดในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ นอกจากนี้ ยังพบว่าคุณสมบัติในการให้อะตอมไฮโดรเจนและการรีดิวซ์ของสารสกัดแปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารละลาย (ภาพที่ 3A) โดย Crude ตีนเป็ดน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงกว่าตีนเป็ดทราย และ EA มีปริมาณมากกว่า Hex และ AQ ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดน่าจะมาจากกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในสารสกัดแต่ละชนิดนั่นเอง

สำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติของสารในการจับกับไอออน Fe^{2+} สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้รูปแบบหนึ่ง เนื่องจากไอออน Fe^{2+} มีความไวต่อปฏิกิริยา และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระได้ดี จากการทดลองพบว่าสารสกัด Crude (10 mg/mL) จากพืชทั้งสองชนิดมีความสามารถในการจับกับ Fe^{2+} ได้ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4C) และส่วนสกัดในตัวทำละลายขั้วต่ำมีคุณสมบัติในการเกิด chelation ได้ดีกว่าตัวทำละลายขั้วสูง (Hex > EA > AQ) แต่ Hex และ EA ของใบตีนเป็ดน้ำสามารถเกิด chelation ได้มากกว่าใบตีนเป็ดทราย ทั้งนี้มีรายงานวิจัยระบุว่าส่วนสกัดของใบ *Alstonia scholaris* ในตัวทำละลายขั้วต่ำสามารถสกัดสารที่มีความสามารถในการจับกับไอออนโลหะได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้น (Thakurdesai *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยพบว่าคุณสมบัติการจับกับไอออนโลหะไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสารฟีนอลิกรวม แต่จะแปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมซึ่งจัดเป็นกลุ่มย่อยของสารประกอบฟีนอลิก (ภาพที่3B)



ภาพที่ 4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและจับกับไอออนโลหะของสารสกัดจากใบตีนเป็ดทราย (■) และใบตีนเป็ดน้ำ (□) (A) ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH(B) ความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะ Fe^{2+} (C) ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} (ตัวอักษรภาษาอังกฤษบนแท่งกราฟที่ต่างกัน (A-F) แสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสารสกัดที่แตกต่างกันที่ $p<0.05$)

ตารางที่ 2 ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH (EC_{50}) ของสารทดสอบ

สารทดสอบ		EC_{50}
ใบตีนเป็ดน้ำ	Crude	1.62±0.27 mg/mL
	Hex	1.53±0.34 mg/mL
	EA	0.55±0.03 mg/mL
	AQ	3.97±0.04 mg/mL
ใบตีนเป็ดทราย	Crude	2.98±0.02 mg/mL
	Hex	1.54±0.01 mg/mL
	EA	1.08±0.04 mg/mL
	AQ	>4 mg/mL
Ascorbic acid		13.75±1.02 µg/mL

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดจากใบตีนเป็ดน้ำมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคในพืชและสัตว์ และต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดจากใบตีนเป็ดทราย และมีแนวโน้มที่สารประกอบฟีนอลิกหรือสารประกอบฟลาโวนอยด์จะเป็นกลุ่มสารออกฤทธิ์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับการสนับสนุนงบวิจัยส่วนหนึ่งจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และขอขอบคุณ ศ.ดร.ศกรณ์ มงคลสุข ผศ.ดร. จามร สมณะ และ ดร.สลิล ชั้นโรจน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(17), 7915-7922.

Benzie, I.F. and Strain, J.J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology, 299*, 15-27.

Carter, P. (1971) Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analalytical Biochemistry*, *40*, 450–458.

Chan, E.W.C., Lim, Y.Y. and Omar, M. (2007). Antioxidant and antibacterial activity of leaves of *Etlingera* species (Zingiberaceae) in Peninsular Malaysia. *Food Chemistry*, *104*(4), 1586-1593.

CLSI. (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; Twenty-Second Informational Supplement*. CLSI document M100-S22. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Maddox, C.E., Laur, L.M., and Tian, L. (2010). Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology*, *60*(1), 53-58.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *26*(2), 211-219.

Orhan, D.D., Özçelik, B., Özgen, S. and Ergun, F. (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*, *165*(6), 496-504.

Osei-Djarbeng, S.N., Cutler, S.J., Cutler, R.R. and Corcoran, O. (2014). Fibroblast growth stimulation, DPPH antioxidant assay and antimicrobial activities of *Funtumia elastica* (Preuss) Stapf (Apocynaceae) leaf extracts. *European Journal of Medicinal Plants*, *4*(7), 835-843.

Pandey, K.B. and Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2*(5), 270-278.

Quattrocchi, U. (2012). *CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common Names, Scientific names, Eponyms, Synonyms and Etymology*. Florida: CRC Press.

Rattanasena, P. (2012). Antioxidant and antibacterial activities of vegetables and fruits commonly consumed in Thailand. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *15*(18), 877-882.

Saeed, N., Khan, M.R. and Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *12*(221), 1-12.

Sathishkumar, T. and Baskar, R. (2012). Evaluation of antioxidant properties of *Tabernaemontana heyneana* Wall. leaves. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. *3*(2), 197-207.

Sengul, M., Ercisli, S., Yildiz, H., Gungor, N., Kavaz, A., and Çetin, B. (2010). Antioxidant, antimicrobial activity and total phenolic content within the aerial parts of *Artemisia absinthum*, *Artemisia santonicum* and *Saponaria officinalis*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *10*(1), 49-56.

Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, *299*, 152-178.

Somwang, T. & Wanichwatanadecha, P. (2015). Comparative study of antibacterial activity of extracts from *Cerbera odollam* and *Cerbera manghas* leaves. In *Proceedings of The 7th National Science Research Conference*. (pp. 1-5). Phitsanulok: Naresuan University. (in Thai)

Thakurdesai, P.A., Narayanan, L.S. and Mazumder, P.M. (2010). In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of fractions from *Alstonia scholaris* Linn. R. Br. *American International Journal of Pharmaceutical Technology Research*, *2*(1), 18-25.

Wanichwatanadecha, P., Kasempin, N., Wilatong, S. and Khoonthong, W. (2015) Antibacterial activity of *Cerbera odollam* Gaertn. extract against plant pathogenic *Xanthomonas*. In *Proceedings of Pure and Applied Chemistry International Conference 2015 (PACCON 2015)*. (pp. 501-204). Bangkok*:* The Chemical Society of Thailand under the Patronage of Her Royal Highness Princess Chulabhorn Mahidol and Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi.

World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Geneva: WHO Press.

Xiaoyong, S. and Luming, C. (2014). Phenolic constituents, antimicrobial and antioxidant properties of blueberry leaves (V5). *Journal of Food and Nutrition Research*, *2*(12), 973-979.

Xu, Y., Luo, Q.Q. and Zhou, M.G. (2013). Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance in the phytopathogen *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. *PloS one*, *8*(2), e55962.