วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ (III): M02/26-33, 2559
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 3, Suppl. (III): M02/26-33, 2016

Research article

สารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบราน้ำ

Phytochemical and Antibacterial Studies of the Crude Leaves' Extract from *Limnophila rugosa* (Roth) Merr.

เบญจมาศ หนูแป้น[1*] จาตุรนต์ ทิพย์วงศ์[1] กนกรัตน์ ใสสอาด[1] และ ไซนีย๊ะ สะมาลา[1]
Nupan, B.[1*], Thipwong, J.[1], Saisa-ard K.[1] and Samala, S.[1]

[1] สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี อ. เมือง จ.สุราษฎร์ธานี 84100
[1] Program in Biology, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University, Suratthani, Thailand, 84100

** Corresponding author: kunben_biot@hotmail.com*

บทคัดย่อ

พืชในสกุล *Limnophila* ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์แผนโบราณจำนวนมาก การศึกษาที่ผ่านมารายงานว่าพืชในสกุลนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิดได้ ดังนั้น งานวิจัยในครั้งนี้จึงทำการตรวจสอบสารพฤกษเคมีและศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบราน้ำ (*Limnophila rugosa*) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ ผลการทดลองพบว่า ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์ เบต้าแคโรทีน และไลโคปีนทั้งหมดของใบราน้ำที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทานอลมีค่าสูงกว่าที่สกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นศึกษาสมบัติของสารสกัดจากใบราน้ำต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus subtilis* และ *Vibrio cholerae* ด้วยวิธี agar well diffusion ผลการทดลองพบว่า สารสกัดมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดได้ โดยมีค่าบริเวณวงใสอยู่ในช่วง 0.7±0.00-1.4±0.71 เซนติเมตร ทั้งนี้สารสกัดจากใบราน้ำสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 12.5 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคและเป็นการส่งเสริมให้มีการนำพืชท้องถิ่นมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้น

คำสำคัญ: ราน้ำ สารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

Abstract

Limnophila plants show numerous medicinal applications in the traditional system. The plants are reported to exhibit significant antimicrobial activity. The present study was carried out to investigate phytochemical compositions and antibacterial activities of *Limnophila rugosa* (Roth) Merr. Methanol, ethanol and water crude extracts of *L. rugosa* leaves were evaluated for total phenolic contents, flavonoid, β-carotene and lycopene. The study revealed that the alcoholic extracts obtained significantly higher total phenolic contents, flavonoid, β-carotene and lycopene than distilled water extracts. Aqueous and alcoholic extracts were investigated for antibacterial activity by agar well diffusion method against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Vibrio cholerae*. All strains showed similar sensitivity of aqueous and alcoholic extracts of *L. rugosa* leaves with clear zone area about 0.7±0.00-1.4±0.71 cm. However, it was founded that ethanol crude extract of the plant had high tendency to inhibitory against *S. aureus* with MIC and MBC value of 12.5 and 100 mg/ml, respectively. The extract was found to effective against gram positive and gram negative bacteria. It can be

developed for using as an alternative treatment of infections and encourage the local plant for more benefits.

Keywords: *Limnophila rugosa*, phytochemicals, antibacterial activity

บทนำ

Limnophila (วงศ์ Scrophulariaceae) มาจากภาษาละตินที่มีความหมายว่า pond-loving ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการดำรงอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีน้ำ พืชในสกุล *Limnophila* พบได้ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แอฟริกา และออสเตรเลีย ในประเทศไทยพบสายพันธุ์ *L. rugosa* (Roth) Merr. มีชื่อไทยว่า ราน้ำ มีชื่อพื้นเมืองตามท้องถิ่นต่างๆ คือ ผักกระโฉม กระออม นางออม โป่ง ผักชะออม และกุหล่ำ (ชัยพร นุภักดิ์, 2551) พืชราน้ำเป็นไม้ล้มลุกมีชื่อสามัญ คือ Marshweed นิยมบริโภคเป็นผักสด มีการเพาะขยายพันธุ์ และจำหน่ายจนกลายเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของชุมชน ราน้ำมีสรรพคุณทางสมุนไพรคือ ทั้งต้นขับเสมหะ แก้ไอ หอบ แน่นหน้าอก ลำต้นใช้สับแล้วตำ พอกแผลพุพอง ส่วนของใบช่วยขับปัสสาวะ แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้แน่นหน้าอกเป็นยาขับลม ลำต้นจะมีน้ำมันหอมระเหย จากรายงานก่อนหน้าพบพืชในสกุล *Limnophila* ประมาณ 40 ชนิด มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและเภสัชวิทยาพบว่า สารสกัดจาก *L. racemosa* และ *L. indica* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* และ *X. malvacearum* ได้ (Dubey *et al*., 2002) น้ำมันหอมระเหยจาก *L. conferta* สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ (Reddy *et al*., 1991) ส่วน *L. rugosa* มีรายงานว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhi* และเชื้อราได้ (Kapil *et al*., 1983) นอกจากนั้น Suksamrarn และคณะ (2003) ยังพบสาร nevadensin (5,7-dihydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavone) และ isothymusin (6,7-dimethoxy-5,8,4'- trihydroxy- flavone) จากสารสกัด *L. geoffrayi* ซึ่งมีสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามงานวิจัยครั้งนี้จะทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพฤกษเคมี จากสารสกัดพืชราน้ำ *L. rugosa* ศึกษาสมบัติการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ รวมทั้งหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration; MIC) และฆ่าเชื้อ (Minimal bactericidal concentration; MBC) ได้ ซึ่งปัจจุบันผู้คนนิยมบริโภคผักพื้นบ้านกันมากขึ้น เพราะคำนึงถึงความปลอดภัยเรื่องสารพิษจากยาฆ่าแมลงและสารเคมีอื่นๆ ทางการเกษตร ราน้ำเป็นพืชท้องถิ่นที่ชาวบ้านบริโภคมาเป็นเวลานานและปัจจุบันคนในชุมชนเริ่มหันมาปลูกเพิ่มขึ้น เพราะเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการและมีสรรพคุณทางยา จากภูมิปัญญาท้องถิ่นทำให้ทราบว่าราน้ำมีสรรพคุณทางสมุนไพร โดยผลจากการวิจัยเรื่องฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชราน้ำที่มากขึ้นจะสนับสนุนองค์ความรู้จากภูมิปัญญาท้องถิ่นและทำให้พืชพื้นบ้านเป็นที่รู้จักถูกนำมาใช้ประโยชน์มากขึ้นและอาจพัฒนาร่วมกับเทคโนโลยีสมัยใหม่ทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีคุณค่าได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมสารสกัดจากใบพืชด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

เก็บตัวอย่างพืชราน้ำจากพื้นที่ อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี จากนั้นนำเฉพาะส่วนใบมาล้างทำความสะอาดและผึ่งให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน ด้วยตู้อบความชื้น และนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องปั่น ตัวอย่างที่ผ่านการอบและบดแล้ว จะถูกสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด เอทานอล เมทานอล และน้ำกลั่น ชั่งตัวอย่างที่บดแล้วใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 25 กรัมต่อขวด จากนั้นเติมตัวทำละลายแต่ละชนิดในปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วนำมากรองเอาส่วนของเหลวออกจากกาก ด้วยผ้าขาวบาง นำสารสกัดที่ได้ เข้าเครื่องระเหยตัวทำละลาย (rotary evaporator) เพื่อทำการแยกตัวทำละลายออกโดยใช้อุณหภูมิการระเหย 45 องศาเซลเซียส จะได้สารในรูปแบบสารสกัดหยาบ

ตรวจดูลักษณะสีและกลิ่นของสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวทำละลาย บันทึกน้ำหนักแห้ง และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้จากการสกัด (Phrompittayarat *et al*, 2007) จากสูตรคำนวณ ดังนี้

เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้จากการสกัด (%) = [น้ำหนักสารสกัดที่ได้ / น้ำหนักตัวอย่างแห้งเริ่มต้น] x 100

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic compounds)

อ้างอิงตามวิธีการของ Singleton และคณะ (1999) คือ นำสารสกัด 1 มิลลิลิตร ผสมร่วมกับ Folin Ciocalteu reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย sodium carbonate (20%) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ได้ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง เขย่าเป็นช่วงๆ เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสาร phenolic อ้างอิงจากกราฟมาตรฐานของ gallic acid (GAL) โดยแสดงปริมาณในหน่วย มิลลิกรัมของ gallic acid ต่อกรัมของสารสกัด (mg GAE/g extract)

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (Flavonoid determination)

อ้างอิงตามวิธีการของ Chang และคณะ (2002) นำสารสกัดปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตรและ 5% $NaNO_2$ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย $AlCl_3.H_2O$ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการกรอง ต่อมาเติม NaOH 1 M ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 275 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายที่มีสีชมพู นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารฟลาโวนอยด์ อ้างอิงจากกราฟมาตรฐานของ quercetin (QU) โดยแสดงปริมาณในหน่วย มิลลิกรัมของ QU ต่อกรัมของสารสกัด

การวิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีนและไลโคปีน (β-carotene and lycopene determination)

อ้างอิงตามวิธีการของ Nagata และ Yamashita (1992) คือ ละลายผงสารสกัด 100 มิลลิกรัมในสารละลายผสม acetone-hexane (4:6) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่านาน 1 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 453, 505 และ 663 นาโนเมตร จากนั้นนำไปคำนวณปริมาณ β-carotene และ lycopene ตามสูตร คือ

$$\beta\text{-carotene (mg/100 ml)} = 0.216\ (A_{663}) - 0.304\ (A_{505}) + 0.452\ (A_{453})$$

$$\text{lycopene (mg/100 ml)} = 0.0458\ (A_{663}) + 0.372\ (A_{505}) + 0.0806\ (A_{453})$$

A คือ ค่าการดูดกลืนแสง

การทดสอบหาปริเวณยับยั้งเชื้อ S. aureus, B. subtilis, E. coli และ V. cholerae ด้วยวิธี agar well diffusion

ดัดแปลงจากวิธีการของ Rauha และคณะ (2000) เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient broth (NB) เขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแบคทีเรียที่เลี้ยงมาปรับปริมาณเชื้อให้เทียบเท่ากับ McFarland No.0.5 (1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แล้วเกลี่ยให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient agar (NA) ทำการเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร บนอาหาร NA ที่มีเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบเกลี่ยไว้แล้ว เติมสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตผลการยับยั้งเชื้อโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ด้วยวิธี Broth dilution technique และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ด้วยวิธี Agar dilution technique

ดัดแปลงจากวิธีการของ Pojananukit และ Kajomcheappunngam (2010) การทดสอบหาค่า MIC ของเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* และ *V. cholerae* ของสารสกัดจากพืชราน้ำ เริ่มต้นนำหลอดทดลอง ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 10 หลอด ทำการดูดอาหารเหลว NB ใส่ลงในหลอดที่ 2-10 หลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วดูดสารสกัดที่ต้องการศึกษาลงในหลอดที่ 1 และ 2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นดูดสารในหลอดที่ 2 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 3 ทำซ้ำทำนองเดียวกันนี้ไปจนถึงหลอดที่ 9 สำหรับหลอดที่ 9 เมื่อผสมสารสกัดและอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ากันได้ดีแล้วดูดสารละลายทิ้งไป 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 10 จะมีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีสารสกัด จึงใช้เป็น positive control จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบที่ปรับปริมาณเชื้อแล้วลงไปในทุกหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง การอ่านผลการหา MIC ให้สังเกตความขุ่นของเชื้อที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด เปรียบเทียบกับ positive control

จากค่า MIC สามารถนำมาหาค่า MBC ได้ โดยนำหลอดที่ไม่มีความขุ่นจากการทดสอบหาค่า MIC ไปเทและเกลี่ย (Spread plate) ลงบนอาหาร NA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้จะสังเกตไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การประเมินผลทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอย่างโดยใช้วิธีของดันแคน (Duncan's new Multiple Range Test : DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสกัดสารสำคัญจากใบราน้ำด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และน้ำกลั่น พบว่าลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอลมีสีเขียวเข้มและหนืด ส่วนสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำกลั่นมีสีน้ำตาลเข้มและหนืด โดยสารสกัดจากใบราน้ำด้วยเมทานอลมีร้อยละของสารสกัดที่ได้มากที่สุด คือ 15.25±0.76 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ สารสกัดจากใบราน้ำด้วยเอทานอลและน้ำกลั่น ได้แก่ 12.25±2.35 และ 11.48±2.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 1

นำสารสกัดใบราน้ำที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยวิธี Folin- Ciocalteu Colorimetric Method เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก พบว่า สารสกัดหยาบใบราน้ำด้วยตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดใกล้เคียงกัน มีค่าเท่ากับ 235.25±12.42 mg GAE/g extract และ 225.95±12.52 mg GAE/g extract ตามลำดับ ตามด้วยสารสกัดใบราน้ำด้วยน้ำกลั่น มีค่าเท่ากับ 103.85±21.29 mg GAE/g extract ดังแสดงใน Table 2 โดยส่วนใหญ่สารประกอบฟนอลิกจะละลายไดดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขั้วสูง ละลายไดเล็กน้อยในน้ำและจะละลายไดดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Walter and Purcell, 1979) เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ โดยวิธี Colorimetric Aluminum Chloride Method เทียบกับสารมาตรฐานเควอร์ซิทิน พบว่า สารสกัดเอทานอลของใบราน้ำมีปริมาณฟลาโวนอยดมากที่สุด (94.17±2.37 mg/g extract) รองลงมา คือ สารสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล (85.17±4.09 mg/g extract) และน้ำกลั่น (8.30±0.31 mg/g extract) ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่า ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเป็นตัวแปรที่สำคัญ เพราะสามารถเป็นตัวกำหนดปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากใบราน้ำ ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ที่เลือกพิจารณา 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และน้ำกลั่น เป็นตัวทำละลายที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดสารมากที่สุด โดยตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอลได้มีงานวิจัยที่นิยมใช้มากที่สุดในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากตัวอย่างทางพฤกษศาสตร์ (Hayouni *et al*., 2007; Pinelo *et al*., 2005; Mazandarani *et al*., 2012) นอกจากสารประกอบฟีนอลิกและ ฟลาโวนอยด์แล้วสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ยังเป็นสารพฤกษเคมีที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน มีรายงานว่าสารกลุ่มแคโรทีนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ลดการติดเชื้อโดยการเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของมนุษย์ (Mohamed *et al*., 2003) เบต้าแคโรทีนและไลโคปีนเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ มีบทบาทสำคัญในการรักษาสุขภาพและยังช่วยลดภาวะการติดเชื้อ ป้องกันเซลล์จากการถูกออกซิเดชั่นและลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคมะเร็ง (Rosati *et al*., 2000; Kong *et al*., 2010) จากการวิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีนและไลโคปีนในสารสกัดหยาบใบราน้ำ พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลมีปริมาณเบต้าแคโรทีนและไลโคปีนสูงมากกว่าสารสกัดใบราน้ำที่ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ทั้งนี้ เนื่องมาจากความมีขั้วของตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยน้ำมีสภาพขั้วสูงสุดตามด้วยเมทานอลและเอทานอล แสดงว่าฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ เบต้าแคโรทีนและไลโคปีนมีสภาพขั้วใกล้เคียงกับเมทานอลและเอทานอล ดังนั้นเมทานอลและเอทานอลจึงเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดใบราน้ำเพื่อตรวจสอบปริมาณสารพฤกษเคมีได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sati และคณะ (2013) ที่ทำการทดลองโดยสกัดสารจากใบแปะก๊วย ซึ่งให้ผลของตัวทำละลายในทำนองเดียวกัน โดยทั่วไปการสกัดเป็นขั้นตอนสำคัญที่จะทำให้ได้มาซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชและส่วนต่างๆ ของพืช ปริมาณ องค์ประกอบและความบริสุทธิ์ของสารออกฤทธิ์ที่ได้จากการสกัดนั้นขึ้นอยู่กับโครงสร้างหรือลักษณะเฉพาะทางเคมีรวมทั้งสภาพขั้วของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จำนวนของตัวอย่าง และสภาวะหรือวิธีการสกัด เช่น ชนิดของตัวทำละลาย เวลา อุณหภูมิ ตลอดจนสิ่งรบกวนต่างๆ ในขั้นตอนการสกัด เป็นต้น

เนื่องจากสารพฤกษเคมีพวกสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในพืชหลายชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Sukumaran *et al*., 2011; Bhargava *et al*., 2012; Jain *et al*., 2012) ดังนั้น จึงทำการศึกษาสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ของสารสกัดใบราน้ำ โดยทดสอบหาบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ด้วยวิธี agar well diffusion ทดสอบกับเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *E. coli, B. subtilis* และ *V. cholerae* พบว่า สารสกัดจากทั้ง 3 ตัวทำละลายมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยมีค่าบริเวณวงใสใกล้เคียงกันประมาณ 1 เซนติเมตร แต่ยังน้อยกว่า streptomycin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (positive

control) ดังแสดงใน Table 3 เมื่อทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (MIC) พบว่า สารสกัดจากใบราน้ำด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีแนวโน้มที่จะยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 12.5 mg/ml รองลงมา คือ สารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 25 mg/ml ส่วนการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) พบว่า สารสกัดหยาบจากใบราน้ำทุกตัวทำละลายสามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 100 mg/ml ดังแสดงใน Table 4 สอดคล้องกับงานวิจัยของ รัตนา (2547) ซึ่งศึกษาผลของพืชสมุนไพรพื้นบ้าน 9 ชนิด ที่นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล และเมทานอล พบว่า สารสกัดสมุนไพรที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายจะให้ผลดีที่สุด

จากการศึกษาผลของใบราน้ำที่นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และน้ำกลั่น พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้มีสีและความหนืดที่แตกต่างกันซึ่งอาจขึ้นอยู่กับสมบัติการมีขั้วของตัวทำละลายต่างชนิดกันจะมีผลต่อสารสกัดที่ได้ โดยใบราน้ำที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทานอลสามารถละลายสีออกมาได้มากกว่าน้ำกลั่น เมื่อพิจารณาผลผลิตพบว่า สารสกัดจากเมทานอลให้ผลผลิตสูงสุด จากการศึกษาสารพฤกษเคมี พบว่า เมทานอลและเอทานอลมีความสามารถในการสกัดสารสำคัญจากใบราน้ำได้ใกล้เคียงกัน เนื่องจากเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการละลายกว้างมาก ส่วนมากใช้ในการสกัดองค์ประกอบสำคัญที่มีขั้วและยังใช้ทำละลายเอนไซม์ในพืชเช่นเดียวกับเอทานอล แต่นิยมใช้เอทานอลมากกว่าเพราะราคาถูกกว่าและเป็นพิษน้อยกว่า เอทานอลยังเป็นตัวทำละลายที่ดีมากมีความไวในการละลายมากกว่าน้ำและยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย เมื่อนำมาสกัดสารจะสามารถระเหยเอาตัวทำละลายออกได้ง่ายกว่าน้ำ (ประเสริฐ, 2528) เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีที่ศึกษากับฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่ามีแนวโน้มไปในทางเดียวกันคือถ้าสารสกัดใบราน้ำมีปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ เบต้าแคโรทีนและไลโคปีนปริมาณมากจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสูงด้วยเช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Esekhiagbe *et al*., 2009; Sengul *et al*., 2009) มีกลไกในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำลายเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (cytoplasmic membrane) และเยื่อหุ้มเซลล์ของโปรตีน (membrane protein) (Hayriye and Melissa, 2015) ส่วนสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์หลายชนิดสามารถมีฤทธิ์เสริมกับยาปฏิชีวนะบางตัวยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (Liu *et al*., 2000; Sato *et al*., 2004) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าใบราน้ำอาจเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในมนุษย์ได้ ดังนั้น อาจมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำใบราน้ำมาประยุกต์ใช้ในด้านอาหาร โภชนาการ เภสัชกรรม และทางการแพทย์

สรุปผล

ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด คือ เมทานอล เอทานอล และน้ำกลั่น มีความสามารถในการสกัดสารออกฤทธิ์จากใบราน้ำได้ โดยสารสกัดจากเอทานอลและเมทานอลมีสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ เบต้าแคโรทีน และไลโคปีนมากกว่าสารสกัดใบราน้ำจากน้ำกลั่น เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ พบว่า สารสกัดจากทั้ง 3 ตัวทำละลายมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เมื่อทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ พบว่า สารสกัดจากใบราน้ำด้วยเอทานอลมีแนวโน้มที่จะยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 12.5 mg/ml ส่วนการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ พบว่า สารสกัดจากใบราน้ำทุกตัวทำละลายสามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้ที่ความเข้มข้น 100 mg/ml

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณรายได้ประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานีที่อนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้ จนงานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

ชัยพร นุภักดิ์. 2551. ราน้ำผักพื้นบ้านท้องถิ่น. เข้าถึงได้จาก: http://www.vcharkarn.com/varticle/37351 [เข้าถึงเมื่อ 20 มีนาคม 2559)

ประเสริฐ ศรีไพโรจน์. 2528. เทคนิคทางเคมี. มหาสารคาม: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Bhargava, S., Dhabhai, K., Batra, A., Sharma, A. and Malhotra, B. 2012. Zingiber officinale: Chemical and phytochemical screening and evaluation of its antimicrobial activities. J. Chem. Pharm. Res. 4: 360-364.

Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. Food Drug Anal. 10: 178–182

Dubey, V. 2002. Screening of some extracts of medicinal plants for antimicrobial activity. Indian J. Mycol. Plant Pathol. 32: 266-267.

Esekhiagbe, M., Agatemor, M. M. U. and Agatemor, C. 2009. Phenolic content and antimicrobial potentials of *Xylopia aethiopica* and *Myristica argentea*. Maced. J. Chem.Chem. Eng. 28: 159–162.

Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, M. and Hamdi, M. 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. Food Chem. 105: 1126-1134.

Hayriye, C. K. and Melissa, C. N. 2015. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia coli*. Food Bioscience. 2: 8–16.

Jain, S. C., Pancholi, B., and Jain, R. 2012. Antimicrobial free radical scavenging activities and chemical composition of *Peltophorum pterocarpum* Baker ex K. Heyne stem extract. Der Pharma Chemica. 4: 2073-2079.

Kapil, V. B., Sinha, A. K. and Sinha, G. K. 1983. Essential oil from the leaves of *L. rugose* exhibits significant anti-bacterial and anti-fungal activities. Bull. Med. Ethnobot. Res. 4: 124-129.

Kong, K. W., Ismail, A., 2011. Lycopene content and lipophilic antioxidant capacity of by-products from *Psidium guajava* fruits produced during puree production industry. Food Bioprod. Process. 89: 53-61.

Liu, I. X., Durham, D. G., and Richards, R. M. E. 2000. Baicalin synergy with β-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other β-lactam-resistant strains of *S. aureus*. J. Pharm. Pharmacol. 52: 361-366.

Mazandarani, M., Zarghami, M. P., Zolfaghari, M. R., Ghaemi, E. A. and Bayat, H. 2012. Effect of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in Onosma dichroanthum Boiss. J. Med. Plants Res. 28: 4481-4488.

Mohamed, M. S., El Mougi, M. T., Mansour, E. H., and Saad, H. H. 2008. Administration of lycopene and betacarotene decreased risks of pneumonia among children. Pak. J. Nutr. 7: 273-277.

Nagata, M. and Yamashita, I. 1992. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish. 39: 925–928.

Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Wittayaareekul, S., Jetiyanon, K. and Ingkaninan, K. 2007. Determination of saponin glycosides in *Bacopa monnieri* by RP HPLC. Srinakharinwirot Journal of Pharmaceutical Sciences 2: 26-32.

Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J. and Nunez, M.J. 2005. Effect of solvent, temperature, solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extract from different component of grape pomance. J. Agric. Food Chem. 53: 2111-2117.

Pojananukit, N. and Kajomcheappunngam, S. 2010. Antimicrobial activity test of herbal plants extractrant on acne-inducing a plants extractrant on acne-inducing bacteria. Proceeding of the 8st Annual Conference in Engineering, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand, 22-23 April 2010, pp. 148-156.

Rauha, J., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahaonen, M. and Kujala T. 2000. Antimicrobial effects of finished plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. Int J Food microbial. 56: 3-12.

Reddy, G. B. S., Melkhani, A. B., Kalyani, G. A., Rao, J. V., Shirwaikar, A., Kotian, M., Ramani, R., Aithal, K. S., Udupa, A. L., Bhat, G. and Srinivasan, K. K. 1991. Chemical and Pharmacological Investigations of *Limnophila conferta* and *Limnophila heterophylla*. Int. J. Pharm. 29: 145-153.

Rosati, C., Aquilani, R., Dharmapuri, S., Pallara, P., Marusic, C., Tavazza, R., Bouvier, F., Camara, B. and Giuliano, G. 2000. Metabolic engineering of betacarotene and lycopene content in tomato fruit. Plant J. 24: 413-419.

Sati, P., Pandey, A., Rawat, S. and Rani, A. 2013. Phytochemicals and antioxidants in leaf extracts of *Ginkgo biloba* with reference to location, seasonal variation and solvent system. J. Pharm. Res. 7: 804-809.

Sato, Y., Shibata, H., Arakaki, N., and Higuti, T. 2004. 6,7-Dihydroxyflavone dramatically intensifies the susceptibility of methicillin-resistant or –sensitive *Staphylococcus aureus* to beta-lactams. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 1357-1360.

Sengul, M., Yildiz, E., Gungor, N., Cetin, B., Eder, Z. and Ercisli, S. 2009. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. Pak. J. Pharm. Sci. 22: 102-106.

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 Enzymol. 299: 152-178.

Suksamrarn, A., Poomsing, P., Aroonrerk, N., Punjanon, T., Suksamrarn, S. and Kongkun, S. 2003. Antimycobacterial and Antioxidant Flavones from *Limnophila geoffrayi*. Arch Pharm Res. 26: 816-820.

Sukumaran, S., Kiruba, S., Mahesh, M., Nisha, S. R., Miller, P. Z., Ben, C. P. and Jeeva, S. 2011. Phytochemical constituents and antibacterial efficacy of the flowers of *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Baker ex Heyne. Asian Pac J Trop Med. 4: 735-738.

Walter, W. M., Purcell, A. E. and McCollum, G. K., 1979. Use of high-pressure liquid chromatography for analysis of sweet potato phenolics. J. Agric. Food Chem. 27: 938–941.

Table 1 Characteristics and % yield of crude extract in different solvents.

Solvents	characteristics of extracts	% yield dry weight
Methanol	dark green, sticky	15.25±0.76 [a]
Ethanol	dark green, sticky	12.25±2.35 [b]
Distilled water	dark brown, sticky	11.48±2.21 [b]

[a-b] Means with different letters within the same column are significantly different ($P<0.05$)

Each value is expressed as Mean ± S.D. (n=3)

Table 2 Total phenolic, flavonoid, β-carotene and lycopene contents of crude extracts from *L. rugosa* leaves.

Extract	Total phenolics (mg GAE/g extract)	Total flavonoids (mg Qu/g extract)	β-carotene (mg/g extract)	lycopene (mg/g extract)
Methanol	235.25±12.42[a]	85.17±4.09[b]	5.943±0.19[b]	4.017±0.16[b]
Ethanol	225.95±12.52[a]	94.17±2.37[a]	11.408±0.95[a]	5.67±0.22[a]
Distilled water	103.85±21.29[b]	8.30±0.31[c]	0.006±0.01[c]	0.012±0.004[c]

[a-c] Means with different letters within the same column are significantly different (P<0.05)

Each value is expressed as Mean ± S.D. (n=3)

Table 3 Antibacterial activity of crude extracts from *L. rugosa* leaves.

Extract	Inhibition zone (cm)			
	S. aureus	*E. coli*	*B. subtilis*	*V. cholerae*
Methanol	1.10±0.20	1.40±0.71	0.95±0.35	0.90±0.11
Ethanol	1.10±0.00	0.97±0.12	1.00±0.28	0.86±0.04
Distilled water	0.80±0.17	0.85±0.07	0.70±0.00	0.70±0.06
Streptomycin	3.60±0.17	2.60±0.44	4.13±0.40	3.58±0.39
95% Ethanol	NA	NA	NA	NA

NA = No activity

Table 4 The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of *L. rugosa* crude extracts against tested organisms.

Extract	MIC/MBC (mg/ml)			
	S. aureus	*E. coli*	*B. subtilis*	*V. cholerae*
Methanol	25/100	50/100	100/NA	25/100
Ethanol	12.5/100	>100/NA	100/NA	50/100
Distilled water	50/100	>100/NA	50/NA	>100/NA

NA = No activity