ผลของสารสกัดจากเปลือกมังคุด ไพลและน้ำมันไพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

Antibacterial Activity of Peel Extracted from Magosteen (*Garcinia Mangostana* Linn.) and Phlai (*Zingiber Montanum* Koenig) Root Extractedand Phlai Oil

วรรณี สมัปปิโต[1*], ศุภชัย สมัปปิโต[2], ลือชัย บุตคุป[3]

Wannee Samappito[1], Supachai Samappito[2], Luchai Butkhup[3]

Received: 1 May 2016; Accepted: 15 September 2016

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียและปริมาณสารสำคัญในตัวอย่างเปลือกมังคุดและเหง้าไพลที่สกัดด้วยวิธีการแช่ในเอธานอล 95% และน้ำมันไพลที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำจากการทดลองพบว่าน้ำมันไพลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย 8 ชนิดที่ทดสอบ (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Bacillus cereus, B. subtilis, Salmonella typhi, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens* และ *Escherichia coli*) เมื่อใช้วิธี broth microdilution assay โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ต่ำกว่า 12.50 µl/ml องค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์สำคัญของน้ำมันไพลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ Sabinene, Terpinen-4-ol, Terpinene และ Pinene การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันไพลมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ จึงสามารถนำน้ำมันไพลไปประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์กำจัดเชื้อที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อลดการใช้สารเคมี และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรไทยพื้นบ้านอีกทางหนึ่ง

คำสำคัญ: กิจกรรมการต้านแบคทีเรีย พืชสมุนไพร น้ำมันระเหย

Abstract

Antibacterial activity and the chemical composition of mangosteen peel and phlai root extracted by macerationin 95% ethanol and phlai oil extracted by using hydro-distillation were investigated in this study. The result showed that phlai oil was the most effective in inhibiting growth of 8 tested bacteria (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Bacillus cereus, B. subtilis, Salmonella typhi, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens*and*Escherichia coli*), by broth microdilution assaywith the MIC less than 12.50 µl/ml. Major chemical composition in the oil were Sabinene, Terpinen-4-ol, Terpinene and Pinene. The results of antibacterial testing suggest that the phlai oil could be used as that the active ingredient in value added eco-friendly disinfectant products based on Thai traditional herb, replacing some currently conventional chemical agents.

Keywords: antibacterial activity, medicinal plant, essential oil

[1] อาจารย์, ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

[2] รองศาสตราจารย์, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

[2] ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

[1] Corresponding author, Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44000, Thailand*

[2] Associate professor, [3]Assistant professor, Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44000, Thailand

บทนำ

โรคติดเชื้อนับเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในปัจจุบันโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำประกอบกับจำนวนของเชื้อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นก็ยิ่งทำให้โอกาสที่จะรักษาโรคติดเชื้อเหล่านี้ให้หายอย่างรวดเร็วเป็นไปได้ยากยิ่งขึ้นการรักษาในปัจจุบันจะใช้ยาที่ได้จากการสังเคราะห์ซึ่งเป็นสารเคมีมีผลทั้งทำให้เชื้อโรคดื้อยาและมีผลข้างเคียง (side effect) ต่อผู้ป่วยด้วย ดังนั้นนักวิจัยในปัจจุบันจึงได้เริ่มมีการค้นหาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งสมุนไพรมาใช้ในการรักษาเนื่องจากสมุนไพรเหล่านี้มีความหลากหลายทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพโอกาสที่ทำให้เชื้อโรคดื้อยาและผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยจึงมีน้อยกว่าการใช้ยาเคมีสังเคราะห์[1]มากไปกว่านั้นคนไทยในสมัยโบราณอดีตก็นิยมใช้สมุนไพรกันเป็นจำนวนมากเพื่อรักษาโรคอยู่แล้วก่อนที่จะมีการนำยาสังเคราะห์แผนปัจจุบันมาใช้

พืชสมุนไพรมีความหลากหลายขององค์ประกอบทางพฤกษเคมี (phytochemicals) และฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) เนื่องจากสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่สมุนไพรสร้างขึ้นมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทุกส่วนของพืชไม่ว่าจะเป็นราก ลำต้น เปลือก ใบ ผลหรือน้ำมันระเหย (essential oil) ก็จะมีสรรพคุณแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่มีอยู่ในส่วนนั้นๆ การใช้เดี่ยวหรือใช้ร่วมกันก็จะช่วยเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุด *(Garcenia mangostana* Linn.)มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง (*Staphylococcus aureus*) ทั้งสายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์ที่ดื้อยาเพนิซิลลิน สารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ คือ แมงโกสติน (mangostin) และอนุพันธ์ของแมงโกสตินซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเทียบเท่ายาปฏิชีวนะ[2]นอกจากนี้จากรายงานของHabsah และคณะ[3] พบว่าสารสกัดเหง้าไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb) ด้วยไดคลอโรมีเทนแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus substilis* (แบคทีเรียแกรมบวก) และ *Pseudomonas aeruginosa* (แบคทีเรียแกรมลบ) โดยมีค่า MIC เท่ากับ 250 และ 125 µg/แผ่นตามลำดับขณะที่ แสงจันทร์[4] พบว่าสาร Terpinene-4-ol ที่อยู่ในน้ำมันไพลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 2–5 mg/ml จาก

รายงานการวิจัยดังกล่าวข้างต้นทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์เภสัชวิทยาด้านการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและองค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์ของเปลือกมังคุด เหง้าไพลและน้ำมันไพล ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่หาได้ทั่วไปในท้องถิ่น เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาทางการแพทย์และลดการนำเข้าของสารปฏิชีวนะจากต่างประเทศ นอกจากนี้ยังเป็นการสนับสนุนการวิจัยและพัฒนาสมุนไพรไทยให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างคุ้มค่า และทัดเทียมกับต่างชาติ

วัตถุดิบและวิธีการทดลอง

การสกัดสารจากเปลือกมังคุดและเหง้าไพล

นำเปลือกมังคุดหรือเหง้าไพลที่บดไว้แล้ว 1 กิโลกรัม มาสกัดแบบการหมัก (Maceration) ด้วยเอทานอล 95 % ปริมาณ 4 ลิตรเป็นเวลา 7 วันจากนั้นนำมากรองเพื่อแยกกากนำสารละลายที่ได้จากการกรองมาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วย Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 - 47 °C ส่วนที่เหลือนำมาทำเป็นผงแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer นำผงที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาในอุณหภูมิ 4 °C รอการวิเคราะห์

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าไพล

นำตัวอย่างผงแห้งไพล 100-200กรัมใส่ลงในฟลาสแก้วก้นกลมทนไฟ ขนาด 2 ลิตร แล้วเติมน้ำให้ท่วมตัวอย่างแต่ไม่เกิน 3 ใน 4 ของความจุฟลาสประกอบเครื่องกลั่นด้วยไอน้ำ (hydro-distillation) และต่อท่อระบายน้ำหล่อเย็นในท่อควบแน่น เปิดเครื่องกลั่น ตั้งอุณหภูมิที่ 65-70°C เก็บน้ำมันไพลที่ได้ใส่ขวดสีชารอการวิเคราะห์

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียในการทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรีย 8 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis,Bacillus cereus, B. subtilis, Salmonella typhi, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens* และ *Escherichia coli* ที่จะใช้ทดสอบมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียให้ได้ 10^4 CFU/ml ก่อนนำไปเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของตัวอย่าง

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion techniques[5]

การหาบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด เหง้าไพล และน้ำมันไพลที่ความเข้มข้น 1 mg/ml และ 200 µl/ml ตามลำดับ โดยใช้ 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลายทำการปิเปต 5 µl ของสารสกัด ลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อขนาด 6 มิลลิเมตร รวมทั้งหมด 3 ตำแหน่งโดยตัวทำละลาย 10% DMSO เป็น control แล้ววางกระดาษกรองบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ นำ

ไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 ^{0}C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้งแบคทีเรีย (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร โดยจะใช้ Tetracycline (30 µg/ml) เป็นตัวยามาตรฐานในการเปรียบเทียบทำการทดลอง แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของสารสกัดสมุนไพร

การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (MIC) โดยทำการทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ด้วยวิธี broth microdilution assay ในถาดหลุมแบบ 96 หลุม ที่ปลอดเชื้อ แต่ละหลุมมีปริมาตรเท่ากับ 200 µl ซึ่งประกอบไปด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ปริมาตร 100 µl ทดสอบ 3 สภาวะ คือ

1. สภาวะที่ 1 เป็นสภาวะควบคุม ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียอายุ 18 ชั่วโมงมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4 log CFU/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นเป็นสองเท่า (2 x สูตรความเข้มข้นอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ) ปริมาตร 100 µl กับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 100 µl

2. สภาวะที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพร ประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นเป็นสองเท่าปริมาตร 100 µl เติมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ 50 µl (10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312%, 0.156%, 0.078%. 0.039%, 0.019% w/v) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในปริมาตรทั้งหมดในแต่ละหลุม และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 µl

3. สภาวะที่ 3 เป็นตัวอย่าง Blank ประกอบด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 µl และเติมสมุนไพรที่ความเข้มข้นเดียวกับที่ทดลองในสภาวะที่ 2 ปริมาตร 50 µl แต่ไม่เติมเชื้อ เพื่อขจัดค่ารบกวนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อและสีของสารสกัดสมุนไพร อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 µl

หลังจากเตรียมการทดลองที่สภาวะต่างๆ เรียบร้อยให้นำไมโครเพลทไปเพาะเชื้อที่ อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไมโครเพลทไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบ vertical ความเร็ว 70 rpm เป็นเวลา 5 นาทีก่อนทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 630 nm (OD_{630} nm) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงสำหรับไมโครเพลท เพื่อหาค่า MIC ที่เวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง), 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

วิธีการหาค่า MIC จากการทดสอบประสิทธิภาพสารยับยั้งด้วยวิธี broth microdilution assay เป็นการนำค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 630 nm(OD_{630} nm) ของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบชนิดหนึ่งจากสภาวะที่เลี้ยงเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับค่า OD_{630} nm เฉลี่ยของการทดสอบ ชนิดนั้นที่ 0 ชั่วโมง ถ้าค่า OD_{630} nm ของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของชนิดนั้นในสภาวะทรีทเมนต์ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับหรือน้อยกว่าค่า OD_{630} nm เฉลี่ยของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบชนิดเดียวกันที่ 0 ชั่วโมง ค่า OD_{630} nm นั้นเป็นค่า MIC กล่าวคือไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบ หรือสารสกัดนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นที่ทดสอบนั้นๆ

วิธีการหาค่า OD_{630} nm ของเชื้อจากสภาวะที่ 24 ชั่วโมง ทำโดยการนำค่า OD_{630} nm ของเชื้อจากสภาวะดังกล่าวหักออกด้วยปัจจัยที่รบกวนค่า OD_{630} nm ของเชื้อ ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

1. OD_{630} nm สภาวะควบคุม - OD_{630} nm สภาวะที่ 3 เป็นตัวอย่าง Blank ค่าที่ได้คือค่าดูดกลืนแสงของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมสารสกัดสมุนไพร แต่กำจัดค่ารบกวนการดูดกลืนแสงของสีอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว

2. OD_{630} nm สภาวะที่ 2 - OD_{630} nm เป็นตัวอย่าง Blank ค่าที่ได้คือค่าดูดกลืนแสงของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมสารสกัดสมุนไพร แต่กำจัดค่ารบกวนการดูดกลืนแสงของสีของสารสกัดสมุนไพรแล้ว

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพล

นำน้ำมันหอมระเหยจากไพลมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry (GC—MS) นำน้ำมันไพลมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 µm แล้วจึงนำตัวอย่างมา 1 ml เพื่อใช้ในการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้ อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 45°C และเพิ่มขึ้นในอัตรา 5°C ต่อนาที จนถึง 100°C จากนั้นเพิ่มขึ้นในอัตรา 3°C ต่อนาที จนถึง 150°C และคงอยู่ที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเพิ่มขึ้นในอัตรา 6°C ต่อนาที จนถึง 200°C ซึ่งจะใช้เวลาทั้งหมด 37 นาที อุณหภูมิ injection port ที่ 280°C และ detector transfer line ที่ 250°C ใช้คอลัมน์ขนาด 30 m × 0.25 mm Rtx® -5MS (Crossbond 5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane) ซึ่งฉาบฟิล์มหนา 0.25 µm ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊ซพาที่อัตราไหล 51.6 cm ต่อวินาที ใช้โหมดการฉีดแบบ split และใช้อิเล็กตรอนที่ความต่างศักย์ 70 eV ใช้สแกนโหมดอยู่ในช่วง 40-500 amu จำแนกชนิดของสารหอมระเหยด้วยการเทียบ Mass Spectra กับฐานข้อมูลของ Wiley 5.0 (Wiley, New York, NY, USA)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุด สารสกัดจากเหง้าไพล และน้ำมันไพลที่ความเข้มข้น 1 mg/ml สำหรับสารสกัดจากเปลือกมังคุดและเหง้าไพลและน้ำมันไพล 100µl/ml ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 8 ชนิดได้แก่ *S. aureus,S. epidermidis,B. cereus, B.subtilis, S. typhi, P. aeruginosa, S. marcescens* และ *E. coli* พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุด สารสกัดจากเหง้าไพลและน้ำมันไพลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ (Table 1) สาเหตุที่แบคทีเรียแกรมลบมีความต้านทานต่อสารสกัดจากพืชสมุนไพรได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวกเนื่องมาจากแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) และ periplasmic space ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งสารไลโพพอลิแซกคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกจะเป็นตัวกั้นการซึมผ่านของสารต่างๆ ได้ดีขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มีโครงสร้างเหล่านี้สารต่างๆ จึงซึมผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ[6]สารสกัดจากเปลือกมังคุดยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus*, *S. epidermidis* และ *S.aureus* ได้ดีสอดคล้องกับการรายงานของสุคนธ์และคณะ[1] ซึ่งรายงานไว้ว่าสารสกัดเอธานอลและอะซิโตนจากเปลือกมังคุดมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* รายงานของ Chomnawang และคณะ[7] ที่พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวชนิด *S. epidermidis* และ *P. acnes* ได้ดีเนื่องจากเปลือกมังคุดมี mangostin และอนุพันธ์ของ mangostin ที่เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์[8] สารสกัดจากเหง้าไพลและน้ำมันไพลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุด ซึ่งทั้งสารสกัดจากเหง้าไพลและน้ำมันไพลมีประสิทธิภาพสูงมากในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* และ *B. cereus* ในบรรดาเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ *S. aureus, S. epidermidis* และ *B. cereus* มีความไวต่อสารสกัดจากพืชที่ใช้ทดสอบกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ

จากการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* สูงกว่าเชื้อแบคทีเรียอื่นเนื่องจากมีค่า MIC ต่ำสุด (3.13 µg/ml) (Table 2) ขณะที่สารสกัดจากเหง้าไพลมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* สูงกว่าเชื้อแบคทีเรียอื่นเนื่องจากมีค่า MIC ต่ำสุด (3.13 µg/ml) ขณะที่น้ำมันไพลมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* และ *B. cereus* สูงกว่าเชื้อแบคทีเรียอื่นเนื่องจากมีค่า MIC ต่ำสุดเท่ากับ 1.57 และ 3.13 µl/ml ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าส่วนของน้ำมันไพลมีฤทธิ์สูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียซึ่งน้ำมันจากสมุนไพรจะมีฤทธิ์สูงมากกว่าสารสกัดเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kamazeri และคณะ[9] ที่พบว่าน้ำมันของพืชตระกูลขิง (*Curcuma mangga*) ที่ปลูกในมาเลเซียมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และ *B. cereus* สูงโดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.2 และ 11.1 µl/ml ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำตัวอย่างน้ำมันไพลไปวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญต่อไป

Table 1 Antibacterial activity of mangosteen peel and Phlai root ethanolic extractsand Phlai oil.

Microorganisms	Zone of inhibition (mm)			
	mangosteen peel	Phlai root	Phlai oil	Ref*
Gram positive				
Staphylococcus aureus	11.7± 0.5	10.4± 0.4	10.8± 0.7	16.2± 0.6
Staphylococcus epidermidis	10.4± 0.8	14.1± 0.7	15.2± 0.5	18.3± 0.8
Bacillus cereus	12.6± 0.4	15.3± 0.5	16.2± 0.6	20.5± 0.7
Bacillus subtilis	9.5± 0.7	7.6± 0.3	9.3± 0.3	17.8± 0.5
Gram negative				
Salmonella typhi	7.7± 0.2	8.7± 0.2	8.6± 0.2	17.2 ± 0.9
Pseudomonas aeruginosa	8.2± 0.4	7.5± 0.4	9.3± 0.4	19.5 ± 0.7
Serratia marcescens	8.4± 0.5	8.6± 0.3	9.7± 0.2	15.4 ± 0.5
Escherichia coli	9.6± 0.8	8.4± 0.6	10.5± 0.7	17.8 ± 0.4

Data expressed as mean ± standard deviation (SD) including the disc diameter (6 mm), All values were rounded to one decimal place,* Positive control: tetracycline(30 µg/ml).

Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC) of ethanolic extracts from mangosteen peel and Phlai root and Phlai oil.

Microorganisms	mangosteen peel (µg/ml)	Phlai parts	
		root(µg/ml)	oil(µl/ml)
Gram positive			
Staphylococcus aureus	6.25	12.50	6.25
Staphylococcus epidermidis	12.50	3.13	1.57
Bacillus cereus	3.13	6.25	3.13
Bacillus subtilis	6.25	25.00	12.50
Gram negative			
Salmonella typhi	12.50	12.50	6.25
Pseudomonas aeruginosa	12.50	12.50	6.25
Serratia marcescens	50.00	25.00	12.50
Escherichia coli	25.00	50.00	12.50

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพล

จากการนำน้ำมันหอมระเหยจากไพล ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สำคัญด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry (GC-MS) จะได้โครมาโตแกรมของน้ำมันไพลดังแสดงใน (Figure 1) ซึ่งประกอบด้วยพีค 26 พีคใช้เวลาในการวิเคราะห์ 26 นาที และแมสสเปคตรัมของตัวอย่างเมื่อเทียบผลของแมสสเปคตรัมกับฐานข้อมูล NIST ทำให้สามารถระบุชื่อและสูตรโครงสร้างที่เป็นไปได้ของแต่ละองค์ประกอบในน้ำมันไพล รวมทั้งร้อยละของปริมาณผลิตภัณฑ์ ซึ่งได้จากการอินทิเกรตพื้นที่ใต้พีกของโครมาโทแกรมจากเครื่อง GC-MS พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าไพลมีองค์ประกอบของสารหอมระเหยที่สำคัญหลายชนิด ดังแสดงในTable3โดยสามารถแบ่งสารหอมระเหยกลุ่มที่พบได้ 3 กลุ่ม ตามเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใต้พีครวมทั้งหมดได้แก่

1) สารหอมระเหยที่มีสัดส่วนมากที่สุดตั้งแต่ 10% ขึ้นไป ได้แก่ Sabinene มีสัดส่วนสูงที่สุดเท่ากับ 58.49% รองลงมาคือ Terpinen-4-ol มีสัดส่วนเท่ากับ 14.61% เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้พบว่าทั้ง Sabinene และ Terpinen-4-ol มีสัดส่วนในช่วงเดียวกันกับรายงานของ Bua-in และ Paisoo ksantivatana[10]ได้รายงานสัดส่วน Sabinene และ Terpinen-4-ol ในน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าไพลที่เก็บมาจากภาคต่างๆ ในประเทศไทย พบว่า Sabinene และ Terpinen-4-ol มีสัดส่วนอยู่ในช่วง 38.99-47.54% และ 11.50-24.36% ตามลำดับ

2) สารหอมระเหยที่มีสัดส่วนปานกลางตั้งแต่ 1-10% ขึ้นไป ได้แก่ γ-Terpinene (4.27%), β-Sesquiphellandrene (3.31%), β-Pinene (3.24%), β-Phellandrene (2.63%), α-Terpinene (2.15%), α-Pinene (1.97%), β-Myrcene (1.71%), Eucalyptol (1.26%) และ Linalool (1.24%)

3) สารหอมระเหยที่มีสัดส่วนต่ำ มีน้อยกว่า 1% ได้แก่ Linalool acetate (0.82%), Terpinolene (0.72%), Cymene (0.59%), α—Thujene (0.57%), α-Terpineol acetate (0.55%), α-Terpineol (0.28%), Zingibene (0.24%), γ-Elemene (0.19%), α-Thujene (0.09%), γ-Terpinene (0.07%), Campene (0.05%) และ *trans*-Piperitol (0.05%)

จากงานวิจัยของ Wungsintaweekul และคณะ[11] ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านอนุมูลอิสระ และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพลซึ่งปลูกในประเทศไทย พบว่า Terpinen-4-ol มีสัดส่วนสูงที่สุดเท่ากับ 40.65% รองลงมาคือ Sabinene (18.03%), γ-Terpinene (7.02%),p-Cymene (5.72%) และ α-Terpinene (3.42%) จะพบว่ามีกลุ่มของสารหอมระเหยเป็นกลุ่มเดียวกับที่พบในงานวิจัยนี้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Bhuiyan และคณะ[12] ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพลที่ปลูกในประเทศบังคลาเทศ และจากการศึกษาพบว่า Triquinacene,1,4-bis (methoxy) มีสัดส่วนสูงที่สุดเท่ากับ 26.47% รองลงมาคือ (Z)-Ocimene (21.97%), Terpinen-4-ol (18.45%), γ-Terpinene (3.86%), β-Phellandrene (3.49%), Cis-Sabinenehydrate (3.00%) และ β-Sesquiphellandrene (2.45%) อย่างไรก็ตามชนิดและปริมาณสารหอมระเหยในไพลที่ปลูกในประเทศมาเลเซียกลับไม่เหมือนกัน โดยจะเห็นได้จากงานวิจัยของ Kamazeri และคณะ[9] พบว่าไพลมีสารหอมระเหยที่มีสัดส่วนมากที่สุดคือ 2,6,9,9-Tetramethyl-2,6,10-cycloundecatrien-1-one มี

สัดส่วนสูงที่สุดเท่ากับ 60.77% รองลงมาคือ α-Caryophyllene (23.92%), Caryophyllene oxide (4.79%), 1,5,5,8-Tetramethyl-12-oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-diene (3.32%) และ Caryophyllene (2.03%)ความแตกต่างกันของชนิดและปริมาณสารหอมระเหยในน้ำมันไพลนี้เป็นไปได้ว่าเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น พันธุ์ เทคนิคการเพาะปลูก สภาพอากาศ อายุการเก็บเกี่ยว และวิธีการสกัด เป็นต้น

จะเห็นได้ว่าสารประกอบหลักๆ ที่พบในน้ำมันไพล คือ Sabinene, Terpinen-4-ol, Terpinene และ Pinene เมื่อนำสารมาตรฐานเหล่านี้มาสร้างวิเคราะห์เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณพบว่าสามารถเรียงลำดับการออกจากคอลัมน์ได้ดังนี้ α-Pinene (RT=5.550),α-Terpinene (RT=7.625), γ-Terpinene (RT=8.767), Sabinene (RT=9.042) และ Terpinen-4-ol (RT=12.174) (Table 3 and 4)

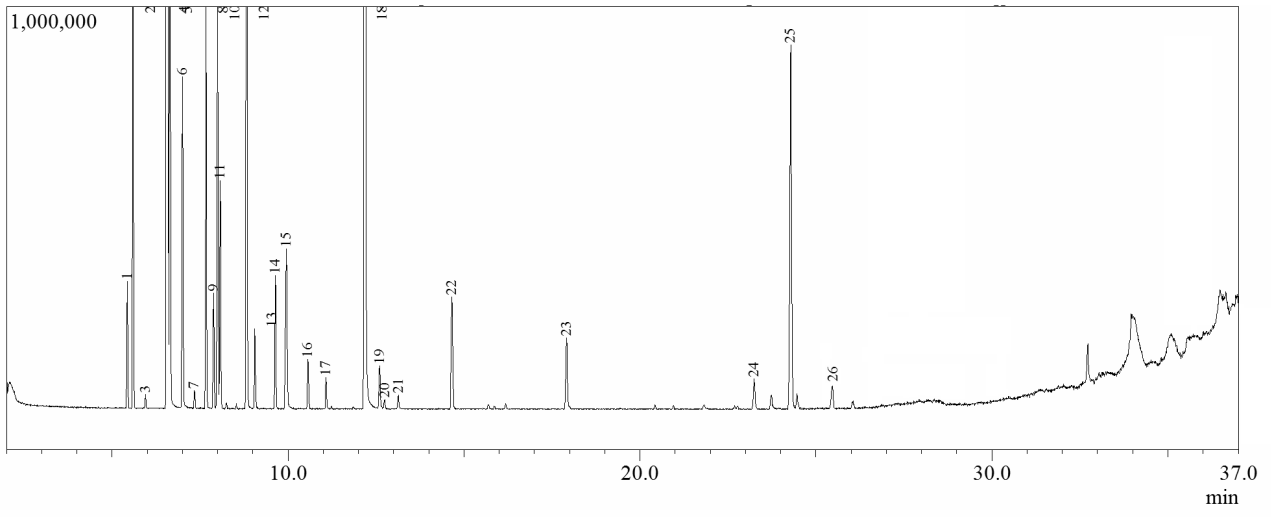

Figure 1 GC-MS chromatogram of Phlai oil

Table 3 Chemical profile of Phlai oil

Peak No.	Compounds	Rt (min.)	Area (%)	% similarity (NIST database)
1	α-Thujene	5.435	0.57	97
2	α-Pinene	5.597	1.97	98
3	Campene	5.953	0.05	88
4	Sabinene	6.566	58.49	96
5	β-Pinene	6.645	3.24	97
6	β-Myrcene	7.003	1.71	97
7	α-Thujene	7.345	0.09	96
8	α-Terpinene	7.671	2.15	95
9	Cymene	7.885	0.59	96
10	β-Phellandrene	8.000	2.63	92
11	Eucalyptol	8.074	1.26	98
12	γ-Terpinene	8.822	4.27	96
13	Sabinene	9.058	0.44	93
14	Terpinolene	9.642	0.72	96
15	Linalool	9.955	1.24	95

Peak No.	Compounds	Rt (min.)	Area (%)	% similarity (NIST database)
16	Sabinene	10.569	0.27	91
17	Sabinene	11.080	0.17	89
18	Terpinen-4-ol	12.183	14.61	93
19	α-Terpineol	12.600	0.28	93
20	*trans*-Piperitol	12.750	0.05	79
21	γ-Terpinene	13.134	0.07	80
22	Linalool acetate	14.657	0.82	94
23	α-Terpineol acetate	17.914	0.55	90
24	Zingibene	23.244	0.24	89
25	β-Sesquiphellandrene	24.282	3.31	91
26	γ-Elemene	25.466	0.19	85

Table 4 Chemical composition of Phlai oil

Compounds	Rt(min)	Calibration curve	R^2	Content (g/L)	Percentage (%)
α-Pinene	5.550	$Y = 3 \times 10^8X + 2 \times 10^6$	0.9999	0.88 ±0.01	0.39
α-Terpinene	7.625	$Y = 2 \times 10^8X + 3 \times 10^6$	0.9999	1.40 ± 0.02	0.62
γ-Terpinene	8.767	$Y = 2 \times 10^8X + 1 \times 10^6$	0.9970	3.08 ± 0.13	1.36
Sabinene	9.042	$Y = 4 \times 10^7X + 12045$	0.9996	210.66 ± 2.14	92.68
Terpinen-4-ol	12.174	$Y = 2 \times 10^8X - 1 \times 10^6$	0.9984	11.29±1.16	4.96

Data express as mean±standard deviation (n = 3)

เมื่อวิเคราะห์น้ำมันไพลด้วยเครื่อง GC-MS โดยเปรียบเทียบแมสสเปคตรัมของตัวอย่างกับและแมสสเปคตรัมของสารมาตรฐานและแมสสเปคตรัมจากฐานข้อมูลของ NIST ได้ผลดังแสดงไว้ใน (Table 4) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากไพลมีปริมาณ α-Pinene, α-Terpinene, γ-Terpinene, Sabinene และ Terpinen-4-ol เท่ากับ 0.88, 1.40, 3.08, 210.66 และ 11.29 g/L ตามลำดับโดยพบ Sabinene เป็นสารหอมระเหยที่พบมากที่สุดในน้ำมันไพล คิดเป็นสัดส่วน 92.68%รองลงมาคือ Terpinen-4-ol และ γ-Terpinene ในขณะที่พบ α-Pinene ปริมาณต่ำที่สุด จากรายงานการวิจัยของ Obame และคณะ[13] รายงานไว้ว่าในผล African pear หรือ Safou ของแอฟริกามีองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่สำคัญคือ sabinene (21.8%), terpinene-4-ol (19.8%) และ α-pinene (17.5%) สารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูงอีกด้วย

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันไพลประกอบไปด้วยสารออกฤทธิ์สำคัญในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ Sabinene, Terpinen-4-ol, Terpinene และ Pinene มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, B. cereus* และ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารหรือมีส่วนในการทำให้อาหารเน่าเสียจึงมีความเป็นไปได้ในการนำน้ำมันไพลไปพัฒนาเป็นสารถนอมอาหารชนิดใหม่เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหารหรือใช้ในการรักษาโรคทางเดินอาหารที่เกิดจากแบคทีเรียเหล่านี้นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. epidermidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวจึงมีความเป็นไปได้ในการนำน้ำมันไพลไปพัฒนาเป็นเครื่องสำอางรักษาสิวได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่อำนวยความสะดวกในการเครื่องมือ และสถานที่ในการทดลอง จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

เอกสารอ้างอิง

1. สุคนธ์ ตันติไพบูลย์ วุฒิเทียนชัย น่วมเศรษฐี เพชรลดา เดชายืนยง. ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลไม้บางชนิด. KKU Res J 2012;17:880-94.
2. Tadtong S, Viriyaroj A, Vorarat S, Nimkulrat S, Suksamrarn S. Antityrosinase and antibacterial activitiesof mangosteen pericarp extract. J Health Res 2009;23:99-102.
3. Habsah M, Amran M, Mackeen MM. Sceening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. J Ethnopharmacol 2000;72: 403-10.
4. แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ.การศึกษาผลของสมุนไพรบางชนิดในวงศ์ซิงกิเบอเรซี (Zingiberaceae) ต่อการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด.รวมบทคัดย่องานวิจัยการแพทย์แผนไทยและทิศทางการวิจัยในอนาคตสถาบันการแพทย์แผนไทย 2543;207.
5. นุศวดี พจนานุกิจ สมใจ ขจรชีพพันธ์งาม. การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อเกิดสิวของสารสกัดจากพืชสมุนไพร. ภาควิชาวิศวกรรมเคมีคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น2553.
6. Shan B, Cai Y-Z, Brooks JD, Corke H. The *invitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. Int J Food Microbiol 2007;117:112-9.
7. Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. J Ethnopharmacol 2005;101:330-3.
8. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตรเมตตา องค์สกุลลัดดา นิลรัตน์ ประสิทธิ์ ธราวิจิตรกุล ศิริพรรณ บุญชู ธวัชชัย เชื้อประไพศิลป์ พิเชษฐ์ วิริยะจิตรา. ฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกมังคุดต่อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin (MRSA) และ *Enterococcus* species. วารสารสงขลานครินทร์, 2537. 16:399-405.
9. Kamazeri TSAT, Samah OA, Taher M, Susanti D, Qaralleh H. Antimicrobial activity and essential oils of *Curcuma aeruginosa*, *Curcuma mangga*, and *Zingiber cassumunar* from Malaysia. Asian Pac J Trop Med 2012;5:202-9.
10. Bua-in S, Paisooksantivatana Y. Essential oil and antioxidant activity of cassumunar ginger (Zingiberaceae: *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr.) collected from various parts of Thailand. Kasetsart J (Nat Sci)2009;43:467-75.
11. Wungsintaweekul J, Sitthithaworn W, Putalun W, Pfeifhoffer HW, Brantner A. Antimicrobial, antioxidant activities and chemical composition of selected Thai spices. Songklanakarin J Sci Technol 2010; 32:589-98.
12. Bhuiyan MNI, Chowdhury JU, Begum, J. Volatile constituents of essential oils isolated from leaf and rhizome of *Zingiber cassumunar* Roxb. Bangladesh J Pharmacol 2008; 3: 69-73.
13. Obame LC, Edou P, Bassolé IHN, Koudou J, Agnaniet H, EbaF, Traore AS. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oil of *Dacryodes edulis* (G. Don) H. J. Lam from Gabon. Afr J Microbiol Res 2008;2:148-52.