การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบห้อม

Biological activity of crude extract from leaves of *Strobilanthes cusia (Nees) Kuntze*

วิมลวรรณ วัฒนวิจิตร[1] นราทร สุขวิเสส[1] ประยูร เอ็นมาก[1]
ประนอม ใจอ้าย[2] ศิวัช พลายเสน[1] นภัสสร เลียบวัน[1]
Wimonwan Wattanawichit[1] Narathorn Sukwises[1] Prayoon Enmak[1]
Pranom Chaiai[2] Siwat Plaisen[1] Napatsorn Leabwan[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบห้อมดำเนินการทดลองที่กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ระหว่างปี 2561 – 2562 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนังของสารสกัดใบห้อมจากตัวทำละลาย 3 ชนิดได้แก่ น้ำ เอทานอล และเอทิลอะซีเตด พบว่าสารสกัดใบห้อมจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH· และ ABTS· ต่ำกว่าวิตามินซี โดยสารสกัดใบห้อมด้วยเอทานอลจะมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงกว่าสารสกัดใบห้อมจากตัวทำละลายอีก 2 ชนิด โดยสารสกัดใบห้อมด้วยเอทานอล และเอทิลอะซีเตด มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ได้ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *S. aureus S. epidermidis B. subtilis C. albicans* และ *P.acnes* ส่วนสารสกัดใบห้อมด้วยน้ำความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. Aureus S. epidermidis* และ *P.acnes* โดยสารสกัดใบห้อมด้วยเอทานอลและเอทิลอะซีเตดมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* เท่ากับ 15.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสารสกัดใบห้อมด้วยเอทานอลมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหรือยาได้ เนื่องจากมีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าสารสกัดห้อมด้วยน้ำ และให้ปริมาณสารสกัดสูงกว่าสารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตด นอกจากนี้ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลไฟโบรบลาสท์ผิวหนังของมนุษย์ ฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลอง ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และ ฤทธิ์สมานแผลในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ของสารสกัดใบห้อมด้วยเอทานอล พบว่าสารสกัดห้อมมีความปลอดภัยต่อเซลล์ผิวหนังเซลไฟโบรบลาสท์ผิวหนังของมนุษย์ และมีฤทธิ์สมานแผลในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและต้านการอักเสบ

คำหลัก : ฤทธิ์ทางชีวภาพ สารสกัดใบห้อม

---

[1] กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูผผลิตผลเกษตร
[1] Postharvest and Processing Research and Development Division
[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรแพร่
[2] Phrae Agricultural Research and Development Center

ABSTRACT

Biological activity of crude extract from leaves of Strobilanthes cusia (Nees) Kuntze was performed during 2018 – 2019 at Postharvest and Processing Research and Development Division. The objective of this study was to investigate antioxidant activity and antibacterial activity of the extracts of *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze leaves by three solvent, water, ethanol and ethyl acetate. The result found that antioxidant activity by scavenging of the stable radical DPPH and ABTS assay of the leaves of *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze extract was lower than vitamin C. The highest antioxidant activity was the ethanol extract. The ethanol and ethyl acetate extract exhibited antibacterial activity against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *C. albicans* and *P. acnes*. While the water extract exhibited antibacterial activity against *S. aureus, S. epidermidis* and *P.acnes*. The minimum inhibitory concentration of ethanol and ethyl acetate extracts to against S. epidermidis were 15.62 mg/ml. Thus, the extract from ethanol of leaves of *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze was the most appropriate extract to apply in cosmetic product and medicine because the ethanol extract had lower minimum inhibitory concentration to against skin pathogen than the water extract and higher yield than the ethyl acetate extract. Moreover, Cytotoxicity of human fibroblast cell, anti-inflammatory activity, anti-tyrosinase activity and wound healing potential of ethanol extract were studied. The result found that the extract was very safe for human fibroblast cell and had wound healing potential without anti-tyrosinase activity and anti-inflammatory activity.

Key words: bioactivity, Strobilanthes cusia (Nees) Kuntze extract

คำนำ

ห้อม เป็นพืชที่ให้สีครามเหมือนกับต้นครามแต่เป็นพืชต่างวงศ์กัน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze หรือ *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek. หรือ อยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีชื่อเรียกแตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่น ได้แก่ ห้อม ห้อมเมือง (เหนือ) แม่ฮ่องสอน เรียกครามดอย น่านเรียกห้อมเมือง ห้อมหลวง และที่เชียงใหม่ เชียงราย แพร่ ลำปาง เรียกห้อมน้อย เมื่อนำมาหมักในน้ำจะให้สารที่เรียกว่า อินดิแคน (Indican) มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ ไม่มีสี เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนจะเกิดเป็นกลูโคส และสารอินโดซิล (Indoxyl) เมื่ออินโดซิลถูกออกซิไดซ์ด้วยออกซิเจนในอากาศจะได้สารสีน้ำเงิน ที่เรียกว่า อินดิโก (Indigo/Indigo blue) นอกจากจะใช้ใบและต้นมาทำสีน้ำเงินใช้ย้อมผ้ากันมาแต่โบราณแล้ว ห้อมสามารถใช้ประโยชน์ด้านสมุนไพร โดยแพทย์พื้นบ้านไทยใช้รากและใบต้มน้ำดื่ม แก้อาการเจ็บป่วยหลายอย่าง เช่น อาการไข้ ปวดศีรษะเนื่องจากหวัด เจ็บคอ หลอดลมอักเสบ ต่อมทอนซิลอักเสบ ตาอักเสบ แพทย์ญี่ปุ่นในเกาะโอกินาวาใช้ใบต้มน้ำดื่มสำหรับรักษาโรคกลากเนื่องจากมีสารทริปแทนตริน (tryptanthrin) สามารถฆ่าเชื้อรา *Trichophyton rubrum* และ *Trichophyton mentagrophytes* และสารสกัดจากใบห้อมสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ซึ่งทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ (Shahni and Handique, 2013)

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชและสารสกัดจากพืชได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอางได้ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติสำคัญและได้รับความสนใจอย่างมาก คือ เป็นสารต้านการออกซิเดชั่นซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ (free radical) ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมตามปกติของร่างกาย หรือเกิดจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมา เพื่อสู้กับเชื้อโรคบางชนิด หรือเกิดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ สารเคมีและสิ่งปนเปื้อนที่มากับอากาศ สารเติมแต่งอาหาร หรือสารเคมี ต่างๆ ที่ใช้ในการเกษตร ฯ สารต้านอนุมูลอิสระจึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคและความชรา ทำให้มนุษย์เราต้องรับประทานอาหารที่เป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันได้แก่ วิตามิน เอ, วิตามิน ซี, วิตามิน อี, และสารสกัดจากพืชหลายชนิด การวิเคราะห์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระสามารถทำได้หลายวิธี โดยวิธีที่ที่นิยมใช้ได้แก่ 2, 2-azobis (3-ethylbenzothialzoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ the oxygen radical absorption capacity (ORAC) (Awika, et al., 2003) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันในการสร้างเม็ดสีเมลานินที่ผิวหนังให้เกิดเร็วขึ้น การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจะสามารถช่วยลดปริมาณเมลานินที่มากเกินไปส่งผลให้ผิวขาวขึ้นและลดความผิดปกติของผิวหนังได้ (Lee, et al., 2009) และฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ คือความสามารถในการยับยั้งการเจริญ หรือความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยการทดสอบความต้านทานของเชื้อต่อยา ซึ่งมีวิธีการหลักอยู่ 2 แบบคือ dilution method และ agar diffusion method (รัชฎาพร และคณะ, 2554) โดยผิวหนังจัดเป็นอวัยวะของร่างกายที่มีโอกาสพบจุลินทรีย์ในอากาศได้มากที่สุด แต่แบคทีเรียในอากาศนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตบนผิวหนังได้เนื่องจากเป็นสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ผิวหนังในแต่ละบริเวณจะมีลักษณะโครงสร้างและหน้าที่ที่ต่างกันออกไป ทำให้แบคทีเรียที่ผิวหนังในแต่ละบริเวณต่างกันออกไป จุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนังที่พบทั่วไป เช่น *Bacilus subtilis* เป็นแบคทีเรียอาจก่อให้เกิดโรคผิวหนังอักเสบและเป็นแบคทีเรียที่ผลิตสารละลายใสมีกลิ่นเฉพาะตัวซึ่งเป็นสาเหตุของกลิ่นตัว *Propionibacterium acne* และ *Staphylococcus epidermidis* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อที่ทำให้ฝี ผิวหนังอักเสบ และเป็นแผลติดเชื้อ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการคัดกรองด้านความปลอดภัยของสารเคมี ด้วยการเลือกใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสอดคล้องกับการได้รับสัมผัสสารทดสอบนั้น การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นเครื่องมือและตัวชี้วัดที่สำคัญในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดธรรมชาติ (Vichai and Kirtikara, 2006)

นอกจากนี้สารสกัดธรรมชาติมีการนำมาใช้ในการรักษาโรคมาเป็นเวลานาน การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบซึ่งเป็นการกระบวนการที่ร่ายกายตอบสนองต่อการติดเชื้อจุลินทรีย์และสิ่งแปลกปลอมที่อันตรายต่อร่างกาย อาการที่ปรากฏคือบวมแดง และร้อน เกิดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบ เช่นไนตริกออกไซด์ พรอสตาแกนดิน E_2 เป็นต้น ซึ่งการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบมากเกินไปทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้ เช่นไขข้ออักเสบ พาร์กินสัน และโรคอักเสบต่าง ๆ (Chandra, et al., 2012) และฤทธิ์สมานแผล เมื่อผิวหนังและเนื้อเยื่อได้รับบาดเจ็บไม่ว่าจะเป็นแผลเล็กหรือแผลขนาดใหญ่ จะทำให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองของการสมานแผลหรือการหายของแผล โดยการหายของแผลจะขึ้นอยู่กับการมีเลือดนำสารอาหารและออกซิเจนไปเลี้ยง

เนื้อเยื่ออย่างเพียงพอ เพื่อช่วยซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ ซึ่งการสมานแผลจะช่วยให้เนื้อเยื่อกลับคืนสู่สภาพปกติและทำหน้าที่ได้ปกติที่สุด (Muhammad, et al., 2013) ทำให้สารสกัดธรรมชาติมาใช้รักษาโรคได้ ซึ่งปัจจุบันจึงมีการศึกษาสารธรรมชาติที่สามารถลดการอักเสบหรือสมานแผลได้ดี มีผลข้างเคียงต่ำเพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวาง

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดห้อมเพื่อนำไปสู่การนำสารสกัดห้อมไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และเครื่องสำอางได้ อันจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชท้องถิ่นทางภาคเหนือของไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ใบห้อม จากศูนย์วิจัยพัฒนาการเกษตรแพร่
2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ เช่น เอทานอล เอทิลอะซีเตท อะซีโตน 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)
3. เชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ ได้แก่ *Propipnibacterium acnes* ATCC 6919, *Staphylococcus aureus subsp*. Aureus ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Bacillus subtilis subsp. Spizizenii* ATCC6633 และ *Candida albicans* ATCC 10231
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar plates (MHA), Sabouraud Dextrose agar (SDA) และ Brian Heart Infusion (BHI) agar
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า Metter AE 200
6. UV-Visible spectrophotometer UV-2600 , Shimadzu
7. ตู้บ่มเชื้อ
8. ตู้ laminar air flow

วิธีการ

1. การศึกษาผลของตัวทำละลายในการสกัดห้อมต่อความสามารถต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนัง

1.1 การสกัดสารสกัดห้อมด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

นำใบห้อมสดล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งแล้วอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ใบห้อมแห้งมีลักษณะกรอบ สีของใบห้อมส่วนใหญ่เปลี่ยนสีเทาดำ มีความชื้นเฉลี่ยประมาณร้อยละ 8

นำใบห้อมอบแห้งมาสกัดในตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล เอทิลอะซีเตด และ น้ำ วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 3 กรรมวิธี 7 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร

กรรมวิธีที่ 2 สกัดด้วยเอทิลอะซีเตด ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร

กรรมวิธีที่ 3 สกัดด้วยน้ำ

การสกัดใบห้อมโดยใบห้อมอบแห้ง 100 กรัม ใส่ขวดแก้วเติมตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำ เอทานอล ความเข้มข้น ร้อยละ 95 โดยปริมาตร และ เอทิลอะซิเตด ความเข้มข้น ร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาตร 2000 มิลลิลิตร ปิดฝา ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 สกัดซ้ำ

ด้วยตัวทำละลาย 1500 มิลลิลิตร อีก 6 ครั้ง จนสารละลายที่ได้มีสีอ่อนลง แล้วนำสารละลายที่ได้มารวมกันระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ ชั่งน้ำหนักสารสกัดใบห้อมที่ได้

1.2 การศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดห้อม

การศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดห้อมจะศึกษา 2 วิธีได้แก่

1.2.1 DPPH radical scavenging assay

การศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay ของสารสกัดห้อมจากการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระ วิตามิน ซี ประยุกต์วิธีการวิเคราะห์ Adedapo, et al. (2009) โดยผสมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.135 mM ในเมทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กับสารสกัดห้อมที่นำมาละลายในเมทานอล ความเข้มข้นของสารสกัดตั้งแต่ 0 – 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณค่า % radical scavenging activity ดังสมการ

DPPH radical scavenging activity (%) = $\{(A_0-A_1)/A_0] \times 100$

โดยที่ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงควบคุม

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

นำค่า % radical scavenging activity ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} หรือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ % radical scavenging activity ลดลงร้อยละ 50

1.2.1 ABTS radical scavenging assay

การศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging assay ของสารสกัดห้อมจากการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระ วิตามิน ซี ประยุกต์วิธีการวิเคราะห์ Adedapo, et al. (2009) โดยผสมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 mM และสารละลาย potassium persulfate ความเข้มข้น 2.4 mM ในปริมาตรที่เท่ากัน ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิริยาในที่มืด เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยเมทานอลจนมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เป็น 0.70 นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตรผสมสารสกัดห้อมที่นำมาละลายในเมทานอล ความเข้มข้นของสารสกัด ตั้งแต่ 0 – 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 7 นาที วัดค่าการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร คำนวณค่า % Inhibition ABTS ดังสมการ

% Inhibition ABTS = $\{(A_0-A_1)/A_0] \times 100$

โดยที่ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงควบคุม

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

นำค่า % Inhibition ABTS ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} หรือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ % radical scavenging activity ลดลงร้อยละ 50

1.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนังของสารสกัดห้อม

1.3.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี agar disc diffusion

1) เตรียมสารสกัดและยาปฏิชีวนะ

เตรียมสารสกัดโดยละลายสารสกัดห้อมให้มีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดด้วยน้ำให้ละลายกลับด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ส่วนสารสกัดเอทิตอะซิเตตและเอทานอลให้ละลายกลับด้วย dimethyl sulphoxide (DMSO) และละลายยาปฏิชีวนะ gentamicin และ ketoconazole ให้มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

2) การเตรียมเชื้อทดสอบ

- เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus, B. subtilis, S. epidermidis* ในอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
- เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ในอาหาร Brian Heart Infusion (BHI) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
- เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *C. albicans* ในอาหารเหลว Sabouraud Dextrose broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3) ปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ทดสอบในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้มีค่าเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland Standard โดยใช้ตาเปล่า จะได้ปริมาณเชื้อ 1.5×10^8 cfu/ml

4) นำเชื้อทดสอบมาเกลี่ย (swab) ให้ทั่วบนอาหาร Mueller Hinton agar ยกเว้น *P. Acnes* นำมาเกลี่ยในอาหาร Brian Heart Infusion (BHI) agar และยีสต์ *C. albicans* นำมาเกลี่ยในอาหาร Sabouraud Dextrose agar ด้วยไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ

5) นำ paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จุ่งลงในสารสกัดแล้วผึ่งให้แห้งก่อนนำมาวางบนผิวหน้าอาหารแข็งที่เกลี่ยเชื้อไว้ โดยใช้ paper disc ชุบตัวทำละลายและยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วางเป็นชุดควบคุมสำหรับเชื้อแบคทีเรีย และ ketoconazole ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วางเป็นชุดควบคุมสำหรับเชื้อยีสต์

6) นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *P. acnes* บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสการยับยั้ง

1.3.2 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดห้อมที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) โดยวิธี agar disc diffusion

1) การเตรียมเชื้อทดสอบ

- เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ในอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
- เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *C. albicans* ในอาหารเหลว Sabouraud Dextrose broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2) ปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ทดสอบในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้มีค่าเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland Standard โดยใช้ตาเปล่า จะได้ปริมาณเชื้อ 1.5×10^8 cfu/ml

3) นำเชื้อทดสอบมาเกลี่ย (swab) ให้ทั่วบนอาหาร Mueller Hinton agar และยีสต์ *C. albicans* นำมาเกลี่ยในอาหาร Sabouraud Dextrose agar ด้วยไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ

4) นำสารสกัดห้อมที่มีบริเวณโซนยับยั้งมาเตรียมสารสกัดเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางลงทีละ 2 เท่าด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ส่วนสารสกัดเอทิตอะซิเตตและเอทานอลเจือจางด้วย DMSO จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.06-500 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร

5) นำ paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จุ่งลงในสารสกัดแล้วผึ่งให้แห้งก่อนนำมาวางบนผิวหน้าอาหารแข็งที่เกลี่ยเชื้อไว้ โดยใช้ paper disc ชุบตัวทำละลายและยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วางเป็นชุดควบคุมสำหรับเชื้อแบคทีเรีย และ ketoconazole ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วางเป็นชุดควบคุมสำหรับเชื้อยีสต์

6) นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสการยับยั้ง

1.4 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารสกัดห้อม

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ นอกเหนือไปจากความสามารถต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนังของสารสกัดห้อม ได้แก่ การทดสอบเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดห้อมต่อเซลล์ไฟโบรบลาสท์ผิวหนังของมนุษย์ โดยวิธีของ Ichai and Kirtikara (2006) การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลอง โดยวิธีของ Chandra, et al. (2012) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยวิธีของ Lee, et al. (2009) และการทดสอบฤทธิ์สมานแผลของสารสกัดห้อมในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ โดยวิธีของ Muhammad, et al. (2013) ในตัวอย่างสารสกัดห้อมด้วยเอทานอล โดยทดสอบที่ศูนย์วิจัยสุขภาพและความงามมาโนเช่ จ.เชียงใหม่

ระยะเวลาดำเนินการ ปี 2561 – 2562

สถานที่ดำเนินการ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาผลของตัวทำละลายในการสกัดห้อมต่อความสามารถต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนัง

1.1 การสกัดสารสกัดห้อมด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

การศึกษาการสกัดห้อมด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ ได้แก่ น้ำ สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร และสารละลายเอทิลอะซิเตดความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำเป็นของเหลวสีน้ำตาล ส่วนสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลและเอทิลอะซิเตดจะเป็นของเหลวสีเขียว หลังจากนำสารสกัดที่ได้ระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ จะได้สารสกัดเป็นลักษณะเป็นของข้นหนืดสีน้ำตาลทั้ง 3 ตัวทำละลาย โดยปริมาณสารสกัดที่ได้แสดงดัง Table 1 จะเห็นว่า การสกัดห้อมด้วยน้ำจะได้ปริมาณสารสกัดสูงสุด เฉลี่ย 47.410 กรัม เนื่องจากการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วแตกต่างกันจะทำให้ได้สารสกัดที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน (Sultana, et al., 2009) โดยงานวิจัยของ สุรีย์ และคณะ (2543) ได้รายงานว่าสารประกอบหลักที่ให้สีน้ำเงินของห้อมเป็นสารประกอบกลูโคไซด์ของอินดิแคน (gluoside indican) ซึ่งละลายน้ำได้ เมื่อถูกออกซิไซด์จึงเปลี่ยนเป็นอินดิโก และสารสกัดห้อมที่สกัดด้วยเอทานอลจะประกอบด้วยสารให้สี 2 ชนิดคือ อินดิโก (indigo) ให้สีน้ำเงิน และอินดิรูบิน (Indirubin) เป็นสารสีแดงซึ่งเป็นไอโซเมอร์ของอินดิโกและมีปริมาณมากกว่าอินดิโก

Table 1 Averge extract yield weight of solvent extraction of *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze

Solvent	Extract yield weight (g)
water	47.410 a
95 %v/v ethanol	13.944 b
95 %v/v ethyl acetate	5.401 c

Means within the same column followed by different letter are significantly different (P<0.05) by DMRT test.

1.2 การศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดห้อม

การศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับสารองค์ประกอบและสภาวะในการทดสอบ การทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระนั้นอาจถูกรบกวนจากหลาย ๆ ปัจจัย จึงทำให้ไม่สามารถอธิบายได้จากการทดสอบเพียงวิธีเดียว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระมากกว่าหนึ่งวิธี (Li, et al., 2008) โดยวิธี DPPH radical scavenging assay และ ABTS radical scavenging assay เป็นวิธีแนะนำในการทดสอบในสารสกัดพืชเนื่องจากวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 และ 734 นาโนเมตร ตามลำดับ ช่วยลดการรบกวนจากสีของสารสกัดพืชได้ (Awika, Rooney, Wu, Prior, & Cisneros-Zevallos, 2003) ผลการศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดห้อมจากการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระ วิตามิน ซี แสดงดัง table 2 โดยความความสามารถต้านอนุมูลอิสระแสดงในรูปของค่า IC_{50} หรือความเข้มข้นของสารที่สามารถดักจับกับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 โดยค่า IC_{50} ของสารสกัดใดมีค่าสูงแสดงว่ามีค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระต่ำ จะเห็นได้ว่า ความสามารถต้านอนมูลอิสระของสารสกัดห้อมจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดนั้นมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำกว่าวิตามิน ซี โดยสารสกัดห้อมด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 95 โดยปริมาตร จะมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าสารสกัดห้อมที่สกัดด้วยตัวทำละลายอีก 2 ชนิด และสารสกัดห้อมจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ต่ำกว่าวิตามินซี โดยสารสกัดห้อมด้วยสารสะลายเอทานอลความเข้มข้น 95 โดยปริมาตร มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสกัดห้อมจากตัวทำละลายอีก 2 ชนิด สอดคล้องกับความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดห้อมด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดมีค่าต่ำอาจเนื่องมาจากสารสกัดห้อมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลต่ำ เช่นเดียวกับรายงานของ Li, et al. (2008) ซึ่งได้ศึกษาความสามารถต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total phenolic compound) ของสารสกัดเมทานอลพืชสุมนไพร 45 ชนิด โดยวิธี FRAP และ scavenge $ABTS^{\cdot+}$ radical assays พบว่าสารสกัดห้อม (*Baphicacanthus cusia (*Nees) Brem) มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระต่ำ และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดต่ำ โดยสารประกอบฟีนอลเช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแทนนิน เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสัมพันธ์กับความสามารถต้านอนุมูลอิสระ เช่น มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านสารก่อมะเร็ง ต้านการอุดตันของหลอดเลือดแดง (anti-atherosclerotic) เป็นต้น

Table 2 DPPH and ABTS radical scavenging assay of *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze extract by solvent extrction

Solvent	DPPH radical scavenging assay IC_{50} (μg/ml)	ABTS radical scavenging assay IC_{50} (μg/ml)
water	457.09 c	329.29 c
ethanol	104.23 a	65.06 a
ethyl acetate	277.76 b	101.04 b
Vitamin C	5.86	5.51

Means within the same column followed by different letter are significantly different (P<0.05) by DMRT test.

1.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนังของสารสกัดห้อม

1.3.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี agar disc diffusion

เมื่อนำสารสกัดห้อมมาทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคผิวหนัง โดยผลการทดสอบความสามารถของสารสกัดห้อมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ จำนวน 5 ชนิดได้แก่ *S. aureus,* B. *subtilis*, *S. epidermidis*, P. *acnes* และ C. *albicans* แสดงดัง Table 3 พบว่าสารสกัดห้อมด้วยน้ำมีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ 3 ชนิด ได้แก่ *S. aureus S. epidermidis* และ *P.acnes* ส่วนสารสกัดห้อมด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร และ เอทิลอะซิเตด ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ได้ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *S. aureus S. epidermidis B. subtilis C. albicans* และ *P.acnes* และเมื่อเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (inhibition zone) พบว่าสารสกัดห้อมด้วยน้ำและสารละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีเทียบเท่ากับยาปฏิชีวนะgentamicin ส่วน *S. Aureus B. subtilis* และ *P.acnes* สารสกัดห้อมทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้น้อยกว่า ยาปฏิชีวนะ gentamicin สอดคล้องกับรายงานของ Chiang, et al.(2013) ซึ่งศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกของสารสกัดใบพืชอินดิโก้ (*Strobilanthes formosanus* Moore) ด้วยเอทิลอะซีเตดและศึกษาสารองค์ประกอบของสารสกัดที่ได้ พบว่าสารสกัดพืชอินดิโกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis,* MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*) และยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. albicans* ได้เล็กน้อย และจากการศึกษาสารองค์ประกอบโดยวิเคราะห์สารสกัดด้วย UPLC-APCI-MS พบว่ามี อินดิโก อินดิรูบิน อิซาทิน (Isatin) ทริปแทนตริน (Tryptantrin) เป็นต้น โดยอิซาทินและทริปแทนตรินจัดว่าเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากพืชอินดิโก นอกจากนี้ Shahni and Handique (2013) ได้รายงานว่าสารสกัดใบห้อมด้วยเอทานอล เมทานอล อะซีโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ได้ดี โดยสารสกัดเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

จากผลการวิจัยนี้ พบว่าสารสกัดห้อมด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อย 95 โดยปริมาตร และสารละลายเอทิตอะซีเดตความเข้มข้นร้อย 95 โดยปริมาตร มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus S. epidermidis B. subtilis* และ *P.acnes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังได้ ดังนั้นสารสกัดห้อมจึงสามารถนำไปใช้

ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ เช่น ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และสามารถพัฒนาเป็นยาเพื่อรักษาโรคอันเกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้

Table 3 Inhibition Zone of *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze extracts at difference solvent extraction and antimicrobial (gentamicin and ketoconaazole) on some microornisms by agar disc diffusion.

	Inhibition Zone (mm)				
microorganisms	Water extracts	ethanol extracts	ethyl acetate extracts	2.5 mg/ml gentamicin	20 mg/ml ketoconazole
S. aureus	11.8±0.1	15.6±0.1	14.7±0.2	18.5±0.3	Not tested
S. epidermidis	22.0±0.2	19.6±0.2	14.3±0.2	19.9±0.2	Not tested
B. subtilis	0.0±0.0	11.5±0.1	14.2±0.2	29.1±0.5	Not tested
C. albicans	0.0±0.0	8.7±0.1	12.8±0.2	Not tested	15.4±0.2
P. acenes	5.5±0.0	5.2±0.0	6.3±0.1	28.8±0.4	Not tested

The diameters of the inhibition zones (diameter of inhibition zone minus diameter of disc) were measured in mm after incubation for 24 h at the optimal temperature for the individual strains tested.

1.3.2 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดห้อมที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) โดยวิธี agar disc diffusion

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 2 ชนิดคือ เชื้อ *S. epidermidis* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบบริเวณผิวหนัง หนังศรีษะ ทำให้เกิดผิวหนังอักเสบ สามารถผลิตเมือกและมีกลิ่นไม่พึงประสงค์ได้ และ *C. albicans* ซึ่งนิยมใช้เป็นตัวแทนสำหรับทดสอบตัวยาในการยับยั้ง *P. orbiculare* เป็นยีสตซึ่งปกติพบอยู่ที่ผิวหนังและหนังศีรษะในเกล็ดรังแค แต่ทำให้บริสุทธิ์ได้ค่อนข้างยาก และต้องการอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความจำเพาะ (ชลลดา, 2546) โดยพบว่า สารสกัดห้อมด้วยเอทานอล และ เอทิลอะซิเตด มีค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ต่ำที่สุด ดังแสดงใน Table 4 จะเห็นได้ว่าค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ของ สารสกัดห้อมด้วยน้ำ คือที่ความเข้มข้น 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดห้อมด้วยเอทานอล และเอทิลอะซีเตด มีค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* เท่ากับ 15.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นต่ำกว่าสารสกัดห้อมด้วยน้ำ ส่วนค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* สารสกัดห้อมด้วยเอทานอล และเอทิลอะซีเตด เท่ากับ 500 และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าต้องใช้สารสกัดห้อมด้วยเอทานอลและเอทิลอะซีเตดในความเข้มข้นสูงจึงจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ได้ ทำให้สารสกัดห้อมไม่เหมาะสมสำหรับเป็นสารสกัดเพื่อยับยั้งการเกิดรังแคบนหนังศรีษะได้ ดังนั้นการสกัดห้อมด้วยเอทานอล จึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมากกว่าสารสกัดห้อมด้วยเอทิลอะซีเตด เนื่องจากจะได้ปริมาณสารสกัดมากกว่าและมีค่า MIC ต่ำกว่าสารสกัดห้อมด้วยน้ำ

Table 4 Minimum inhibitory concentration of selected solvent *Strobilanthes cusia (Nees) Kuntze* extracts against *S. epidermidis* and *C. albicans.*

microorganisms	MIC (mg/ml)		
	Water extracts	95 %v/v ethanol extracts	95 %v/v ethyl acetate extracts
S. epidermidis	125	15.62	15.62
C. albicans	-	500	250

1.4 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารสกัดห้อม

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารสกัดห้อม โดย ทดสอบเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดห้อมต่อเซลล์ไฟโบรบลาสท์ผิวหนังของมนุษย์ การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลองของสารสกัดห้อม การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดห้อม และการทดสอบฤทธิ์สมานแผลของสารสกัดห้อมในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ ของสารสกัดห้อมด้วยเอทานอล เนื่องจากสารสกัดห้อมด้วยเอทานอลมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมากกว่าสารสกัดห้อมด้วยน้ำและเอทิลอะซีเตต จึงได้การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ได้แก่ ทดสอบเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดห้อมต่อเซลล์ไฟโบรบลาสท์ผิวหนังของมนุษย์ การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลอง การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการทดสอบฤทธิ์สมานแผลในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ โดยมีผลการทดสอบดังนี้

1.4.1 การทดสอบเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดห้อมต่อเซลล์ไฟโบรบลาสท์ผิวหนังของมนุษย์

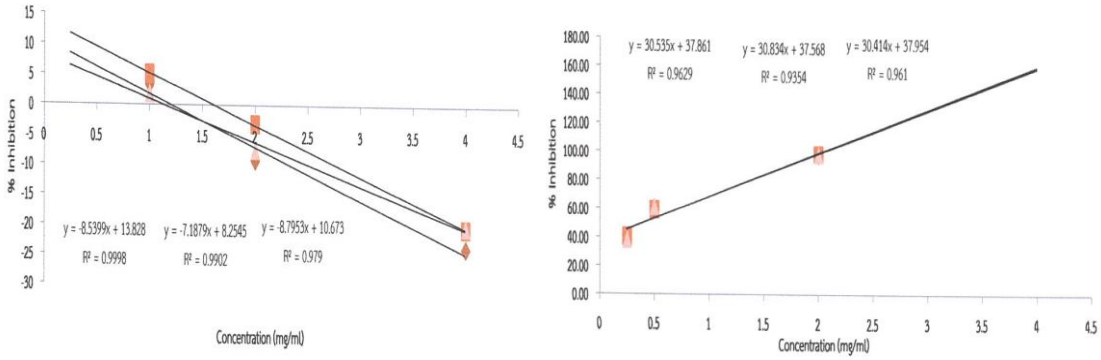
ผลการทดสอบเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดห้อมด้วยเอทานอลต่อเซลล์ไฟโบรบลาสท์ผิวหนังของมนุษย์ ดังแสดงใน Table 5 พบว่าสารสกัดห้อมที่ความเข้มข้น 0.0001 – 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลไฟโบรบลาสท์ของผิวหนังมนุษย์ มีร้อยละการรอดชีวิตอยู่ระหว่าง 101.38-111.47 ในขณะที่ sodium lauryl sulfate เป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 12.03±1.82 และ 9.13±0.23 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดห้อมมีความปลอดภัยสูงต่อเซลล์ไฟโบรบลาสท์ผิวหนังของมนุษย์

Table 5 Percentage of live human fibroblast cell with vary concentration of *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze extracts.

Sample / Concentration (mg/ml)	% Viability of human fibroblast cell				
	0.0001	0.001	0.01	0.1	1
Strobilanthes cusia (Nees) Kuntze extracts	111.47±4.17	110.62±2.49	105.90±2.38	101.38±0.19	102.33±3.70
sodium lauryl sulfate	105.33±4.31	103.33±4.31	98.05±1.01	12.03±1.82	9.13±0.23

1.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลอง (In vitro anti-inflammatory activity) ของสารสกัดห้อม

ผลการยับยั้งการสลายตัวของอัลบูมินของสารสกัดห้อมด้วยเอทานอล และ diclofenac diethylammonium แสดงดัง Figure 1 จะเห็นได้ว่าสารสกัดห้อมไม่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเมื่อทดสอบในหลอดทดลอง ในขณะที่ diclofenac diethylammonium ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้งการสลายตัวของอัลบูมินได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ที่ความเข้มข้น 0.40±0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



(A) *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze extract (B) diclofenac diethylammonium

Figure 1 Percentage of albumin denaturation inhibition at different concentration of *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze extract and diclofenac diethylammonium

1.4.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดห้อม

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดห้อม แสดงดัง Table 6 จะเห็นได้ว่าสารสกัดห้อมไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ในขณะที่กรดโคจิกมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 0.02±0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Table 6 Inhibition of tyrosinase by *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze extracts as IC_{50} and Kojic acid is reported as standard inhibitor

Sample	IC_{50} (mg/ml)
Strobilanthes cusia (Nees) Kuntze extract	NA
Kojic acid	0.02±0.00

1.4.2 การทดสอบฤทธิ์สมานแผลของสารสกัดห้อมในเซลล์ผิวหนังมนุษย์

ผลการทดสอบฤทธิ์สมานแผลของสารสกัดห้อมในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ แสดงดัง Figure 2 จะเห็นได้ว่า เซลล์ที่ได้รับสารสกัดห้อมและวิตามินซีเริ่มมีการเคลื่อนที่เข้าหากันเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง มีระยะห่างของรอยขีดน้อยกว่ากลุ่มควบคุม เซลล์ที่ได้รับสารสกัดห้อมและวิตามินซีมีการเคลื่อนที่ชิดติดกันเมื่อเวลาผ่านไป 48 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีการเคลื่อนที่

แต่ไม่ชิดติดกัน แสดงให้เห็นว่า สารสกัดห้อมความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์สมานแผล โดยสามารถกระตุ้นให้เซลล์ผิวหนังของมนุษย์เคลื่อนที่เข้าหากันได้เร็วกว่ากลุ่มควบคุมแต่ออกฤทธิ์ช้ากว่าวิตามินซี ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

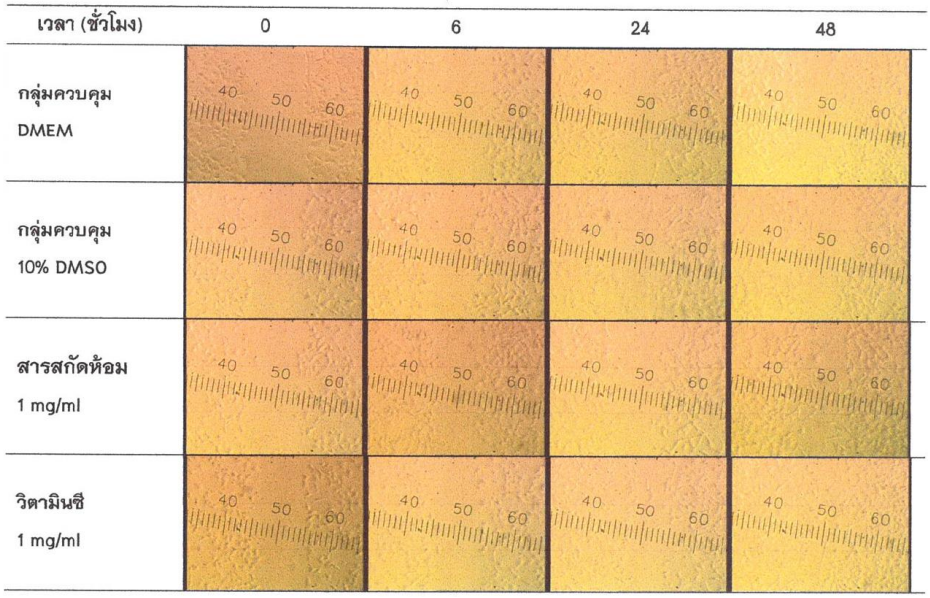


Figure 2 The effect of *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze extract on human dermal fibroblast migration in a wound scratch test assay.

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดห้อมมีความสามารถต้านอนูมลอิสระ DPPH และ ABTS ต่ำกว่าวิตามินซี โดยสารสกัดห้อมด้วยเอทานอล จะมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงกว่าสารสกัดห้อมด้วยเอทิลอะซีเตด และน้ำ สารสกัดห้อมด้วยเอทานอล และเอทิลอะซีเตด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ได้ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *S. aureus, S. epidermidis, B. subtilis, C. albicans* และ *P.acnes* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* เท่ากับ 15.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดห้อมด้วยสารละลายเอทานอล มีความเหมาะสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่อไป เนื่องจากให้ปริมาณสารสกัดมากกว่าการสารสกัดด้วยสารละลายเอทิลอะซีเตด นอกจากนี้ สารสกัดห้อมด้วยเอทานอลที่ได้ยังมีความปลอดภัยต่อเซลล์ไฟโบรบลาสท์ผิวหนังของมนุษย์ และมีฤทธิ์ในการสมานแผลผิวหนังมนุษย์อีกด้วย

การนำไปใช้ประโยชน์

สามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ทั้งในเชิงวิชาการเพื่อต่อยอดผลงานวิจัย และประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหรือยาเพื่อรักษาโรคอันเกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้ อันจะสร้างมูลค่าเพิ่มและเป็นเอกลักษณ์ของท้องถิ่นให้กับกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกห้อมทางภาคเหนือของไทย

คำขอบคุณ

-

เอกสารอ้างอิง

ชลลดา วชิรเดชเสถียร. 2546. การพัฒนาผลิตภัณฑ์แชมพูผสมมะกรูดจากวัสดุเหลือใช้ของอุตสาหกรรมอาหาร. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

รัชฎาพร อ่นศิวิไลย์, จิราวรรณ อุ่นเมตตาอารี และ จิตรา สิงห์ทอง. 2554. ฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดย่านาง เครือหมาน้อย และรางจืด. รายงานวิจัย. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 53 หน้า.

สุรีย์ ฟูตระกูล สรศักดิ์ เหลี่ยวไชยพันธุ์ สุปราณี เสียงใส อนงค์ จีระโสตถิกุล ฐานิศ บุตรเพชร รัตน์ อัฉรา สายหยุด ศิริวรรณ วิชัย และสุรารักษ์ จันทนเสถียร. 2543. การพัฒนาสารย้อมสีธรรมชาติในเขตภาคเหนือตอนบน. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 199 หน้า.

Adedapo, A. A., Jimoh, F. O., Afolayan, A. J., and Masika, P. J. 2009. Antioxidant properties of the methanol extracts of the leaves and stems of Celtis africana. Records of Natural Products, 3(1), 23–31.

Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L., and Cisneros-Zevallos, L. 2003. Screening Methods to Measure Antioxidant Activity of Sorghum (Sorghum bicolor) and Sorghum Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(23), 6657–6662.

Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P., and Bhattacharya, S. 2012. Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(1 SUPPL.), S178–S180.

Chiang, Y. R., Li, A., Leu, Y. L., Fang, J. Y., and Lin, Y. K. 2013. An in vitro study of the antimicrobial effects of indigo naturalis prepared from strobilanthes formosanus moore. Molecules, 18(11), 14381–14396.

Lee, K. H., Farida, F. H., Syahida, A., Abas, F., Shaari, K., Israf, D. A., and Lajis, N. H. 2009. Synthesis and biological evaluation of curcumin-like diarylpentanoid analogues for anti-inflammatory, antioxidant and anti-tyrosinase activities. European Journal of Medicinal Chemistry, 44(8), 3195–3200.

Li, H. Bin, Wong, C. C., Cheng, K. W., and Chen, F. 2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. LWT - Food Science and Technology, 41(3), 385–390.

Muhammad, A. A., Pauzi, N. A. S., Arulselvan, P., Abas, F., and Fakurazi, S. 2013. In vitro wound healing potential and identification of bioactive compounds from Moringa oleifera Lam. BioMed Research International, 2013, 1-10.

Vichai, V., and Kirtikara, K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nature Protocols, *1*(3), 1112–1116.

Shahni, R. and P J Handique. 2013. Antibacterail Properties of leaf extracts of *Strobilanthes cusia (Nees) Kuntze*, a rare ethno-medicinal plant of Manipur, India. Int. J.Pharm Tech Res. 5(3): 1281-1285.

Sultana, B., Anwar, F., Ashraf, M. 2009. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. Molecules, 14(6), 2167-2180.