การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากยอดและกิ่งอ่อนสะเดาบาเรน

Preliminary Phytochemical, Antioxidant and Antibacterial Activity Tests of *Schinus terebinthifolius* young leaf and twig methanolic extracts

โชติกา คุณประทุม (Chotika Khunprathum)* ปกิต กำบุญมา (Pakit Kumboonma) **
ปุญชรัสมิ์ ครินฐพัฒฑาวัณ (Pooncharat Karitpattawan) *** ชนกพร เผ่าศิริ (Chanokbhorn Phaosiri) ****

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้ศึกษาผักพื้นบ้านในเขตบ้านก่าน ตำบลหนองสังข์ อำเภอแก้งคร้อ จังหวัดชัยภูมิที่เก็บในช่วงมกราคม - มีนาคม ค.ศ. 2015 นำยอดและกิ่งอ่อนสะเดาบาเรนมาสกัดด้วยเมทานอลพบว่ากิ่งอ่อนมีสารพฤกษเคมีในปริมาณที่มากกว่ายอดอ่อน การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดจากยอดอ่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่ากิ่งอ่อน (EC_{50} = 22 ± 0.99 µg/mL) สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่าสารสกัดจากกิ่งอ่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่ายอดอ่อน (FRAP =193 ± 0.74 mg GEAC/g crude extract) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี agar well diffusion และวิธี broth dilution พบว่าสารสกัดยอดอ่อนมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด (% Inhibition = 95.77) และสารสกัดกิ่งอ่อนมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด (% Inhibition = 59.48) ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 วิธีให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันซึ่งสามารถนำไปสู่การค้นพบยาปฏิชีวนะได้

ABSTRACT

This research focused on the study of local vegetables in Bankan, Nong Sang, Kaeng Khro District, Chaiyaphum Province collected during January – March 2015. Young leaves and twigs of *Schinus terebinthifolius* were extracted with methanol. There were more phytochemicals in the young twig extract than in the young leaf extract. The antioxidant activity test by using DPPH assay showed that the young leaf extract had better activity than the young twig extract (EC_{50} = 22 ± 0.99 µg/mL). The antioxidant activity test via FRAP method showed that the young twig extract had better activity than the young leaf extract (FRAP = 193 ± 0.74 mg GEAC/g crude extract). The antibacterial activity test by using agar well diffusion and broth dilution methods indicated that the young leaf extract inhibited *E. coli* with the highest inhibition (% Inhibition = 95.77) and the young twig extract inhibited *P. aeruginosa* with the best inhibition (% Inhibition = 59.48). The results from both methods showed a good correlation which could lead to the discovery of antibacterial agents.

คำสำคัญ: มะตูมซาอุ ผักพื้นบ้าน สารต้านอนุมูลอิสระ

Key Words: *Schinus terebinthifolius*, Local Vegetables, Antioxidants

*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมีสำหรับครู คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
**นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาเคมีอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
***อาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
****ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

ปัจจุบันโลกๆ ของสังคมออนไลน์ทำให้รับรู้ข้อมูลข่าวสารต่างๆ ได้รวดเร็วขึ้น รวมทั้งกระแสเรื่องของสุขภาพ การป้องกันโรคและการเจ็บป่วยต่างๆ ผู้บริโภคได้เล็งเห็นความสำคัญของการบริโภคอาหารที่มีประโยชน์เพิ่มมากขึ้น เช่น พืชผักและผลไม้ โดยเฉพาะพืชผักเป็นอาหารประจำวันของมนุษย์ที่สำคัญและมีประโยชน์หลายด้าน เช่น เครื่องเทศปรุงอาหาร เครื่องปรุงและยารักษาโรค ผู้บริโภคสามารถเลือกพืชผักในการบริโภคได้หลากหลายทั้งนี้ขึ้นอยู่กับฤดูกาลหรือแหล่งชุมชน งานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ได้พิสูจน์ว่าพืชผักมีสารสำคัญต่างๆ และยังมีบทบาทสำคัญในการลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคภัยต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ และยังมีสารต้านอนุมูลอิสระ (Sriket, 2014) และสารสำคัญต่างๆ ปริมาณมากหรือน้อยขึ้นกับชนิดของพืชและแหล่งกำเนิด

สะเดาบาเรนหรือมะตูมซาอุเป็นไม้ในกลุ่มไม้มะม่วง (ANACARDIACEAE) มีชื่อสามัญในภาษาอังกฤษว่า Brazilian Pepper tree (หนอนน้อย, 2013) ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Schinus terebinthifolius* พืชชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกาใต้แถบประเทศบราซิล อาร์เจนตินาและปารากวัย (Ferriter, 1997) ซึ่งมีการใช้ประโยชน์หลากหลาย เนื่องจากเป็นพันธุ์ไม้ที่มีน้ำมันหอมระเหยหลายชนิด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเซลล์มะเร็ง (Bendaoud et al., 2010) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา (Bernardes et al., 2014) ช่วยลดการอักเสบ (Fedel-Miyasato et al., 2014) และยังมีการศึกษาความเป็นพิษจากเปลือก (Lima et al., 2009)

การนำสะเดาบาเรนเข้ามาปลูกในประเทศไทยเกิดขึ้นอย่างแพร่หลายกระจายไปยังแหล่งชุมชนต่างๆ และมีการนำมาใช้ในการบริโภคในแต่ละท้องถิ่น

วัตถุประสงค์

การวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาสะเดาบาเรนโดยศึกษาด้านสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หาปริมาณฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณแทนนิน รวมถึงมีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

วิธีดำเนินการ

1) วัตถุดิบและการสกัด

ตัวอย่างพืชสดสะเดาบาเรนเก็บมาจากบ้านก่าน ตำบลหนองสังข์ อำเภอแก้งคร้อ จังหวัดชัยภูมิ ในช่วงเดือนมกราคม – มีนาคม ค.ศ. 2015 ส่วนของพืชที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ยอดอ่อนและกิ่งอ่อน นำตัวอย่างพืชสดมาล้างให้สะอาด จากนั้นผึ่งลมให้แห้งแล้วบดเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนักแห้ง 500 กรัม ทำการสกัดด้วยเมทานอล 1.5 ลิตรด้วยวิธีการแช่หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ กรองและระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) ได้สารสกัดเมทานอลและคำนวณหาผลได้เป็นร้อยละ (%yield)

2) การตรวจสอบสารพฤกษเคมีในเบื้องต้น

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีของสารสกัดยอดและกิ่งอ่อนสะเดาบาเรนประกอบด้วย 9 กลุ่ม ได้แก่ ซาโปนิน สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน อัลคาลอยด์ แอนทราควิโนน ไดเทอร์พีน ไตรเทอร์พีน และคาร์โบไฮเดรต (Boonmee et al., 2015; Danmalam et al., 2012; Denrungruang et al., 2007; Yusuf et al., 2014) ดังนี้

การตรวจสอบซาโปนิน ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่น จำนวน 5 มิลลิลิตร อุ่น 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและกรองสารละลาย เขย่าแรงๆ หากเกิดฟองและคงอยู่ประมาณ 10 นาที แสดงว่าพบซาโปนิน

การตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิก ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร อุ่น 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและกรอง จากนั้นหยด 2% เฟอริกคลอไรด์ ถ้าหากสารละลายให้สีน้ำเงินเข้มหรือดำแสดงว่าพบสารประกอบฟีนอลิก

การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร อย่างระมัดระวัง ใส่ลวดแมกนีเซียมลงไป 2 ชิ้นเล็กๆ ถ้าฟองที่เกิดเป็นสีส้ม แดงหรือชมพู แสดงว่าพบสารประกอบฟลาโวนอยด์

การตรวจสอบแทนนิน ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร อุ่น 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและกรองสารละลาย จากนั้นนำสารละลายที่ได้ทดสอบด้วย 2 วิธีดังนี้ (1) หยด 1% เจลาติน ถ้าเกิดตะกอนสีขาวขุ่น แสดงพบว่าสารกลุ่มแทนนิน (2) หยด 10% เลด อะซิเตต โดยผลบวกเกิดตะกอนขาวขุ่น

การตรวจสอบอัลคาลอยด์ ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร อุ่น 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและกรองสารละลาย ทดสอบด้วย Wagner's reagent ถ้าหากเกิดตะกอนสีน้ำตาลแสดงว่าพบสารอัลคาลอยด์

การตรวจสอบแอนทราควิโนน ทำการทดสอบ 2 วิธีคือ (1) Borntrager's test โดยชั่งสารสกัด จำนวน 0.1 กรัม เติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร เขย่าและกรอง จากนั้นเติม 10% แอมโมเนีย 2 มิลลิลิตร ถ้าชั้นแอมโนเนีย มีสีส้ม แดง ชมพู เหลืองส้ม แสดงว่าพบอนุพันธุ์แอนทราซิน (2) Modified Borntrager's test โดยชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติม 10 % กรดไฮโดรคลอริก 5 มิลลิลิตร อุ่นนาน 5 นาที กรองสารละลายขณะร้อน ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วสกัดสารละลายด้วยคลอโรฟอร์ม 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำชั้นของคลอโรฟอร์มมาเติม 10% แอมโมเนีย 2 มิลลิลิตร หากสารละลายเกิดสีชมพู แดง หรือส้ม แสดงว่าพบอนุพันธุ์ของแอนทราควิโนน

การตรวจสอบไดเทอร์พีน ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร อุ่น 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น กรองสารละลาย หยด 10% คอปเปอร์ อะซิเตต ถ้าสารละลายเกิดสีเขียวมรกต แสดงว่าพบไดเทอร์พีน

การตรวจสอบไตรเทอร์พีน ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร เขย่าและกรอง จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2 มิลลิลิตร อย่างระมัดระวัง เขย่าเบาๆ ทิ้งไว้สัก 2-3 นาที สังเกตสีของสารละลายชั้นล่างที่เกิดขึ้น หากปรากฏสีน้ำตาลแดง แสดงว่าพบไตรเทอร์พีน

การตรวจสอบคาร์โบไฮเดรต ทำการทดสอบ 2 วิธีคือ (1) ทดสอบแป้ง ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร อุ่น 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและกรอง หยดสารละลายไอโอดีน ถ้าหากสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือดำ แสดงว่าพบแป้ง (2) ทดสอบน้ำตาล ชั่งสารสกัด 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร อุ่น 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและกรอง จากนั้นเติมสารละลายเบเนดิกต์ 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที สังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น หากมีตะกอนสีแดงอิฐ แสดงว่าพบน้ำตาล

3) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Activity)

3.1) การทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (Maisuthisakul et al., 2007)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl) assay โดยสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ที่มีความเข้มข้น 0.2 - 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเตรียมสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 5 – 70 มิลลิกรัมต่อลิตร นำสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ผสมกับเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1×10^{-4} โมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดสอบ 3 ครั้ง แล้วคำนวณร้อยละฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสมการ

$$\% \text{ DPPH radical scavenging activity} = \frac{(Ac - As)}{Ac} \times 100$$

Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม

As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน

3.2) การทดสอบด้วยวิธี FRAP assay (Ferric Reducing Antioxidant Power)

เตรียมสารละลาย FRAP โดยผสม 0.3 M Acetate buffer pH 3.6 กับ 0.02 M $FeCl_3$ และ 0.01 M TPTZ (2,4,6 – Tris (2-pyridyl) - 1,3,5 - triazine) ในอัตราส่วน 10 : 1 : 1 ตามลำดับ เก็บโดยปราศจากแสง ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีความเข้มข้น 0.5 - 25.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยนำสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นอุ่นสารละลาย FRAP ที่ 37 °C ประมาณ 5 นาที เติมลงไปในสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ครั้ง คำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GEAC/g crude extract) (Kukongviriyapan et al., 2007)

4) การหาปริมาณฟลาโวนอยด์

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทำได้โดยใช้เควอซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.5 - 25.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเตรียมสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลาย 10% อะลูมิเนียมคลอไรด์ 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม 10% กรดอะซิติก จำนวน 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตร และนำมาทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ครั้ง คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์จากกราฟมาตรฐานของเควอซิตินในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเควอซิตินต่อกรัมสารสกัด (mg QCE/g crude extract) (Gracelin et al., 2013)

5) การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทำได้โดยใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu และกรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 1.0 - 25.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเตรียมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าและทิ้งไว้ 5 นาที เกิดตะกอนสีขาว จากนั้นเติมสารละลาย 20% โซเดียมคาร์บอเนต จำนวน 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยง 3,300 รอบต่อนาที ประมาณ 5 นาที นำสารละลายที่ได้มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ครั้ง แล้วคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g crude extract) (Maisuthisakul et al., 2008)

6) การหาปริมาณแทนนิน

การหาปริมาณแทนนินทำได้โดยใช้คาเทชิน (Catechin) เป็นสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 5.0 - 50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง 0.25 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย 0.1 M $FeCl_3$ ใน 0.1 M HCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2.75 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 0.008 M $K_3Fe(CN)_6$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกัน ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ครั้ง คำนวณปริมาณแทนนินจากกราฟมาตรฐานของคาเทชินในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของคาเทชินต่อกรัมสารสกัด (mg CCE/g crude extract) (Gracelin et al., 2013)

7) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

7.1) Agar Well Diffusion Method

การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar Well Diffusion โดยเจือจางเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* ให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับความขุ่นของสารมาตรฐาน 0.5 McFarland จากนั้นใช้ก้านพันสำลี (cotton swab) ปลอดเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อแล้วป้ายเชื้อให้ทั่วผิวอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ทิ้งให้แห้งประมาณ 5 นาที และทำการเจาะหลุม จากนั้นเตรียมสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide) เป็นตัวทำละลายและกรองในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นเติมลงในหลุมๆ ละ 20 ไมโครลิตร จะได้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัม ตามลำดับ บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง และทำการวัดวงใส (Inhibition zone) (Smânia-Jr et al., 2007)

7.2) Broth Dilution Method

การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Broth Dilution โดยเจือจางเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* ให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับความขุ่นของสารมาตรฐาน 0.5 McFarland และเตรียมอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) หลอดละ 1 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นลำดับที่ 1 ของตัวอย่างมีความเข้มข้นสูงสุด 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางความเข้มข้นเป็นอนุกรมความเข้มข้นลดลงเป็น 2 เท่า จนกระทั่งมีความเข้มข้น 0.2441 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร – 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในหลอดขนาด 5 มิลลิลิตรที่ปลอดเชื้อ หลังจากเตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานแล้วนำมาเติมลงในแต่ละความเข้มข้น อัตราส่วนการเจือจาง 1 : 1 บ่มที่ 37 °C เวลา 16 - 20 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความขุ่น (Optical density) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร คำนวณร้อยละของฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (%Inhibition) (Smânia-Jr et al., 2007)

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากยอดอ่อนและกิ่งอ่อนของสะเดาบาเรน

สารพฤกษเคมี		ยอดอ่อน	กิ่งอ่อน
ซาโปนิน		-	++
สารประกอบฟีนอลิก		++	+++
ฟลาโวนอยด์		+	+
แทนนิน	เจลาติน	+	+++
	เลด อะซิเตต	++	+++
อัลคาลอยด์		-	+++
แอนทราควิโนน	Borntrager's test	+++	+
	Modified Borntrager's test	++	++
ไดเทอร์พีน		-	-
ไตรเทอร์พีน		+	-
คาร์โบไฮเดรต	สารละลายเบเนดิกต์	-	+++
	สารละลายไอโอดีน	-	-

+ หมายถึง ตรวจพบสารพฤกษเคมี (+++ = มาก, ++ = ปานกลาง, + = น้อย), - หมายถึง ตรวจไม่พบสารพฤกษเคมี

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารมาตรฐาน สารสกัดสะเดาบาเรน	EC_{50} values of DHHP assay (EC_{50}, µg/mL)	FRAP values (mg GEAC/g crude extract)
กรดแกลลิก	3 ± 0.31	-
ยอดอ่อน	22 ± 0.99	105 ± 2.16
กิ่งอ่อน	24 ± 1.34	193 ± 0.74

Mean ± % RSD (n = 3)

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิกรวมและแทนนิน

สารสกัดสะเดาบาเรน	Total flavonoids (mg QCE/g crude extract)	Total phenolic compounds (mg GAE/g crude extract)	Total tannin (mg CCE/g crude extract)
ยอดอ่อน	111 ± 1.68	165 ± 0.64	34 ± 0.07
กิ่งอ่อน	29 ± 3.64	217 ± 1.32	82 ± 0.32

Mean ± % RSD (n = 3)

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar Well Diffusion

สารสกัดสะเดาบาเรน (มิลลิกรัม)	เส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (มม.)ต่อเส้นผ่าศูนย์กลาง Agar Well (มม.)			
	Gram-positive bacteria		Gram-negative bacteria	
	S. aureus	*B. subtilis*	*E. coli*	*P. aeruginosa*
ยอดอ่อน				
1.0	2.13 ± 0.11	2.14 ± 0.10	2.56 ± 0.15	2.15 ± 0.10
2.0	2.47 ± 0.06	3.00 ± 0.07	3.58 ± 0.18	2.43 ± 0.18
กิ่งอ่อน				
1.0	2.43 ± 0.14	2.02 ± 0.13	2.18 ± 0.06	2.53 ± 0.06
2.0	2.68 ± 0.08	2.46 ± 0.09	2.76 ± 0.19	3.03 ± 0.12

Mean ± SD (n = 3)

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Broth Dilution

ความเข้มข้น (µg/mL)	ร้อยละของฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย							
	ยอดอ่อนสะเดาบาเรน				กิ่งอ่อนสะเดาบาเรน			
	Gram-positive bacteria		Gram-negative bacteria		Gram-positive bacteria		Gram-negative bacteria	
	S. aureus	*B. subtilis*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*B. subtilis*	*E. coli*	*P. aeruginosa*
DMSO	100	100	100	100	100	100	100	100
2,000	27.87	32.30	95.77	27.90	30.85	17.80	32.41	59.48
1,000	18.57	25.45	91.39	21.57	27.11	16.45	31.66	37.97
500	8.53	13.59	78.76	15.80	12.32	14.20	18.71	36.38
250	7.19	8.98	78.32	8.91	7.03	13.81	10.48	11.60
125	5.33	7.28	77.60	8.35	6.29	12.53	9.77	10.40
62.5	4.96	7.07	73.97	7.73	6.03	11.21	8.44	10.37
31.25	4.91	6.98	54.53	7.71	5.71	10.67	7.80	9.32
15.625	4.84	6.82	35.50	7.51	5.38	9.37	7.27	7.86
7.8125	4.67	6.79	34.99	7.14	5.33	9.23	7.24	7.82
3.9063	4.51	5.91	12.53	7.06	4.97	8.50	6.76	7.67
1.9531	4.29	5.82	11.2	6.05	4.68	7.73	6.46	7.34
0.9766	4.21	5.43	9.75	5.82	4.41	7.59	6.40	6.65
0.4883	3.83	5.37	9.66	5.26	4.09	7.57	6.33	6.29
0.2441	3.00	5.34	8.24	4.92	3.49	6.77	6.24	6.02

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สะเดาบาเรนที่นำมาทดสอบมี 2 ส่วนคือยอดอ่อนและกิ่งอ่อน เมื่อทำการสกัดด้วยเมทานอล พบว่าน้ำหนักสารสกัดยอดอ่อนมีค่าเท่ากับ 33.10 กรัม มีร้อยละผลได้ 6.62 และน้ำหนักสารสกัดกิ่งอ่อนมีค่าเท่ากับ 22.37 กรัม ร้อยละผลได้คิดเป็น 4.47 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีทั้งยอดอ่อนและกิ่งอ่อนสะเดาบาเรน พบว่าส่วนใหญ่ตรวจพบสารกลุ่มเดียวกัน ยกเว้น ซาโปนิน อัลคาลอยด์และน้ำตาลตรวจพบในกิ่งอ่อน และไตรเทอร์พีนตรวจพบในยอดอ่อน

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดจากยอดอ่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดจากกิ่งอ่อน (EC_{50} = 22 ± 0.99 µg/mL) ซึ่งพบว่ายอดมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่ากิ่งอ่อนและเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar Well Diffusion และวิธี Broth dilution พบว่ายอดอ่อนมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* ดีที่สุด (% inhibition = 95.77) และกิ่งอ่อนนั้นมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด (% inhibition = 58.49) ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 วิธีสอดคล้องกัน

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่าสารสกัดจากกิ่งอ่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดจากยอดอ่อน (FRAP = 193 ± 0.74 mg GEAC/g crude extract) ทั้งนี้เนื่องจากกิ่งอ่อนพบ

กลุ่มสารซาโปนิน อัลคาลอย์และน้ำตาลส่งผลให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและแทนนินมากกว่ายอดอ่อนสะเดาบาเรน รายงานนี้เป็นครั้งแรกที่รายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบและฤทธิ์ทางชีวภาพของยอดและกิ่งอ่อนของต้นสะเดาบาเรน

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ตามโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.)ที่สนับสนุนทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

หนอนน้อย หนองกี่. มาเบิ่ง มะตูมแขก (สะเดาบาเรน) กับสรรพคุณของมัน [ออนไลน์] มกราคม 2013 [อ้างเมื่อ 14 พฤศจิกายน 2015]. จาก http://www.baanmaha.com/community/threads/47823

Bendaoud H, Romdhane M, Souchard JP, Cazaux S, Bouajila J. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. J Food Sci 2010; 75(6): 466-472.

Bernardes NR, Heggdorne-Araújo M, Borges IFJC, Almeida FM, Amaral EP, Lasunskaiab EB, Muzitano MF, Oliveira DB. Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus terebinthifolius*. Rev Bras Farmacogn 2014; 24(6): 644-650.

Boonmee A, Chantra S, Suwancharoen S. Phytochemical and Antibacterial Activity of Jellyfish Curing Extract. KKU Sci. J 2015; 43(1): 106-115.

Danmalam UH, Allahmagani PK, Ilyas N, Abdurahman EM, Yaro AH,Magaji MG. Phytochemical and Anticonvulsant Studies on the Aqueous Ethanol Extract of the Root-Back of *Ficus Abutilifolia* (Miq.) Miq. (Family: Moracea). J App Pharm Sci 2012; 2(7): 234-237.

Denrungruang P, Suksabai S, Kolsuwan S. Phytochemical Screening from Stem Barks of Some Lauraceae Plant. Annual Report of the Department of Forest and Wood Science 2007; 9-18.

Fedel-Miyasato LES, Kassuya CAL, Auharek SA, Formagio ASN, Cardoso CAL, Mauro MO, Cunha-Laura AL, Monreal ACD, Vieira MC, Oliveira RJ. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. Rev Bras Farmacogn 2014; 24(5): 565-575.

Ferriter A. Brazilian Pepper Management Plan for Florida. A report from The Florida Exotic Pest Plant Council's Brazilian Pepper Task Force. Natural Resources Department. Florida, UAS. 1997.

Gracelin DHS, Britto AJD, Kumar BJR. Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals in five *Pteris* Species. Int J Pharm Sci 2013; 5(1): 105-107.

Kukongviriyapan U, Luangaram S, Leekhaosoong K, Kukongviriyapan V, Preeprame S. Antioxidant and Vascular Protective Activities of *Cratoxylum formosum*, *Syzygium gratum* and *Limnophila aromatic*. Biol. Pharm. Bull 2007; 30(4): 661-666.

Lima LB, Vasconcelos CFB, Maranhão HML, Leite VR, Ferreira PA, Andrade BA, Araújoa EL, Xavier HS, Lafayette SSL, Wanderley AG. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. J Ethnopharmacol 2009; 126(3): 468–473.

Maisuthisakul P, Pasuk S, Ritthiruangdej P. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. J Food Comp Anal 2008; 21(3): 229-240.

Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. Food Chem 2007; 100(4): 1409–1418.

Smânia-Jr A, Machado-de SS, Smânia EFA Valgas C. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. Brazilian J Microbiol 2007; 38(2): 369-380.

Sriket P. Chemical Components and Antioxidant Activities of Thai Local Vegetables. J Thai KMITL Sci Tech 2014; 14(1): 18-23.

Yusuf AZ, Zakir A, Shemau Z, Abdullahi M, Halima SA. Phytochemical analysis of the methanol leaves extract of *Paullinia pinnata* linn. J Pharmacognosy Phytother 2014; 6(2): 10-16.