การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดในใบหม่อน

ศิริจรรยา เขาประเสริฐ [1] ศจี สุวรรณศรี [1, 3] อมรรัตน์ พรหมบุญ [2] และปุณฑริกา รัตนตรัยวงศ์ [1]

[1] ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ : 055-261000-4 ext 2703, โทรสาร : 055-261987, [3] E-mail : suwansris@yahoo.com

[2] ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทนำ

หม่อน (Mulberry) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Morus alba Linn.* อยู่ในวงค์ Moraceae เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางด้านยาและที่สำคัญหม่อนจัดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากมีองค์ประกอบของสารอาหารที่จำเป็นต่อการสร้างรังไหมของหนอนไหมในการผลิตเส้นไหม (วิโรจน์, 2538) นอกจากนี้มีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณแตกต่างกันได้แก่ สารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ชนิด 1-ดีออกซีโนจิริไมซิน (1-deoxynojirimycin) ที่มีผลต่อการรักษาโรคเบาหวาน มีปริมาณเควอซิติน (quercetin) และปริมาณเคมเฟอรอล (kaempferol) สูงถึง 2,069.75 และ 869.44 มิลลิกรัม (รัตติยา, 2544) ซึ่งมากกว่าใบชาทั่วไปถึง 600 เท่า และมีปริมาณคาเฟอีน (caffeine) น้อยมากหรือแทบไม่มีเลย นอกจากนี้สารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ยังมีฤทธิ์ยับยั้งหรือต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นสาเหตุต่อการทำให้อาหารเป็นพิษ เช่น *Staphylococcus aureus* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์และรา (Rauha at el., 2000) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากใบหม่อนที่เพาะปลูกในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นข้อมูลสนับสนุนการคัดเลือกพันธุ์หม่อนที่มีสารสกัดที่เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

วัตถุดิบและวิธีการทดลอง

ตัวอย่างใบหม่อนจำนวน 13 ตัวอย่าง ได้รับการรวบรวมจากแหล่งเพาะปลูก 3 แหล่ง และมีรายละเอียดดังนี้ บุรีรัมย์ 60 (Bn60) คุณไพ (Pn) น้อย (Nn) ไผ่ (Pin) นครราชสีมา 60 (Nm60) บุรีรัมย์ 51 (Bn51) และเชียงใหม่กินผล (Cmn) จากสถาบันวิจัยหม่อนไหม จังหวัดนครราชสีมา บุรีรัมย์ 4 (Bj4) คุณไพ (Pj) บุรีรัมย์ 60 (Bj60) และจีนลูกผสม (Chj) จากบริษัทจิมทอมสันจำกัด จังหวัดนครราชสีมา และบุรีรัมย์ 60 (Bk60) คุณไพ (Pk) จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ตรวจสอบความชื้น สี และขนาดของใบหม่อนสดทันทีที่เก็บตัวอย่าง นำมาล้างทำความสะอาด ตากแห้งในที่ร่มที่อุณหภูมิห้องจนแห้งหรือความชื้นร้อยละ 10-12 บดด้วยเครื่องบดผสมให้ละเอียด แล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาด 100 mesh

นำตัวอย่างใบหม่อนผงมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล 60 % (อัตราส่วน 1:10) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Kahkonen et al., 1999) กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วระเหยสารละลายที่กรองได้ให้

แห้งภายใต้ความดัน เก็บสารละลายเข้มข้นที่ผ่านการระเหยในขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดมิดชิดเพื่อป้องกันแสงและความชื้นในบรรยากาศ สำหรับนำมาใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ศึกษาปริมาณคลอโรฟิลในใบหม่อนโดยผสมตัวอย่างใบหม่อนผง 2 กรัม กับอะซิโตน 80 % ใน Volumetric flask 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Ab.) ที่ความยาวคลื่น 660 และ 642.5 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์แล้วคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ (มิลลิกรัม/ลิตร) (A.O.A.C, 1990)

ตรวจวัดหาปริมาณสารประกอบฟินอลทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu วัดค่าการดูดกลืนแสง (Ab.) ของสารละลายที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิคที่วัดได้ (Meda et al., 2005)

ตรวจวัดค่า Scavenging activity ของสารสกัดจากใบหม่อนโดยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical ($DPPH^{\bullet}$) วัดค่าความดูดกลืนแสง (Ab.) ที่ 518 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณร้อยละของสารอนุมูลอิสระ (% scavenging activity) โดย % S คือร้อยละของสารอนุมูลอิสระที่เหลืออยู่ของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร และ ค่า SC_{50} คือปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (Chang et al., 2002)

ทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc Diffusion Method โดยวางแผ่น Disc ที่แช่สารสกัดนาน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 10 ºC บนจานเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli, Escherichia coli :0157*, *Staphylococus aureus, Bacillus cereus*, *Pseudomonas flurorescens* และ *Salmonella typhimurium* แล้วเปรียบเทียบกับผลของ Discที่ผ่านการแช่น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อและแช่ Penicillin G (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (Siripongvutikorn et al., 2005)

ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) (วัชรี, 2543) โดยเตรียมหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1,000 ไมโครลิตร จำนวน 5 หลอด ปิเปตสารสกัดหยาบ 1,000 ไมโครลิตรลงในหลอดที่ 1 แล้วเจือจางต่อไปโดยปิเปตสารละลายจากหลอดที่ 1 จำนวน 1,000 ไมโครลิตร ลงในสารละลายหลอดที่ 2 เป็นลำดับจนครบ แล้วนำสารละลายเจือจางทำการทดลองต่อตามวิธี Disc Diffusion Method (Siripongvutikorn et al., 2005)

ผลการทดลอง

จากการวัดค่าสีของใบหม่อนสดและแห้ง ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (%S และค่า SC_{50}) ของตัวอย่างใบหม่อนทั้ง 15 พันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าใบหม่อนสดมีสีน้ำเงินออกเหลือง ($L^* = 26.09 – 37.52$, $a^* = (-11.14) – (-6.29)$, $b^* = 7.22 – 15.33$) หม่อนพันธุ์ Pn มีสีคล้ำที่สุดและหม่อนพันธุ์ Pk มีสีอ่อนที่สุด ใบหม่อนแห้ง 12 ตัวอย่างมีสีเขียวออกเหลือง ($L^* = 42.16 – 50.03$, $a^* = (-10.72) – (-5.26)$, $b^* = 16.39 – 21.42$) โดยหม่อนพันธุ์ Bn60 และ Bj60 มีสีคล้ำที่สุดและสีอ่อนที่สุด ตามลำดับ

ปริมาณคลอโรฟิลล์ของใบหม่อนสดมีค่าระหว่าง 7.84 – 10.41 มิลลิกรัม/ลิตรโดยหม่อนสดพันธุ์ Pin มีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดสูงสุด รองลงมาคือพันธุ์ Bj 60 mg/L และพันธุ์ Cmn มีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดต่ำสุด เท่ากับ 10.41, 10.35 และ 7.84 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ปริมาณคลอโรฟิลล์ของใบหม่อนที่ตากแห้งมีค่าระหว่าง 27.58 – 95.55 มิลลิกรัม/ลิตร โดยหม่อนพันธุ์ Chj มีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดสูงสุด และหม่อนแห้งพันธุ์ Pk มีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดต่ำสุด เท่ากับ 59.62 และ 27.58 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดใบหม่อนอย่างหยาบอยู่ในช่วง 5.84 -7.06 โดยสารสกัดจากใบหม่อนพันธุ์ Pin ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงสุด และพันธุ์ Bk60 มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดมีค่าระหว่าง 3074.6 - 3939.37 mgGAE/100g โดยหม่อนพันธุ์ Bn51 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงสุด รองลงมาคือหม่อนพันธุ์ Nn และหม่อนพันธุ์ Nm60 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดต่ำสุด และจากการศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าค่า SC_{50} ของสารสกัดอย่างหยาบจากใบหม่อนพันธุ์ Pk, Bk60, Bj60, และ Pn มีค่าเท่ากับ 310, 375, 385 และ 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงการยับยั้งสารอนุมูลอิสระมากกว่าหม่อนพันธุ์อื่นๆ

ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบหม่อนเมื่อเปรียบเทียบกับ Penicillin G ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทุกสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าหม่อนแต่ละพันธุ์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกัน โดยหม่อน 5 พันธุ์คือ Nn, Bn51, Pj, Chj และ Pk สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดโดยสังเกตุจากเส้นผ่าศูนย์กลางพื้นที่ส่วนใส และเมื่อนำไปทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่าหม่อนทั้ง 5 พันธุ์นี้สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococus aureas* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัม *Bacillus cereus* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.25, 0.25, 0.25, 0.16, 0.25 มิลลิกรัม ตามลำดับ และเชื้อ *Pseudomonas flurorescens* ที่ความเข้มข้น 0.5, 0.25, 0.5, 0.16, 0.16 มิลลิกรัม ตามลำดับ

สรุปผลการทดลอง

ใบหม่อนที่มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระพบว่าในหม่อนแต่ละพันธุ์มีค่า SC_{50} ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและการดูแลรักษา อีกทั้งฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่าหม่อนพันธุ์แต่ละพันธุ์ เช่น Nn, Bn51, Pj, Chj และ Pk มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococus aureus* , *Bacillus cereus* และ *Pseudomonas flurorescens* และนอกจากนี้หม่อนพันธุ์ Nn ยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E.coli : 0157* โดยการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลสนับสนุนในการคัดเลือกใบหม่อนพันธุ์ที่มีสารสกัดที่เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม สถาบันวิจัยหม่อน

ไหมและบริษัทจิมทอมสันจำกัด จังหวัดนครราชสีมา ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาค้นคว้าและตัวอย่างใบหม่อน ขอขอบคุณ ดร.ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สำหรับการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Association of Official Analyical Chemists. (1990). ChlorophyII in Plants Photoelectric Colorimetric Method for Total Chlorophyll Only. In K. Helrich, Official Method of Analysis vol. 1 (15th Ed.) (pp. 62). Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, Inc.

Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H. J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Hujala, T.S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic. J. Agri. Food Chem., 47 (10), 3954-3962.

Siripongvutikorn, S., Thummaratwasik, P., & Huang, Y. (2005). Antimicrobial and antioxidation effect of seasoning, *Tom-Yum*. Lebens-Wiss.Technol., 38, 347-352.

Chang, W.C., Sei, C.K., Soon, S.H., Bong, K.C., Hye, J.A., Min, Y.L., Sang, H.P. & Soo, K.K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison, Plant Sci., 163, 1161-1168.

Meda, A., Charles, E.L., Marco, R., Jeanne, M., & Odile , G.N. (2005). Determination of total phenolic , flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavending activity. Food Chem., 91, 571–577.

Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., & Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effect of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. Int. J. Food Microbiol., 56, 3-12.

รัตติยา สำราญสกุล. (2544). ปริมาณสารโพลีฟีนอลและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันโดยรวมของใบหม่อนและชาใบหม่อนจากบางแหล่งในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 1-66.

วิโรจน์ แก้วเรือง. (2538). พืชผักพื้นบ้าน: หม่อนและไหมพืชและสัตว์สารพัดประโยชน์. เทคโนโลยีชาวบ้าน, 7(118): 53.

วัชรี สุภาอินทร์. (2543). การตรวจหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในพืชสมุนไพร 12 ชนิด วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หน้า 37-40.

ตารางที่ 1 ค่าสีและคลอโรฟิลล์ทั้งหมด ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดและสารอนุมูลอิสระของสารสกัดใบหม่อนอย่างหยาบ

ตัวอย่าง	สี[a]						ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (mg/L)		pH	Total phenolic (mg GAE/100g)	DPPH	
	ใบสด			ใบแห้ง							S^b	$SC_{50}{}^c$
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	ใบสด	ใบแห้ง			(%)	(µg/ml)
Bn60	26.24±1.23	-8.76±0.52	9.95±0.46	43.27±0.05	-9.00±0.15	20.13±0.05	8.69±0.01	40.16±0.02	6.00	3490.46 ± 0.03	11.14	_[c]
Pn	26.09±1.67	-6.29±0.37	7.22±0.67	45.19±0.15	-8.70±0.22	19.19±0.06	10.17±0.02	44.33±0.02	6.54	3199.19± 1.69	12.53	400
Nn	31.84±3.07	-9.79±0.31	11.99±0.84	45.25±0.10	-9.00±0.15	21.18±0.11	9.05±0.00	41.66±0.04	6.52	3658.48 ± 0.88	14.86	_[c]
Pin	32.39±2.15	-9.72±1.21	9.85±0.45	44.82±0.13	-8.41±0.21	20.05±0.05	10.41±0.12	43.24±0.01	7.06	3125.15 ± 0.88	11.30	_[c]
Nm60	34.97±0.53	-10.87±0.62	15.33±0.50	44.01±0.05	-9.29±0.03	19.58±0.15	8.46±0.00	46.51±0.02	6.23	3079.17 ± 0.15	1.32	_[c]
Bn51	34.65±0.65	-8.88±0.68	14.01±0.32	45.29±0.03	-7.15±0.03	21.42±0.03	8.70±0.00	40.18±0.02	6.09	3939.37 ± 0.82	14.45	475
Cmn	30.26±3.65	-7.69±2.54	10.47±3.14	44.29±0.17	-9.89±0.14	20.88±0.13	7.84±0.01	57.15±0.10	5.89	3535.26 ± 0.43	11.30	470
Bj4	31.74±0.71	-9.69±0.28	11.49±0.47	46.02±0.01	-9.68±0.09	19.73±0.04	9.21±0.01	41.43±2.46	6.28	3074.60 ± 0.66	8.44	_[c]
Pj	30.09±1.23	-10.04±2.32	10.61±1.88	42.45±0.02	-9.47±0.04	18.89±0.00	9.29±0.00	49.18±0.03	6.04	3505.57 ± 1.07	7.12	_[c]
Bj60	28.78±0.48	-9.02±0.64	11.04±0.26	50.03±0.09	-5.26±10.43	21.02±0.01	10.35±0.00	54.80±0.03	6.68	3089.97 ± 0.44	7.92	385
Chj	29.05±2.21	-9.23±0.80	11.02±1.69	47.64±0.02	-10.72±0.04	21.07±0.00	7.97±0.00	95.55±0.69	6.81	3136.20 ± 0.64	9.00	_[c]
Bk60	33.93±0.84	-10.63±0.22	13.94±0.34	42.15±0.02	-9.73±0.09	19.69±0.04	8.12±0.00	48.20±0.03	5.84	3526.81 ± 0.43	12.84	375
Pk	37.52±0.72	-12.56±0.25	15.32±0.52	47.64±1.46	-10.72±0.03	19.09±0.01	8.65±0.01	27.58±0.00	6.34	3555.94 ± 0.73	14.30	310

[a] L* :0 = ดำ , 100 = ขาว ; a* -100 = เขียว , 100 = แดง; b*-100 = น้ำเงิน , 100 = เหลือง : [b] scavenging ที่ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ;

[c] ปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระได้ 50 % ; [c] ไม่สามารถหาค่าได้ หรือมากกว่า 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของใบหม่อนแต่ละสายพันธุ์ โดยวิธี Disc diffusion method

ชื่อเชื้อ	บริเวณใสที่เกิดขึ้น [1]													ตัวอย่างควบคุม
	Bn60	Pn	Nn	Pin	Nm60	Bn51	Cmn	Bj4	Pj	Bj60	Chj	Bk60	Pk	(penicillin)
Bacillus cereus	++	-	+	+	++	++	-	-	++	-	++	++	++	+++
E.coli	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
E.coli : 0157	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Pseudomonas flurorescens	++	-	++	-	-	++	-	-	++	-	++	-	++	++
Sallmonella sp.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Staphylococus aureus	-	-	++	-	+	++	++	-	++	++	+++	-	++	+++

[1] - = ไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ, + = ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อเล็กน้อย (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง < 0.1 เซนติเมตร), ++ = ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อปานกลาง (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง < 1.0 > 0.1 เซนติเมตร)
+++ = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อมาก (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง > 1.0 เซนติเมตร)