

การออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดพลูในประเทศไทย
Antimicrobial Activity of Betel Vine (*Piper betle* Linn.) Extracts in Thailand

อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์¹, ยูพา มงคลสุข¹, งามพ่อง คงคาทิพย์²,

อุดมลักษณ์ สุขอิตตะ¹, วิภารัตน์ รัตนะ¹, ประภัสสร รักถาวร¹

Uraiwan Dilokkunanant¹, Yupa Mongkolsook¹, Ngampong Kongkathip²,

Udomlak Sukatta¹, Wiparat Rattana¹, Prapassorn Rakhaworn¹

บทคัดย่อ

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมต้นพันธุ์พลู (*Piper betle* Linn) จากแหล่งปลูกในจังหวัดต่างๆ ได้พลูจำนวน 74 ตัวอย่าง มาสกัดเป็นด้วยตัวทำละลาย petroleum ether และนำกากที่ได้มาสกัดต่อด้วยตัวทำละลาย ethanol เมื่อนำสารสกัดพลูที่ได้มาทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aspergillus niger*, *Trichophyton metagrophytes*, *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus* sp. ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion Method พบว่า สารสกัดพลูจากตัวทำละลายทั้งสองชนิดออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. metagrophytes* ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ *S. aureus*, *A. niger* และ *Streptococcus* sp. ตามลำดับ สำหรับแหล่งของสารสกัดพลูที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ได้ดีที่สุด คือ สารสกัดพลูจาก PiPr015 จังหวัดปราจีนบุรี และ PiSuK 055 จังหวัดสุโขทัย

ABSTRACT

Upon a surveying of betel vine (*Piper betle* Linn), 74 betel vine samples were put into solvent extractions. Dried leaves of each sample was cold extracted firstly by petroleum ether and followed by ethanol. Antimicrobial activities of the extracts were then tested on 4 microbes; *Aspergillus niger*, *Trichophyton metagrophytes*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* sp., by using Agar Disc Diffusion Method. The results showed that, the extracts from both solvents; petroleum ether and ethanol, gave the highest inhibition activity to *T. metagrophytes*, followed by *S. aureus*, *A. niger* and *Streptococcus* sp., respectively. It was also found that, the extracts from PiPr 015 (Prachin Buri), and from PiSuK 055 (Sukhothai) showed the highest inhibition activity.

Key Word : betel extract, betel oil, bacteria, fungi, inhibition, antimicrobial

e-mail address : uraiwand@yahoo.com

บทนำ

พลู (Betel vine) เป็นไม้เลื้อยหรือเถา ปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Piper betle* Linn. จัดอยู่ในตระกูล Piperaceae (ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร, 2529; นันทกาญจน์และคณะ, 2541) พลูเป็นพืชที่มีการใช้ประโยชน์

¹ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kasetsart Agricultural and Agroindustrial Product Improvement Institute (KAPI), Kasetsart University.

² ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University.

ทางด้านสมุนไพรมาตั้งแต่สมัยโบราณ ตามตำหรับยาไทยพลูมีสรรพคุณในการบำบัดโรคได้หลายอย่าง ทั้งการใช้พลูเพียงลำพัง และการใช้ร่วมกับพืชสมุนไพรอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสรรพคุณของพลูในด้านการรักษาโรคผิวหนังทั้งในทางเชื้อราและแบคทีเรียนับว่าน่าสนใจ จากผลงานวิจัยต่างๆ พบว่า สารสกัดพลูและน้ำมันหอมระเหยจากพลูนั้นมีฤทธิ์ต่อเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่ากว้างขวางยิ่ง (ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร, 2529; นันทกาญจน์และคณะ, 2541; อุไรวรรณและคณะ, 2543; NAPRALERT, 1998) สำหรับสารสำคัญในใบพลูที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มีรายงานว่า ได้แก่ eugenol, และ hydroxychavicol (Yang and Chou, 1997) จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่า พลู เป็นพืชที่มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเพื่อให้เกิดมูลค่าเพิ่มทางเศรษฐกิจได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ต้องการใช้ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจากสารธรรมชาติประเภทต่างๆ โครงการจึงทำการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการพัฒนาการผลิตสารสกัดจากพลูและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ เพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่พลู และนำสารสกัดพลูซึ่งเป็นสารธรรมชาติมาทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ที่ออกฤทธิ์แบบเดียวกัน ซึ่งจะเป็นการเพิ่มโอกาสให้แก่เกษตรกรและภาคเอกชนได้ผลิตผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มที่ใช้วัตถุดิบในประเทศและเป็นของคนไทยเอง

อุปกรณ์และวิธีการ

การสำรวจและรวบรวมพันธุ์พลู

คณะผู้วิจัยได้ออกเก็บตัวอย่างต้นพันธุ์พลูจากแหล่งต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศ ทั้งจากแหล่งธรรมชาติและจากแหล่งปลูกพลู โดยแบ่งการเก็บเป็น 2 แบบ คือ เก็บเฉพาะใบพลูเพื่อนำไปสกัดสารเพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ต่อเชื้อราและแบคทีเรียทดสอบ และเก็บลำต้นและยอดเพื่อนำไปเก็บรักษาไว้เป็นต้นพันธุ์ในโรงเรียน

การสกัดสารจากใบพลู

ทำการสกัดสารจากใบพลูแห่งที่ผ่านการล้างทำความสะอาดด้วยตัวทำละลาย petroleum ether จนได้สารสกัดหยาบจาก petroleum ether นำกากพลูที่เหลือมาสกัดต่อด้วยตัวทำละลาย ethanol จนได้สารสกัดหยาบจาก ethanol ดังนั้นใน 1 ตัวอย่างพลูจะได้สารสกัดหยาบ 2 ตัวอย่าง คือ crude petroleum ether extracts และ crude ethanol extracts ซึ่งนำไปใช้ในการทดสอบการออกฤทธิ์ต่อเชื้อทดสอบต่อไป

การทดสอบการออกฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์

ในการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดพลูต่อเชื้อจุลินทรีย์นั้น ได้นำสารสกัดทั้งสองชนิดที่ได้จากตัวอย่างพลูทุกตัวอย่างมาทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ *Aspergillus niger* วท.3245, *Trichophyton mentagrophytes* 12573, *Staphylococcus aureus* วท.118 และ *Streptococcus* sp. วท.1306 ด้วยวิธี agar disc diffusion method โดยในการเตรียมเชื้อนั้นได้ใช้วิธีการของ AOAC (1990) และ Baron and Finegold (1990); ใช้ amphotericin B (Steiman, 1998) และ erythromycin (ศิริวรรณ, 2538) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ และใช้ Dimethylsulfoxide เป็นตัวละลายสารสกัด วัดผลโดยดูค่า clear zone และประเมินผลการทดสอบโดยประยุกต์วิธีการของ Piddock (1990)

ผลการวิจัย

ทำการรวบรวมตัวอย่างสายพันธุ์พลูจากแหล่งปลูกต่างๆ ทุกภาคได้ 42 จังหวัด ดังนี้ เลย เพชรบูรณ์ ทรราช ปราจีนบุรี แพร่ น่าน ชลบุรี นครศรีธรรมราช สงขลา ตรัง สุราษฎร์ธานี สระแก้ว ฉะเชิงเทรา เชียงราย พะเยา ลำปาง สุโขทัย พิจิตร นครสวรรค์ กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี อุทัยธานี ชัยนาท สุพรรณบุรี

ลพบุรี ภูเก็ต พังงา ระนอง ชุมพร ขอนแก่น หนองคาย อุดรธานี นครราชสีมา ยโสธร มหาสารคาม ร้อยเอ็ด อุบลราชธานี ศรีสะเกษ สุรินทร์ บุรีรัมย์ และนครปฐม โดยสามารถเก็บรวบรวมสายพันธุ์พืชได้ทั้งหมด 137 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้ได้้นำตัวอย่างใบพืชที่มีปริมาณใบมากพอมาสกัด และทดสอบการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ จุลินทรีย์ทั้งสิ้นจำนวน 74 ตัวอย่าง

จากตัวอย่างใบพืชจำนวน 74 ตัวอย่าง เมื่อนำมาสกัดด้วย petroleum ether ตามด้วย ethanol ได้ตัวอย่างสารสกัดหยาบทั้งสิ้น 148 ตัวอย่าง เปรอร์เซ็นต์ผลผลิตสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วย ethanol สูงกว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วย petroleum ether ในส่วนของสารสกัดหยาบจาก petroleum ether นั้นพบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จาก PiSa 042 จังหวัดสระแก้ว ภาคตะวันออก ให้ปริมาณสารสกัดสูงสุด คือ 3.90 % ของน้ำหนักใบแห้ง รองลงมาได้แก่สารสกัดพืชจาก PIRN 093 จังหวัดระนอง ภาคใต้ ได้ 3.72 % ของน้ำหนักใบแห้ง ในส่วนของสารสกัดหยาบจาก ethanol พบว่า ใบพืชจาก PiTr 012 จังหวัดตราด ภาคตะวันออก ให้ปริมาณสารสกัดสูงสุดคือ 14.13 % ของน้ำหนักใบแห้ง รองลงมาได้แก่สารสกัดพืชจาก PiSuK 055 จังหวัดสุโขทัย ภาคเหนือ ได้ 12.77 % ของน้ำหนักใบแห้ง (Table 1)

จากการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด ด้วยวิธี agar disc diffusion method พบว่า การออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดพืชที่สกัดได้จากตัวอย่างพืชในทุกภาคเป็นไปในทางเดียวกัน คือ ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ *Trichophyton mentagrophytes* ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* และ *Streptococcus* sp. ตามลำดับ (Table 2)

นอกจากนี้ จากตัวอย่างพืชทั้งหมดจำนวน 74 ตัวอย่าง มี 29 ตัวอย่างที่ให้สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี (Table 2) และในจำนวนนี้สารสกัดพืชจาก PiPr 015 จังหวัดปราจีนบุรี และ จาก PiSuK 055 จังหวัดสุโขทัย ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุดใกล้เคียงกัน สำหรับแหล่งของสารสกัดพืชที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ รองลงมาได้แก่ สารสกัดพืชจาก PiKB 065 จังหวัดกาญจนบุรี จาก PiNK 105 จังหวัดหนองคาย และ PiNM 116 จังหวัดนครราชสีมา และจาก PiST 041 จังหวัดสุราษฎร์ธานี ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม จากการวิเคราะห์การออกฤทธิ์ของสารสกัดพืชในกลุ่มที่ให้ค่า clear zone สูงสุดทั่วประเทศ 10 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการทางสถิติ พบว่า การออกฤทธิ์ของสารสกัดพืดังกล่าวในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

สรุป

สารสกัดพืชออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Trichophyton mentagrophytes* ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* และ *Streptococcus* sp. ตามลำดับ โดยที่สารสกัดพืชที่ได้จากตัวทำละลาย ethanol ออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารสกัดพืชที่ได้จากตัวทำละลาย petroleum ether และแหล่งของสารสกัดพืชที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด สูงสุด 5 อันดับ ได้แก่ สารสกัดพืชจาก PiPr015 จังหวัดปราจีนบุรี, PiSuK 055 จังหวัดสุโขทัย, PiKB 065 จังหวัดกาญจนบุรี, PiKB 067 จังหวัดกาญจนบุรี, และ PiPr 014 จังหวัดปราจีนบุรี

คำนิยม

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ กองโครงการ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกจนโครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บรรณานุกรม

นันทกาญจน์ สุวรรณปฏิภนกุล, วณิดา จันทรเทพเทวัญ, เยาวพา บุญปู้, ประพิมพัทธ์ เกื่อนสุขคนธ์, กฤษณา ไกรสินธุ์. 2541. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความคงตัวของน้ำมันพริกกับฤทธิ์การต้านเชื้อรา. ไทยเภสัชสาร. เล่มที่ 22(1):42-45.

ศิริวรรณ วงศ์วานิช. 2538. การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียไร้อากาศในห้องปฏิบัติการ. กองพยาธิวิทยาคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 90 หน้า.

ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร. 2529. ก้าวไปกับสมุนไพร 2. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. 207 หน้า
อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, งามผ่อง คงคาทิพย์, อุดมลักษณ์ สุขอัสตะ, สุภนิดา บัวบาน, นวลอนงค์ นาคคง, สุวรรณ กัดพันธุ์. 2543. การออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิดของสารสกัดจากพริก. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 หน้า 515-522.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemist. 14 th ed. The AOAC.Inc., Virginia.1141 p.

Baron,E.J. and Finegold,S.M. 1990. Methods for Testing Antimicrobial Effectiveness. Bailey and Scott's Diagnosis Microbiology. 3th Ed. The C.V. Mosby Company. U.S.A. p.171-194.

Pidcock, L.J. 1990. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. In: Antimicrobial in food. *In Antimicrobials in food, 2nd ed.*, edited by P.M.Davidson and A.L.Branen, Marcel Dekker, New York, 647 p.

Steiman,R., F. Seigle-Murandi et, L. Sage. 1998. Antifungigram of dermatophytes. Ann Inst. Pasteur/Microbiol 139 : 485-491

Yang, J. and C. Chou. 1997. Antimicrobial activity of various solvent extracts of betel quid ingredients. Chem.Abstr. 128:84076b.

Table 1 Percentage yields of crude petroleum ether (PE) and crude ethanol (ET) extracts from various sources

No	Sample Code	% yield		No	Sample Code	% yield		No	Sample Code	% yield	
		PE	ET			PE	ET			PE	ET
1	PILo 001	1.38	7.14	26	PISuK 056	1.48	6.92	51	PIK 107	2.24	10.27
2	PILo 002	1.60	11.56	27	PIPC 059	2.71	8.91	52	PIUD 108	3.17	9.78
3	PILo 003	1.36	8.39	28	PIPC 060	2.61	9.52	53	PIUD 109	1.74	8.99
4	PILo 004	1.61	7.91	29	PIPC 061	2.42	8.96	54	PIUD 110	1.98	8.34
5	PIPC 005	1.29	9.08	30	PINW 062	2.10	7.76	55	PIKK 112	2.37	9.02
6	PIPC 006	1.34	7.78	31	PIKB 063	2.30	4.80	56	PINM 114	2.80	7.89
7	PIPC 007	1.88	9.18	32	PIKB 064	1.30	8.13	57	PINM 115	2.33	8.91
8	PITr 010	2.19	11.73	33	PIKB 065	2.04	10.00	58	PINM 116	2.84	4.60
9	PITr 012	3.68	14.13	34	PIKB 067	1.68	9.27	59	PINM 118	2.95	8.99
10	PITr 013	2.13	9.93	35	PIKB 068	2.38	9.75	60	PIYT 120	2.67	7.94
11	PIPr 014	1.57	9.24	36	PIRB 069	1.64	9.39	61	PIMK 121	2.99	10.87
12	PIPr 015	2.28	10.02	37	PIRB 071	2.38	8.56	62	PIMK 122	3.53	11.35
13	PIINS 034	2.24	7.87	38	PIPBR 074	1.65	9.81	63	PIRE 123	3.06	10.57
14	PIINS 035	1.51	6.45	39	PIChN 079	3.62	9.52	64	PIYT 124	3.38	8.96
15	PISK 036	2.56	10.44	40	PISuP 080	3.35	11.12	65	PIUb 127	1.52	7.57
16	PISK 037	2.25	8.74	41	PILR 082	2.10	6.61	66	PIUb 128	2.60	9.08
17	PITg 038	1.76	7.75	42	PISuP 083	2.45	7.87	67	PISSK 129	2.86	9.08
18	PIST 041	2.78	9.65	43	PISuP 084	2.22	7.22	68	PISuR 130	2.83	7.35
19	PISa 042	3.90	10.03	44	PIPhK 087	1.73	5.30	69	PIBR 131	2.65	7.43
20	PICS 044	2.34	8.03	45	PIPN 089	1.39	5.57	70	PIBR 132	2.53	7.90
21	PIPY 049	2.31	6.63	46	PIRN 093	3.72	10.14	71	PINT 133	2.31	11.11
22	PILP 052	1.92	7.56	47	PIRN 096	1.94	7.46	72	PINT 135	2.35	9.61
23	PILP 053	2.09	7.95	48	PIChP 099	2.17	6.63	73	PINT 136	2.75	11.87
24	PISuK 054	1.43	6.51	49	PIK 105	1.68	7.73	74	PINT 137	2.64	11.97
25	PISuK 055	2.78	12.77	50	PIK 106	2.09	7.21				

Table 2 Average clear zone of both betel crude extracts from various region of the country in inhibiting 4 tested microbes.

No	Part	Clear Zone (mm.)										Average PE+ET
		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Trichophyton mentagrophytes</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Streptococcus sp.</i>		Average		
		PE	ET	PE	ET	PE	ET	PE	ET	PE	ET	
1	North	7.9(l)	9.3(l)	17.8(m)	40.0(h)	9.3(l)	18.8(m)	7.6(l)	7.8(l)	10.7(l)	18.9(m)	14.8(l)
2	North East	8.0(l)	11.0(l)	20.7(m)	41.0(h)	9.3(l)	19.9(m)	7.6(l)	8.5(l)	11.4(l)	20.1(m)	15.7(m)
3	Central	7.7(l)	9.8(l)	20.7(m)	42.6(h)	9.8(l)	20.0(m)	7.7(l)	8.6(l)	11.5(l)	20.3(m)	15.9(m)
4	East	8.7(l)	12.4(l)	21.4(m)	44.2(h)	10.0(l)	19.9(m)	7.6(l)	9.5(l)	11.9(l)	21.5(m)	<u>16.7(m)</u>
5	South	8.5(l)	10.9(l)	16.9(m)	39.5(h)	10.9(l)	16.3(m)	8.2(l)	8.0(l)	11.1(l)	18.7(m)	14.9(l)
6	Average	8.2	10.7	19.5	41.5	9.9	18.9	7.7	8.5	-	-	-
7	Amphotericin B	16.8(m)		16.0(m)		-		-		-		
8	Erythromycin	-		-		28.0(m)		26.1(m)		-		

Note disc diameter = 6 mm;

Amphotericin B = 100 µg/disc ; Erythromycin = 15 µg/disc; and betel crude extract 2,000 µg/disc

PE = petroleum ether; ET = ethanol;

(h) = high inhibition activity (clear zone > 30 mm);

(m) = moderate or medium inhibition activity (clear zone 15 - 30 mm);

(l) = low activity inhibition (clear zone < 15 mm)