นิพนธ์ต้นฉบับ

ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม (*Punica granatum*) ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคกลุ่ม Gram-negative bacilli

ตรีชฎา ศิริรักษ์[1], ถนอมจิต สุภาวิตา[2], กานดา ปานทอง[3], และ ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย[4]

Abstract

Sirirak, T.[1], Supavita, T.[2], Panthong, K.[3], and Voravuthikunchai, S.[4]

Antibacterial activity of crude extract of *Punica granatum* pericarp on pathogenic Gram-negative bacilli.

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 2) : 535-544

The objective of this study was to investigate the effect of crude extracts of *Punica granatum* Linn. pericarp with 3 different solvents against pathogenic Gram-negative bacilli. Ethanolic extracts showed the antibacterial activity against all strains tested including enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 4 strains (*E. coli* O157: H7, *E. coli* O26: H11, *E. coli* O111: NM, *E. coli* O22), *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella boydii* and *Salmonella london*. Inhibition zones ranged from 10.02 to 19.15 mm. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) ranged from 0.09 to 3.13 mg/ml and 3.13 to 25 mg/ml, respectively. Aqueous extract had low antibacterial activity while crude chloroform extracts had no effect on the growth of these strains. Ethyl acetate and n-butanol fractions of *P. granatum* pericarp demonstrated high activity with the best MIC and MBC values of 0.02 to 0.78 mg/ml and 0.19 to 6.25 mg/ml, respectively. As ethanolic extract of *P. granatum* was very effective against these pathogenic bacteria, further investigation on this plant species may provide alternative, but bioactive, medicines for the treatment of Gram-negative bacterial infection.

Key words : Antibacterial activity, *Punica granatum*, gram-negative bacteria, medicinal plant, enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7

[1]Department of Microbiology, [2]Department of Chemistry, Faculty of Science, [3]Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

[1]นักศึกษาหลักสูตร วท.ม. สาขาจุลชีววิทยา, [2]ภ.ม. (เภสัชพฤกษศาสตร์) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์, [3]ปร.ด. (เคมีอินทรีย์), [4]Ph.D. (Microbiology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: s4522018@maliwan.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 20 สิงหาคม 2547 รับลงพิมพ์ 1 ธันวาคม 2547

บทคัดย่อ

ตรีชฎา ศิริรักษ์ ถนอมจิต สุภาวิตา กานดา ปานทอง และ ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย

ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม (*Punica granatum*) ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคกลุ่ม Gram-negative bacilli

ว.สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 2) : 535-544

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม (*Punica granatum* Linn.) ด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน 3 ชนิดต่อ Gram-negative bacilli ที่มีปัญหาทางการแพทย์ สารสกัดหยาบด้วย ethanol มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ ได้แก่ enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 4 สายพันธุ์ (*E. coli* O157: H7, *E. coli* O26: H11, *E. coli* O111: NM, *E. coli* O22), *Pseudomonas aeruginosa, Shigella boydii* และ *Salmonella london* ค่าของ inhibition zone อยู่ในช่วง 10.02 ถึง 19.15 มม. ค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) อยู่ในช่วง 0.09 ถึง 3.13 มก./มล. และ 3.13 ถึง 25 มก./มล. ตามลำดับ สารสกัดหยาบด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียน้อย ส่วนสารสกัดหยาบด้วย chloroform ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่นำมาทดสอบ ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ของ ethyl acetate และ n-butanol fractions จากเปลือกผลทับทิมพบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อได้ดีโดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.02 ถึง 0.78 มก./มล. และ 0.19 ถึง 6.25 มก./มล. ตามลำดับ งานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดหยาบด้วย ethanol มีฤทธิ์ดีในการต้านเชื้อ ดังนั้นการศึกษาต่อในรายละเอียดของสมุนไพรชนิดนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนายาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อจาก Gram-negative bacilli

ปัจจุบันการรักษาโรคติดเชื้อมีปัญหาเพิ่มขึ้นในโรงพยาบาลต่าง ๆ เนื่องจากยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อทำให้เกิดการดื้อยา เช่น เชื้อ *Salmonella* spp. กลุ่มที่ก่อให้เกิดอาการ enteric fevers มักดื้อต่อยา ampicillin, chloramphenicol และ trimethoprim (Ling and Chau, 1987) เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็น opportunistic pathogen ดื้อต่อยา imipenem (Sasaki *et al.*, 2004), ceftazidime, ciprofloxacin และ tobramycin (Jung *et al.*, 2004) เชื้อ *Shigella* spp. ดื้อต่อยา streptomycin, ampicillin, TMP-SMZ, chloramphenicol และ tetracycline พบได้ทั่วไปทั้งในประเทศแถบทวีปเอเชีย (Bhattacharya *et al.*, 1994) แอฟริกา (Ashkenazi *et al.*, 1993) และอเมริกา (Lima *et al.*, 1995; Cheasty *et al.*, 1998) การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) ซึ่งเป็นเชื้อที่สำคัญก่อให้เกิด haemorrhagic colitis, haemolytic-uremic syndrome (HUS) และ thrombocytopenic purpura (TTP) (Yoh *et al.*, 1997) แม้ว่าจะไม่มีรายงานการดื้อยามากนัก แต่ก็มีรายงานของ Yoh และคณะ (1999) พบว่าความเข้มข้นระดับ subinhibitory ของยา quinolones, norfloxacin, sparofloxacin และ grepafloxacin จะมีผลกระตุ้นให้เชื้อมีการปล่อย Verocytotoxin 1 (VT1) และ Verocytotoxin 2 (VT2) ซึ่งอาจมีส่วนทำให้ความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องหาสารที่จะเป็นทางเลือกใช้แทนยาปฏิชีวนะ

มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากทับทิม (*Punica granatum*) ต่อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ทั้ง Gram-positive bacteria และ Gram-negative bacteria ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากทับทิมมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Bacillus anthracis* (Trividi and Kazmi, 1979), *B. subtilis* (Trividi and Kazmi, 1979; Ahmad *et al.,* 1998; Prashanth *et al.*, 2001), *Escherichia coli* (Anesini and Perez, 1993; Navarro *et al.*, 1996; Ahmad *et al.,* 1998; Prashanth *et al.*, 2001), *Helicobacter pylori* (Voravuthikunchai *et al.,* 2004a), *Pseudomonas aeruginosa* (Anesini and Perez, 1993; Navarro *et al.*, 1996; Ahmad *et al.,* 1998), *Staphylococcus aureus* (Anesini and Perez, 1993; Navarro *et al.*, 1996; Ahmad

et al., 1998; Prashanth *et al.*, 2001; Holetz *et al.*, 2002), methicillin-resistant *S. aureus* หรือ MRSA (Machado *et al.*, 2002, 2003; Voravuthikunchai and Kitpipit, 2003) และ *Vibrio cholerae* (Trividi and Kazmi, 1979; Guevara *et al.*, 1994)

จากรายงานของ Voravuthikunchai และคณะ (2004c) โดยศึกษาสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร 38 ชนิด พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* O157: H7 ได้ดี ดังนั้นจึงนำเปลือกผลทับทิมมาวิเคราะห์หาสารที่มีประสิทธิภาพและศึกษาต่อในรายละเอียดสำหรับสารส่วนที่ออกฤทธิ์ โดยนำมาทดสอบกับเชื้อก่อโรคกลุ่ม Gram-negative bacilli ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาน่าจะเป็นประโยชน์ในการนำเปลือกผลทับทิมมาพัฒนาเป็นยาแทนที่การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรค

วัสดุ อุปกรณ์และการทดลอง

1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) จำนวน 5 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ STEC RIMD 05091078 O157: H7, STEC RIMD 05091083 O157: H7, STEC RIMD 05091055 O26: H11 และ STEC RIMD 05091056 O111: NM ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นในการระบาดเมื่อปี ค.ศ. 1997 และสายพันธุ์ STEC RIMD 05091556 O22 เป็นเชื้อที่แยกได้จากวัว โดยเชื้อทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จาก Research Institute of Microbial Diseases, Osaka University, Japan และใช้สายพันธุ์มาตรฐาน *Escherichia coli* ATCC 25922 Gram-negative bacteria อื่นๆ ที่ทำการศึกษาได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella london* DMST 7110, *Shigella boydii* DMST 7124

2. การสกัดสารสกัดหยาบ (crude extract) จากเปลือกผลทับทิม

นำเปลือกผลทับทิมมาล้าง ชั่ง สับเป็นชิ้นเล็กๆ อบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C จนแห้ง บดให้ละเอียดและชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำมาสกัดด้วย chloroform โดยการแช่เป็นเวลา 5 วัน แล้วกรองเอาส่วนสกัดออก แช่กากเดิมด้วย chloroform ซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นแช่ต่อด้วย ethanol 95% 3 ครั้งและสุดท้ายแช่ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ไประเหยให้แห้งโดยใช้ vacuum dryer ชั่งน้ำหนักและเก็บสารที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

3. การแยกสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (fraction) ของสารสกัดหยาบโดยวิธี solvent-solvent extraction

(ดัดแปลงตามวิธีของ Machado *et al.*, 2003) นำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol มาละลายในน้ำ รินส่วนใสใส่ในกรวยแยกสารขนาด 250 มล. ใส่ตัวทำละลายลงไป โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ n-hexane, chloroform, ethyl acetate และ n-butanol ตามลำดับ เขย่าให้ตัวทำละลายและสารสกัดเข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ไขเอาส่วนที่ต้องการไประเหยให้แห้ง

4. การทดสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืช (phytochemical screening test) โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี

(ดัดแปลงตามวิธีของวีณา, 2534 และ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2542) นำส่วนสกัดที่ได้มาทดสอบทางเคมีเบื้องต้นโดยทดสอบ flavonoids (Shinoda test), sterols, triterpenes, tannins และ phenolic compounds

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion

5.1 การเตรียม inoculum

นำเชื้อแบคทีเรียตัวที่ทดสอบมาเพาะเลี้ยงบน Nutrient agar (NA, Difco) ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เลือกเขี่ยเชื้อมา 4 ถึง 5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน Mueller-Hinton broth (MHB, Difco) บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 3 ถึง 5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลาย barium sulfate McFarland no. 0.5 โดยใช้น้ำเกลือไร้เชื้อ แล้วใช้ sterile cotton swab จุ่มเชื้อที่ใช้ทดสอบแล้วนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA, Difco)

3 แนวทำมุม 60 °

5.2 การทดสอบกับแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐาน (NCCLS, 2000)

ใช้ forceps คีบแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐานวางบนวุ้นอาหารในข้อ 5.1 ให้แผ่นยาห่างกัน 15 ถึง 20 มม. และห่างจากขอบจานอาหาร 15 มม. โดยทำการทดสอบกับยา amikacin (30 μg), ampicillin (10 μg), chloramphenicol (30 μg), gentamicin (10 μg), kanamycin (30 μg), norfloxacin (10 μg) และ tetracycline (30 μg) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

อ่านผลโดยใช้ vernier caliper วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) แล้วนำไปเทียบกับตารางมาตรฐานเพื่อแปลผลว่า ไว (susceptible) หรือดื้อยา (resistant) ทำการทดสอบ 2 ซ้ำ

5.3 การเตรียมสารสกัดแบบแผ่นแห้ง

นำ sterile paper disc (6 มม.) วางบนตะแกรงลวด sterile ใน plate sterile ดูดสารละลายของสารสกัดที่มีความเข้มข้น 250 มก./มล. ปริมาตร 10 μl. หยดลงกลางแผ่น disc จะได้ปริมาณสารสกัด 2.5 มก./แผ่น ทิ้งไว้ให้แห้ง ส่วน negative control ใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck) แทนสารสกัด

5.4 การเตรียมสารสกัดแบบแผ่นเปียก

ทำเช่นเดียวกับการเตรียมสารสกัดแบบแผ่นแห้ง แต่วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อทันที

5.5 การทดสอบกับสารสกัด

ทำเช่นเดียวกับข้อ 5.1 และ 5.2 แต่ใช้สารสกัดแทน

6. การทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดต่อ pathogenic Gram-negative rod โดยวิธี agar dilution (ดัดแปลงตามวิธีของ Lorian, 1996)

6.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบมาเพาะเลี้ยงบน NA ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ เลือกเขี่ยเชื้อมา 4 ถึง 5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 3 ถึง 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลาย barium sulfate McFarland No. 0.5 โดยใช้น้ำเกลือไร้เชื้อ แล้วเจือจางต่อด้วยน้ำเกลือไร้เชื้อ 0.85% ในอัตราส่วน 1: 10

6.2 การเตรียมสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม

เตรียมสารสกัดหยาบด้วย ethanol ให้มีความเข้มข้น 250 มก./มล. โดยเจือจางสารสกัดสมุนไพรแบบลำดับ 2 (2-fold serial dilution) ด้วยตัวทำละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบตั้งแต่ 0.12 ถึง 250 มก./มล. ส่วน ethyl acetate และ n-butanol fractions ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.12 ถึง 250 มก./มล. ทำการทดสอบหาค่า MIC หากค่า MIC ที่ได้ต่ำกว่า 0.12 มก./มล. ก็ทำการเจือจางแบบลำดับสองจนกระทั่งได้ค่า MIC

6.3 การทดสอบหาค่า MIC

ในการทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบ นำสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol แต่ละความเข้มข้นมาผสมกับ MHA หลอมเหลวปริมาตร 6 มล. ในอัตราส่วน 1: 10 เทอาหารที่ได้ลงในจานเพาะเชื้อ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม.) ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง นำแผ่นกรอง membrane filter (0.45 μm) มาวางบนผิวหน้าอาหาร แล้วหยดเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 μl ลงบนแผ่นกรองและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง control ใช้ตัวทำละลายคือ DMSO แทนสารสกัด ส่วน positive control ใช้ยา ciprofloxacin และ gentamicin

หาค่า MIC ของ ethyl acetate และ n-butanol fractions โดยผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 1 ส่วนกับ MHA ที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 45 ถึง 50 °C 9 ส่วนให้เข้ากันใน eppendrof ดูดขึ้นลง 10 ถึง 15 ครั้ง ให้เป็นเนื้อเดียวกัน หยดอาหารลงในหลุมของ sterile microtiter plate หลุมละ 200 μl หากมีฟองก๊าซเกิดขึ้น ให้นำ loop ลนไฟแตะฟองอากาศเบา ๆ ทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง จากนั้นหยดเชื้อที่เตรียมไว้ ลงไปหลุมละ 1 μl (ประมาณ 10^4 CFU) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด

สมุนไพรที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้

6.4 การทดสอบหาค่า MBC

การทดสอบหาค่า MBC ของสารสกัดหยาบโดยนำแผ่นกรอง membrane filter ที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ในการทดลองหาค่า MIC มาวางเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร MHA ใหม่ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 ^{o}C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

ส่วน fraction ทำการทดสอบโดยนำหลุมที่สารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อได้มาโดยทำในอาหารเหลวแทนอาหารแข็ง ใช้ loop จุ่มหลุมที่ใส ซึ่งมีความเข้มข้นเดียวกับการหาค่า MIC นำมา streak บน MHA บนผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 35 ^{o}C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้

ผลการทดลอง

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมโดยใช้วิธี disc diffusion

จากการทดสอบเมื่อนำแผ่น disc ที่มีสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่สกัดด้วย chloroform, ethanol 95% และ น้ำ ที่ความเข้มข้น 2.5 มก./แผ่น ทั้งแบบแผ่นเปียกและแผ่นแห้งมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Table 1) สารที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อที่นำมาทดสอบทั้ง 9 สายพันธุ์ คือ สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol 95% โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดจากแผ่นเปียกมีค่าระหว่าง 10.37 ถึง 19.15 มม. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดจากแผ่นแห้งมีค่าอยู่ในช่วง 9.45 ถึง 16.85 มม. สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่สกัดด้วย chloroform พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อที่นำมาทดสอบได้ สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วยน้ำจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ระหว่าง 6.05 ถึง 7.15 มม. ส่วนการทดสอบกับแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐานแสดงใน Table 2

ผลการทดสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี

ผลการทดสอบทางเคมีโดยนำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol 95% โดยพบสารที่มีอยู่ในเปลือกผลทับทิม คือ flavonoids, tannins, sterols และ triterpenes

ผลการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration และ minimum bactericidal concentration โดยวิธี agar dilution

นำสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย ethanol 95% ที่มีฤทธิ์

Table 1. Antibacterial activity of ethanolic, chloroform and aqueous extracts of *Punica granatum* pericarp by disc diffusion method (concentration 2.5 mg/disc).

Strains	Mean values of inhibition zone (mm)		
	chloroform	ethanol 95%	aqueous
E. coli O157: H7 RIMD 05091078	-	12.75^{+}/11.33*	7.15/6.25
E. coli O157: H7 RIMD 05091083	-	11.23/11.05	7.10/6.25
E. coli O26: H11 RIMD 05091055	-	11.53/11.43	6.43/6.05
E. coli O111: NM RIMD 05091056	-	11.68/10.60	6.45/6.05
E. coli O22 RIMD 05091556	-	12.00/10.80	6.25/6.20
E. coli ATCC 25922	-	10.95/10.08	7.15/7.05
P. aeruginosa ATCC 27853	ND	11.23/9.45	ND
S. boydii DMST 7124	ND	19.15/16.85	ND
S. london DMST 7110	ND	10.37/10.02	ND

+ = Wet disc, * = Dry disc, - = No inhibition zone, ND = Not done.

Table 2. Antibacterial activity of antibiotics by disc diffusion method.

Strains	Antibiotics						
	AM	AP	C	GM	K	N	T
E. coli O157: H7 RIMD 05091078	21.80 (S)	7.95 (R)	21.45 (S)	19.83 (S)	21.38 (S)	26.75 (S)	24.35 (S)
E. coli O157: H7 RIMD 05091083	22.30 (S)	7.50 (R)	22.45 (S)	21.13 (S)	22.40 (S)	36.85 (S)	- (R)
E. coli O26: H11 RIMD 05091055	17.45 (S)	6.53 (R)	23.10 (S)	19.03 (S)	19.48 (S)	38.45 (S)	22.65 (S)
E. coli O111: NM RIMD 05091056	23.45 (S)	- (R)	23.85 (S)	20.23 (S)	- (R)	32.95 (S)	- (R)
E. coli O22 RIMD 05091556	21.08 (S)	6.90 (R)	24.85 (S)	20.08 (S)	19.63 (S)	31.10 (S)	21.60 (S)
E. coli ATCC 25922	23.93 (S)	6.48 (R)	23.85 (S)	20.20 (S)	21.63 (S)	31.95 (S)	24.03 (S)
P. aeruginosa ATCC 27853	23.37 (S)	- (R)	ND	20.87 (S)	- (R)	ND	9.57 (R)
S. boydii DMST 7124	15.63 (I)	- (R)	ND	17.50 (S)	16.63 (I)	ND	7.5 (R)
S. london DMST 7110	21 (S)	22.5 (S)	ND	19.28 (S)	21.5 (S)	ND	25.33 (S)

S = Susceptible; R = Resistant; I = Intermediate; - = No inhibition zone; ND = Not done; AM = amikacin; AP = ampicillin; C = chloramphenicol; GM = gentamicin; K = kanamycin; N = norfloxacin; T = tetracycline.

Table 3. Antibacterial activity of ethanolic extracts of *Punica granatum* pericarp by agar dilution method.

Strains	Antibacterial activity			
	Ethanolic extract (mg/ml)		Antibiotics (µg/ml)	
	MIC	MBC	ciprofloxacin	gentamicin
E. coli O157: H7 RIMD 05091078	0.39	12.5	0.016 (S)	0.25 (S)
E. coli O157: H7 RIMD 05091083	3.13	25	0.016 (S)	0.25 (S)
E. coli O26: H11 RIMD 05091055	3.13	12.5	0.016 (S)	0.25 (S)
E. coli O111: NM RIMD 05091056	3.13	12.5	0.016 (S)	0.25 (S)
E. coli O22 RIMD 05091556	1.56	12.5	0.016 (S)	0.25 (S)
E. coli ATCC 25922	0.39	6.25	ND	ND
P. aeruginosa ATCC 27853	0.09	3.13	ND	ND
S. boydii DMST 7124	0.09	3.13	ND	ND
S. london DMST 7110	6.25	25	ND	ND

S = Susceptible; R = Resistant; I = Intermediate; ND = Not done; MIC = Minimum inhibitory concentration, MBC = Minimum bactericidal concentration.

ต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิด inhibition zone ได้ดีที่สุด มาทดสอบหาค่า MIC และ MBC โดยวิธี agar dilution พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อที่นำมาทดสอบทั้ง 9 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อกลุ่ม EHEC ทั้ง 5 สายพันธุ์และ *E. coli* ATCC 25922 มีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.39 ถึง 3.13 และ 12.5 ถึง 25 มก./มล. ตามลำดับ เชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. boydii* DMST 7124 มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.09 และ 3.13 มก./มล. ตามลำดับ เชื้อ *S. london* DMST 7110 มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 6.25 และ 25 มก./มล. ตามลำดับ (Table 3)

ผลการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration และ minimum bactericidal concentration ของ ethyl acetate และ n-butanol fractions จากเปลือกผลทับทิม โดยวิธี agar dilution

ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของ ethyl acetate และ n-butanol fractions จากเปลือกผลทับทิมพบว่า มีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.02 ถึง 0.78 มก./มล. และ 0.19 ถึง 6.25 มก./มล. ตามลำดับ (Table 4) ส่วนอีก 2 fractions คือ n-hexane และ chloroform fractions เนื่องจากได้สารที่มีปริมาณน้อยมากจึงไม่ได้นำมาทดสอบ

Table 4. Antibacterial activity of fractions from ethanolic extract of *Punica granatum* pericarp by agar dilution method.

Strains	MIC/MBC (mg/ml)	
	Ethyl acetate fraction	n-Butanol fraction
E. coli O157: H7 RIMD 05091078	0.05+/0.39*	0.09/0.19
E. coli O157: H7 RIMD 05091083	0.09/1.56	0.19/3.13
E. coli O26: H11 RIMD 05091055	0.19/0.78	0.05/0.39
E. coli O111: NM RIMD 05091056	0.39/0.78	0.39/0.39
E. coli O22 RIMD 05091556	0.78/6.25	0.19/1.56
E. coli ATCC 25922	0.19/3.13	0.19/6.25
P. aeruginosa ATCC 27853	0.02/0.78	0.02/1.56
S. boydii DMST 7124	0.02/0.39	0.02/0.39
S. london DMST 7110	0.09/1.56	0.19/1.56

+ = MIC; * = MBC

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมโดยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่สกัดด้วย chloroform ethanol และน้ำ มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแตกต่างกัน สังเกตได้จากขนาดของ inhibition zone ซึ่งอาจเป็นเพราะสารที่อยู่ในเปลือกผลทับทิมอาจจะละลายในน้ำและ chloroform ได้ไม่ดีเท่ากับละลายใน ethanol ดังนั้นการเลือกตัวทำละลายจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแตกต่างกันและในการทดสอบจะใช้แผ่น disc ทั้งแบบแผ่นเปียกและแผ่นแห้งซึ่งผลการทดสอบให้ขนาดของ inhibition zone ใกล้เคียงกัน แต่แบบแผ่นเปียกให้ขนาดของ inhibition zone กว้างกว่าแผ่นแห้งเล็กน้อย Voravuthikunchai และคณะ (2004b) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบของสมุนไพรไทย 58 ชนิด กับเชื้อ enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 พบเพียง 24.14% ของสารสกัดที่สามารถออกฤทธิ์ต้าน Gram-negative bacteria ส่วน Ahmad และคณะ (1998) รายงานค่าของสารสกัดหยาบด้วย alcohol จากเปลือกผลทับทิม (ความเข้มข้น 200 มก./มล.) ต่อเชื้อ *E. coli* K-12 และ *P. aeruginosa* ATCC 25619 มีค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 10 ถึง 19 มม. ซึ่งให้ผลที่ใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งนี้ และรายงานก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ต้านเชื้อ Gram-negative bacteria เช่น *Vibrio cholerae* (Guevara *et al.,* 1994), *E. coli* (Navarro *et al.,* 1996; Prashanth *et al.,* 2001), *P. aeruginosa* (Navarro *et al.,* 1996) และ *K. pneumoniae* (Prashanth *et al.,* 2001) นอกจากนี้สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ต้านเชื้อ Gram-positive bacteria ได้ เช่น *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (Prashanth *et al.,* 2001; Holetz *et al.,* 2002) และ methicillin-resistant *S. aureus* ได้ (Machado *et al.,* 2002)

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีในเบื้องต้น คือสารสกัดหยาบด้วย ethanol มาทดสอบหาค่า MIC และ MBC ด้วยวิธี agar dilution โดยใช้ Millipore filter membrane พบว่ามีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.09 ถึง 3.13 มก./มล. และ 3.13 ถึง 25 มก./มล. ตามลำดับ ซึ่งให้ผลที่ใกล้เคียงกันกับการศึกษาของ Voravuthikunchai และคณะ (2004b) ส่วน Navarro และคณะ (1996) และ Prashanth และคณะ (2001) รายงานค่าของสารสกัดหยาบด้วย methanol จากเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *E. coli* มีค่า MIC เท่ากับ 10 และ 12 มก./มล. ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นว่าค่า MIC (0.39 ถึง 3.13 มก./มล.) ที่ได้มีค่าที่ดีกว่ามาก ค่าที่แตกต่างกันคงเป็นเพราะชนิดของ solvent ที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดสารและวิธีการสกัดสาร ส่วนปัจจัยอื่น ๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับศักยภาพการออกฤทธิ์ของสมุนไพร ได้แก่ แหล่งที่เก็บ สภาวะ

แวดล้อมในการเพาะปลูกซึ่งอาจทำให้สารที่มีอยู่ในสมุนไพรมีปริมาณต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำพืชสมุนไพรมาสกัดแต่ละครั้งกลุ่มสารสำคัญที่แยกได้มีปริมาณต่างกัน (Nimiri *et al.,* 1999; Lin *et al.,* 1999) เนื่องจากสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทดสอบได้ดีจึงนำมาสกัดให้เป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ และนำเฉพาะส่วนที่มีสารปริมาณมากคือ ethyl acetate และ n-butanol fractions มาทดสอบหาค่า MIC และ MBC พบว่าต้านเชื้อที่นำมาทดสอบได้ดีโดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.02 ถึง 0.78 มก./มล. และ 0.19 ถึง 6.25 มก./มล. ตามลำดับ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าส่วนและสารผสมของ ellagitannin (hydrolysable tannins) จากเปลือกผลทับทิมสามารถต้านเชื้อ methicillin-resistant *S. aureus* ได้ (Machado *et al.,* 2003)

จากผลการทดสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol พบสารสำคัญได้แก่ flavonoids, tannins, sterols และ triterpenes รายงานการศึกษาของ Husain และคณะ (1992) พบ alkaloids, tannins และ glycosides เป็นสารสำคัญในเปลือกผลทับทิม Poyrazoglu และคณะ (2002) พบว่ามีสารพวก organic acids และ phenolic compounds ในผลทับทิม มีรายงานว่า tannins (Bruyne *et al.*, 1999; Chattopadhyay *et al.*, 2002), flavonoid (Laks, 1987) และ sterols (Sharma, 1993; Ramesh *et al.*, 2001) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ทั้ง Gram-positive และ Gram-negative ดังนั้นการที่สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Gram-negative ได้นั้น อาจเนื่องจากสารสำคัญพวก tannins, flavonoid และ sterols เนื่องจากทับทิมเป็นพืชสมุนไพรหาได้ง่ายในท้องถิ่น ราคาไม่แพงและสกัดง่าย ดังนั้นจึงควรศึกษาต่อในรายละเอียดสำหรับสารส่วนที่มีฤทธิ์ดี เพื่อที่จะนำมาพัฒนาใช้เป็นยาต้านแบคทีเรียต่อไป

สรุป

สารสกัดหยาบด้วย ethanol มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ ได้แก่ *E. coli* O157: H7, *E. coli* O26: H11, *E. coli* O111: NM, *E. coli* O22, *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella boydii* DMST 7124 และ *Salmonella london* DMST 7110 ค่าของ inhibition zone อยู่ในช่วง 10 ถึง 19 มม. ค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.09 ถึง 3.13 มก./มล. และ 3.13 ถึง 25 มก./มล. ตามลำดับ สารสกัดหยาบด้วย chloroform ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่นำมาทดสอบ ส่วนผลการศึกษาสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ทั้ง 2 fraction ได้แก่ ethyl acetate และ n-butanol fractions ของเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ต้านเชื้อได้ดี โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.02 ถึง 0.78 มก./มล. และ 0.19 ถึง 6.25 มก./มล. ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก Thailand-Tropical Diseases Research Programme. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ID 02-1-ENT-07-042) ปี 2004-2005 และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

วีณา จิรัจฉริยากูล. 2534. ยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

สงขลานครินทร์, มหาวิทยาลัย, คณะเภสัชศาสตร์. 2542. คู่มือปฏิบัติการเภสัชเวท 1. สงขลา : ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Ahmad, I., Mehmood, Z. and Mohammad, F. 1998. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. J. Ethnopharmacol., 62: 183-193.

Anesini, C. and Perez, C. 1993. Scanning of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol., 39: 119-128.

Ashkenazi, S., May-Zahav, M., Dinari, G., Gabbay, U., Zilberberg, R. and Samara, Z. 1993. Recent trends in the epidemiology of *Shigella* species in Israel.

Clin. Infect. Dis., 17: 897-899.

Bhattacharya, M.K., Bhayyacharya, S.K., Paul, M., Dutta, D., Dutta, P., Kole, H., Ghosh, A.B., Das, P. and Nair, G.B. 1994. Shigellosis in Calcutta during 1990-1992: antibiotic susceptibility pattern and clinical features. Diarrhoeal. Dis. Res., 12: 121-124.

Bruyne, T.D., Pieters, L., Deelstra, H. and Vlietinck, A. 1999. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. Biochem. Syst. Ecol., 27: 445-459.

Chattopadhyay, D., Arunachalam, G., Mandal, A.B., Sur, T.K., Mandal, S.C. and Bhattacharya, S.K. 2002. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. J. Ethnopharmacol., 82: 229-237.

Cheasty, T., Skinner, J.A., Rowe, B. and Threlfall, E.J. 1998. Increasing incidence of antibiotic resistance in *Shigella* from humans in England and Wales : recommendations for therapy. Microb. Drug. Resist., 4: 57-60.

Guevara, J.M., Chumpitaz, J. and Valencia, E. 1994. The *in vitro* action of plants on *Vibrio cholerae.* Rev gastroenterol Peru., 14: 27-31.

Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V. and Filho, B.P.D. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian Folk Medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro., 97:1027-1031.

Husain, A., Virmani, O.P. and Popli, S.P. 1992. Dictionary of Indian medicinal plants. Lucknow, India: CIMAP. 384.

Lak, P.E. 1987. Flavonoid biocides: Phytoalexin analogues from condensed tannins. Phytochem., 26: 1617-1621.

Jung, R., Fish, D.N., Obritsch, M.D. and MacLaren, R. 2004. Surveillance of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an urban tertiary-care teaching hospital. J. Hospital Infect., 57: 105-111.

Lima, A.A., Lima, N.L., Pinho, M.C., Barros, E.A., Teixeira, M.J., Martins, M.C. and Guerrant, R.L. 1995. High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol and tetracycline isolated from patients with Shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. Antimicrob. Agents. Chemother., 39: 256-259.

Lin, J., Opoku, A.R., Geheeb-Keller, M., Hutchings, A.D., Terblanche, S.E., Jager, A.K. and Staden, J. 1999. Preliminary screening of some traditional zulu medicinal plants for anti-inflammatory and anti-microbial activities. J. Ethnopharmacol., 68: 267-274.

Ling, L. and Chau, P.Y. 1987. Incidence of plasmids in multiply-resistant *Salmonella* isolates from diarrhoeal patients in Hong Kong. Epidemiol Infect., 99: 307-321.

Lorian, V. 1996. Antibiotics in Laboratory Medicine 4th edition. Baltimore: Williams & Wilkins.

Machado, T.B., Leal, I.C.R., Ameral, A.C.F., Santos, K.R.N., Silva, M.G. and Kuster, R.M. 2002. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. J. Braz. Chem. Soc., 13: 606-610.

Machado, T.B., Pinto, A.V., Pinto, M.C.F.R., Leal, I.C.R., Silva, M.G., Ameral, A.C.F., Kuster, R.M. and Santos, K.R.N. 2003. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* Int J. Antimicrob Agents., 21: 279-284.

National Committee For Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. Villanova: PA: M7-A5: NCCLS.

Navarro, V., Villarreal, M.L., Rojas, G. and Lozoya, X. 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. J. Ethnopharmacol., 53: 143-147.

Nimiri, L.F., Meqdam, M.M. and Alkofahi, A. 1999.

Antibacterial activity of Jordanian medicinal plants. Phamaceu Biol., 37: 196-201.

Poyrazoglu, E., Gokmen, V. and Artik, N. 2002. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. J. Food Composis Ana. 15: 567-575.

Prashanth, D., Asha, M.K. and Amit, A. 2001. Antibacterial activity of *Punica granatum*. Fitoterapia., 72: 171-173.

Ramesh, N., Viswanathan, M.B., Saraswathy, A., Balakrishna, K., Brindha, P. and Lakshmanaperumalsamy, P. 2001. Phytochemical and antimicrobial studies on *Drynaria quercifolia*. Fitoterapia., 72: 934-936.

Sasaki, M., Hiyama, E., Takesue, Y., Kodaira, M., Sueda, T. and Yokoyama, T. 2004. Clinical surveillance of surgical imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a Japanese hospital. J. Hospital Infect., 56: 111-118.

Sharma, R.K. 1993. Phytosterols: Wide-Spectrum antibacterial agents. Bioorg. Chem. 21: 49-60.

Trivedi, V.B., Kazmi, S.M. 1979. Kachnar and Anar as antibacterial drugs. Indian Drugs., 16: 295.

Voravuthikunchai, S.P. and Kitpipit, L. 2003. Activities of crude extract of Thai medicinal plants on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. Infect., 9 (suppl 1): 236.

Voravuthikunchai, S.P., Brusentsev, S., O'Rourke, J. and Mitchell, H. 2004a. Efficacy of crude extract of Thai medicinal plants on antibiotic-resistant *Helicobacter pylori* strains isolated from peptic ulcers. J. Clin. Microbiol. Infect., 10: 334.

Voravuthikunchai, S.P., Popaya, W. and Supavita, T. 2004b. Antibacterial activity of crude extracts of medicinal plants used in Thailand against pathogenic bacteria. Ethnopharmacologia., 33: 60-65.

Voravuthikunchai, S.P., Lortheeranuwat, A., Jeeju, W., Sririrak, T., Phongpaichit, S. and Supawita, T. 2004c. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. J. Ethnopharmacol., 94: 49-54.

Yoh, M., Frimpong, E.K. and Honda, T. 1997. Effect of antimicrobial agents, especially fosfomycin, on the production and release of vero toxin by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. FEMS Immunol. Med. Microbial., 19: 54-64.

Yoh, M., Frimpong, E.K., Voravuthikunchai, S.P. and Honda, T. 1999. Effect of Subinhibitory concentrations of antimicrobial agents (quinolones and macrolide) on the production of verotoxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. Can J. Microbiol., 45: 732-739.