Science and Technology
RMUTT Journal
Vol.5 No.1 (2015) : 63–69
www.sci.rmutt.ac.th/stj
Online ISSN 2229-1547

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของเปลือกผลไม้บางชนิด ต่อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Antibacterial Activities of Some Fruit Peels against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

สิริแข พงษ์สวัสดิ์[1] , ทรงพล จำดิษฐ์[1*]

[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110
*E-mail: songphon_c@rmutt.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลไม้จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ กระท้อน มะขาม มะนาว ลิ้นจี่ สับปะรด และเสาวรสต่อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จำนวน 5 ไอโซเลท เมื่อทดสอบด้วยวิธี disk diffusion และ broth microdilution พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ได้แก่ มะนาว เสาวรสและสับปะรด (ค่า MIC เท่ากับ 15.63 31.25 และ 62.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) แต่ไม่พบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกกระท้อน มะขามและลิ้นจี่

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย, เปลือกผลไม้, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Abstract

This study was aimed to evaluate the antibacterial activities of 6 fruit peel extracts: santol, tamarind, lemon, lychee, pineapple, and passion fruit against 5 isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Disk diffusion and broth microdilution assay revealed that lemon, passion fruit, and pineapple peel extracts

Received: May 18, 2015
Revised: Jun 30, 2015
Accepted: Jun 30, 2015

exerted the antibacterial activities (MIC were 15.63, 31.25, and 62.50 mg/L, respectively). No antibacterial activities of santol, tamarind, and lychee peel extracts were observed in this study.

Keywords: antibacterial activity, fruit peel, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

1. บทนำ

นับตั้งแต่มีการตรวจพบและเริ่มมีรายงานตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 จนถึงปัจจุบันการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในหลายพื้นที่ทั่วโลกและมีผู้ป่วยที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อนี้หลายกลุ่ม [1] MRSA สามารถก่อให้เกิดโรคได้หลายลักษณะตั้งแต่การติดเชื้อที่ผิวหนัง เช่น ฝี หนอง แผลติดเชื้อ ไปจนถึงเป็นสาเหตุของการติดเชื้อของอวัยวะภายในที่เป็นอันตรายถึงชีวิต โดยพบได้ทั้งในลักษณะของการติดเชื้อในโรงพยาบาลและมีรายงานพบการติดเชื้อในชุมชนที่เพิ่มมากขึ้น [2] จากข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่าการติดเชื้อที่มีสาเหตุจาก *S. aureus* ในบางพื้นนั้นเกินกว่า 50 เปอร์เซ็นต์เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยา methicillin [3] ในประเทศไทยเองก็มีรายงานว่าพบ MRSA สายพันธุ์ที่ดื้อต่อ chlorhexidine ซึ่งเป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้กันทั่วไปในโรงพยาบาล [2] การติดเชื้อ MRSA จึงเป็นโรคติดเชื้อที่จำเป็นต้องได้รับติดตามสถานการณ์อย่างต่อเนื่องในปัจจุบัน

จากการสำรวจพบว่าพืชพรรณบนโลกนั้นมีจำนวนประมาณ 250,000 ถึง 500,00 ชนิด แต่มีเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ที่ถูกนำมาใช้เป็นอาหารของสัตว์ต่าง ๆ ซึ่งมีหลายชนิดที่มนุษย์ใช้เป็นอาหารรวมถึงใช้เป็นยา [4-6] โดยพบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบ Phenolics, Polyphenols, Terpenoids, Alkaloids และสารกลุ่มอื่น ๆ ซึ่งมีรายงานถึงประสิทธิภาพในหลายด้าน เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย [5,7]

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีพืชหลากหลายชนิด บางชนิดก็มีคุณสมบัติเป็นสมุนไพรและถูกนำมาใช้เป็นยาสำหรับรักษาโรคต่าง ๆ งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของเปลือกผลไม้บางชนิดซึ่งไม่นิยมนำส่วนเปลือกมารับประทานและถูกทิ้งให้กลายเป็นขยะไปในที่สุด เพื่อเป็นแนวทางการเพิ่มมูลค่าให้กับของเหลือทิ้งให้เกิดประโยชน์ต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

Ethanol, absolute (BDH, VWR Prolab Chemicals) Brain heart infusion broth (BHI broth, Sisco Research Laboratory) Mueller Hinton broth (MHB broth, Sisco Research Laboratory) แผ่นดิสก์สำหรับทดสอบยาปฏิชีวนะ (6 mm Antibiotic assay disk, Whatman)

2.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) จำนวน 5 ไอโซเลท (isolates) ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ จังหวัดนครนายก แบคทีเรียทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสด้วยอาหาร 10 % (v/v) glycerol BHI broth แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร BHI agar บ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาทำการทดลอง

2.3 การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารจากเปลือกผลไม้

นำเปลือกผลไม้ 6 ชนิด ได้แก่ มะขาม (*Tamarindus indica* Linn.) มะนาว (*Citrus aurantifolia* (Christm. et Panz) Swing.) กระท้อน (*Sandoricum koetjape* Burm.f. Mer.) สับปะรด (*Ananas comosus* (Linn.) Merr.) ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) และเสาวรส (*Passiflora edulis* Sims) มาล้างให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง หั่นให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจนแห้ง บดให้ละเอียด แล้วบรรจุไว้ในภาชนะที่มีฝาปิด เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง การสกัดทำได้โดยหมักเปลือกผลไม้ 50 กรัมกับ absolute ethanol ปริมาตร 150 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงกรองเพื่อแยกกากออก นำของเหลวที่ได้ไปแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจนได้สารสกัดข้นหนืด เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในภาชนะสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี disk diffusion

เตรียมเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับสารละลาย McFarland standard no. 0.5 (จำนวนเซลล์ประมาณ 1.5 x 10^8 CFU/mL) จากเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร BHI broth อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (sterile cotton swab) จุ่มลงในเซลล์แขวนลอย แล้วขีดลงบนอาหาร MHA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นเตรียมแผ่นดิสก์สำหรับทดสอบโดยชั่งสารสกัดที่ได้จากข้อ 2.3 มา 250 มิลลิกรัม ละลายด้วย absolute ethanol ปริมาตรน้อยที่สุดที่ทำให้สารสกัดเหลวและสามารถดูดได้ด้วย micropipette แล้วจึงดูดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตรหยดลงบนแผ่นดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ทดสอบโดยวางแผ่นดิสก์ลงบนผิวหน้าของอาหาร MHA ทำการทดสอบสารสกัดชนิดละ3 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร โดยใช้ absolute ethanol เป็นชุดควบคุม (negative control)

2.5 การหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC)

ทดสอบด้วยวิธี broth microdilution โดยเจือจางสารสกัดแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นลดลงครั้งละสองเท่า (two-fold dilution) ด้วยอาหาร MHB ในไมโครไตเตอร์เพลทชนิด 96 หลุม (96-well microplate) ให้มีความเข้มข้นของสารสกัดอยู่ในช่วง 125-1.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยให้แต่ละหลุมมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครลิตร เจือจางเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยที่เตรียมด้วยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 2.4 ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^6 CFU/mL เติมลงไปหลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจึงอ่านผล โดยค่า MIC คือ ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ จากนั้นเพาะเชื้อจากหลุมที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหาร BHI agar เพื่ออ่านค่า MBC ซึ่งค่า MBC คือ ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ ทำการทดสอบสารสกัดชนิดละ 3 ซ้ำ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี disk diffusion

เมื่อทดสอบด้วยวิธี disk diffusion ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งพบว่าสารสกัดจากเปลือกมะนาวสามารถยับยั้ง MRSA ได้ดีที่สุด ในขณะที่สารสกัดจากเสาวรสและลิ้นจี่สามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA ได้ใกล้เคียงกัน ในขณะที่สารสกัดจากเปลือก มะขาม กระท้อน และลิ้นจี่ไม่พบฤทธิ์ต้าน MRSA

3.2 การหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC)

จากผลการทดลองที่ 3.1 ผู้วิจัยได้เลือกนำสารสกัดจากเปลือกมะนาว สับปะรดและเสาวรส ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง MRSA ได้มาหาค่า MIC และ MBC ด้วยวิธี broth microdilution ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลไม้ทั้ง 3 ชนิดมีค่า MIC และ MBC ดังตารางที่ 2 โดยสารสกัดจากเปลือกมะนาวมีฤทธิ์ในการยับยั้ง MRSA ทั้ง 5 ไอโซเลทได้ดีที่สุด (MIC เท่ากับ 15.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาคือสารสกัดจากเปลือกเสาวรส (MIC เท่ากับ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และสับปะรด (MIC เท่ากับ 62.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาจากค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากเปลือกผลไม้ที่ทดสอบพบว่าเป็นความเข้มข้นเดียวกัน (สารสกัดจากเปลือกมะนาวและสับปะรด) หรือต่างกันเพียงสองเท่า (สารสกัดจากเปลือกเสาวรส) แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบของเปลือกผลไม้ทั้งสามชนิดออกฤทธิ์ต่อ MRSA ในลักษณะฆ่าแบคทีเรีย (bactericidal activity) [8]

สารออกฤทธิ์ที่พบในน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีมากที่ผิวของผลมะนาวนั้น ได้แก่ limonene, geranial, geraniol และ neral [9,10] ซึ่งมีรายงานถึงคุณสมบัติในการต้านจุลชีพของสารกลุ่มดังกล่าว [11-14] ส่วนเปลือกของสับปะรดมีสารประกอบกลุ่ม polyphenols เป็นองค์ประกอบ รวมทั้งพบ myricetin และ coumaric acid ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ [15-17] ในขณะที่เปลือกเสาวรสนั้นมีรายงานว่าพบ isoorientin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม flavonoids ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ [18-19]

ตารางที่ 1 ขนาดของบริเวณยับยั้งเมื่อทดสอบสารสกัดจากเปลือกผลไม้ชนิดต่าง ๆ กับ MRSA ด้วยวิธี disk diffusion

เปลือกผลไม้	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร±SD)				
	MRSA1	MRSA2	MRSA3	MRSA4	MRSA5
กระท้อน	n	n	n	n	n
มะขาม	n	n	n	n	n
มะนาว	20.00±0.00	16.67±0.67	18.33±0.88	20.00±0.0	10.00±0.00
ลิ้นจี่	n	n	n	n	n
สับปะรด	7.00±0.00	7.00±0.00	6.67±0.17	7.00±0.33	7.33±0.33
เสาวรส	7.67±0.33	7.33±0.33	7.83±0.73	7.00±0.00	7.67±0.00

หมายเหตุ n หมายถึงไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

ตารางที่ 2 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากเปลือกผลไม้เมื่อทดสอบกับ MRSA ด้วยวิธี broth microdilution

เปลือกผลไม้	MIC/MBC	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)				
		MRSA1	MRSA2	MRSA3	MRSA4	MRSA5
มะนาว	MIC	15.63	15.63	15.63	15.63	15.63
	MBC	15.63	15.63	15.63	15.63	15.63
เสาวรส	MIC	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25
	MBC	62.50	62.50	62.50	62.50	62.50
สับปะรด	MIC	62.50	62.50	62.50	62.50	62.50
	MBC	62.50	62.50	62.50	62.50	62.50

4. สรุปผลการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อ MRSA ของสารสกัดจากเปลือกผลไม้จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ กระท้อน มะขาม มะนาว ลิ้นจี่ สับปะรด และเสาวรส ด้วยวิธี disk diffusion และ broth microdilution พบว่าสารสกัดจากเปลือกมะนาวมีฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อ MRSA ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากเปลือกเสาวรสและสับปะรด ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นว่าเปลือกของผลไม้บางชนิดซึ่งเป็นของเหลือทิ้งนั้นมีองค์ประกอบที่เป็นสารต้านจุลชีพได้ จึงควรมีการศึกษาในด้านต่าง ๆ เช่น ชนิดและปริมาณสารสำคัญที่พบในเปลือกผลไม้จากแหล่งต่าง ๆ เพิ่มเติมเพื่อเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์จากเปลือกผลไม้ในอนาคตต่อไป

5. เอกสารอ้างอิง

[1] H.W. Boucher, G.R. Corey. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*. 46(2008): S344-S349.

[2] อ. ลุลิตานนท์, ธ. ดำนา, อ. ชนะวงศ์, พ. ศรีเบญจลักษณ์, น. เจริญศรี, ส. สังคีรี, พ. สายสุด, ส. เคนพรม, ช. วิลาชัย. การติดตามสถานการณ์ของเชื้อ methicillin-resistant Staphylococcus aureus ที่ไวต่อ vancomycin และ chlohexidine ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด*. 24(2555): 22-28.

[3] C. Mejia, J. Zurita, M. Guzman-Blanco. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 14(2010): S79-S86.

[4] S.M. Ali, A.A. Khan, I. Ahmed, M. Musaddiq, K.S. Ahmed, H. Polasa, L.V. Rao, C.H. Habibullah, L.A. Sechi, N. Ahmed. Antibacterial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 4(2005): 1-7.

[5] M.M. Cowan, Plant product as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(1999): 564-582.

[6] R. O'Mahony, H. Al-Khtheeri, D. Weerasekera, N. Fernando, D. Vaira, J. Holton, C. Basset. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*. 11(2005): 7499-7505.

[7] D.S. Alviano, C.S. Alviano. Plant extracts: Search for new alternatives to treat microbial diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 10(2009): 106-121.

[8] G.A. Pankey, L.D. Sabath. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infection. *Clinical Infectious Disease.* 38(2004): 864-870.

[9] O.A. Lawal, I.A. Ogunwande, M.S. Owolabi, A.O. Giwa-Ajeniya, A.A. Kasali, F.A. Abudu, A.A. Sanni, A.R. Opoku. Comparative analysis of essential oils of *Citrus aurantifolia* Swingle and *Citrus reticulate* Blanco, from two different localities of Lagos State, Nigeria. *American Journal of Essential Oils and Natural Products.* 2(2014): 8-12.

[10] P.M.J. Dongmo, F. Tchoumbougnang, F.F. Boyom, E.T. Sonwa, P.H.A. Zollo, C. Menut. Antiradical, antioxidant activities and anti-inflamatory potential of the essential oils of the varieties of *Citrus limon* and *Citrus aurantifolia* growing in Cameroon. *Journal of Asian Scientific Research*. 3(2013): 1046-1057.

[11] S. Inouye, T. Takizawa, H. Yamaguchi. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antibacterial Chemotherapy*. 47(2001): 565-573.

[12] D.L. Miladinovic, B.S. Ilic, B.D. Docic, M.D. Miladinovic. An *in vitro* antibacterial study of savory essential oil and geraniol in combination with standard antimicrobials. *Natural Product Communications.* 9(2014): 1629-1632.

[13] J.M. Kim, M.R. Marshall, J.A. Cornell, J.F. Preston III, C.I. Wei. Antibacterial activity of Carvacrol, citral, and Geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science.* 60(1995): 1364-1368.

[14] Z. Maksimovici, M. Milenkovic, D. Vucicevic, M. Ristic. Chemical composition and antimicrobial activity of *Thymus pannonicus* All. (Lamiaceae) essential oil. *Central European Journal of biology*. 3(2008): 149-154.

[15] J.A. Larrauri, P. Ruperez, F.S. Calixto. Pineapple shell as a source of dietary fiber with associated polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(1997): 4028-4031.

[16] R. Hendra, S. Ahmad, A. Sukari, M.Y. Shukor, E. Oskoueian. Flavonoid analyses

and antimicrobial activity of various parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl fruit. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(2011): 3422-3431.

[17] D. Stojkovic, J. Petrovic, M. Sokovic, J. Glamoclija, J. Kukic-Markovic, S. Petrovic. *In situ* antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, *p*-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93(2013): 3205-3208.

[18] M.L. Zeraik, J.H. Yariwake. Analysis of passion fruit rinds (*Passiflora edulis*): isoorientin quantification by HPTLC and evaluation of antioxidant (radical scavenging) capacity. *Química Nova*. 35(2012): 541-545.

[19] A.G. Ingale, A.U. Hivrale. Pharmacological studies of *Passiflora* sp. and their bioactive compounds. *African Journal of Plant Science*. 4(2010): 417-426.