PROCEEDINGS

6th Conference

2019

6th National and International Conference (NICs)

on "Smart Society Development"

การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 6 ประจำปี 2562

"การพัฒนาสู่สังคมอัจฉริยะ"

9th February 2019

Pathumthani University, Thailand

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดผลกระวาน
Biological activities of extracts from *Amomum krervanh* Pierre

ไพรชา สุทนต์[1] และ ฐาปกรณ์ ไตรยะวิภาค[2]

[1,2] คณะสาธารณสุขศาสตร์และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยปทุมธานี

บทคัดย่อ

โรคอาหารเป็นพิษครอบคลุมถึงอาการป่วยที่เกิดจากการรับประทานอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อหรือสารพิษเข้าไป ข้อมูลจากสำนักระบาดวิทยาในช่วงปี พ.ศ. 2553 – 2557 พบว่า เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* เป็นสาเหตุอันดับ 1 ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ การศึกษาครั้งนี้ได้นำสารสกัดผลกระวาน (*Amomum krervanh* Pierre ex Gagnep ในวงศ์ Zingiberaceae) มาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide และฤทธิ์ต้านเชื้อแบททีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* DMST 22842, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Vibrio cholerae* DMST 2873 และ *Shigella dysenteriae* DMST 15111 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของผลกระวาน มีฤทธิ์ต้านการอักเสบใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Indomethacin โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 24.64±1.97, 26.04±0.67 µg/ml ตามลำดับ สำหรับฤทธิ์ต้านเชื้อแบททีเรียพบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของผลกระวาน มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 ค่า MIC เท่ากับ 2.5 mg/ml และค่า MBC เท่ากับ 5 mg/ml ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนับสนุนการใช้กระวาน เป็นสมุนไพรรักษาอาการอาหารเป็นพิษตามองค์ความรู้แบบดั้งเดิม

คำสำคัญ : ผลกระวาน, ต้านการอักเสบ, ต้านเชื้อแบททีเรีย

Abstract

Food poisoning caused by eating contaminated food or water. The information from the Bureau of Epidemiology, Thailand during year 2010 - 2014 found that Vibrio parahaemolyticus is the 1st cause of food poisoning. The effects of absolute ethanol extract of Krawarn (Amomum krervanh Pierre ex Gagnep) on the anti-inflammatory stimulant, nitric oxide (NO) and anti-bacterial activity such as Staphylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 25922, Salmonella typhi DMST 22842, Salmonella typhimurium ATCC 13311, Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802, Vibrio cholerae DMST 2873 and Shigella dysenteriae DMST 15111. The ethanol extract showed nitric oxide inhibitory activities with IC_{50} value of 24.64±1.97 which was better than indomethacin (IC_{50} = 26.04 ±0.67 µg/ml. Moreover, the extract showed anti-bacterial activity V. parahaemolyticus ATCC 17802 with MIC and MBC value are 2.5 and 5 mg/ml, respectively. This study support Krawarn use as a herb to treat food poisoning according to traditional knowledge.

Keyword: *Amomum krervanh* Pierre ex Gagnep, Anti-inflammatory activity, Antibacterial activity

บทนำ

อาหารเป็นพิษเป็นชื่อโรคที่ครอบคลุมถึงอาการป่วยที่เกิดจากการรับประทานอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อหรือสารพิษเข้าไป ข้อมูลจากสำนักระบาดวิทยาในช่วงปี พ.ศ. 2553 – 2557 พบว่า เชื้อ Vibrio parahaemolyticus เป็นสาเหตุอันดับ 1 ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษคิดเป็นร้อยละ 51.08 รองลงมา ได้แก่ Salmonella spp. 26.04% และ Staphylococcus aureaus 22.22% ซึ่งกระวาน (Amomum krervanh Pierre ex Gagnep พืชในวงศ์ Zingiberaceae) เป็นสมุนไพรพื้นเมืองของจังหวัดจันทบุรี ประเทศไทย โดยกระวานจะถูกใช้เป็นเครื่องเทศรับประทานร่วมกับอาหารพื้นเมือง เช่น หมูเรียง ไก่กระวาน เป็นต้น กระวานมีสรรพคุณแก้ท้องอืดเฟ้อ ช่วยขับลม ใช้ผสมกับยาระบายเช่น มะขามแขก เพื่อบรรเทาอาการคลื่นไส้อาเจียน ผลกระวานยังเป็นส่วนประกอบในตำรับยาสมุนไพรไทยตามคัมภีร์แพทย์แผนไทยหลายตำรับ ที่ถูกนำมาใช้บรรเทาอาการเจ็บป่วยในปัจจุบัน ตำรับ เช่น พิกัดตรีธาตุ เป็นยาแก้ธาตุพิการ แก้ลม แก้เสมหะ แก้ไข้ พิกัดตรีทุราวสา เป็นยาแก้เสมหะ แก้ลม บำรุงน้ำดี แก้พิษตานซาง นอกจากนั้นยังเป็นตัวยาในตำรับยาธาตุบรรจบ ใช้บรรเทาอาการท้องอืดเฟ้อ และอาการอุจจาระธาตุพิการ ซึ่งจากการทบทวนวรรณกรรมไม่ปรากฏหลักฐานงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ผู้วิจัยจึงได้มีความสนใจที่จะศึกษาภูมิปญญาการแพทยแผนไทย เพื่อสนับสนุนการใช้กระวาน เป็นสมุนไพรรักษาอาการอาหารเป็นพิษตามองค์ความรู้แบบดั้งเดิม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide ด้วย Griess Reagent
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบททีเรีย ด้วยวิธี disc diffusion และ two-fold serial dilution

สมมติฐานของการวิจัย

สารสกัดผลกระวานมีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide และมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบททีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษได้

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

Antimicrobial assay

เชื้อจุลชีพที่ใช้ทดสอบ มีดังนี้ Staphylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 25922, Salmonella typhi DMST 22842, Salmonella typhimurium ATCC 13311, Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802, Vibrio cholerae DMST 2873, Shigella dysenteriae DMST 15111, Mueller–Hinton agar (Oxoid, England), Mueller–Hinton broth (Himedia, India), DifcoTM plate count agar (BD, USA) และ Resazurin (Sigma, USA)

การเตรียมสมุนไพรและการสกัดสมุนไพร

นำวัตถุดิบผลกระวานที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 50°C องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเก็บไว้ที่ตู้ดูดความชื้น สารสกัดชั้นน้ำ: นำผลกระวานอบแห้งมาสกัดด้วยวิธีการต้มน้ำ เคี่ยวให้เหลือ 1 ใน 3 ส่วน ควบคุมอุณหภูมิที่ 60 °C นำสารสกัดที่ได้ไปกรองและทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophillizer

สารสกัดชั้นเอทธานอล: นำผลกระวานอบแห้งมาสกัดด้วยวิธีการหมักกับ 95% เอทธานอล เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำสารสกัดไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง evaporator ได้จะสารสกัดชั้นเอทธานอล

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

Disc diffusion assay: วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพโดยหยดส่วนสกัดความเข้มข้น 500 µg/ml สำหรับสารสกัดชั้นเอทธานอลและความเข้มข้น 100 µg/ml สำหรับสารสกัดชั้นน้ำ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ปล่อยไว้ให้แห้ง ในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นเตรียมเชื้อที่นำมาทดสอบ มาปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อ และป้ายลงบนอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) จากนั้นนำ paper disc ที่เตรียมไว้มาวาง จานละ 4 paper disc นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดบริเวณโซนใสรอบๆ paper disc (inhibition zone) (Lorian, 1996)

Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentrations (MBC) : สารสกัดที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพจากการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion จะถูกนำมาทดสอบเพื่อหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) (Sarker et al., 2007) โดยนำสารสกัดมาละลายและเจือจางในอาหาร Muller Hinton Broth ด้วยวิธี two-fold serial dilution ใน 96-well microplates ปริมาตร 50 µl จากนั้นเตรียมเชื้อที่นำมาทดสอบ มาปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland และเจือจาง 200 เท่า ใส่ลงใน 96-well microplates ปริมาตร 50 µl นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาใส่ resazurin ปริมาตร 10 µl ลงใน plate และบ่มไว้ 2 ชั่วโมง ทำการอ่านผลโดยสังเกตความเข้มข้นต่ำสุดที่ resazurin ไม่เปลี่ยนสี บันทึกค่า MIC หลังจากนั้นทำการทดสอบเพื่อหาค่า Minimal bactericidal concentration (MBC) โดยการนำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นที่ได้จากการทดสอบ MIC ป้ายลงบนอาหาร Nutrient agar บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการอ่านผลค่า MBC จะดูจากความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่มีการเจริญเติบโต

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistic analysis)

การทดสอบตัวอย่างๆ ละ 3 ครั้งในการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย สามารถนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (± SEM)

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 ที่มีส่วนประกอบของ 10% fetal bovine serum (FBS) 100 unit/ml, 1% penicillin 100 µg/ml และ streptomycin 25 µg/ml ในตู้ CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ที่ 5% อุณหภูมิ 37 °C และทำการ subcultured ทุก 2 วัน รอจนได้ปริมาณเซลล์หนาแน่นร้อยละ 80 เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยศึกษาการยับยั้งการหลั่ง NO ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS

เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ใน 96 wells plate (cell มีความเข้มข้น 1×10^5 cells/well) โดยบ่มเซลล์ใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ที่ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที ล้าง cell ด้วย PBS solution เติมอาหาร RPMI ที่ประกอบด้วย 100 ng/ml LPS ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละหลุมของชุดทดสอบเติม test sample ลงไป 100 µl incubate cells ใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ที่ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยในการศึกษาใช้ indomethacin เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบตรวจวัดปริมาณ NO ที่เซลล์สร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมมา 100 µl ใส่ใน 96 well plate เติม griess reagent แต่ละหลุม 100 µl แล้วตรวจวัดปริมาณ NO ที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วย microplate reader (Sudsai *et al.,* 2013) นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งและสร้างกราฟระหว่างร้อยละการยับยั้งและความเข้มข้นของตัวอย่างเพื่อหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่ สามารถยับยั้ง NO ที่ 50% (IC_{50}; n เท่ากับ 3)

การคำนวณร้อยละการยับยั้งการหลั่ง NO ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(A-B) / (A-C)] \times 100$$

โดยที่ A - C: nitrite concentration; A : LPS (+), sample (-), B: LPS (+), sample (+), C: LPS (-), sample (-)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 ใช้วิธี MTT assay โดยอาศัยเอนไซม์ภายใน mitochondria ของเซลล์ที่มีชีวิตรีดิวส์ MTT สารสีเหลืองเป็นผลึก formazan สีม่วง โดยหลังจากทำการทดสอบสารตัวอย่างกับเซลล์ RAW 264.7 ใน CO_2

incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ที่ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT (10 µl, 5 mg/ml) ในแต่ละ wells แล้วบ่มต่อใน CO_2 incubator เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นดูดสารละลายทิ้งไปแล้วเติม DMSO 100 µl เพื่อละลายผลึก formazan แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วย microplate reader โดยสารที่ทดสอบจะถือว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่า 80% เมื่อเทียบกบกลุ่มควบคุม (n เท่ากับ 3) (Sudsai *et al*., 2013)

สรุปผลการวิจัย

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดผลกระวาน

สารสกัด	Biological activities							
	anti-inflammatory IC_{50} (µg/ml)	Antibacterial activity Inhibition zone (mm), MIC, MBC (mg/ml)						
		S. aureus	*E. coli*	*S. typhi*	*S. typhimurium*	*V. parahaemolyticus*	*V. cholerae*	*S. dysenteriae*
EtOH	24.64	NI	NI	NI	NI	8±1, 2.5, 5	NI	NI
Water	28.34	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Genta (µg/ml)	-	25±0, 0.625, 0.625	23±0, 0.625, 0.625	23±1, 0.625, 0.625	22±1, 0.3125, 0.3125	19±1, 0.625,0.625	22±1, 1.25, 1.25	22±0, 1.25, 1.25
Indomethacin (µg/ml)	26.04	-	-	-	-	-	-	-

สารสกัดใช้ความเข้มข้น 5 mg/disc และค่าที่แสดงรวมความกว้างของ disc 6 mm. NI= ไม่มี inhibition zone, MIC= Minimum inhibitory concentration, MBC= Minimum bactericidal concentrations

อภิปรายผล

สารสกัดชั้นเอทานอลของผลกระวานมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802 ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide ที่เป็นสาเหตุของอาการอักเสบของเนื้อเยื่อได้ ผลการศึกษาในครั้งนี้ จึงสนับสนุนการใช้กระวานเป็นสมุนไพรรักษาอาการอาหารเป็นพิษตามองค์ความรู้แบบดั้งเดิม และการพัฒนายาสมุนไพรเพื่อให้รับประทานน้อยลงแต่มีฤทธิ์ลดการเกิดอุจจาระร่วงได้ก็น่าจะต้องใช้วิธีการดองเหล้าหรือสกัดด้วยเอทธานอลมากกว่าการต้มน้ำหรือสกัดด้วยน้ำ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บรรณานุกรม

สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ประจำปี 2557 สืบค้น ณ วันที่ 30 พฤศจิกายน 2561 http://boe.moph.go.th/

Lorian .V. (1996). Antibiotics in Laboratory Medicine. 3rd ed. Williams&Wilkins. Baltimore.

Sarker S. D, Nahar L and Kumarasamy Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. Methods.: 321-4.

Sudsai, T., Wattanapiromsakul, C., Nakpheng, T. and Tewtrakul, S. (2013). Evaluation of the Wound Healing Property of Boesenbergia longiflora Rhizomes. Journal of Ethnopharmacology, 150, 223-231.