

พฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของผลเสมา

Phytochemicals and Biological Activities of *Opuntia elatior* Fruit

บุษราคัม สิงห์ชัย* และอุมาพร แดงขวัญทอง

สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

ตำบลนาวัน อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี 76000

ดำรงค์ พงศ์พุทธานติ

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

ตำบลนาวัน อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี 76000

Butsarakham Singchai* and Umaporn Daengkhwanthong

Division of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Phetchaburi Rajabhat University,

Nawung, Muang, Phetchaburi 76000

Dumrong Pongputthachat

Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Phetchaburi Rajabhat University,

Nawung, Muang, Phetchaburi 76000

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ความเป็นพิษต่อเซลล์ ปกติและฤทธิ์ต้านไวรัสเริมชนิด 1 ของสารสกัดผลเสมา ผลเสมาถูกเก็บในเดือนเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2559 ที่อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี แยกเปลือกและเนื้อผลออกจากกัน ทำให้แห้ง แล้วบดและสกัดด้วยเอทานอล ทดสอบกลุ่มสารพฤกษเคมี 8 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ แทนนิน คูมาริน และสเตอรอยด์ ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH โดยมีวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน การต้านแบคทีเรียใช้การทดสอบ agar diffusion ต่อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ 10 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *M. luteus*, *S. marcescens*, *E. aerogenes*, *S. typhimurium*, *P. vulgaris* และ *P. aeruginosa* โดยมีเอทานอลเป็นสารมาตรฐานเชิงลบ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell) และฤทธิ์ต้านไวรัสเริมชนิด 1 ด้วยวิธี green fluorescent protein (GFP) โดยมียาเป็นสารมาตรฐานควบคุม ได้แก่ อีลิปติซิน และอะไซโคลเวียร์ ตามลำดับ ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดเปลือกผลและเนื้อผลพบสาร 3 กลุ่ม ได้แก่ สเตอรอยด์ น้ำตาลไดออกซี และแทนนิน โดยสารสกัดจากเปลือกและวิตามินซีมีการต้านออกซิเดชันต่ำที่ค่า $IC_{50} \pm SD$ เท่ากับ $0.82 \pm 33.4 \mu g/ml$ และ $2.290 \pm 0.30 \mu g/ml$ ตามลำดับ สารสกัดเปลือกผลแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงกว่าสารสกัดเนื้อผล โดยสารสกัดเปลือกผลมีฤทธิ์สูงที่สุดในการต้านแบคทีเรีย *S. saprophyticus* ที่ความเข้มข้นต่ำสุด

(MIC) เท่ากับ 0.24 ± 0.12 mg/ml และแสดงฤทธิ์ต่อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในช่วงความเข้มข้นต่ำสุด 1.00-6.00 mg/ml สารสกัดเนื้อผลมีฤทธิ์สูงสุด ในการต้านแบคทีเรีย *S. saprophyticus* เช่นเดียวกับสารสกัดเปลือกผล ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.75 ± 0.00 mg/ml และแสดงฤทธิ์ต่อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในช่วงความเข้มข้นต่ำสุด 1.50-6.00 mg/ml สารสกัดทั้งสองชนิดไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell) และไม่แสดงฤทธิ์ต้านไวรัส เริมชนิด 1 ยาอีลิปติซิน (ellipticine) และอะไซโคลเวียร์ (acyclovir) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.75 และ 4.29 μ g/ml ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติและการต้านไวรัสเริมชนิด 1 ตามลำดับ

คำสำคัญ : เสมวา; ฤทธิ์ทางชีวภาพ; พฤษเคมี

Abstract

This research was aimed to study phytochemical screening test, antioxidant activity, antibacterial activities, cytotoxicity and antiviral (HSV-1) activity of the extracts of *O. elatior* fruit. The fruit was harvested in December 2015. After separation peeled fruit and flesh from juice, dried and ground samples were successively extracted with ethanol. Both extracts were studied 8 standard preliminary phytochemical tests, including alkaloids, cardiac glycosides, flavonoids, saponins, anthraquinone glycosides, tannins, coumarins, and steroids. The antioxidant activity of the extracts was tested by DPPH assay, and vitamin C was a positive control. The antimicrobial activities were tested by agar diffusion method, against ten human pathogenic microorganisms, including *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *M. luteus*, *S. marcescens*, *E. aerogenes*, *S. typhimurium*, *P. vulgaris* and *P. aeruginosa*, and ethanol was a negative control. Cytotoxicity tests were performed against primate cell line (Vero cell) and anti-Herpes simplex virus type 1 by green fluorescent protein (GFP) method, with standards, ellipticine and acyclovir as positive controls, respectively. The results showed that; steroids, deoxy sugars and tannins were found in both extracts. Also they showed the low antioxidant activity with DPPH assay. The $IC_{50} \pm SD$ of peeled fruit extract was 0.82 ± 33.4 μ g/ml and vitamin C was the standard, showed $IC_{50} \pm SD$ of 2.290 ± 0.30 μ g/ml. On the other hand, peel extract inhibited human pathogenic antimicrobial activity against 10 organisms. The peel fruit extract displayed % inhibition higher than that of flesh fruit extract. The highest antimicrobial activities of peel fruit extract were against *S. saprophyticus* at the minimum concentration of 0.24 ± 0.12 mg/ml. This extract showed the minimum inhibitory concentration against other microorganisms in range of 1.00-6.00 mg/ml. The highest antimicrobial activities of flesh fruit extract were found to against *S. saprophyticus* at the minimum concentration of 0.75 ± 0.00 mg/ml. This extract showed the minimum concentration inhibited against other microorganisms in range of 1.50-6.00 mg/ml. Both extracts showed no activities against Vero cell line and HSV-1. Notably, standard drugs, ellipticine and acyclovir showed IC_{50} of 0.75 and 4.29 μ g/ml for cytotoxicity and anti-HSV tests, respectively.

Keywords: *Opuntia elatior*, biological activity, phytochemical

1. บทนำ

เสมา (รูปที่ 1) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Opuntia elatior* Mill. วงศ์ Cactaceae [1] *Opuntia* เป็นพืชสกุลใหญ่ของพุ่มไม้อวบน้ำ ส่วนใหญ่จะเติบโตบริเวณที่มีความแห้งแล้ง มีการสะสมน้ำไว้ในส่วนของต้น รากและใบ เป็นพืชที่รู้จักกันโดยทั่วไป คือ ลูกแพร์มีหนาม (Prickly pears) [2] ลำต้นต่อกันเป็นข้อ ๆ ขึ้นไป สูง 2-4 เมตร มีลักษณะเป็นแผ่นแบน รูปไข่กลับ ยาว 8-20 ซม. กว้าง 8-12 ซม. สีเขียวเข้ม มีหนาม เป็นกระจุก 2-8 อัน ยาว 2-5 ซม. หรืออาจยาวได้ถึง 8 ซม. ดอกเดี่ยวสีแดงหรือชมพู ภายในสีขาว บานโต 5 ซม. อยู่ได้นานหลายวัน ผลรูปลูกแพร์มีหนามสีแดงเนื้อสีแดง เมล็ดสีน้ำตาล ขนาดประมาณ 0.5 ซม. [3]สรรพคุณทางยา คือ ใช้รักษา โรคท้องมาน เนื้องอก แก้วปวด บรรเทาอาการอักเสบ อาการติดเชื้อในลูกนัยน์ตา รักษาโรคหลอดลมอักเสบ โรคหอบหืด โรคหนองใน อาการไอกรน เพิ่มการหลั่งของน้ำดี และขับเสมหะ [4] เสมาพบมากในบริเวณที่รกร้าง จังหวัดเพชรบุรี ประชาชนในท้องถิ่นได้นำผลสุกของเสมาให้วัวกิน ผลเสมา มีองค์ประกอบเบตาไซยานิน ซึ่งเป็นสารที่ให้สีแดงเข้ม [3] ในประเทศอินเดียพบปริมาณเบตาไซยานินในน้ำผล 47.10 mg/100 ml ปริมาณฟีนอลิกรวม 49.82 mg น้ำหนักสมมูลกรดกลลิก/100ml มีความเป็นกรดด้วยค่า pH เท่ากับ 4.6 ปริมาณน้ำตาลรวม 11.41 g/ml และสารบริสุทธิ์ชนิด opuntiol ร้อยละ 1 [4] นอกจากนี้ยังพบแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกายมนุษย์ ได้แก่ โพแทสเซียม แคลเซียม โซเดียม เหล็ก สังกะสี และทองแดง [2] มีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี acetic acid-induced writhing test ในหนูทดลอง พบว่าน้ำผลเสมา 15 ml/kg น้ำหนักตัว และยาโคลฟีแนคโซเดียม 10 mg/kg

น้ำหนักตัว สามารถยับยั้งการอักเสบได้ร้อยละ 54.69±5.98 และ 60.99±2.48 ตามลำดับ [5] นอกจากนี้ยังมีการรายงานสารสกัดเนื้อผลของเสมาปริมาณ 300 และ 900 mg/kg น้ำหนักตัว ทำให้หนูตัวเมียมีการลดการตั้งครรภ์ร้อยละ 67 และ 84 ตามลำดับ แต่ทั้งนี้สารสกัดไม่มีผลต่อการปริมาณของสเปิร์มในหนูตัวผู้ โดยพบว่าปริมาณระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนสูงกว่าหนูที่ไม่ได้รับสารสกัดเสียอีก [6] ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ และฤทธิ์ต้านไวรัสเสริมของผลเสมามาก่อน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาเรื่องนี้



รูปที่ 1 เสมา (*O. elatior*)

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมสารสกัด

เก็บผลเสมาเดือนธันวาคม พ.ศ. 2558 รีมถนนหาดเจ้าสำราญ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี แยกเปลือกผลและเนื้อผลออกจากน้ำและเมล็ด ตรวจสอบเอกลักษณ์พืชโดย อาจารย์ ดร.บุญสนอง ช่วยแก้ว อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ผึ่งตัวอย่างให้แห้งสนิท และบดให้ละเอียดแล้วสกัดด้วยการหมักในเอทานอล เป็นเวลา 3 วัน 3 ครั้ง ระเหย

สารสกัด ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เก็บสารสกัดไว้ทดสอบต่อไป

2.2 การทดสอบหาสารสำคัญเบื้องต้นในส่วน ของพืชที่น่าสนใจ

การทดสอบพฤษเคมีเบื้องต้นทั้งหมด 8 กลุ่มสาร [7] ดังนี้

2.2.1 การทดสอบแอลคาลอยด์ นำสารสกัดมาเล็กน้อย 2 M HCl 2 ml ต้ม 2 นาที นำส่วนใส 1 ml แล้วเติม Dragendorff's reagent 2 หยด สังเกตการณเปลี่ยนสี

2.2.2 การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ นำสารสกัดมาเล็กน้อยเติม 10 % lead acetate ในน้ำ ต้มให้เดือดเบา ๆ 15 นาที ทำให้เย็น กรองแล้ว สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน นำสารละลายไประเหยจนเกือบแห้ง แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด ดังนี้ หลอดที่ 1 ทดสอบส่วนที่เป็นสเตอรอยด์ โดย Liebermann-Burchard reaction หยด glacial acetic acid ลงไป 3 หยด เขย่า แล้วค่อย ๆ หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 หยด สังเกตการณเปลี่ยนสี หลอดที่ 2 ทดสอบส่วนที่เป็นบิวทิโนไลด์ แลคโตน โดย Kedde's reaction หยด Kedde's reagent ลงไป 1 ml และสารละลาย 1 M NaOH 2-3 หยด สังเกตการณเปลี่ยนสี หลอดที่ 3 ทดสอบส่วนที่เป็นน้ำตาลดีออกซี โดย Keller-Kiliane reagent เติม FeCl_3 reagent 3 ml เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 ml ไปตามข้าง ๆ หลอด สังเกตการณเปลี่ยนสี ระหว่างรอยต่อสารละลาย

2.2.3 การทดสอบฟลาโวนอยด์ นำสารสกัดมาเล็กน้อยสกัดไขมันออกด้วยเฮกเซน แล้วละลายใน 80 % เอทานอล 10 ml แบ่งใส่หลอดทดลอง 2 หลอด ดังนี้ หลอดที่ 1 ทดสอบ Cyanidin เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 ml และลวดแมกนีเซียม 1 แผ่น สังเกตการณเปลี่ยนสี หลอดที่ 2 ทดสอบ Leucoanthocyanin เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น

0.5 ml อุณหภูมิอ่างน้ำร้อน 5 นาที กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น สังเกตการณเปลี่ยนสี

2.2.4 การทดสอบซาโปนินเป็นการทดสอบฟอง นำสารสกัดเล็กน้อยใส่ในหลอดทดลองเติมน้ำกลั่น 5 ml อุณหภูมิอ่างน้ำร้อน 5 นาที กรองขณะร้อน ปล่อยให้สารละลายเย็นแล้วเขย่าสารละลายอย่างแรง 1 นาที สังเกตผลนาน 30 นาที เติมกรดซัลฟิวริกเจือจาง 1 ml ลงในสารละลาย ต้มนาน 5 นาที ปล่อยให้เย็น เขย่าแรง ๆ 1 นาที บันทึกผล

2.2.5 การทดสอบแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ นำสารสกัดมาเล็กน้อยใส่ในหลอดทดลอง เติม 10 % กรดไฮโดรคลอริก 5 ml แล้วต้ม นำสารละลายที่ได้สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน นำชั้นน้ำที่ได้เติม 10 % แอมโมเนีย สังเกตการณเปลี่ยนสี

2.2.6 การทดสอบแทนนิน เติมสารสกัดเล็กน้อยในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 5 ml แล้วอุณหภูมิอ่างน้ำร้อน 5 นาที กรองขณะร้อน นำสารละลายเติมน้ำกลั่นแล้วหยด FeCl_3 3-4 หยด สังเกตการณเปลี่ยนสี

2.2.7 การทดสอบคูมาริน นำสารสกัดมาเล็กน้อยละลายในเอทานอลแล้วหยดลงบนกระดาษกรองที่ขึ้นด้วยสารละลาย 1 M NaOH นำกระดาษให้ความร้อน แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอุตราไวโอเลต และสังเกตการณเรืองแสงที่เกิดขึ้นเมื่อฉายแสงอุตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

2.2.8 ทดสอบสเตอรอยด์ในพืช (Liebermann-Burchard test) นำสารสกัดมาเล็กน้อยเติมกรดซัลฟิวริกเจือจาง 10 ml เขย่าให้เข้ากัน ต้ม 15 นาที แล้วสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน หยด glacial acetic acid 3 หยดในสารละลาย เขย่าให้เข้ากันดี แล้วหยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1-2 หยด สังเกตการณเปลี่ยนสี

2.3 การทดสอบฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน

การศึกษาฤทธิ์ด้านออกซิเดชันเบื้องต้นของ

สารสกัดด้วยวิธี DPPH [8] เตรียมสารละลาย 0.02 mM 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazine (DPPH) 0.2 ml และสารสกัดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5000 µg/ml ในเมทานอล 0.1 ml และเมทานอล 3.7 ml ลงในหลอดทดลอง (ทดลอง 3 ซ้ำ) บ่มในที่มืด 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (วิตามินซีเป็นสารมาตรฐานเชิงบวก) คำนวณค่าร้อยละการต้านออกซิเดชันจากสูตร

DPPH scavenging (%) = $[(A_0 - A_1) \div A_0] \times 100$
เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนของสารควบคุม; A_1 = ค่าการดูดกลืนของสารตัวอย่าง

หากสารสกัดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากกว่าร้อยละ 50 ทดสอบหาค่า IC_{50} โดยการเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (125.000, 12.500, 1.250, 0.125, 0.012, 0.001 µg/ml) คำนวณค่า IC_{50} จากการเทียบค่าในกราฟ ระหว่างความเข้มข้นและค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้สูตรเดียวกัน ทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) และนำมาผลที่ได้มาวิเคราะห์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\pm$ S.D.)

2.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย [9]

2.4.1 การเตรียมจุลินทรีย์เพื่อใช้ทดสอบ

นำจุลินทรีย์ที่ได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี 10 ชนิด ดังนี้ *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *M. luteus*, *S. marcescens*, *E. aerogenes*, *S. typhimurium*, *P. vulgaris* และ *P. aeruginosa* เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร NA โดยวิธีการแยกเชื้อ (streak plate) นำจุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์โคโลนีเดียว ใส่ในอาหารเหลว NB เขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำจุลินทรีย์ที่เลี้ยงได้ ปริมาตร 10^6 CFU (เปรียบเทียบจาก standard Mcfarland

number 5) ใส่ในอาหาร NA แล้วเทลงจานเพาะเชื้อ รอให้แข็งตัว นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C สภาวะ 5 % CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเตรียมไว้สำหรับทดสอบต่อไป

2.4.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารสกัดเสมา

เตรียมสารสกัดเสมาที่ความเข้มข้น 100 mg/ml ส่วนของเปลือกผลและเนื้อผล เติมสารสกัดทั้งหมดบน paper disc ขนาด 8 mm รอให้ paper disc แห้ง แล้วนำไปวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37 °C สภาวะ 5 % CO_2 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดของวงใสจากขอบของ paper disc ไปถึงขอบของวงใสเป็นหน่วยมิลลิเมตร ตัวควบคุมลบ (negative control) คือ เอทานอล

2.4.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์

การทดสอบตอนนี้ ทดสอบเฉพาะสารสกัดจากเสมาที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากข้อ 2.4.2 เท่านั้น ดังวิธีการทดสอบดังนี้ เตรียมสารสกัดเสมาที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 mg/ml เจือจางให้มีค่าความเข้มข้น 50.00, 25.00, 12.50, 6.25, 3.12 และ 1.56 mg/ml ตามลำดับ เติมสารละลายที่เตรียมได้ paper disc ขนาด 8 mm จำนวน 60 µl ได้ค่าความเข้มข้นของสารละลายที่ใส่ลงใน paper disc ดังนี้ 6.00, 3.00, 1.50, 0.75, 0.37, 0.18, 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รอให้ paper disc แห้ง แล้ววาง paper disc บนจานเลี้ยงแบคทีเรีย 7 ความเข้มข้น ต่อ 1 จานเพาะเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C สภาวะ 5 % CO_2 ระยะเวลา 24 ชั่วโมง หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ (MIC) 5 % DMSO เป็นสารละลายควบคุมเชิงลบ

2.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell)

วิธีทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ติดฉลากโปรตีนเรืองแสงสีเขียวชนิด pEGFP-N1 (Clontech) [10] เป็นโดยมีวิธีการสรุปดังนี้ เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 µg/ml ปริมาตร 5 µl ลงในถาดหลุมชนิด 384 หลุม เติมสารละลายที่มีเซลล์ Vero จำนวน 3.3×10^4 cells/ml ปริมาตร 45 µl บ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะ 5 % CO₂ วัดการเรืองแสงที่สภาวะกระตุ้นและการปล่อยพลังงานที่ความยาวคลื่น 485 และ 535 nm ตามลำดับด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices, USA) โดยสารอิลิปติซิน (ellipticine) เป็นสารมาตรฐานเชิงบวก และ 5 % DMSO เป็นสารละลายควบคุมเชิงลบ คำนวณหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยสูตร

$$\% \text{ Cytotoxicity} = [1 - (FU_T \div FU_C)] \times 100$$

เมื่อ FU_T = การเรืองแสงของเซลล์ที่มีสารสกัด; FU_C = การเรืองแสงของเซลล์ที่ไม่มีสารสกัด

2.6 การทดสอบเริ่มชนิด 1 (Herpes simplex virus type-1, HSV-1)

การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่มชนิด 1 จะทดสอบในช่วงของความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ เป็นวิธีทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ติดฉลากโปรตีนเรืองแสงสีเขียวชนิด pEGFP-N1 (Clontech) [10] ดังนี้ ละลายสารตัวอย่างด้วย 10 % DMSO สารละลายตัวอย่างลงในทุกหลุมของถาด 96 หลุมต่อการเพาะเชื้อ ปริมาณ 10 µl/หลุม เติม 190 µl ของเซลล์ปกติที่ติดฉลากโปรตีนเรืองแสงสีเขียว และเซลล์ปกติ (Vero cell) 1×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ผสมกับ 5×10^5 PFU/ml ของ HSV-1 (ATCC VR260) ที่จะถูกเพิ่มในแต่ละหลุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะ 5 % CO₂ เป็นเวลา 4 วัน วัดค่าการเรืองแสงโดยใช้ SpectraMax M5 หลาย microplate ที่ความยาวคลื่น 485 และ 535 nm และคำนวณร้อยละ

ร้อยละของการยับยั้งไวรัสโดยใช้สมการต่อไปนี้ :

$$\text{ร้อยละการยับยั้งไวรัส} = \{1 - [(FUC - FUVT) \div (FUC - FUVVC)]\} \times 100$$

เมื่อ FUC คือ ค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของเซลล์ปกติที่ไม่ติดไวรัส; FUVT คือ ค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของเซลล์ปกติที่ติดไวรัสที่เติมสารสกัด; FUVVC คือ ค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของเซลล์ปกติที่ติดเชื้อไวรัสที่ไม่มีสารสกัด

ค่า IC₅₀ ทดสอบเมื่อสารสกัดมีค่าร้อยละการยับยั้งมากกว่า 50 ยาอะไซโคลเวียร์ (acyclovir) และ 0.5 % DMSO เป็นสารมาตรฐานเชิงบวกและเชิงลบตามลำดับ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การตรวจสอบสารพิษจากเคมีเบื้องต้น

สารสกัดส่วนของผลเสมาแห้ง 2 ส่วน ได้แก่เปลือกผลและเนื้อผลด้วยเอทานอล เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลจากการตรวจสอบสารพิษจากเคมีเบื้องต้น 8 กลุ่ม พบว่าสารสกัดทั้งสองมีสารกลุ่มเดียวกันดังนี้ กลุ่มสเตอรอยด์ น้ำตาลไดออกซี และ แทนนิน ดังตารางที่ 1

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้น

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้นของสารสกัดทั้งส่วน เปลือกผล และเนื้อผลด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดเปลือกผลแสดงค่า IC₅₀ 82.00±4.33 µg/ml ส่วนสารสกัดเนื้อผลมีค่า IC₅₀ มากกว่า 125 µg/ml ขณะที่วิตามินซีแสดงค่า IC₅₀ 29.20±0.03 µg/ml (ตารางที่ 2) ในสภายังไม่เคยมีการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมาก่อน ดังนั้นจึงเป็นการรายงานครั้งแรก แต่มีการรายงานปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ Folin-Ciocalteu [2] ซึ่งอาจเป็นสารกลุ่มแทนนินและเป็นกลุ่มสารที่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของผลเสมานี้

ตารางที่ 1 พฏิกษเคมีเบื้องต้นของผลเสมา

สารพฤษเคมี	วิธีการทดสอบ	สารสกัดเอทานอล	
		เปลือกผล	เนื้อผล
แอลคาลอยด์	Dragendorff	-	-
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์			
- สเตอรอยด์	Liebermann-Burchard	+	+
- บิฟิโนไซด์ แลคโตน	Kedde's reagent	-	-
- น้ำตาลดีออกซี	Keller-Kiliani test	+	+
ฟลาโวนอยด์	Cyanidin test	-	-
	Leucoanthocyanin test	-	-
ซาโปนิน	Foam test	-	-
แอนทราควิโนนไกลโคไซด์	Borntraeger reaction	-	-
แทนนิน	Ferric chloride test	+	+
คูมาริน	Alkaline test	-	-
โปรตีน	Ninhydrin test	-	-

หมายเหตุ : - หมายถึง ตรวจสอบให้ผลลบ; + หมายถึง ตรวจสอบให้ผลบวก

ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} ($\mu g/ml$) ในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดผลเสมาและวิตามินซี

สารสกัด	IC_{50}	SD
เปลือกผล	82.00	4.33
เนื้อผล	>125.00	1.53
วิตามินซี	29.20	0.03

3.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย

3.3.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเบื้องต้น

ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 mg/ml สารสกัดเปลือกผลสามารถยับยั้งแบคทีเรีย 10 ชนิด ส่วนสารสกัดเนื้อผลสามารถยับยั้งแบคทีเรีย 9 ชนิด ไม่ยับยั้ง *P. aeruginosa* เพียงชนิดเดียว ดังตารางที่ 3

3.3.2 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดเปลือกผล และเนื้อผลในการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดเปลือกผลเสมา สามารถยับยั้ง *S. saprophyticus* ที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.24 ± 0.12 mg/ml รองลงมา คือ *M. luteus* และ *P. vulgaris* ที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 1.00 ± 0.43 และ 1.50 ± 0.00 mg/ml สารสกัดเนื้อผลเสมาที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.75 ± 0.00 mg/ml สามารถยับยั้ง *S. saprophyticus* รองลงมา คือ *M. luteus* และ *P. vulgaris* ที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 1.50 ± 0.00 mg/ml ทั้งนี้ยังพบว่ามีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากผลพืชสกุล *Opuntia* ชนิด *O. dillenii* [11] *O. stricta* [12] และ *O. ficusindica* [13] แต่ในเสมายังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เลย ดังนั้นการวิจัยนี้จึงเป็นการรายงานครั้งแรกในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดผลเสมา ดัง

ในตารางที่ 4

1 ในขณะที่ยาอะไซโคลเวียร์ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งค่า $IC_{50} = 4.29 \mu\text{g/ml}$ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 3 ความเฉลี่ย ($\pm$ SD) ความสามารถของสารสกัดจากเสมานในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 100 mg/ml

จุลินทรีย์	ขอบเขตการยับยั้งของสารสกัด (มิลลิเมตร)	
	เปลือกผล	เนื้อผล
<i>B. subtilis</i>	24.3($\pm$ 0.58)	25.0($\pm$ 1.17)
<i>B. cereus</i>	23.0($\pm$ 0.00)	24.0($\pm$ 1.50)
<i>S. aureus</i>	25.3($\pm$ 0.58)	25.0($\pm$ 0.50)
<i>S. saprophyticus</i>	35.0($\pm$ 0.58)	34.0($\pm$ 0.00)
<i>M. luteus</i>	31.0($\pm$ 0.00)	32.0($\pm$ 1.50)
<i>S. marcescens</i>	15.0($\pm$ 0.00)	13.0($\pm$ 0.00)
<i>E. aerogenes</i>	26.7($\pm$ 0.58)	25.0($\pm$ 0.00)
<i>S. typhimurium</i>	14.0($\pm$ 0.00)	14.0($\pm$ 0.00)
<i>P. vulgaris</i>	20.3($\pm$ 0.58)	19.0($\pm$ 0.00)
<i>P. aeruginosa</i>	16.0($\pm$ 0.00)	-

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่แสดงฤทธิ์เชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุด ($\pm$ SD) ที่สารสกัดเปลือกผลและเนื้อผลในการยับยั้งแบคทีเรีย

จุลินทรีย์	ขอบเขตการยับยั้งของสารสกัด (มิลลิเมตร)	
	เปลือกผล	เนื้อผล
<i>B. subtilis</i>	3.00($\pm$ 0.00)	3.00($\pm$ 0.00)
<i>B. cereus</i>	3.00($\pm$ 0.00)	3.00($\pm$ 0.00)
<i>S. aureus</i>	3.00($\pm$ 0.00)	3.00($\pm$ 0.00)
<i>S. saprophyticus</i>	0.24($\pm$ 0.12)	0.75($\pm$ 0.00)
<i>M. luteus</i>	1.00($\pm$ 0.43)	1.50($\pm$ 0.00)
<i>S. marcescens</i>	3.00($\pm$ 0.00)	6.00($\pm$ 0.00)
<i>E. aerogenes</i>	3.00($\pm$ 0.00)	2.00($\pm$ 0.87)
<i>S. typhimurium</i>	3.00($\pm$ 0.00)	3.00($\pm$ 0.00)
<i>P. vulgaris</i>	1.50($\pm$ 0.00)	1.50($\pm$ 0.00)
<i>P. aeruginosa</i>	6.00($\pm$ 0.00)	-

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่แสดงฤทธิ์เชื้อแบคทีเรีย

3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell) พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุด 50 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดเปลือกผลและสารสกัดเนื้อผล มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติร้อยละ 4.10 และ 0.96 ตามลำดับ ยาอิลิป-ติซินมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติด้วยค่า $IC_{50}=0.753 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน ดังนั้นการวิจัยนี้จึงเป็นการรายงานครั้งแรก ดังแสดงในตารางที่ 5

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเข็มชนิด 1

การทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเข็มชนิด 1 ของสารสกัดเสมาน พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุด 50 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดทั้งสองไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสเข็ม ชนิด

4. สรุป

สารสกัดเสมานทั้ง 2 ส่วน พบสารพฤษเคมี 3 กลุ่ม ได้แก่ สเตอรอยด์ น้ำตาลดีออกซี และแทนนิน ส่วนเปลือกผลมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าเนื้อผลประมาณ 2 เท่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ 10 ชนิด และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดต่อ *S. saprophyticus* ดีที่สุดที่ความเข้มข้น $0.24 \pm 0.12 \text{ mg/ml}$ ส่วนสารสกัดเนื้อผลมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ 9 ชนิด โดยที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 mg/ml ไม่ยับยั้ง *P. aeruginosa* และที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดทั้งสองไม่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ในการต้านไวรัสเข็มชนิด 1 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเสมายังมีไม่

ตารางที่ 5 ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ($\mu\text{g/ml}$) ของสารสกัดเสมาและยาอิลิปดิซีน

อิลิปดิซีน	ร้อยละการยับยั้ง	เปลือกผล	ร้อยละการยับยั้ง	เนื้อผล	ร้อยละการยับยั้ง
4.0	93.22	50.00	4.10	50.00	0.96
2.0	83.06	16.67	2.79	16.67	0.12
1.0	64.48	5.56	0.86	5.56	0.00
0.5	30.23	1.85	0.29	1.85	0.00
0.25	10.31	0.62	0.00	0.62	0.00
0.13	4.07	0.21	0.00	0.21	0.00

ตารางที่ 6 ร้อยละการยับยั้งไวรัสเริ่มชนิด 1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ($\mu\text{g/ml}$) ของสารสกัดเสมาและยาอะไซโคลเวียร์

อะไซโคลเวียร์	ร้อยละการยับยั้ง	เปลือกผล	ร้อยละการยับยั้ง	เนื้อผล	ร้อยละการยับยั้ง
20.00	100.00	50.00	0.00	50.00	0.00
10.00	100.00	16.67	0.00	16.67	0.00
5.00	66.26	5.56	0.00	5.56	0.00
2.50	5.14	1.85	0.00	1.85	0.00
1.25	0.00	0.62	0.00	0.62	0.00
0.63	0.00	0.21	0.00	0.21	0.00

มาก ดังนั้นควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นของเสมาเพิ่มเติม

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอาจารย์ ดร.บุญสนอง ช่วยแก้ว ที่ช่วยกรุณาพิสูจน์เอกลักษณ์พืช และขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ (ไบโอเทค) ที่เอื้อเพื่อการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่ม ชนิด 1

6. รายการอ้างอิง

- [1] Smitinand, T., 2014, Thai plant name, Buddhists office, Bangkok.
- [2] Chauhan, S.P., Sheth, N.R., Rathod, I.S., Suhagia, B.N. and Maradia, R.B., 2013, Phytochemical screening of fruits of *Opuntia elatior* Mill, Am. J. Pharm. Tech. Res. 3(2): 1-6.
- [3] Yuyun, Y. and Jamaluddin, 2016, Study of betacyanin level from cactus fruit (*Opuntia elatior* Mill) in Palu city using spectrophotometry UV-VIS, Int. J. Phyto. Pharm. 6(4): 85-89.
- [4] Chauhan, S.P., Sheth, N.R. and Suhagia, B.N., 2015, Analgesic and antiinflammatory action of *Opuntia elatior* Mill fruits, J. Ayurveda Integr. Med. 6(2): 75-81.

- [5] Loganayagi, C., Kamal, C. and Sethuraman, M.G., 2014, Opuntiol: An active principle of *Opuntia elatior* as an eco-friendly Inhibitor of corrosion of mild steel in acid medium, ACS Sustain. Chem. Eng. 2: 606-613.
- [6] Ramya, M.C. and Shivanandappa, S.T., 2015, Reversible antifertility effect of *Opuntia elatior* Mill. fruit extract, Int. J. Reprod. Contracept. Obstet. Gynecol. 4: 392-397.
- [7] Ayoola, G.A., Coker, H.A.B., Adesegun, S.A., Adepoju-Bello, A.A., Obaweya, K., Ezennia, E.C., Atangbayila, T.O., 2008, Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria, Trop. J. Pharm. Res. 7: 1019-1024.
- [8] Gaikwad, S.A., Kamble, G.S., Devare, S., Deshpande, N.R. and Salvekar, J.P., 2011, *In vitro* evaluation of free radical scavenging potential of *Cassia auriculata* L., J. Chem. Pharm. Res. 3: 766-772.
- [9] Pukumpuang, W., Thongwai, N. and Tragoolpua. Y., 2012, Total phenolic contents, antibacterial and antioxidant activities of some Thai medicinal plants extracts, J. Med. Plants Res. 6: 4953-4960.
- [10] Hunt, L., Jordan, M., De Jesus, M. and Wurm, F.M., 1999, GFP-expressing mammalian cells for fast, sensitive, noninvasive cell growth assessment in a kinetic mode, Biotechnol. Bioeng. 65: 201-205.
- [11] Kumaar, A.P.S., Vanitha, J., Venkateshwaran, K., Reddy, K.S. and Karthikeyan, D., 2013, Antibacterial and antifungal activity of *Opuntia dillenii* (Cactaceae) fruit extract, J. Environ. Nanotechnol. 2(1): 16-19.
- [12] Shafiei, S., Kariminik, A. and Hasanabadi, Z., 2013, Antimicrobial activity of methanol extract of *Opuntia stricta* F., Int. Res. J. Appl. Basic Sci. 7: 907-910.
- [13] Rabhi, A., Falleh, H., Limam, F., Ksouri, R., Abdelly, C. and Raies, A., 2013, Upshot of the ripening time on biological activities, phenol content and fatty acid composition of Tunisian *Opuntia ficusindica* fruit, Afr. J. Biotechnol. 12: 5875-5885.