วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 29:3 เล่ม 2 (28-36)

ความคงตัวและกิจกรรมการต้านแบคทีเรียของสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำต่อการต้านเชื้อ Coagulase Positive *Staphylococcus aureus* ที่แยกจากเนื้อสุกร

The Stability and Antibacterial Activity of Crude Water Extract from Mangosteen Hull Against Coagulase Positive *Staphylococcus aureus* Isolated from Pork

ผุสดี ตังวัชรินทร์[1]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำและกรดแกลลิคในการต้านเชื้อ coagulase positive *Staphylococcus aureus* CH1 ที่แยกได้จากซากสุกร โดยทำการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและทำลายแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration, MIC และ minimum bactericidal concentration, MBC ตามลำดับ) และระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายแบคทีเรีย พบว่า สารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำและกรดแกลลิคมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* CH1 ได้ที่ความเข้มข้น $\geq$ 300.00 และ $\geq$ 18.75 μg/ml ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับค่า MIC ของสารทั้ง 2 ชนิด ที่มีค่าเท่ากับ 300.00 และ 18.75 μg/ml ตามลำดับ และค่า MBC เท่ากับ 1,200 และ 75.00 μg/ml ตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายของสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น MBC และ 2MBC (1,200 และ 2,400 μg/ml ตามลำดับ) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเหล่านี้ออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย (bactericidal effect) และยิ่งไปกว่านั้นสารสกัดยังทำให้แบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะปกติถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่สภาวะเครียด โดยอัตราการทำลายแบคทีเรียขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด และระยะเวลาสัมผัสสารสกัด จากการทดสอบความคงตัวของประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน ไม่น้อยกว่า 7 วัน การเก็บสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำในสภาวะค่า pH 3 และ 7 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล และประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัด แต่ในการเก็บในสภาวะค่า pH 9 นาน 2 ชั่วโมง มีผลทำให้สารสกัดมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลและประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียลดลง ($P \leq 0.05$)

คำสำคัญ: สารสกัดจากเปลือกมังคุด กรดแกลลิค *Staphylococcus aureus*

Abstract

The objective of this study was to investigate the in vitro activities of crude water extract from hulls of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) and gallic acid against coagulase positive *Staphylococcus aureus* CH1, isolated from pig carcasses, by determination of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and kill-time. The result was shown that the MIC of crude water extract and gallic acid at $\geq$ 300.00 and $\geq$ 18.75 μg/ml, respectively, exhibited ability of inhibition of *S. aureus* CH1 and their MBC of antibacterial were 1,200 and 75.00 μg/ml, respectively. For kill-time studies, MBC and 2MBC (1,200 and 2,400 μg/ml,respectively) of the crude water extract for 24 hours produced a bactericidal effect. Moreover, in case of non-stressed cells could be induced to change to stressed cells.

[1]คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง 93110

The bactericidal effect depended on concentration of crude water extract and contact time. Further studies effects of temperatures and acid or base conditions that simulate processing conditions were investigated to determine the stability of antibacterial activity of dried whole hull extraction with water under processing conditions. At 4°C, the antibacterial activity of crude water extracts was stabilities for more than 7 days. The polyphenol compound concentration of crude extract was constant and the antibacterial activity of dried whole hull extraction with water was stability at pH 3 and 7 for 2 hours, but decreased at pH 9 for 2 hours ($P \leq 0.05$)

Keywords: crude mangosteen extract, gallic acid , *Staphylococcus aureus*

บทนำ

ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์มักพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษ (Smith *et al.*, 1983) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องใช้สารต้านจุลินทรีย์เพื่อลดเชื้อดังกล่าวใส่ลงในผลิตภัณฑ์ ซึ่งสารสกัดที่ได้จากพืชสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับหรือมากกว่ายาปฏิชีวนะ (Eloff, 1998)

มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) จัดเป็นพืชที่อยู่ในตระกูล Clusiaceae (Guttiferae) ที่นิยมปลูกมากในภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งแพทย์แผนไทยได้มีการนำสารสกัดจากเปลือกมังคุดมาใช้ในการรักษาโรคท้องร่วง โรคบิด และโรคผิวหนังติดเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบโพลีฟีนอลที่เป็นองค์ประกอบในเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Mahabusakam and Viriyachitra, 1987; Praveen *et al.*, 1991) ทั้งนี้ มีสารประกอบโพลีฟีนอลหลักที่มักพบในสารสกัดเปลือกมังคุด คือ แทนนิน ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ในระดับปานกลาง เนื่องจากโครงสร้างของสารแทนนินประกอบด้วยหมู่แกลลออิล (galloyl group) (Taguri *et al.*, 2004) และแทนนินเป็นสารปรุงแต่งในอาหารที่ได้รับการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (generally recognized as safe, GRAS) (The Office of the Federal Register, 1990) แต่อย่างไรก็ตาม สารประกอบโพลีฟีนอลจะมีปริมาณลดลงในสภาวะที่อุณหภูมิสูงและเป็นด่าง (Patthamakanokporn *et al.*, 2008; Krook *et al.*, 2009)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ coagulase positive *S. aureus* ที่แยกได้จากเนื้อสุกรของสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำและกรดแกลลิค และความคงตัวของสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำในสภาวะต่างๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ คือ เชื้อ coagulase positive *S. aureus* CH1 ที่แยกได้จากซากสุกรในโรงฆ่าสุกรแหล่งหนึ่งในภาคใต้ของประเทศไทย ตามวิธีของ BAM online (2001) และยืนยันผลจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ทำการจัดเก็บ stock culture ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เมื่อต้องการทำการทดลอง นำ stock culture มาละลายน้ำแข็ง และเลี้ยงให้เจริญเติบโตบนอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) (Merck, Germany) บ่มที่อุณหภูมิ 35±2°C เป็นเวลา 22-24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาวะ late log phase (non-stressed cells) ตามวิธีของ Tangwatcharin *et al.* (2006) เขี่ยแบคทีเรีย 2-3 โคโลนี มาใส่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland (ประมาณ 10^8 cfu/ml) จากนั้นทำการเจือจางเพื่อใช้ในการศึกษาต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 4×10^5 ถึง 6×10^5 cfu/ml

2. ชนิดของสารต้านแบคทีเรีย

ทำการเก็บรวบรวมเปลือกมังคุดจากเกษตรกรในจังหวัดชุมพร ในปี 2552 นำเปลือกมังคุดมาทำสารสกัดด้วยน้ำที่ภาควิชาวิชาแพทย์แผนไทย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จังหวัดปทุมธานี โดยการนำเปลือกมังคุดมาทำการอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วบดให้เป็นผงและเก็บทำการบรรจุใส่ถุงทึบแสงแบบสูญญากาศ เก็บไว้ในที่มิดชิด จากนั้นนำผงเปลือกมังคุดหมักในเมทานอลเป็นเวลา 3 วัน และทำการกรอง นำสารที่กรองได้มาระเหยแบบลดความดันภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) นำกากมาสกัดซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาเติมน้ำกลั่นให้ท่วม นำไปต้มจนเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิให้คงที่ที่ 60 °C นาน 30 นาที นำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนที่กรองได้มาทำให้แห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer และบดผลึกสารสกัดหยาบให้ละเอียด ทำการบรรจุใส่ขวดทึบแสงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลเป็นตัวแทนของการวิเคราะห์สารกลุ่ม tannin ด้วยวิธี Folin Ciocalteau Phenol reagent method หรือ Gallic acid equivalent per gram ตามวิธีของ Tsai *et al.* (2005) โดยนำสารสกัดทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย phenolic hydroxyl groups ของ total polyphenols เกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 765 nm ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดหาโดย เทียบกับปริมาณของกรดแกลลิค (gallic acid)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำและกรดแกลลิค ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี diffusion agar ตามวิธีของ Bauer *et al.* (1966) วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) โดยมีความเข้มข้นของสารสกัดและกรดแกลลิค จำนวน 5 และ 10 ระดับ ตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รวมทั้งสิ้น 45 ตัวอย่าง การเตรียมสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำและกรดแกลลิคทำละลายด้วยน้ำปลอดเชื้อ และเจือจางแบบสองเท่า (two fold serial dilution) จำนวน 5 และ 10 ระดับ ตามลำดับ แล้วหยดสารแต่ละชนิดลงบนแผ่น disc (กระดาษกรองเบอร์ 1, Whatman, Maidstone, UK) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0-2,400 และ 0-2,400 μg/ml ตามลำดับ โดยความเข้มข้น 0 μg/ml ของสารแต่ละชนิดเป็นชุดควบคุม (negative control) คือน้ำปลอดเชื้อ จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อจุ่มสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมไว้มาป้ายให้ทั่วผิวหน้าวุ้นอาหาร (MHA) วาง disc ที่หยดสารสกัด กรดแกลลิค และชุดควบคุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และวัดขนาดวงใส (inhibition zone) ด้วย vernier caliper จากนั้นการบันทึกค่าเป็นมิลลิเมตร

ศึกษาวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรีย (minimal inhibition concentration (MIC) หรือ minimal bactericidal concentration (MBC) ตามลำดับ) ของสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำ และกรดแกลลิค ด้วยวิธี broth microdilution method ตามวิธีของ CLSI M7-A4 (2002) ทั้งนี้วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยให้สารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสุดท้ายใน microplate อยู่ในช่วง 0-2,400 μg/ml จำนวน 10 ระดับ ด้วยการเจือจางเช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้น ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ รวมทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง และใส่เชื้อ *S. aureus* เตรียมไว้ โดยเตรียมชุดควบคุมทุกตัวอย่าง ๆ ละ 4 แบบ ดังนี้ 1) growth control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB + แบคทีเรีย 2) negative control คือ ตัวทำละลาย + อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB + แบคทีเรีย 3) sterile control คือใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ และ 4) positive control คือ ยาปฏิชีวนะ Ciprofloxacin เช่นเดียวกับสารสกัด ให้มีความเข้มข้น 0.5 - 250 μg/ml + อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB + แบคทีเรีย แล้วนำ microplate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความขุ่นด้วยเครื่อง UVM 340 Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 nm โดยความสามารถในการวัดความขุ่นต่ำสุดคือ < 0.05 จากนั้นหาค่า MBC โดยนำสารละลายในหลุมของ

microplate ที่ใสมาปริมาตร 10 µl เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วบันทึกค่า MBC ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ไม่น้อยกว่า 99.99% ของจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น

4. การวิเคราะห์ระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายแบคทีเรีย

ศึกษาประสิทธิภาพการลดปริมาณเชื้อ *S. aureus* CH1 ของสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำ จัดกลุ่มการทดลองแบบ 2x10 factorial arrangement in CRD โดยมีปัจจัย A คือระดับความเข้มข้นของสารสกัด 2 treatments ได้แก่ 1,200 และ 2,400 µg/ml และปัจจัย B คือระยะเวลาที่แบคทีเรียสัมผัสสารสกัด 10 treatments ได้แก่ 0, 15, 30 นาที, 1, 2, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ รวมทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง จากนั้นทำการวิเคราะห์ Population density estimate โดยตามวิธีของ Tangwatcharin *et al.* (2006) โดยวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียที่เหลืออยู่ภายหลังสัมผัสสารสกัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA เพื่อหาปริมาณ Total culturable cells และอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ Baird-Parker ที่มีการเติม potassium tellurite ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 84 µg/ml เพื่อหาปริมาณ culturable cell แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสภาวะของเซลล์ในการศึกษาผลการตอบสนองทางสัณฐานวิทยาและกายภาพของเซลล์ *S. aureus* เนื่องจากสภาวะเครียด (morphological and physiological responses of *S. aureus* to stress) ดัง Table 1

Table 1 Scheme of determination of sub-population density (Tangwatcharin *et al.*, 2006)

Sub-population	Calculation criteria
Stressed cells	= Total culturable cells[a] – culturable cells[b]
Non-stressed cells	= Culturable cells

[a] Determined by plating on MHA

[b] Determined by plating on BP

5. การวิเคราะห์ความคงตัวของสารสกัดในสภาวะต่าง ๆ

ศึกษาความคงตัวของสารสกัดเปลือกมังคุดในสภาวะต่าง ๆ โดยนำสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำมาทำละลายด้วยน้ำปลอดเชื้อ จากนั้นเก็บในสภาวะต่าง ๆ ดังนี้

1) การให้ความเย็น ได้แก่ เก็บที่อุณหภูมิ -18, 4 และ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3 และ 7 วัน

2) ค่า pH ได้แก่ pH 3, 7 และ 9 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ทั้งนี้ทำการปรับค่า pH ด้วยสารละลาย 0.5 M HCl และ 0.5 N NaOH

จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลด้วยวิธี Folin Ciocalteau Phenol reagent method ตามวิธีของ Tsai *et al.* (2005) และทำการวิเคราะห์ความเป็นสารต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยวิธี Broth microdilution method ตามวิธีของ CLSI M7-M4 (2002) เพื่อหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) ที่เปลี่ยนแปลงไป

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นผ่านศูนย์ inhibition zone ปริมาณเชื้อ *S. aureus* CH1 ที่เหลืออยู่ภายหลังสัมผัสการสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลของสารสกัดภายหลังการเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ โดย GLM procedure และ Duncan's New Multible Range Test ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม SAS (Staitical Analysis System Institute, 1998)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำ และกรดแกลลิคมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* CH1 ที่ความเข้มข้น ≥300.00 และ ≥18.75 μg/ml ตามลำดับ (Figure 1) ซึ่งสอดคล้องกับค่า MIC ของสารทั้ง 2 ชนิด ที่มีค่าเท่ากับ 300.00 และ 18.75 μg/ml ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม ค่า MBC มีความเข้มข้นเป็น 4 เท่าของค่า MIC คือ 1,200 และ 75.00 μg/ml ตามลำดับ (Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล 70.54±2.61 μg gallic acid equivalent/mg คิดเป็น 7.05% นอกจากนี้สารแทนนินเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลหลักที่มักพบในสารสกัดเปลือกมังคุด โดยโครงสร้างของสารแทนนินประกอบด้วยหมู่แกลลออิล (galloyl group) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *S. aureus* ในระดับปานกลาง (Taguri *et al.*, 2004) ดังนั้นกรดแกลลิคจึงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* CH1 ได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วยน้ำ

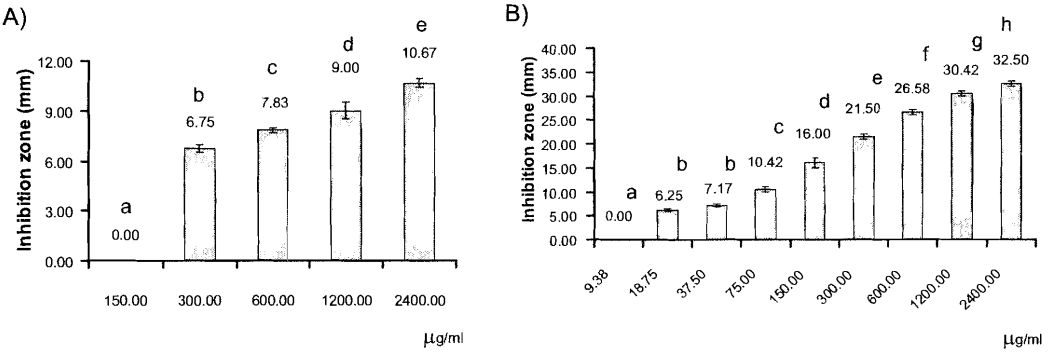

Figure 1 Antibacterial activity (zone of inhibition) of (A) crude water extract and (B) gallic acid against coagulase positive *S. aureus* CH1. The results are presented as means of three replications and standard deviations (bar)

[a-h] Different letters within each solution indicate that values are significantly different ($P \leq 0.05$)

Table 2 The MIC and MBC (μg/ml) of mangosteen hull extract against coagulase positive *S. aureus* CH1 compared to those of gallic acid

Strain	Crude extract (μg/ml)		Gallic acid (μg/ml)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
S. aureus CH1	300.00	1,200.00	18.75	75.00

2. ระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายแบคทีเรีย

จาก Figure 2 แสดงอัตราการทำลายเชื้อ *S. aureus* CH1 ของสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น MBC และ 2MBC (1,200.00 และ 2,400.00 μg/ml ตามลำดับ) พบว่าแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะปกติ (total และ non-stressed bacterial ตามลำดับ) มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วภายหลังสัมผัสสารสกัดที่ความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยความเข้มข้น 1,200.00 μg/ml มีปริมาณแบคทีเรียเหลือน้อยกว่า 1 log และยังเหนี่ยวนำแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะปกติเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) สูงสุดเมื่อสัมผัสกับสารสกัดที่ความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ($P \leq 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดที่ความเข้มข้น 2MBC มีอัตรา

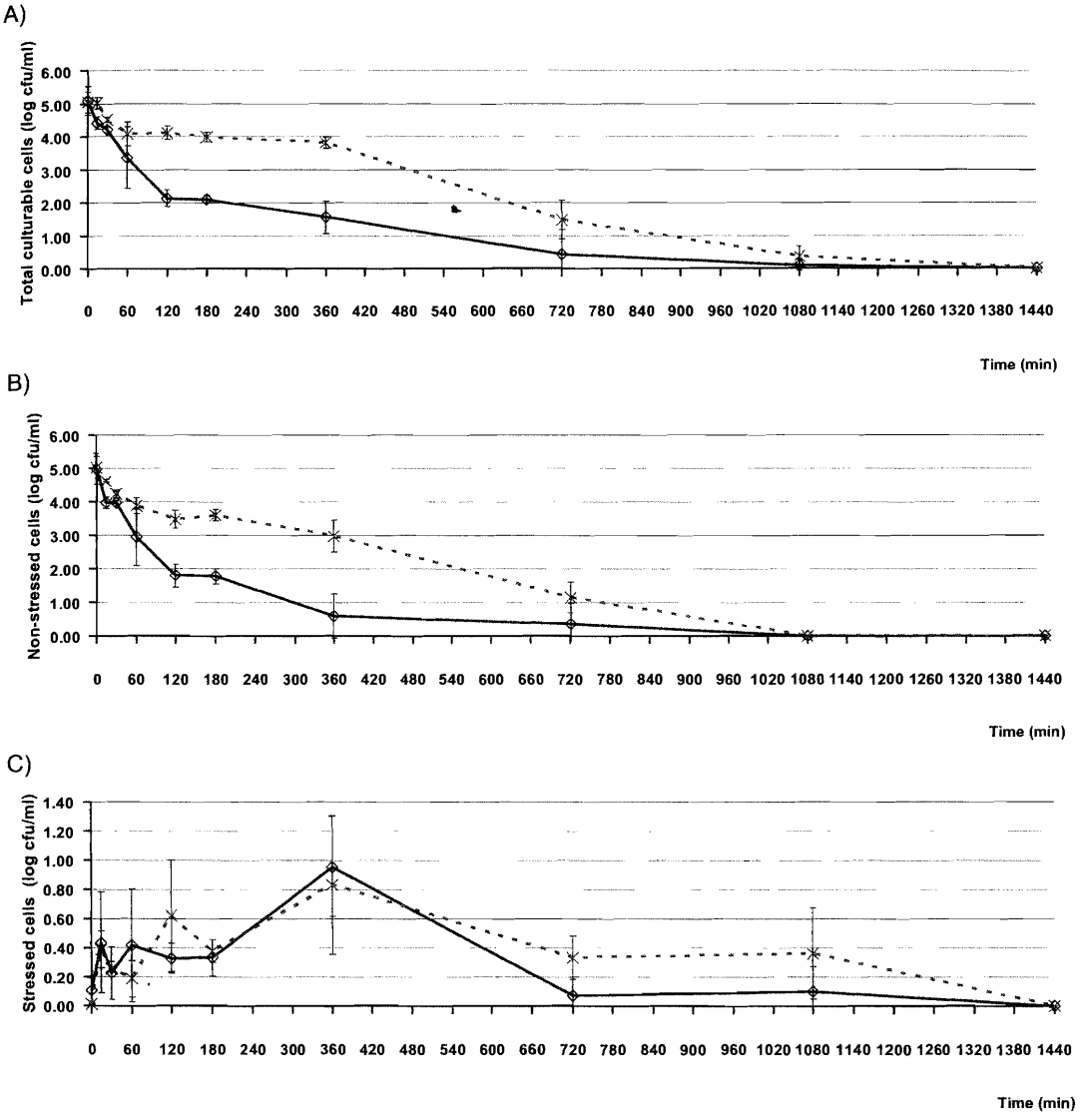

Figure 2 Survivors curves for (A) total culturable, (B) non-stressed and (C) stressed cells of coagulase positive *S. aureus* CH1 in MHB at 35°C as a function of antibacterial concentration, (– – –) 1,200.00 and (——) 2,400.00 μg/ml

การทำลายเชื้อ *S. aureus* CH1 เร็วกว่าที่ความเข้มข้น MBC ($P \leq 0.05$) โดยความเข้มข้น 2,400.00 μg/ml เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีปริมาณแบคทีเรียเหลือน้อยกว่า 1 log ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อสัมผัสสารสกัดที่ความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเหล่านี้ออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย (bactericidal effect) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเปลือกมังคุดความเข้มข้น 2MBC และ 4MBC (2.5 และ 5 μg/ml ตามลำดับ) ต่อการทำลายเชื้อ *Streptococcus mutans* พบว่า การสัมผัสสารสกัดความเข้มข้น 2MBC เป็นเวลา 90 นาที มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดนี้ (bacteriostatic effect) โดยสามารถทำให้แบคทีเรียทั้งหมดมีปริมาณลดลง 10 เท่า แต่เมื่อเพิ่มขึ้นความเข้มข้นเป็น 4MBC สัมผัสเป็นเวลา 60 นาที มีสารสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียโดย

สามารถทำให้แบคทีเรียทั้งหมดมีปริมาณลดลง 100 เท่า และเมื่อสัมผัสเป็นเวลา 90 นาที สารสกัดมีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียทั้งหมดได้ (bactericidal effect) (Torrungruang *et al.*, 2007) ดังนั้นอัตราการทำลายแบคทีเรียของสารสกัดขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด และระยะเวลาสัมผัสสารสกัด อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาประยุกต์ใช้สารสกัดเปลือกมังคุดด้วยน้ำความเข้มข้น 2,400.00 μg/ml ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ต่อไป

3. ความคงตัวของสารสกัดในสภาวะต่าง ๆ

จากการศึกษาความคงตัวของสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำด้วยการให้ความเย็นที่อุณหภูมิ -18 4 และ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3 และ 7 วัน ด้วยวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล พบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 และ 4 องศาเซลเซียส สารสกัดมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 7 วัน ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สารสกัดมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลลดลง ($P \leq 0.05$) จาก 71.54±3.12 เป็น 55.26±2.64 μg gallic acid equivalent/mg เช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยการเก็บรักษาสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำที่ -18 และ 4 องศาเซลเซียส มีค่า MIC และ MBC ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 7 วัน คือ 300 และ 1,200 μg/ml ตามลำดับ ในขณะที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส กลับมีค่า MBC เพิ่มขึ้นเป็น 2,400 μg/ml (Table 3) ดังนั้นจากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าภายหลังทำละลายสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำ ควรทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากสามารถรักษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ได้นานถึง 7 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Patthamakanokporn *et al.* (2008) รายงานว่าสารประกอบโพลีฟีนอลในสารสกัดผลฝรั่งจะมีความคงตัวที่อุณหภูมิการเก็บรักษา -20 องศาเซลเซียส มากกว่าที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 และ 5 องศาเซลเซียส สารประกอบโพลีฟีนอลจะคงตัวได้ 14 และ 7 วัน ตามลำดับ โดยมีปริมาณกรดแกลลิคไม่แตกต่างกันกับกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นจะเริ่มลดลง

ในขณะที่การเก็บรักษาสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำที่สภาวะค่า pH 3, 7 และ 9 เป็นเวลา 0 1 และ 2 ชั่วโมง โดยการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล พบว่า การเก็บรักษาที่สภาวะค่า pH 9 เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง สารสกัดมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลลดลง ($P \leq 0.05$) จาก 71.22±3.49 เป็น 47.57±4.66 และ 24.46±5.89 μg gallic acid equivalent/mg ตามลำดับ ในขณะที่การเก็บรักษาที่สภาวะค่า pH 3 และ 7 สารสกัดมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นผลเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ที่พบว่าที่สภาวะค่า pH 9 เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง มีผลทำให้ค่า MIC เพิ่มขึ้นจาก 300.00 เป็น 1,200 และ 2,400 μg/ml ตามลำดับ และมีค่า MBC เพิ่มขึ้นจาก 1,200 เป็น 2,400 และ 4,800 μg/ml ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม ที่สภาวะค่า pH 3 และ 7 ตลอดระยะเวลาการเก็บ 2 ชั่วโมง ทำให้ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดไม่เปลี่ยนแปลง (Table 3) ดังนั้นจากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าภายหลังทำละลายสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำ สารสกัดไม่สามารถคงตัวที่สภาวะด่าง แต่จะคงตัวที่สภาวะกรด และกลาง ทั้งนี้เนื่องจาก ในสภาวะด่างสารแทนนินจะไวต่อการออกซิเดชันและสูญเสียความสามารถในการเป็นสารต้านแบคทีเรียและสารต้านการเกิดออกซิเดชัน แต่สารแทนนินจะมีความคงตัวได้ที่สภาวะกรดและกลาง (Krook *et al.*, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความคงตัวของสารประกอบโพลีฟีนอลในชาดำที่พบว่าสารประกอบโพลีฟีนอลจะสามารถคงตัวในน้ำย่อยของกระเพาะอาหารที่มีค่า pH 3 และในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 5.5 แต่สารประกอบโพลีฟีนอลจะมีปริมาณลดลงเล็กน้อยในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 7.4 และไม่คงตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 8.5 และน้ำย่อยของลำไส้เล็กที่มีค่า pH 7.4-8.5 ทำให้สารประกอบโพลีฟีนอลเกิดการออโตออกซิเดชัน (Jhoo *et al.*, 2005; Bermúdez-Soto *et al.*, 2007)

Table 3 Stability of crude water extract from mangosteen hull at different conditions

Conditions	Contact times	Polyphenol compound[1] (μg gallic acid equivalent/mg)	MIC (μg/ml)	MBC (μg/ml)
-18°C	0 d	69.98±3.0[a]	300.00	1,200.00
	3 d	70.17±3.40[a]	300.00	1,200.00
	7 d	68.74±2.91[a]	300.00	1,200.00
4°C	0 d	71.79±4.47[a]	300.00	1,200.00
	3 d	69.48±3.75[a]	300.00	1,200.00
	7 d	67.97±5.61[a]	300.00	1,200.00
10°C	0 d	71.54±3.12[a]	300.00	1,200.00
	3 d	68.69±3.46[a]	300.00	1,200.00
	7 d	55.26±2.64[b]	300.00	2,400.00
pH 3	0 h	69.42±3.75[a]	300.00	1,200.00
	1 h	70.12±2.97[a]	300.00	1,200.00
	2 h	68.81±3.14[a]	300.00	1,200.00
pH 7	0 h	70.69±4.29[a]	300.00	1,200.00
	1 h	69.43±3.75[a]	300.00	1,200.00
	2 h	70.18±3.84[a]	300.00	1,200.00
pH 9	0 h	71.22±3.49[a]	300.00	1,200.00
	1 h	47.57±4.66[b]	600.00	2,400.00
	2 h	24.46±5.89[c]	1,200.00	4,800.00

[1] [a-c] Different letters within each condition indicate that values are significantly different ($P \leq 0.05$)

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วยน้ำมีฤทธิ์ทำลายเชื้อ *S. aureus* CH1 ที่แยกได้จากเนื้อสุกร และภายหลังการทำละลายสารสกัด ควรทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่เป็นกลางหรือกรด นอกจากนี้ควรมีการศึกษาการประยุกต์ใช้สารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วยน้ำในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินแผ่นดิน มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

เอกสารอ้างอิง

Bacteriological Analytical Manual (BAM) Online. 2001. *Staphylococcus aureus.* U.S. Food and Drug Administration. Available at: http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html. 9 Dec. 2006.

Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 45 (4): 493-496.

Bermúdez-Soto, M.J., F.A. Tomás-Barberán and M.T. García-Conesa. 2007. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. Food Chemistry. 102 (3): 865-874.

CLSI. 2002. Reference method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically Approved standard M7-A4. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

Eloff, J.N. 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. Journal of Ethnopharmacology. 60 (1): 1-8.

Jhoo, J.W., C.Y. Lo, S. Li, S. Sang, C.Y.W. Ang, T.M. Heinze and C.T. Ho. 2005. Stability of black tea polyphenol, theaflavin, and indentification of theanaphthoquinone as its major radical reaction product. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (15): 6146-6150.

Krook, M.A., A.J. Kreinberg, A.E. Hagerman, J. Gonzalez and J.J. Halvorson. 2009. Tannin (polyphenol) stability in aqueous solutions. 2009 International Annual Meetings. 1-5 November 2009. Pittsburgh, PA.

Mahabusakam, W. and P. Viriyacitra. 1987. Chemical constituents of *Garcinia mangostana*. Journal of Natural Products. 50 (5): 474-478.

Patthamakanokporn, O., P. Puwastien, A. Nitithamyonga, and P.P. Sirichakwal. 2008. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. Journal of Food Composition and Analysis. 21 (3): 241-248.

Praveen, M., N.U. Khan, B. Achari and P.K. Dutta. 1991. A triterpene from Garcinia mangostana. Phytochemistry. 30 (1): 361-362.

SAS. 1998. SAS/STAT User's Guide. Version 6.12. USA: Statistical Analysis Systems Institute Inc.

Smith, J.L., R.L. Buchanan and S.A. Palumbo. 1983. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: A review. Journal of Food Protection. 46 (6): 545-555.

Tangwatcharin, P., S. Chanthachum, P. Khopaibool and M.W. Griffiths. 2006. Morphological and physiological responses of *Campylobacter jejuni* to stress. Journal of Food Protection. 69 (11): 2747-2753.

Taguri, T., T. Tanaka and I. Kouno. 2004. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 27 (12): 1965-1969.

The Office of the Federal Register 1990. The Code of Federal Regulations: Alcohol, Tobacco Products and Firearms. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.

Tsai, T-H., P-J. Tasi and S-C. Ho. 2005. Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used spices. Journal of Food Science. 70 (1): C93–C97.

Torrungruang, K., P. Vichienroj and S. Chutimaworapan. 2007. Antibacterial activity of mangosteen pericarp extract against cariogenic *Stretococcus mutans*. Chulalungkorn University Dental Journal. 30 (1): 1-10.