นิพนธ์ต้นฉบับ

ฤทธิ์ต้านจุลชีพและความเป็นพิษของสารสกัดมะตะหลวง

ปฐมาพร ปรึกษากร[*,§], ภาณุพันธ์ ปัญญาใจ[†], ชุติมา จิตตประสาทศีล[‡], อรพรรณ ศรีพิชัย[‡], แสงตะวัน ศรีโบราณ[*], ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์[*]

[*] *สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี 11000*

[†] *สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี 11000*

[‡] *สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี 11000*

[§] ***ผู้รับผิดชอบบทความ:*** *patamaporn.p@dmsc.mail.go.th*

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: มะตะหลวงเป็นไม้ผลที่พบได้ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จีน และอินเดีย ผลสุกรับประทานได้มีรสหวานอมเปรี้ยว พืชนี้มีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย แต่ในประเทศไทยยังคงมีการนำมะตะหลวงมาใช้ประโยชน์และบริโภคอย่างจำกัด การศึกษานี้มีเป้าหมายเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพและความเป็นพิษของสารสกัดเอทานอลจากส่วนใบ เนื้อผลสุก และเมล็ดของมะตะหลวง

วิธีการศึกษา: ผงแห้งของส่วนใบ เนื้อผลสุก และเมล็ดของมะตะหลวงถูกนำมาสกัดด้วย 95% เอทานอล และนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดเอทานอลของมะตะหลวงใช้วิธี Broth microdilution method ประเมินความเป็นพิษของสารสกัดโดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HaCaT ด้วยวิธี MTT assay และการทดสอบความเป็นพิษต่อไรทะเล

ผลการศึกษา: สารสกัดใบ เนื้อผลสุก และเมล็ดของมะตะหลวงมีฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด สารสกัดใบมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไมโคแบคทีเรีย *Mycobacterium smegmatis* และ *M. bovis* ที่ MICs 100 μg/mL สารสกัดจากเนื้อผลสุกและเมล็ดแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคฟันผุ แบคทีเรียที่อยู่บนผิวหนัง และแบคทีเรียก่อโรคบริเวณช่องคลอด ที่ MICs 25-200 μg/mL การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบ เนื้อผลสุก และเมล็ดในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HaCaT มีค่า IC_{50} >100, >100 และ 91.25 μg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้ การทดสอบความเป็นพิษต่อไรทะเลพบว่าสารสกัดใบ เนื้อผลสุก และเมล็ดมีค่าความเป็นพิษต่อไรทะเล ที่ LC_{50} 221.54, 985.67 และ 43.54 μg/mL ตามลำดับ

อภิปรายผล: สารสกัดจากเนื้อผลสุกและเมล็ดของมะตะหลวงแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณผิวหนังได้ดี สอดคล้องกับการใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์พื้นบ้านของชนพื้นถิ่นดั้งเดิมในอินเดีย ที่ใช้ผลมะตะหลวงสำหรับรักษาโรคผิวหนัง และรักษาแผล

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามะตะหลวงเป็นพืชที่มีศักยภาพสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านส่งเสริมการบริโภค หรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับดูแลสุขภาพ

คำสำคัญ: มะตะหลวง, ฤทธิ์ต้านจุลชีพ, ความเป็นพิษ

Received date 14/09/23; Revised date 22/02/24; Accepted date 11/07/24

Antimicrobial Activity and Toxicity of the Ethanolic Extracts from *Garcinia xanthochymus*

Patamaporn Pruksakorn[*,§], Parnuphan Panyajai[†], Chutima Jittaprasatsin[‡], Orapan Sripichai[‡], Sangtawan Sriboran[*], Siriwan Chaisomboonpan[*]

[*] *Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000*

[†] *Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000*

[‡] *National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000*

[§] ***Corresponding author:*** *patamaporn.p@dmsc.mail.go.th*

Abstract

Introduction and Objective: Egg tree, or *Garcinia xanthochymus* Hook.f. ex T.Anderson (*madaluang* in Thai), is a fruit tree distributed widely in Southeast Asian countries as well as China and India. The ripe fruit is edible and has a sweet and sour taste. This plant has been reported to have a wide range of pharmacological activities. However, the use and consumption of *G. xanthochymus* are still limited in Thailand. This study aimed to examine antimicrobial activity and evaluate toxicity of the ethanolic extracts obtained from the leaves, ripe fruits, and seeds of *G. xanthochymus*.

Methods: The dried leaves, ripe fruits, and seeds of *G. xanthochymus* were extracted with 95% ethanol and used for biological activity study. Antimicrobial activity testing was performed by the broth microdilution method. The extracts were evaluated for cytotoxicity in human skin keratinocytes (HaCaT cell line) using the MTT assay and brine shrimp toxicity.

Results: Three extracts from the leaves, ripe fruits, and seeds of *G. xanthochymus* exhibited antimicrobial activity against various pathogenic microorganisms. The leaf extract presented antimycobacterial activity against *Mycobacterium smegmatis* and *M. bovis* at a minimum inhibitory concentration (MIC) value of 100 μg/mL. The fruit and seed extracts of *G. xanthochymus* showed antibacterial activity against cariogenic bacteria, skin commensal bacteria, and vaginal pathogenic bacteria at MIC values of 25–200 μg/mL. The cytotoxicity assay revealed that the leaf, fruit, and seed extracts exhibited cytotoxic effects on HaCaT cells with lethal concentration 50 (LC_{50}) values of >100, >100, and 91.25 μg/mL, respectively. In addition, the leaf, fruit, and seed extracts showed brine shrimp toxicity with LC_{50} values of 221.54, 985.67, and 43.54 μg/mL, respectively.

Discussion: The fruit and seed extracts of *G. xanthochymus* exhibited remarkable antibacterial activity, especially against skin commensal bacteria. The results support the ethnobotanical uses of this plant in India for the treatment of skin diseases and wound healing.

Conclusion and Recommendation: *G. xanthochymus* has the potential to be utilized for consumption and development of health-care products.

Key words: egg tree, *Garcinia xanthochymus*, antimicrobial activity, toxicity

บทนำและวัตถุประสงค์

มะดะหลวง (*Garcinia xanthochymus* Hook.f. ex T. Anderson) เป็นพืชในวงศ์ Clusiaceae (Guttiferae) มีชื่อสามัญคือ egg tree และมีชื่อท้องถิ่นแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ เช่น มะดะ, มะพูด, จะค้าส่า[1-3] มีการเจริญเติบโตในบริเวณแหล่งน้ำของป่าดิบต่ำและป่าดิบ พบได้ทุกภาคของประเทศไทย ในต่างประเทศพบที่อินเดีย เนปาล ภูฏาน บังกลาเทศ จีนตอนใต้ เมียนมา ลาว และเวียดนาม ลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงกลาง สูง 8-10 เมตร ใบรูปรีหรือรูปใบหอก กว้าง 6.5-9 เซนติเมตร ยาว 19-23 เซนติเมตร แผ่นใบหนาคล้ายหนัง แผ่นใบด้านล่างมีขนอยู่บริเวณเส้นกลางใบ ก้านใบยาว 1.5 เซนติเมตร ดอกเป็นดอกแยกเพศอยู่ร่วมต้น ออกเป็นกลุ่มตามซอกใบประมาณ 8-10 ดอก ดอกเพศเมียมีก้านดอกยาว 1.5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมี 5 กลีบ เกสรเพศผู้ก้านเชื่อมติดกันเป็นมัดจำนวน 5 มัด แต่ละมัดมีเกสรเพศผู้ 3-5 เกสร ยอดเกสรเพศเมียแยกเป็น 5 แฉก รังไข่กลม ผลเป็นผลสด ก้านผลยาว 1.5-2.5 เซนติเมตร รูปทรงไข่หรือทรงกลม ผิวเกลี้ยง เมื่อสุกมีสีเหลืองเข้ม ภายในมีเมล็ด 3-5 เมล็ด[2-4] (Figure 1) ผลสุกรับประทานได้มีรสหวานอมเปรี้ยว ผลมะดะหลวงอุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการและสารอาหารที่มีประโยชน์ ได้แก่ ไฟเบอร์ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน รวมถึงวิตามินและแร่ธาตุ เช่น แคโรทีนอยด์ วิตามินซี โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม สังกะสี และธาตุเหล็ก[5-6]

Figure 1 The whole plant (A), leaves (B), flowers (C), and Fruits of *G. xanthochymus* (D) (Photographed by Patamaporn Pruksakorn)

จากการค้นหาข้อมูลของมะดะหลวงในตำราเกี่ยวกับสมุนไพรไทยและตำราการแพทย์แผนโบราณของไทยไม่พบเอกสารระบุสรรพคุณหรือการใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์แผนไทยที่ชัดเจน ข้อมูลสำรวจการใช้ประโยชน์ของมะดะหลวงในทางการแพทย์พื้นบ้านของชนพื้นถิ่นดั้งเดิมในเขตรอบป่าทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอินเดีย พบการใช้ผลมะดะหลวงสำหรับรักษาแผล (wound healing) โรคผิวหนัง (skin diseases) ความบกพร่องทางเพศ (sexual disorders) อาการท้องเสีย (diarrhea) และปัญหากระเพาะอาหาร (stomach problems)[5] มะดะหลวงมีสารหลากหลายชนิดเป็นองค์ประกอบทางเคมี ในส่วนใบพบสารกลุ่ม sterols, flavonoids และ triterpenoids[7] เปลือกไม้พบสารกลุ่ม xanthones[8-9] และส่วนผลสุกพบสารกลุ่ม biflavonoids, benzophenones และ xanthones[10] ส่วนเมล็ดพบสารกลุ่ม fatty acids[11] และ phenolic compounds เช่น organic acids, flavonoids และ tannins[6] นอกจากนี้ยังมีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ต้านการอักเสบ[7] ต้านอนุมูลอิสระ[8-12] ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้[10] ต้านเบาหวาน[6,11] ต้านแบคทีเรีย[12] และต้านมาลาเรีย[13]

ในประเทศไทยมะดะหลวงนับเป็นไม้ผลที่สามารถเพาะปลูกได้ง่าย และพบได้ในหลายพื้นที่ของประเทศ อย่างไรก็ตาม ยังคงมีการนำพืชนี้มาใช้ประโยชน์อย่างจำกัด ทั้งการนำมาใช้บริโภค หรือเพื่อวัตถุประสงค์อื่น เช่น การปลูกเป็นไม้ประดับ จากข้อมูลผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรและพืชพื้นบ้านที่หาได้ง่ายในพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทยที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัย ได้พบว่าสารสกัดจากมะดะหลวงมีฤทธิ์ดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบางชนิด รวมถึงรายงานวิจัยที่ระบุว่าผลมะดะหลวงอุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการและสารอาหารที่มีประโยชน์ ทำให้พืชนี้มีความน่าสนใจสำหรับนำไปศึกษาเชิงลึกเพื่อต่อยอดการวิจัยและนำไปใช้ประโยชน์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดเอทานอลจากส่วนใบ เนื้อผลสุก และเมล็ดของมะดะหลวงต่อเชื้อแบคทีเรีย ไมโคแบคทีเรีย ยีสต์ และ รา พร้อมทั้งศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดทั้งสามชนิดในเซลล์เพาะเลี้ยงและไรทะเล เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับช่วยสนับสนุนการนำมะดะหลวงไปใช้ประโยชน์เพิ่มขึ้นทั้งในด้านส่งเสริมการบริโภค หรือพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีผลในการต้านจุลชีพสำหรับส่งเสริมสุขภาพได้ในอนาคต

ระเบียบวิธีศึกษา

ตัวอย่างพืช

มะดะหลวง เก็บจากอำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี เดือนกุมภาพันธ์ 2564 ตรวจระบุชื่อชนิดพันธุ์พืชตามหลักอนุกรมวิธานโดยนักพฤกษศาสตร์ และเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงเพื่องานวิจัย (herbarium no. DMSC.: 5327) ที่พิพิธภัณฑ์พืช สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี

การเตรียมสารสกัดจากใบ เนื้อผลสุกทั้งเปลือก และเมล็ดมะดะหลวง

สารสกัดตัวอย่างสำหรับการทดสอบเตรียมจากมะดะหลวง โดยใช้ส่วนใบทั้งหมดทุกขนาด ส่วนเนื้อผลสุกทั้งเปลือก และส่วนเมล็ด นำมาหั่นลดขนาดแล้วผึ่งให้แห้งในที่ร่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ และนำมาบดให้มีขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตร

จากนั้นนำผงพืชแห้งส่วนใบ เนื้อผลสุก และเมล็ด มาหมักด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1 กรัมของพืชแห้งต่อ 95% เอทานอล 20 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และสกัดต่อด้วยคลื่นอัลตราโซนิค 15 นาที โดยทำการสกัดตามขั้นตอนข้างต้นซ้ำ 2 ครั้ง กรองและนำส่วนเอทานอลไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำให้แห้งต่อด้วยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ได้สารสกัดเอทานอลของใบ เนื้อผลสุก และเมล็ดมะดะหลวง เก็บรักษาตัวอย่างสารสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำสารสกัดมาเตรียมตัวอย่างสำหรับใช้ทดสอบโดยละลายใน DMSO (Merck, Germany)

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดมะดะหลวงโดยวิธี Broth microdilution method

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย:

แบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* DMST15505, *S. haemolyticus* DMST 15511, *Streptococcus mutans* ATCC25175T, *Lactobacillus acidophillus* DMST 31297, *L. gasseri* TBRC 373, *L. crispatus* DSM 20584, *Corenebacterium striatum* DMST 15562, *Cutibacterium acnes* DMST69085, *Prevotella bivia* ATCC 29303, *Neisseria gonorrhoeae* DMST 6209, *Atopobium vaginae* ATCC BAA-55, *Porphyromonas gingivalis* DMST21360, *Pseudomonas aeruginosa* DMST 4739 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

วิธีทดสอบ

การทดสอบใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการตามเอกสาร EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) discussion document E.Dis 5.1[14] โดยเตรียมสารตัวอย่างสำหรับทดสอบในอาหาร Mueller-Hinton broth (Merck, Germany) หรืออาหารชนิดอื่นที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อที่ทำการทดสอบ ให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่ต้องการศึกษา โดยเตรียมเป็น two-fold serial dilution ปริมาตร 50 μL ใน 96-well culture plate ชนิด U-shape wells (ความเข้มข้นสำหรับการทดสอบอยู่ในช่วง 25-200 μg/mL) ทำการทดสอบตัวอย่างแต่ละชนิด 2 ซ้ำ ใช้ยาต้านแบคทีเรียเป็น positive control และใช้ DMSO (Merck, Germany) เป็น negative control เตรียมเชื้อสำหรับใช้ทดสอบโดยให้มีความหนาแน่นของเชื้อ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือ 0.5 McFarland standard จากนั้นเจือจางเชื้อต่ออีกครั้งด้วยอาหารในอัตราส่วน 1:10 ถึง 1:100 ให้มีความหนาแน่นของเชื้อ $3\text{-}7 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วใส่เชื้อที่เตรียมได้นี้ปริมาตร 50 μL ลงในแต่ละหลุม บ่มถาดเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส (บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนสำหรับ anaerobic bacteria) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ช้า หลังจากครบกำหนดการบ่มเลี้ยงอ่านผลการทดสอบโดยดูความขุ่นที่ปรากฏในหลุมเป็นตัวบ่งชี้การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentrations, MICs) ตัดสินจากความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเจริญในหลุม

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไมโคแบคทีเรีย:

ไมโคแบคทีเรีย

เชื้อไมโคแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Mycobacterium smegmatis* ATCC607 และ *M. bovis* BCG str. Tokyo ได้จากสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

วิธีทดสอบ

การทดสอบใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธี tetrazolium microplate assay[15] โดยเติมน้ำปราศจากเชื้อปริมาตร 300 μL ลงในหลุมรอบนอกของ 96-well culture plate ชนิด flat bottom ในหลุมที่เหลือเตรียมสารตัวอย่างสำหรับทดสอบในอาหาร Middlebrook 7H9 (BD Difco, USA) ที่เสริมด้วย 0.2% glycerol (Fisher, USA), 0.05% Tween80 (Sigma-Aldrich, USA) และ 10% OADC (BD, USA) ให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่ต้องการศึกษา เตรียมเป็น two-fold serial dilution ปริมาตร 100 μL (ความเข้มข้นสำหรับการทดสอบอยู่ในช่วง 25-200 μg/mL) ทำการทดสอบตัวอย่างแต่ละชนิด 2 ซ้ำ ใช้ isoniazid (Sigma-Aldrich, USA) เป็น positive control และใช้ DMSO เป็น negative control เตรียมเชื้อสำหรับใช้ทดสอบโดยใช้เชื้อที่ late-log phase มีความหนาแน่นของเชื้อประมาณ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเชื้อต่ออีกครั้งด้วยอาหาร Middlebrook 7H9 ให้มีความหนาแน่นของเชื้อ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับ *M. smegmatis* และ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับ *M. bovis* BCG แล้วใส่เชื้อที่เตรียมได้นี้ปริมาตร 100 μL ลงในแต่ละหลุม บ่มถาดเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง สำหรับ *M. smegmatis* หรือ 5 วัน สำหรับ *M. bovis* BCG หลังครบกำหนดการบ่มเลี้ยง ทดลองเติมสารละลาย MTT (0.05% MTT (TCI, Japan), 50% absolute ethanol (Merck, Germany) และ 5% Tween80) ปริมาตร 50 μL ลงในหลุม Negative control 1 หลุม แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับ *M. smegmatis* หรือ 12 ชั่วโมง สำหรับ *M. bovis* BCG เมื่อครบกำหนดการบ่มเลี้ยงถ้าหลุมที่เติมสารละลาย MTT ไม่เปลี่ยนเป็นสีม่วงให้บ่มเลี้ยงต่อ 2 วัน ถ้าเปลี่ยนเป็นสีม่วง ให้เติมสารละลาย MTT ลงในหลุมทดสอบที่เหลือ แล้วบ่มเพาะเพิ่มเติมตามระยะเวลาที่ระบุข้างต้น อ่านผลการทดสอบโดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ตัดสินจากหลุมแรกที่มีการลดลงอย่างมากของค่าการดูดกลืนแสงเมื่อเทียบกับหลุมที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าซึ่งอยู่ถัดไป หรือสังเกตดูสีที่เปลี่ยนไปในแต่ละหลุมของตัวอย่างด้วยตาเปล่า (หลุมที่ไม่มีการเปลี่ยนจากเหลืองเป็นม่วง)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา:

รา

เชื้อราที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ เชื้อยีสต์ *Candida albicans* DMST 5815 และเชื้อราแบบมีเส้นใยกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ ได้แก่ *Trichophyton rubrum* DMST 30263, *T. mentagrophytes* DMST 19735, *Microsporum canis* DMST29297 และ *M. gypseum* DMST 21146 ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านยีสต์

การทดสอบใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการตาม The National Committee for Clinical and Laboratory Standards (CNCCLS) document M27-A2[16] โดยเตรียมสารตัวอย่างสำหรับทดสอบในอาหาร RPMI-MOPS ใช้ RPMI 1640 medium, with L-glutamine, without sodium bicarbonate (Gibco, USA) ที่มีส่วนผสมของ 165 mM morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) (TCI, Japan) ให้ตัวอย่างทดสอบมีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่ต้องการศึกษา โดยเตรียมเป็น two-fold serial dilution ปริมาตร 50 μL ใน 96-well culture plate ชนิด U-shape wells (ความเข้มข้นสำหรับการทดสอบอยู่ในช่วง 25-200 μg/mL) ทำการทดสอบตัวอย่างแต่ละชนิด 2 ซ้ำ ใช้ ketoconazole (Sigma-Aldrich, USA) เป็น positive control และใช้ DMSO เป็น negative control และเตรียมเชื้อสำหรับใช้ทดสอบโดยเจือจางเชื้อ *C. albicans* ใน 0.85% sodium chloride (Merck, Germany) ให้มีความขุ่นเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 McFarland standard เพื่อให้มีความหนาแน่นของเชื้อ 1-5 × 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเชื้อต่ออีกครั้งด้วยอาหาร RPMI-MOPS ในอัตราส่วน 1:500 แล้วใส่เชื้อที่เตรียมได้นี้ปริมาตร 50 μL ลงในแต่ละหลุม บ่มถาดเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบกำหนดการบ่มเลี้ยงอ่านผลการทดสอบโดยดูความขุ่นที่ปรากฏในหลุมเป็นตัวบ่งชี้การเจริญของเชื้อยีสต์ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ตัดสินจากความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อยีสต์ในหลุม

วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์

การทดสอบใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการตาม The Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) document M38-A2[17] โดยเตรียมสารตัวอย่างสำหรับทดสอบในอาหาร RPMI-MOPS ให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่ต้องการศึกษา โดยเตรียมเป็น two-fold serial dilution ปริมาตร 50 μL ใน 96-well culture plate ชนิด U-shape wells (ความเข้มข้นสำหรับการทดสอบอยู่ในช่วง 25-200 μg/mL) ทำการทดสอบตัวอย่างแต่ละชนิด 2 ซ้ำ ใช้ ketoconazole เป็น positive control และใช้ DMSO เป็น negative control และเตรียมเชื้อสำหรับการทดสอบโดยเจือจาง conidia ของเชื้อราใน 0.85% NaCl ให้มีความขุ่นเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตรเท่ากับ 1 McFarland standard เพื่อให้มีความหนาแน่นของเชื้อ 1-5 × 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเชื้ออีกครั้งด้วยอาหาร RPMI-MOPS ในอัตราส่วน 1:50 แล้วใส่เชื้อที่เตรียมได้นี้ปริมาตร 50 μL ลงในแต่ละหลุม บ่มถาดเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72-120 ชั่วโมง หลังจากครบกำหนดการบ่มเลี้ยงอ่านผลการทดสอบโดยดูเส้นใยของเชื้อราที่ปรากฏในหลุมเป็นตัวบ่งชี้การเจริญของเชื้อรา ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ตัดสินจากความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อราในหลุม

การทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลชีพ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพแต่ละชนิดสามารถนำมาหาความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย หรือความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อรา โดยนำอาหารเพาะเลี้ยงจากหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อมา spread ลงบนอาหารแข็ง Mueller-Hinton agar

(Merck, Germany) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย Middlebrook 7H10 agar (BD Difco, USA) สำหรับเชื้อไมโครแบคทีเรีย และ Sabouraud Dextrose agar สำหรับเชื้อยีสต์และรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อในสภาวะที่เหมาะสมกับจุลชีพแต่ละชนิด และสังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหาร ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อตัดสินจากความเข้มข้นที่ไม่พบการเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยง

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดมะดะหลวง

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HaCaT ด้วยวิธี MTT assay

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ HaCaT (human keratinocyte cell line) (CLS, Germany) เพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM (Gibco, USA) ที่เสริมด้วย 10% fetal bovine serum (HyClone, USA) และ 0.45% glucose (Merck, Germany) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% CO_2

วิธีทดสอบ

เตรียมเซลล์ ให้มีความหนาแน่นของเซลล์ 1×10^5 cell/mL และเพาะเลี้ยงใน 96-well cell culture plate หลุมละ 200 μL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 2 μL (ความเข้มข้นสำหรับการทดสอบ 3, 10, 30 และ 100 μg/mL) ทำการทดสอบตัวอย่างแต่ละชนิดความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ใช้ doxorubicin (Sigma-Aldrich, USA) เป็น positive control และใช้ DMSO เป็น negative control เพาะเลี้ยงต่อ 48 ชั่วโมง และตรวจวัดผลความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic effects) ด้วยวิธี MTT assay[18] และวิเคราะห์ค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับคำนวณค่า IC_{50}

การทดสอบความเป็นพิษต่อไรทะเล (Brine Shrimp Lethality Assay)

เตรียมไรทะเล (*Artemia salina*) โดยการฟักไข่ไรทะเล (Sanders, USA) ในน้ำทะเลเทียมสำหรับการเพาะเลี้ยงไรทะเลที่เตรียมจากเกลือสำหรับทำน้ำทะเล (AquaRaise, Thailand) ความเข้มข้น 3.8% และเติมผงยีสต์สกัด (Gibco, USA) 6 mg/L ฟักไข่ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดสอบโดยใช้ไรทะเลจำนวน 15-30 ตัว เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลเทียมสำหรับการเพาะเลี้ยงไรทะเลปริมาตร 1 mL ที่มีสารทดสอบความเข้มข้นต่าง ๆ (ความเข้มข้นสำหรับการทดสอบ 10, 30, 100, 300 และ 1,000 μg/mL) ทำการทดสอบตัวอย่างแต่ละชนิดความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ใช้ doxorubicin เป็น positive control และใช้ DMSO เป็น negative control แล้วเพาะเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังครบกำหนดตรวจนับจำนวนไรทะเลที่ตายและจำนวนไรทะเลรวมทั้งหมดเพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าร้อยละการตายของไรทะเลสำหรับคำนวณค่า LC_{50}[19]

ผลการศึกษา

การสกัดมะดะหลวงด้วยเอทานอลได้ปริมาณสารสกัดเมื่อคำนวณเทียบกับน้ำหนักแห้งของพืชส่วนใบ เนื้อผลสุก และเมล็ด คิดเป็น 7.02%, 38.55% และ 17.06% (%yields, w/w) ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดมะดะหลวงต่อเชื้อ แบคทีเรีย ไมโคแบคทีเรีย ยีสต์ และรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ ด้วยวิธี broth microdilution method ที่ความเข้มข้นของสารสกัดสูงสุด 200 μg/mL ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยรวมพบว่าสารสกัดเอทานอล

ของเมล็ดมะดะหลวงมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ใช้ทดสอบหลายชนิดได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดของเนื้อผลสุกและใบมะดะหลวง อย่างไรก็ตาม สารสกัดมะดะหลวงทั้งสามตัวอย่างไม่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *P. aeruginosa* และ *E. coli* ที่ความเข้มข้นเข้มข้น 200 μg/mL สารสกัดเอทานอลจากส่วนใบของมะดะหลวงแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อไมโคแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบทั้งสองชนิด ได้แก่ *Mycobacterium smegmatis* และ *M. bovis* ที่ MICs 100 μg/mL ในขณะที่สารสกัดจากส่วนเนื้อผลสุกและเมล็ดไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไมโคแบคทีเรียต่อเชื้อดังกล่าวที่ความเข้มข้น 200 μg/mL นอกจากนี้ การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดเอทานอลจากส่วนใบ เนื้อผลสุก และเมล็ดของมะดะหลวง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อเชื้อกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ ได้แก่ *T. mentagrophytes, M. canis* และ *M. gypseum* ที่ MICs ระหว่าง 50-200 μg/mL แต่ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อเชื้อ *T. rubrum* และ *C. albicans* ที่ความเข้มข้น 200 μg/mL (Table 1)

Table 1 Antimicrobial activities of the ethanolic extracts obtained from the leaves, ripe fruits, and seeds of *G. xanthochymus*.

Strains	Antimicrobial activities of the ethanolic extracts from *G. xanthochymus*. (μg/mL)							
	Leaves		Ripe fruits		Seeds		Positive control	MIC
	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC		
Staphylococcus aureus ATCC 25923	–	–	–	–	100	–	gentamicin	0.39
S. epidermidis DMST15505	–	–	200	–	200	–	gentamicin	0.13
S. haemolyticus DMST 15511	–	–	200	–	–	–	tetracyclin	3.13
Streptococcus mutans ATCC25175T	–	–	200	–	100	–	tetracyclin	12.50
Lactobacillus acidophillus DMST 31297	–	–	100	–	50	–	chloramphenicol	3.13
L. gasseri TBRC 373	–	–	–	–	200	200	tetracyclin	25.0
L. crispatus DSM 20584	–	–	–	–	200	–	tetracyclin	3.13
Corenebacterium striatum DMST 15562	100	–	–	–	–	–	tetracyclin	6.25
Cutibacterium acnes DMST69085	–	–	200	–	100	–	clindamycin	0.25
Prevotella bivia ATCC 29303	100	200	–	–	100	100	gentamicin	100.00
Neisseria gonorrhoeae DMST 6209	–	–	50	50	50	50	tetracyclin	3.13
Atopobium vaginae ATCC BAA-55	–	–	25	25	100	100	gentamicin	160.00
Porphyromonas gingivalis DMST21360	–	–	25	25	25	25	gentamicin	3.13
Pseudomonas aeruginosa DMST 4739	–	–	–	–	–	–	gentamicin	0.50
Escherichia coli ATCC 25922	–	–	–	–	–	–	gentamicin	1.00
Mycobacterium smegmatis ATCC607	100	–	–	–	–	–	isoniazid	2.50
M. bovis BCG str. Tokyo	100	–	–	–	–	–	isoniazid	0.03
Candida albicans DMST 5815	–	–	–	–	–	–	ketoconazole	100.00
Trichophyton rubrum DMST 30263	–	–	–	–	–	–	ketoconazole	1.56
T. mentagrophytes DMST 19735	100	–	–	–	50	200	ketoconazole	0.31
Microsporum canis DMST 29297	–	–	200	–	200	–	ketoconazole	6.25
M. gypseum DMST 21146	100	–	–	–	–	–	ketoconazole	1.25

– > 200 μg/mL; *L. gasseri* และ *L. crispatus* > 400 μg/mL

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดมะดะหลวงในเซลล์ HaCaT พบว่าสารสกัดเอทานอลจากส่วนใบ และเนื้อผลสุกมีค่า IC_{50} มากกว่า 100 μg/mL ส่วนสารสกัดเอทานอลจากเมล็ด มีค่า IC_{50} 91.25 μg/mL การทดสอบความเป็นพิษต่อไรทะเลของสารสกัดเอทานอลจากส่วนใบ เนื้อผลสุก และเมล็ดของมะดะหลวงพบว่ามีค่า lethal concentration 50% (LC_{50}) 221.54, 985.67 และ 11.64 μg/mL ตามลำดับ (Table 2 and Figure 2)

Table 2 Toxicity studies of the ethanolic extracts obtained from the leaves, ripe fruits, and seeds of *G. xanthochymus.*

Test samples	Cytotoxicity in HaCaT IC_{50} (μg/mL)	Brine Shrimp Toxicity LC_{50} (μg/mL)
Leaf extract	> 100	221.54
Ripe fruit extract	> 100	985.67
Seed extract	91.25	43.54
Doxorubicin	0.63	11.64

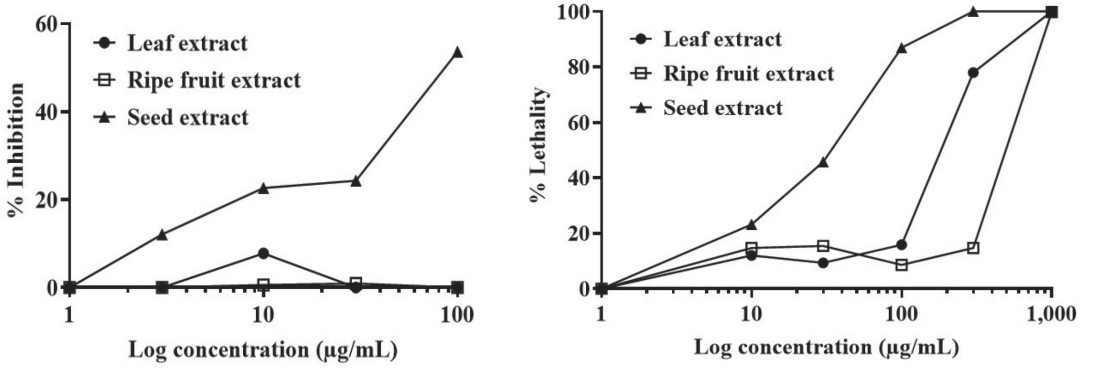

Figure 2 Graph representing %inhibition of HaCaT cell growth versus logarithm of the concentration (left) and %lethality of brine shrimp versus logarithm of the concentration (right) of the ethanolic extracts obtained from the leaves, ripe fruits, and seeds of *G. xanthochymus*

อภิปรายผล

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดมะดะหลวงทั้งในส่วนใบ เนื้อผลสุก และเมล็ด แสดงให้เห็นว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านจุลชีพหลายชนิดได้ดี ซึ่งฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดผลมะดะหลวงสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Murmu P และคณะ[5] ที่ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผลมะดะหลวงที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Petroleum ether, Acetone, n-Hexane และน้ำ ต่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* MTCC

1252, *Shigella flexnerii* MTCC 1457, *Vibrio cholera* MTCC 3906, *S. pyrogens* MTCC 1926, *S. mutans* MTCC 2513 และ *C. parapsilosis* MTCC2513 โดยวิธี dish diffusion method แสดงผลการทดสอบเมื่อใช้สารสกัดความเข้มข้น 1,000 μg/mL ปริมาตร 10 μL ปรากฏ clear zone ขนาด 0.7-1.5 cm และยาต้านแบคทีเรีย gentamicin ปรากฏ clear zone ขนาด 2.6-2.8 cm ผลการศึกษาของ Murmu P และคณะนี้ นับเป็นข้อมูลการวิจัยเชิงวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนการใช้ผลมะดะหลวงสำหรับรักษาอาการท้องเสียตามการแพทย์พื้นบ้านของอินเดีย[5]

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดส่วนใบมะดะหลวง พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไมโคแบคทีเรีย ซึ่งสารสกัดใบมะดะหลวงไม่เคยมีรายงานฤทธิ์ในการต้านเชื้อไมโคแบคทีเรียมาก่อน และสารสกัดใบมะดะหลวงมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและต้านรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ได้บางชนิด ในส่วนของสารสกัดเนื้อผลสุกและเมล็ดสามารถต้านแบคทีเรียได้หลายชนิดทั้งแบคทีเรียที่อยู่บนผิวหนัง ได้แก่ *S. aureus, S. epidermidis, S. haemolyticus, C. acnes* แบคทีเรียในช่องปาก ได้แก่ *S. mutans, L. acidophillus, P. gingivalis* และแบคทีเรียก่อโรคบริเวณช่องคลอด ได้แก่ *P. bivia, N. gonorrhoeae, A. vaginae* รวมถึงมีฤทธิ์ต้านรากลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ได้บางชนิด แต่ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไมโครแบคทีเรียที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการทดสอบ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บนผิวหนังของสารสกัดเนื้อผลสุกและเมล็ดของมะดะหลวงนี้น่าจะช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และลดการติดเชื้อบริเวณแผลเปิดที่ผิวหนังได้ ผลการทดสอบนี้จึงเป็นข้อมูลสนับสนุนสรรพคุณของมะดะหลวงสำหรับรักษาแผลและโรคผิวหนังอื่น ๆ ตามการแพทย์พื้นบ้านของอินเดีย[5] นอกจากนี้ ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเนื้อผลสุกและเมล็ดของมะดะหลวงมีฤทธิ์ดีในการต้านแบคทีเรียก่อโรคบริเวณช่องคลอด เช่น *P. bivia* และ *A. vaginae* ซึ่งทำให้เกิดช่องคลอดอักเสบจากเชื้อแบคทีเรีย (*Bacterial Vaginosis*)[20] และ *N. gonorrhoeae* แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคหนองใน ซึ่งเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่ทำให้เกิดภาวะอุ้งเชิงกรานอักเสบ (pelvic inflammatory disease)[21] อีกทั้งในความเข้มข้นของสารสกัดที่ MICs ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคบริเวณช่องคลอดดังกล่าวข้างต้นไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *L. gasseri* และ *L. crispatus* ซึ่งเป็นเชื้อ lactobacilli สำคัญที่พบในช่องคลอดผู้ที่มีสุขภาวะดีและทำหน้าที่ป้องกันการรุกรานของเชื้อก่อโรคชนิดอื่นที่บริเวณช่องคลอด[22]

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดมะดะหลวงต่อเซลล์ HaCaT เมื่อให้ระยะเวลาสัมผัสระหว่างสารทดสอบและเซลล์ (exposure period) นาน 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดเอทานอลจากส่วนใบและเนื้อผลสุกมีค่า IC_{50} มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการทดสอบ (100 μg/mL) โดยที่ความเข้มข้นดังกล่าวพบจำนวนเซลล์ HaCaT ที่มีชีวิตมีปริมาณเทียบเท่ากับจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม (%inhibition $\leq$ 0) (Figure 2) ส่วนสารสกัดเอทานอลจากเมล็ด มีค่า IC_{50} 91.25 μg/mL การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้ long exposure period (exposed for 24 hr or more) จะทำให้ได้ผลการทดสอบที่ถูกต้องสำหรับสารที่แสดงความเป็นพิษจำเพาะต่อการแบ่งเซลล์[23-24] ดังนั้นผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเอทานอลจากส่วนใบ และเนื้อผลสุกของมะดะหลวงแสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 100 μg/mL ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ อย่างไร

ก็ตาม ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับหลอดทดลอง (*in vitro* cytotoxicity test) เพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะระบุถึงระดับความเป็นพิษของสารทดสอบได้อย่างถูกต้องเช่นเดียวกับ *in vivo* acute toxicity เนื่องจากยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องด้วย เช่น ผลของเภสัชจลนศาสตร์ และความเป็นพิษที่จำเพาะต่ออวัยวะ[23]

การทดสอบความเป็นพิษต่อไรทะเล เป็นวิธีทดสอบที่ง่าย ทำได้รวดเร็ว และมีค่าใช้จ่ายต่ำ มีความสามารถในการทำซ้ำได้ รวมถึงให้ค่าผลการทดสอบ LC_{50} ที่สอดคล้องกับค่าผลการทดสอบ LD_{50} ของ oral acute toxicity ในหนูไมซ์ (ข้อมูลการทดสอบสารสกัดพืช 20 ชนิด, $r = 0.85$, $p < 0.05$)[25] การประเมินระดับความเป็นพิษต่อไรทะเลของสารสกัดพืชจากค่า LC_{50} อ้างอิงจากบทความวิจัยมีเกณฑ์การพิจารณาที่หลากหลาย เช่น เกณฑ์ในการพิจารณาผลของ Mayer และคณะ[26] กำหนดให้สารสกัดที่มีค่า $LC_{50} < 1,000$ μg/mL มีพิษ และ $LC_{50} > 1,000$ μg/mL ไม่มีพิษ เกณฑ์ในการพิจารณาผลของ Deciga-Campos และคณะ[27] กำหนดให้สารสกัดที่มีค่า $LC_{50} < 500$ μg/mL มีพิษ (toxic) $LC_{50} \geq 500$-$1,000$ μg/mL มีพิษอย่างอ่อน (weak toxicity) $LC_{50} > 1,000$ μg/mL ไม่มีพิษ (non-toxic) และเกณฑ์ในการพิจารณาผลของ Moshi และคณะ[28] กำหนดให้สารสกัดที่มีค่า $LC_{50} <$ 1.0 μg/mL มีพิษสูง (highly toxic) LC_{50} 1.0-10.0 μg/mL มีพิษ (toxic) LC_{50} 10.0-30.0 μg/mL มีพิษปานกลาง (moderately toxic) $LC_{50} >$ 30-100 μg/mL มีพิษเล็กน้อย (mildly toxic) และ $LC_{50} > 100$ μg/mL ไม่มีพิษ (non-toxic) ในการทดสอบความเป็นพิษต่อไรทะเลของสารสกัดมะดะหลวงใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายของสารสกัดสำหรับทดสอบเนื่องจากไรทะเลสามารถทนต่อ DMSO ได้สูงถึง 11%[19] และใช้ doxorubicin ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดสำหรับรักษามะเร็งเป็น positive control ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อไรทะเลของสารสกัดเอทานอลจากส่วนใบ เนื้อผลสุก และเมล็ดของมะดะหลวง มีค่า $LC_{50} < 1,000$ μg/mL โดยสารสกัดเนื้อผลสุกมี LC_{50} 985.67 μg/mL จัดเป็น weak toxicity ตามเกณฑ์ในการพิจารณาผลของ Deciga-Campos และคณะ[27] แต่จัดเป็น non-toxic ตามเกณฑ์ในการพิจารณาผลของ Moshi และคณะ[28] ส่วนสารสกัดใบและเมล็ดของมะดะหลวงมี $LC_{50} < 500$ μg/mL จัดเป็น toxic ตามเกณฑ์ในการพิจารณาผลของ Deciga-Campos และคณะ[27] แต่เมื่อพิจารณาผลตามเกณฑ์ของ Moshi และคณะ[28] สารสกัดใบจัดเป็น non-toxic และสารสกัดเมล็ดจัดเป็น mildly toxic ในขณะที่ doxorubicin จัดเป็น moderately toxic

สารสกัดจากส่วนใบ เนื้อผลสุก และเมล็ดของมะดะหลวงมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพได้ดีต่อทั้ง แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ไมโคแบคทีเรีย และรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดจากเนื้อผลสุกและเมล็ดแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณผิวหนังได้ดี สอดคล้องกับการใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์พื้นบ้านของชนพื้นถิ่นดั้งเดิมในอินเดียที่ใช้ผลมะดะหลวงสำหรับรักษาโรคผิวหนัง และรักษาแผล[5] สารสกัดจากเนื้อผลสุกและเมล็ดแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ช่องคลอดได้ดี แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ lactobacilli ที่พบในช่องคลอด การศึกษาความเป็นพิษพบว่าสารสกัดเมล็ดของมะดะหลวงมีพิษปานกลาง ในขณะที่สารสกัดเนื้อผลสุกมีพิษต่ำหรือไม่มีพิษ นอกจากนี้ รายงานการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการชี้ให้เห็นว่าผลมะดะหลวงอุดมไปด้วย

วิตามินและแร่ธาตุ[5-6] ดังนั้นมะดะหลวงจึงนับเป็นไม้ผลที่มีประโยชน์สำหรับการบริโภคเพื่อสุขภาพ ควรมีการส่งเสริมการเพาะปลูกและการบริโภคให้แพร่หลายต่อไปในอนาคต

ข้อสรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามะดะหลวงมีฤทธิ์ดีในการต้านจุลชีพหลากหลายชนิด โดยสารสกัดในส่วนของใบมีฤทธิ์ต้านเชื้อไมโคแบคทีเรีย และในส่วนของสารสกัดเนื้อผลสุกและเมล็ดสามารถต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุ (cariogenic bacteria) ได้แก่ *S. mutans, L. acidophillus* และ *P. gingivalis* ได้ดี นอกจากนี้ สารสกัดจากทั้งส่วนของเนื้อผลสุกและเมล็ดยังมีฤทธิ์ดีในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่อยู่บนผิวหนังและแบคทีเรียก่อโรคบริเวณช่องคลอด โดยสารสกัดเนื้อผลสุกแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *N. gonorrhoeae* และ *A. vaginae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคหนองในและช่องคลอดอักเสบ ที่ MICs ≤ 50 μg/mL แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *L. gasseri* และ *L. crispatus* (MICs > 400 μg/mL) ซึ่งเป็นเชื้อ Lactobacilli สำคัญที่พบในช่องคลอดผู้ที่มีสุขภาวะดี และผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเนื้อผลมะดะหลวงแสดงให้เห็นว่าสารสกัดมีความเป็นพิษต่ำ ดังนั้นมะดะหลวงจึงนับเป็นไม้ผลที่มีศักยภาพสำหรับไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านส่งเสริมการบริโภค หรือนำไปวิจัยต่อยอดเพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีผลในการต้านจุลชีพสำหรับดูแลสุขภาพได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

References

1. Smitinand T. Thai Plant Names. 2nd ed (revised edition). Bangkok: Prachachon Ltd.; 2001. (in Thai)
2. Gardner S, Sidisunthorn P, Chayamarit K, Utteridge T. Forest trees of Southern Thailand. Bangkok: Kobfai Publishing Project.; 2015.
3. Hooker JD. Flora of British India. Kent: L. Reeve & Co. LTD.; 1875.
4. Xiwen L, Jie L. Stevens PF. 8. GARCINIA Linnaeus, Sp. P1. 1: 443. 1753. [Internet]. Flora of China; 2007 [cited 2023 Jun 30]. Available from: http://flora.huh.harvard.edu/china/PDF/PDF13 /Garcinia.pdf
5. Murmu P, Kumar S, Patra JK, Singh NR, Rath SK. Ethnobotanical, nutritional, phytochemical and antimicrobial studies of *Garcinia xanthochymus* fruit extracts. Br Biotechnol J. 2016;13(2):1-11.
6. Prakash J, Sallaram S, Martin A, Veeranna RP, Peddha MS. Phytochemical and functional characterization of different part of the *Garcinia xanthochymus* fruit. ACS Omega 2022;7(24):21172-82.
7. PaL SC, Nirmal SA, Borhade PS, Pawae C, Kshirsagar S, Atpade S. Anti-inflammatory activity of various extracts of leaves of *Garcinia xanthochymus*. Indian J Pharm Sci. 2005;67(3):394-5.
8. Zhong FF, Chen Y, Yang GZ. Chemical constituents from the bark of *Garcinia xanthochymus* and their 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activities. Helv Chim Acta. 2008;91(9):1695-403.
9. Chen Y, Fan H, Yang GZ, Jiang Y, Zhong FF, He HW. Prenylated xanthones from the bark of *Garcinia xanthochymus* and their 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical -scavenging activities. Molecules. 2010;15(10):7438-49.
10. Baggett S, Protiva P, Mazzola EP, Yang H, Ressler ET, Basile MJ, et al. Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* Fruits. J Nat Prod. 2005;68(3):354-60.
11. Payamalle S, Joseph KS, Bijjaragi SC, Aware C, Jadhav JP, Murthy HN. Anti -diabetic activity of *Garcinia xanthochymus* seeds. Comp Clin Pathol. 2017;26(2):437-46.
12. Manohar SH, Naik PM, Patil LM, Karikatti SI, Murthy HN. Chemical composition of *Garcinia xanthochymus* seeds, seed oil, and evaluation of its antimicrobial and antioxidant activity. J Herbs Spices Med. 2014;20(2):148-55.
13. Lyles JT, Negrin A, Khan S, He K, Kennelly EJ. *In vitro*

antiplasmodial activity of benzophenones and xanthones from edible fruits of Garcinia species. Planta Med. 2014;80(8-9):676-81.

14. European committee for antimicrobial susceptibility testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. Clin Microbiol Infect. 2003;9(8):1-7.
15. Caviedes L, Delgado J, Gilman RH. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. J clin Microbiol. 2002;40(5):1873-4.
16. The National Committee for Clinical and Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard-Second edition. NCCLS document M27-A2. Wayne, PA: NCCLS; 2002.
17. The Clinical and Laboratory Standard Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard-Second edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: CLSI; 2008.
18. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell viability. The Assay Guide Manual [Internet]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2016 [cited 2021 Oct 21]. Available from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/pdf/Bookshelf_NBK144065.pdf
19. Hamidi MR, Jovanova B, Panovska TK. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. Maced Pharm Bull. 2014;60(1):9-18.
20. Muzny CA, Laniewski P, Schwebke JR, Herbst-Kralovetz MM. Host-vaginal microbiota interactions in the pathogenesis of bacterial vaginosis. Curr Opin Infect Dis. 2020;33(1):59-65.
21. Bash MC, Connelly M, Marrazzo J, Bloom A. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria gonorrhoeae* infection. [Internet]. Wolters Kluwer; 2023 May [cited 2023 Jul 18]; [1 page]. Available from: https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-and-pathogenesis-of-neisseria-gonorrhoeae-infection#H21428802
22. Chee WJY, Chew SY, Than LTL. Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health. Micorb Cell Fact. 2020;19(1):203. https://doi.org/10.1186/s12934-020-01464-4
23. Garle MJ, Fentem JH, Fry JR. *In vitro* cytotoxicity test for the prediction of acute toxicity in vivo. Toxic In Vitro. 1994;8(6):1302-12.
24. Riddell RJ, Panacer DS, Wilde SM, Clothier RH, Balls M. The importance of exposure period and cell type in *in vitro* cytotoxicity test. Altern Lab Anim. 1986;14(2):86-92.
25. Parra AL, Yhebra SY, Sardinas GI, Buela LI Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. Phytomed. 2001;8(5):395-400.
26. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen DE, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med. 1982;45(5):31-4.
27. Deciga-Campos M, Rivero-CruZ I, Arriaga-Alba M, Castaneda-Corral G, Angeles-Lopez GE, Navarrete A, et al. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. J Ethnopharmacol. 2007;110(2):334-42.
28. Moshi MJ, Innocent E, Magadula JJ, Otieno DF, Weisheit PK, Mbabazi PK, Nondo RSO. Brine shrimp toxicity of some plants used as traditional medicines in Kagera Region, north western Tanzania. Tanzan J Health Res. 2010;12(1);63-7.