

ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่ง (*Lawsonia inermis*)
ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากโรคเต้านมอักเสบในโคนม

Antimicrobial Activities of Crude Extract from Henna (*Lawsonia inermis*)
Leaves on Bacteria Isolated from Mastitis in Dairy Cattle

รัตน์ีย์ ทองทา* เสาวลักษณ์ พาดัวง
Rattane Thongtha* Saowaluck Paduang

Abstract

Backgrounds: Henna (*Lawsonia inermis*) is one of Thai herbal plants which can be easily found and its leaves have ability to inhibit both bacteria and fungi. There is currently no research using Henna leaves crude extract to inhibit bacteria that cause mastitis in dairy cattle resulting in major economic losses. Therefore, the objective of this experiment is to study the antimicrobial activities of crude extract from Henna (*Lawsonia inermis*) leaves on bacteria isolated from mastitis in dairy cattle.

Methods: Fresh Henna leaves were dried in sunlight. Dried leaves were grinded into powder. Extraction of the powder was performed by using 95% ethanol in the ratio 1:5 w/v. The crude extract was heated to evaporate its liquid content until a dark brown viscous mass occurred (Henna crude extracts) and weighed to calculate the percentage yield. Henna crude extracts were then investigated for their antimicrobial activities on *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 by agar well diffusion method. One hundred and forty-seven bacterial isolated from mastitis in dairy cattle were tested by the same method and the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) values were determined by broth microdilution assay.

Results: The yield of the crude extract was 2% of the dry weight of Henna. The antimicrobial activities on *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 were found to inhibit. The average inhibition zone of *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci (CNS), *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. and *Klebsiella* spp. were 16.66 ± 2.33 , 14.61 ± 1.29 , 15.00 ± 2.36 , 24.60 ± 2.64 , 23.48 ± 3.92 , 15.91 ± 2.76 , 15.25 ± 0.50 , 16.20 ± 1.92 and 15.30 ± 1.30 mm, respectively. While the MIC of these bacteria were 256-512, 64-256, 32-512, 32-128, 16-128, 128-256, 64-128, 128-256 and 128-512 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

Conclusions: The results indicated that Henna crude extracts can inhibit the growth of all bacteria used in this study. This Information can be useful to develop herbal products used to inhibit the bacteria that cause mastitis in dairy cattles.

Keywords: Mastitis, Dairy cattle, Henna crude extracts, Antimicrobial

ศูนย์ทดสอบและวิจัยคุณภาพชีววัตถุสำหรับสัตว์ 1212 หมู่ 11 ต.ปากช่อง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

* ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 0-4427-9948 โทรสาร 0-4431-3298, e-mail: ratt_chan@hotmail.com

Veterinary Biologics Assay and Research Center 1212 Moo.11 Pakchong, Nakhonratchasima 30130

* Corresponding author: Tel. 0-4427-9948, Fax. 0-4431-3298, e-mail: ratt_chan@hotmail.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: เทียนกิ่ง (*Lawsonia inermis*) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่หาได้ง่ายและมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่นำสารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่งมาใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ ซึ่งเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมเลี้ยงโคนม การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่งในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากโรคเต้านมอักเสบในโคนม

วิธีการ: นำใบสดเทียนกิ่งมาตากแห้ง บดเป็นผงละเอียด สกัดสารจากผงใบเทียนกิ่ง โดยใช้ 95% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:5 ระเหยตัวสกัดออกด้วยความร้อนจนได้สารลักษณะเหนียวข้นสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งน้ำหนักหยาบของสารสกัดหยาบ ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่งกับเชื้อแบคทีเรียอ้างอิงมาตรฐาน *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 โดยวิธี agar well diffusion จากนั้นนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำนมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ จำนวน 147 isolates ด้วยวิธีเดียวกันและหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (MIC) ด้วยวิธี broth microdilution

ผล: ได้ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่งเท่ากับ 2% ของน้ำหนักแห้ง นำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียอ้างอิงมาตรฐาน *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 พบว่ามีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากโรคเต้านมอักเสบในโคนม พบว่าสารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่งมีฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อ *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci (CNS), *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. และ *Klebsiella* spp. ได้ทั้งหมด โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 16.66 ± 2.33 , 14.61 ± 1.29 , 15.00 ± 2.36 ,

24.60 ± 2.64 , 23.48 ± 3.92 , 15.91 ± 2.76 , 15.25 ± 0.50 , 16.20 ± 1.92 และ 15.30 ± 1.30 mm ตามลำดับ เมื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (MIC) โดยวิธี broth microdilution พบว่ามีค่า MIC ต่อเชื้อดังกล่าวอยู่ในช่วง 256-512, 64-256, 32-512, 32-128, 16-128, 128-256, 64-128, 128-256 และ 128-512 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

สรุป: จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งเชื้ออ้างอิงมาตรฐานและเชื้อกลุ่มที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนม ข้อมูลนี้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในโคนมต่อไป

คำสำคัญ: โรคเต้านมอักเสบ, โคนม, สารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่ง, การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

บทนำ

เทียนกิ่ง (*Lawsonia inermis*) หรือที่รู้จักกันในชื่อเฮนนา (Henna) (Gupta, 2003) เป็นพืชในวงศ์ Lythraceae มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย ศรีลังกา และตะวันออกกลาง (Sharma *et al.*, 2016) โดยจัดเป็นไม้พุ่มกึ่งเลื้อยขนาดกลาง มีความสูงของต้นประมาณ 3-6 เมตร ลำต้นแตกกิ่งก้านเป็นพุ่มกว้าง ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด เจริญเติบโตได้เร็ว ขึ้นได้ดีในดินทุกชนิดที่มีความชื้นต่ำถึงปานกลาง และชอบแสงแดดแบบเต็มวัน (วิทย์, 2542) ในประเทศไทยยังไม่พบแหล่งการปลูก แต่มีการเพาะพันธุ์ขายตามร้านขายพันธุ์ไม้ ใบเทียนกิ่งมีสารประกอบสำคัญได้แก่ Naphthoquinone (Lawson) ซึ่งเป็นสารที่มีความปลอดภัยสูง ไม่มีความเป็นพิษกับคน (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2539) จึงนิยมนำมาใช้อย่างกว้างขวางในวงการเครื่องสำอาง เช่น การทำยาย้อมผม การเขียนลายตามผิวหน้า ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

(Uddin *et al.*, 2013) มีรายงานการนำสารสกัดจากใบเทียนกิ่งมาใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค เช่น การศึกษาของ Kathem *et al.* (2008) พบว่าสารสกัดจากใบเทียนกิ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci (CNS), β -hemolytic streptococci และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคผิวหนัง จากการศึกษาของวิทย์ (2542) พบว่าการสกัดใบเทียนกิ่งสดด้วยแอลกอฮอล์จะได้สารที่เรียกว่า Lawsone ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1,000 $\mu\text{g/ml}$ สามารถใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราหรือเชื้อโรคได้หลายประเภท เช่น *Brucella* spp., *Escherichia coli*, *Micrococcus pyogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. แต่สารนี้ไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *Candida albicans* และเชื้อ *P. aeruginosa* นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Gull *et al.* (2013) พบว่าสารในกลุ่ม Naphthoquinone ซึ่งมีสาร Lawsone เป็นองค์ประกอบหลักมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, และ *S. epidermidis* และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli*, *S. Typhi*, *Klebsiella* spp. และ *Shigella sonnei*

โรคเต้านมอักเสบ (Mastitis) เป็นโรคที่ทำให้ผนังของท่อนมและเซลล์ผลิตน้ำนมเสียหาย ส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพน้ำนมลดลง (Bhushan, 2000; Guimaraes *et al.*, 2017) สร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมเป็นอย่างมาก จากการศึกษาทางระบาดวิทยาของโรคเต้านมอักเสบในประเทศไทยของ Leelahapongsathon *et al.* (2014) พบว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบที่เป็นปัญหาหลัก ได้แก่ เชื้อ *Streptococcus agalactiae* (7.1%), *S. uberis* (9.4%), *S. dysgalactiae* (4.0%) และ *Streptococcus* spp. (16.7%) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *S. aureus*, CNS และ *E. coli* เป็นสาเหตุของการเกิดโรคได้ (Bradley *et al.*, 2007) การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับในการรักษา อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะก่อให้เกิดปัญหาการตกค้างในน้ำนมและการดื้อยาของเชื้อ ปัจจุบันยังไม่พบงานวิจัยที่นำสารสกัดจากใบเทียนกิ่งมาใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านม

อักเสบในโคนม การวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเทียนกิ่งในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากโรคเต้านมอักเสบในโคนม ซึ่งข้อมูลนี้จะเป็นประโยชน์และเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ใช้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนมได้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมสารสกัดจากใบเทียนกิ่ง

เตรียมสารสกัดจากใบเทียนกิ่ง ด้วยวิธีสกัดที่ดัดแปลงจาก Kathem *et al.* (2008) โดยนำใบเทียนกิ่งสดที่ได้จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก จ.ราชบุรี ตากแดดให้แห้ง บดเป็นผงละเอียด นำมาสกัดด้วย 95% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:5 โดยชั่งผงใบเทียนกิ่ง 50 กรัม ผสมกับ 95% เอทานอล ปริมาตร 250 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสารละลาย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสมารองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1 แล้วระเหย 95% เอทานอล ออกด้วยความร้อน โดยวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 °C จนได้สารสกัดหยาบ นำไปชั่งน้ำหนัก เพื่อหา % yield จากสูตร น้ำหนักของสารสกัดหยาบหารด้วยน้ำหนักแห้งของใบเทียนกิ่งที่ใช้สกัดแล้วคูณด้วย 100 จากนั้นเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/ml}$ โดยชั่งสารสกัดหยาบ 0.1 กรัม ใส่ลงในขวด วัดปริมาตรขนาด 50 ml ละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร ผสมให้เข้ากันเก็บใส่ขวดแก้วสีชา แช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C ไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 1 เดือน เพื่อร่นำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเชื้อทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียอ้างอิงมาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 29213 รวมทั้งเชื้อที่แยกได้จากน้ำนมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ในพื้นที่เขต 7 ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2561 จำนวน 147 isolates ได้แก่เชื้อ *S. uberis* 25 isolates, *S. agalactiae* 9 isolates, *Streptococcus* spp. 38 isolates, *S. aureus* 20 isolates, CNS 30 isolates, *E. coli* 11 isolates, *Pseudomonas* spp. 4 isolates,

Aeromonas spp. 5 isolates และ *Klebsiella* spp. 5 isolates โดยนำเชื้อทั้งหมดจากตู้แช่แข็ง -20 °C ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อกลุ่ม Streptococci นำมาเพาะลงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB)+5% Laked horse blood (Oxoid, England) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมา streak ลงบนอาหาร Blood Agar (Oxoid, England) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดโคโลนีเดี่ยว ส่วนเชื้อกลุ่มอื่น ๆ นำมาเพาะลงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) (Oxoid, England) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมา streak ลงบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) (Oxoid, England) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดโคโลนีเดี่ยว สำหรับนำไปทดสอบต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบเตียนกึ่งในการยับยั้งเชื้อ

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบเตียนกึ่งในการยับยั้งเชื้อ ด้วยวิธี Agar well diffusion ดัดแปลงจากวิธีของ ปิยนุช และคณะ (2016) กับเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 29213 เตรียมเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ Mcfarland No. 0.5 หรือ ประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml โดยใช้ 0.85% normal saline solution (NSS) ในการเจือจาง โดยใช้ไม้พันสำลี (cotton swab) ชุบเชื้อป้ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (Oxoid, England) กระจายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Three dimension swab ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที ให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย Sterile cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm จานละ 2 หลุม ปิเปิดสารสกัดหยาบใบเตียนกึ่ง ปริมาตร 40 μ l ลงในหลุมที่เจาะไว้ ใช้แผ่น Gentamicin (CN) 10 μ g และ Ampicillin (AMP) 10 μ g เพื่อเป็นตัวควบคุมคุณภาพการทดสอบเท่านั้น (ศุภรัตน์ และคณะ, 2550) จากนั้นทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากโรคเต้านมอักเสบในโคนม โดยป้ายเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Streptococci ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood Agar (Oxoid, England) ส่วนเชื้อ *Staphylococcus* spp., *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. และ

Klebsiella spp. ป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (Oxoid, England) เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อ จานละ 3 หลุม แล้วปิเปิดสารละลายของสารสกัดหยาบใบเตียนกึ่ง ปริมาตร 40 μ l ลงในหลุม 2 หลุม และอีกหนึ่งหลุมใช้ 95% เอทานอล เป็น negative control (สุทธิจิต, 2019) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ SD)

หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบเตียนกึ่งที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

หาค่า MIC ด้วยวิธี broth microdilution ตามมาตรฐาน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016) ใน 96 microwell plates ที่ระดับความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 และ 512 μ g/ml จากความเข้มข้นของสารสกัดหยาบใบเตียนกึ่ง 2,000 μ g/ml โดยเติมเชื้อแต่ละชนิดที่ปรับความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^6 CFU/ml ลงในแต่ละหลุมปริมาตร 10 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละหลุมในเพลท

ผลและวิจารณ์

ผงจากใบเตียนกึ่งแห้งที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:5 จะได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะเหนียวข้นสีน้ำตาลเข้ม น้ำหนักผลผลิต (%yield) เท่ากับ 2% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Al-Daamy *et al.* (2016) ที่พบว่าการสกัดใบเตียนกึ่งแห้งด้วย 70% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:5 ให้ %yield เท่ากับ 2% เช่นเดียวกัน และการศึกษาของ นุสวดีและสมใจ (2010) พบว่าการใช้ 95% เอทานอลมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสกัดสารออกจากพืชสมุนไพร และไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อเมื่อใช้เป็น negative control จากตารางที่ 1 เมื่อนำสารสกัดหยาบไปทดสอบประสิทธิภาพในการ

ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Agar well diffusion กับเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922 พบเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 16.00 ± 0.00 mm ควบคุมคุณภาพการทดสอบด้วย CN 10 μg และ Amp 10 μg พบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 18.00 ± 0.00 และ 19.00 ± 0.00 mm ตามลำดับ เมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 พบเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 20.00 ± 0.00 mm ทดสอบกับ CN 10 μg และ AMP 10 μg พบเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 21.00 ± 0.00 และ 34.00 ± 0.00 mm ตามลำดับ (รูปที่ 1 และ 2) ซึ่งตามเกณฑ์การควบคุมคุณภาพของ CLSI (2016) เมื่อทดสอบด้วย CN 10 μg และ AMP 10 μg สำหรับ ATCC 25922 จะต้องมีย่านผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง ที่ 19-26 mm และ 16-22 mm ส่วน ATCC 29213 จะอยู่ที่ 19-27 mm และ 27-35 mm ตามลำดับจากผลการทดสอบพบว่า การควบคุมคุณภาพของเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน ATCC 29213 อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดส่วน ATCC 25922 เฉพาะที่ทดสอบด้วย CN 10 μg ให้ค่าต่ำกว่าเกณฑ์เล็กน้อย อย่างไรก็ตามการทดสอบนี้เป็นเพียงการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเบื้องต้นว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อหรือไม่ ซึ่งพบว่ามีย่านยับยั้งเกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สามารถนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากนํานมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบได้ และเพื่อพิสูจน์ว่าสารสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้จริงจึงต้องนำไปหาค่า MIC ในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่งในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากนํานมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ด้วยวิธี Agar well diffusion จากตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดหยาบใบเทียนกิ่งความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. uberis*, *S. agalactiae*, *Streptococcus* spp., *S. aureus*, CNS, *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. และ *Klebsiella* spp. ได้ทุกตัวอย่าง โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 16.66 ± 2.33 , 14.61 ± 1.29 , 15.00 ± 2.36 , 24.60 ± 2.64 , 23.48 ± 3.92 , 15.91 ± 2.76 , 15.25 ± 0.50 , 16.20 ± 1.92 และ 15.30 ± 1.30 mm ตามลำดับ และการใช้ 95% เอทานอล เป็น negative

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่งต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอ้างอิงมาตรฐาน โดยวิธี Agar well diffusion เมื่อทดสอบสารสกัดหยาบใบเทียนกิ่ง 2,000 $\mu\text{g/ml}$, CN 10 μg และ AMP 10 μg

เชื้อแบคทีเรียอ้างอิงมาตรฐาน	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; mm)		
	สารสกัดหยาบใบเทียนกิ่ง	CN 10 μg	AMP 10 μg
<i>E. coli</i> ATCC 25922	16.00 ± 0.00	18.00 ± 0.00	19.00 ± 0.00
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	20.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00	34.00 ± 0.00

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่งต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่แยกได้จากนํานมโคที่เป็น

เชื้อแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; mm)	
	สารสกัดหยาบใบเทียนกิ่ง	95% เอทานอล
<i>S. uberis</i> (n=25)	16.66 ± 2.33	NI
<i>S. agalactiae</i> (n=9)	14.61 ± 1.29	NI
<i>Streptococcus</i> spp. (n=38)	15.00 ± 2.36	NI
<i>S. aureus</i> (n=20)	24.60 ± 2.64	NI
CNS (n=30)	23.48 ± 3.92	NI
<i>E. coli</i> (n=11)	15.91 ± 2.76	NI
<i>Pseudomonas</i> spp. (n=4)	15.25 ± 0.50	NI
<i>Aeromonas</i> spp. (n=5)	16.20 ± 1.92	NI
<i>Klebsiella</i> spp. (n=5)	15.30 ± 1.30	NI

หมายเหตุ: n = จำนวนตัวอย่าง, NI = No inhibition zone

control ไม่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (ภาพที่ 3-8) แสดงว่าสารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nivetha and Vetha (2019) ที่พบว่าสารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่งที่ความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. sonnei*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *P. mirabilis*, *Enterococcus* spp. และ *S. aureus* ได้ โดยวิธี Agar well diffusion นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Gull et al. (2013) รายงานว่าสารสกัดจากใบเทียนกิ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *S. epidermidis* และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli*, *S. Typhi*, *Klebsiella* spp. และ *Shigella* โดยวิธี disc diffusion และมีการศึกษาของ Ponugoti

(2017) รายงานว่าสารสกัดจากใบเตียนกึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa* โดยวิธี broth microdilution ซึ่งการศึกษาทั้งสองนี้ แม้เป็นการศึกษาถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ต่างวิธีกัน แต่ก็เป็นการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเตียนกึ่งในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ทำการศึกษาดังกล่าว

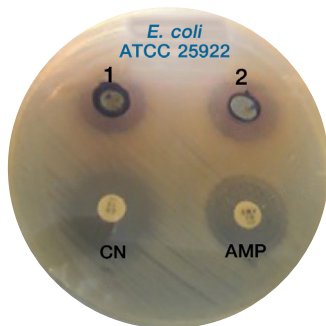
การหาค่า MIC โดยวิธี broth microdilution พบว่ามีค่า MIC ของเชื้อ *S. uberis*, *S. agalactiae*, *Streptococcus* spp., *S. aureus*, CNS, *E. coli*, *Pseudomonas* spp., และ *Aeromonas* spp. อยู่ในช่วงระหว่าง 256-512, 64-256, 32-512, 32-128, 16-128, 128-256, 64-128 และ 128-256 µg/ml ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Klebsiella* spp. พบค่า MIC ที่ 128 และ 512 µg/ml (ตารางที่ 3) ซึ่งไม่มีเชื้อถูกยับยั้งที่ 256 µg/ml ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อที่ใช้ทดสอบเป็นเชื้อที่ต่าง isolates กัน คุณสมบัติในการถูกยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จึงแตกต่างกัน หรืออาจเกิดจากตัวอย่างเชื้อที่ใช้ทดสอบมีจำนวนน้อย ทำให้ไม่มีเชื้อที่ถูกยับยั้งที่ค่า MIC ดังกล่าว ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่ามีค่า MIC ต่อเชื้อ CNS ต่ำที่สุด อยู่ในช่วง 16-128 µg/ml และมีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. uberis* สูงที่สุด อยู่ในช่วง 256-512 µg/ml ทั้งนี้ค่า MIC ที่ได้ค่อนข้างสูง เนื่องจากเป็นสารสกัดหยาบที่ยังไม่ได้แยกสารที่ออกฤทธิ์ให้มีความบริสุทธิ์ และเชื้อที่ใช้ทดสอบเป็นเชื้อที่แยกได้จากโรคเต้านมอักเสบในโคนม ซึ่งจากการศึกษาของ Suriyasathaporn (2011) พบว่าเชื้อแยกได้จากโรคเต้านมอักเสบ เริ่มคือต่อยาปฏิชีวนะ เนื่องจากผลของการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาเป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้ยังพบการศึกษาของ Kathem *et al.* (2008) พบว่าการสกัดใบเตียนกึ่งแห้งด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคผิวหนัง โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อ β -hemolytic streptococci (n=5) อยู่ในช่วง 0.125-0.150 µg/ml, CNS (n=5) อยู่ในช่วง 0.125-0.175 µg/ml, *S. aureus* (n=5) และ *P. aeruginosa* (n=5) มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.500-0.570 µg/ml ซึ่งการศึกษาได้ค่า MIC ที่แตกต่าง

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ โดยวิธี broth microdilution

แบคทีเรีย	ค่า MIC (µg/ml)					
	16	32	64	128	256	512
<i>S. uberis</i> (n=25)	-	-	-	-	24 (96.00%)	1 (4.00%)
<i>S. agalactiae</i> (n=9)	-	-	5 (55.56%)	1 (11.11%)	3 (33.33%)	-
<i>Streptococcus</i> spp. (n=38)	-	5 (13.16%)	3 (7.90%)	2 (5.26%)	27 (71.05%)	1 (2.63%)
<i>S. aureus</i> (n=20)	-	5 (25.00%)	12 (60.00%)	3 (15.00%)	-	-
CNS (n=30)	2 (6.67%)	6 (20.00%)	11 (36.67%)	11 (36.76%)	-	-
<i>E. coli</i> (n=11)	-	-	-	7 (63.64%)	4 (36.36%)	-
<i>Pseudomonas</i> spp. (n=4)	-	-	3 (75.00%)	1 (25.00%)	-	-
<i>Aeromonas</i> spp. (n=5)	-	-	-	3 (60.00%)	2 (40.00%)	-
<i>Klebsiella</i> spp. (n=5)	-	-	-	3 (60.00%)	-	2 (40.00%)

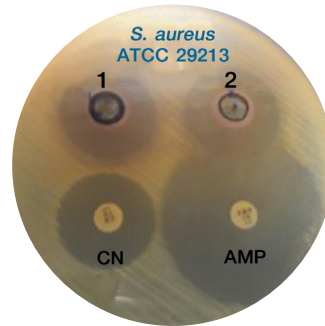
หมายเหตุ: n = จำนวนตัวอย่าง, - = ไม่มีเชื้อที่ถูกยับยั้ง

กับการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากเชื้อที่ใช้ทดสอบเป็นเชื้อที่แยกได้จากแหล่งที่มาต่างกัน ทำให้คุณสมบัติของเชื้อที่ใช้ทดสอบมีความแตกต่างกันด้วย อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาสารสกัดหยาบจากใบเตียนกึ่งครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าใบเตียนกึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนม ทั้งนี้เนื่องจากในส่วนของใบเตียนกึ่งจะมีสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก เรียกว่า Lawsone (2-hydroxy-1, 4-naphthoquinone) อยู่ประมาณ 0.5-1.5% (Chaudhary *et al.*, 2010) และมีสารอื่น ๆ ได้แก่ mannite, tannic acid, mucilage และ gallic acid รวมกันในรูปของสารผสม ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ โดยอาศัยกลไกของไฮดรอกซิลอิสระจำนวนมากเข้าไปรวมตัวกับคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เอนไซม์ของเชื้อถูกยับยั้งการทำงาน เชื้อจึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Mastanaiah *et al.*, 2011) ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จึงมีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ หรือศึกษาพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ใช้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนมได้



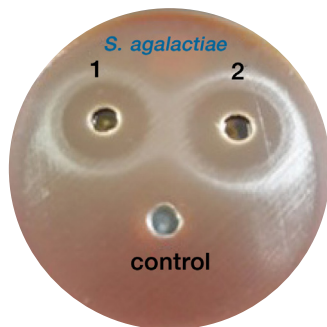
รูปที่ 1 Inhibition zone ของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922

หมายเหตุ: 1-2 = สารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่ง, CN = Gentamicin 10 µg, AMP = Ampicillin 10 µg



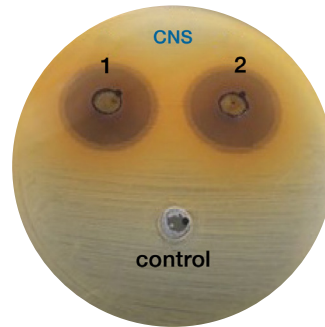
รูปที่ 2 Inhibition zone ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213

หมายเหตุ: 1-2 = สารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่ง, CN = Gentamicin 10 µg, AMP = Ampicillin 10 µg



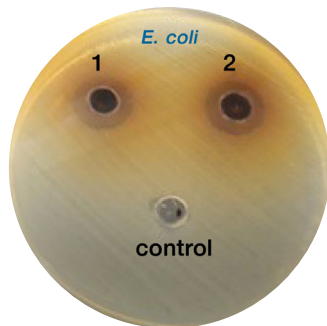
รูปที่ 3 Inhibition zone ของเชื้อ *S. agalactiae*

หมายเหตุ: 1-2 = สารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่ง, control = 95% เอทานอล



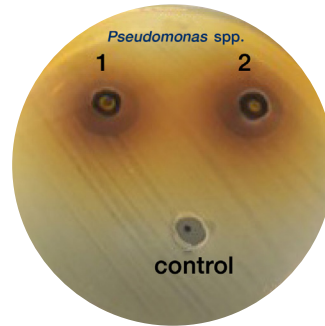
รูปที่ 4 Inhibition zone ของเชื้อ CNS

หมายเหตุ: 1-2 = สารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่ง, control = 95% เอทานอล



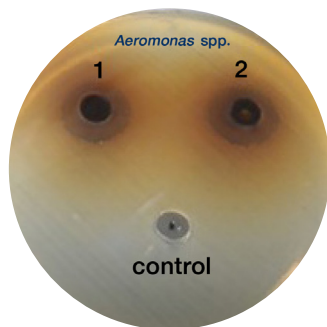
รูปที่ 5 Inhibition zone ของเชื้อ *E. coli*

หมายเหตุ: 1-2 = สารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่ง, control = 95% เอทานอล



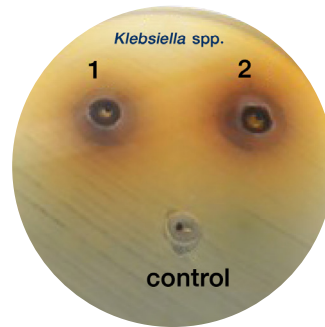
รูปที่ 6 Inhibition zone ของเชื้อ *Pseudomonas* spp.

หมายเหตุ: 1-2 = สารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่ง, control = 95% เอทานอล



รูปที่ 7 Inhibition zone ของเชื้อ *Aeromonas* spp.

หมายเหตุ: 1-2 = สารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่ง, control = 95% เอทานอล



รูปที่ 8 Inhibition zone ของเชื้อ *Klebsiella* spp.

หมายเหตุ: 1-2 = สารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่ง, control = 95% เอทานอล

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากใบเทียนกิ่งในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้านมโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบที่ยังไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ผลการศึกษาพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ทั้งเชื้ออ้างอิงมาตรฐานและเชื้อกลุ่มที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเต้านมอักเสบ แสดงให้เห็นว่าในสารสกัดหยาบมีสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพของสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ โดยแยกสารออกฤทธิ์ให้บริสุทธิ์ เพื่อเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น สเปรย์ฉีด ผลิตภัณฑ์จุ่มเต้า ซึ่งเกษตรกรจะสามารถนำไปใช้ได้ง่ายและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณเพชรรัตน์ เปี่ยมสุขสานต์ งานแบคทีเรียและเชื้อรา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันตก ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการดำเนินงานการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2539. หนังสือสมุนไพรสวนสิริรุกชาติ. หน้า 132. กรุงเทพฯ.
- นุสวดี พจนานุกิจ และ สมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม. 2010. เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุดขมิ้นชัน และใบบัวบก. *Naresuan University Journal*. 1-8(1): 1-9.
- ปิยนุช พรหมภมร และ นกัสนร์ ราชรินทร์. 2016. การประเมินฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและการพัฒนาตำรับเจลจากสารสกัดสมอไทย. *SDU Res. J.* 9(1): 51-63.
- วิทย์ เทียงบุญธรรม. 2542. หนังสือพจนานุกรมสมุนไพรไทย “เทียนกิ่ง”. พิมพ์ครั้งที่ 5. หน้า 380-382. กรุงเทพฯ รวมสาส์น.

- ศุภรัตน์ บุญยยาตรา จุฬานี ธาบุญเป็ง ขวัญชัย เครือสุคนธ์ และ วิทยา สุริยาสาพร. 2550. การต่อต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียที่สัมพันธ์กับเต้านมอักเสบในแม่โครีดนมในเขตจังหวัดเชียงใหม่. *เชียงใหม่สัตวแพทยสาร*. 5(2): 135-145.
- สุทธิจิต ศรีวัชรกุล. 2019. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพลูคาว. *Walailak Procedia* 2019. (3): ST.204.
- Al-Daamy, A.A.K., Hassan, A.A., Mahmooda, A. 2016. Study of antibacterial activity of *Lawsonia inermis* leaf extract. *J. Contemp. Med. Sci.* 2(7): 103-106.
- Bhushan, J. 2000. Bovine Mastitis. Department of Veterinary Science, Pennsylvania State University, USA.
- Bradley, A.J., Leach, K.A., Breen, J.E., Green, L.E. and Green, M.J. 2007. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet. Rec.* 160: 253-258.
- Chaudhary, G., Goyal, S. and Poonia, P. 2010. *Lawsonia inermis* Linnaeus: A phytopharmacological review. *Int. J. Pharm. Sci. Drug.* 2 (2): 91-98.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. Method for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. 3rd edition, CLSI guideline M45. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.
- Guimaraes, J.L.B., Brito, M.A.V.P., Lange, C.C., Silva, M.R., Ribeiro, J.B., Mendonca, L.C., Mendonca, J.F.M. and Souza, G.N. 2017. Estimate of the economic impact of mastitis: a case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. *Prev. Vet. Med.* 142: 46-50.
- Gull, R., Sohail, M., Aslam, M.S. and Athar, M.A. 2013. Phytochemical, toxicological and antimicrobial evaluation of *Lawsonia inermis* extracts against clinical isolates of pathogenic bacteria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 12 (36): 2-6.
- Gupta, A.K. 2003. Quality standards of Indian medicinal plants. Indian Council of Medical Research. 1: 123-129.
- Kathem, K.A., Nawres, N.J., Al-Mhaawe, B.H. and Laith K.A. 2008. Antimicrobial Efficacy of Henna Extracts. *Oman Med. J.* 23 (4): 253-256.
- Leelahapongsathon, K., Schukken and Y.H. Suriyasa-thaporn, W. 2014. Quarter, cow, and farm risk factors for intramammary infections with major pathogens relative to minor pathogens in Thai dairy cows. *Trop. Anim. Health Prod.* 46: 1067-1078.

- Mastanaiah, J., Prabhavathi, N.B. and Varaprasad, B. 2011. Invitro Antibacterial Activity of Leaf Extracts of *Lawsonia inermis*. *Int. J. PharmTech. Res.* 3(2): 1045-1049.
- Nivetha, S. and Vetha, R.D. 2019. Antimicrobial Activity of *Azadiracta indica*, *Lawsonia inermis* and *Aloe barbadensis* Leaves against Some Multidrug Resistant Microorganisms. *J. Chem. Pharm. Res.* 11(10): 40-47.
- Ponugoti, M. 2017. A pharmacological and toxicological review of *Lawsonia inermis*. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 9(3): 902-915.
- Sharma, R.K., Goel, A. and Bhatia, A.K. 2016. *Lawsonia inermis* Linn: A Plant with Cosmetic and Medical Benefits. *Int. J. Appl. Sci. Biotechnol.* 4(1): 15-20.
- Suriyasathaporn, W. 2011. Epidemiology of subclinical mastitis and their antimicrobial susceptibility in small holder dairy farm, Chiang Mai province, Thailand. *J. Anim. Vet. Adv.* 10: 316-321.
- Uddin, N., Siddiqui, B.S. and Begum, A. 2013. Chemical Constituents and Bioactivities of *Lawsonia alba* Lam. (Henna). *J. Chem. Soc. Pak.* 35(2): 476-485.