

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของสารสกัดทับทิม

Study on Antifungal Activity of Pomegranate Extract

จิระภา ดำรงโภคภัณฑ์

Jeerapa Damrongpokaphan

E-mail: Jeerapa.pokaphan@hotmail.com

บทคัดย่อ

ทับทิมเป็นผลไม้ที่มีสารสกัดมีประโยชน์ ป้องกันและรักษาโรคได้หลายชนิด ได้แก่ ระบบหลอดเลือดและหัวใจ น้ำทับทิมช่วยลดปริมาณไขมันไม่ดี เปลือกทับทิมช่วยรักษาระดับไขมันในเลือด ทับทิมสามารถต้านการอักเสบและอาการแพ้มีสารสกัดชนิดฟุนิคาลาจิน ฟุนิคาลิน สตรีคไทนิน เอ และกรานาติน บี มีผลลดโปรตีนเกี่ยวกับการอักเสบและเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น นิวโทรฟิล มาโครฟาจ และโมโนไซต์ พบว่า สภาพภูมิอากาศที่ร้อนชื้นของทางภาคใต้เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมให้เชื้อราเจริญได้ดี ส่งผลให้ประชากรเป็นโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อราและเชื้อยีสต์ได้ง่าย ยารักษาเชื้อราที่ผิวหนัง ต้องใช้ต่อเนื่องเป็นเวลานาน มีราคาแพง และอาจมีฤทธิ์ข้างเคียง เช่น อาการระคายเคืองผิวหนัง, หนังสอก, ผิวหน้าแดง, ตุ่มพอง, บวม, คัน และลมพิษ ผู้ป่วยบางส่วนหันมานิยมใช้ยาจากธรรมชาติหรือสมุนไพรทดแทนยา คุณประโยชน์ของสารสกัดทับทิมเป็นสิ่งสำคัญในการรักษาอาการต่างๆ โดยเฉพาะฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของสารสกัดทับทิม ในกลุ่ม dermatophytes ผลการศึกษา กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดทับทิมจากการทดลอง สามารถยับยั้งเชื้อของกลุ่ม dermatophytes อยู่ระหว่าง 31.25-11.72 mg/mL ยับยั้งเชื้อ *T. mentagrophytes*, *M.canis*, *T.rubrum*, *E.floccosum*, *M.gypseum* โดยวิธีการทดลองในการใช้ยาต้านเชื้อราจำพวก clotrimazole ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งเชื้อ *M.canis*, *M.gympseum*, *T. mentagrophytes*, *T.rubrum*, *E.floccosum* สารสกัดทับทิมมีกลไกการออกฤทธิ์แบบผ่านยีน (genomic pathway) ร่างกายตอบสนองต่อโปรตีนในลักษณะหรือรูปแบบที่แตกต่างกัน

คำสำคัญ: ทับทิม, เชื้อรา, สารสกัดทับทิม, การยับยั้ง

Abstract

Pomegranate is a fruit rich in extracts that are beneficial to various systems of the body. And can be used to prevent and treat many types of diseases, including the vascular system and heart. Pomegranate juice helps reduce bad cholesterol that causes clogged arteries and leads to heart disease. And pomegranate peel, which is rich in fiber, helps maintain blood lipid levels and prevents narrowing of the arteries. Pomegranate is anti-inflammatory and anti-allergic. The pomegranate peel contains extracts of Punicalagin, Puni Punicalin, Strictinin A and Granatin B. These extracts have the effect of reducing the

expression of inflammatory proteins and inflammatory cells such as Neutrophil, Macrophage and Monocyte. It also found that the hot and humid climate of the south is one factor that promotes the growth of fungi well. As a result, the population is prone to skin diseases caused by fungi and yeasts. which drug to treat skin fungus which must be used continuously for a long time, is expensive and may have side effects such as Skin irritation, peeling, flushing, blisters, swelling, itching and hives in conjunction with the trend of products that come from nature, thus increasing in succession Causing some patients to prefer using natural medicines or herbal substitutes for medicines. The benefit of pomegranate extract is therefore important in helping to treat many symptoms, especially the anti-fungal effect. The purpose of this research was to study the antifungal activity of pomegranate extract among dermatophytes. Results of the study The mechanism of action of pomegranate extract from the experiment. Pomegranate extract can inhibit the bacteria of the group. dermatophytes is between 31.25-11.72 mg/mL and can also inhibit *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *T. rubrum*, *E. floccosum*. *M. gypseum* In an experimental method of using clotrimazole antifungal drugs at concentrations 100 µg/ml and can also inhibit *M.canis*, *M.gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T.rubrum*, *E.floccosum*. From this study, the researchers also found that Pomegranate extract has a mechanism of action through gene (genomic pathway) And next time, researchers will study the action through genes, namely the level of protein, which the body will respond to these proteins in different ways or patterns, levels of proteins

Keywords: Pomegranate, Fungicide , Pomegranate extract, Inhibition

บทนำ

ในปัจจุบันกระแสของพืชสมุนไพรในประเทศไทย คนไทยและคนต่างชาติให้ความสนใจในการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรมากขึ้น เนื่องจากในประเทศไทยมีพื้นที่ตั้งอยู่เขตร้อนชื้นจึงทำให้มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตสูง พืชพรรณต่าง ๆ มีจำนวนพันธุ์พืชไม่น้อยกว่า 20,000 ชนิด ทำให้มีการใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ของสมุนไพรที่มีอยู่ในประเทศไทยอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะทับทิมที่มีสารสำคัญอยู่ในกลุ่ม phytoestrogen มีสารที่พบในทับทิมอยู่หลายชนิด ซึ่งพบในเปลือกของผลและน้ำมันจากเมล็ด ได้แก่ สารในกลุ่ม polyphenol เช่น quercetin และ kaempferol (Chauhan และ Chauhan, 2001) สารกลุ่ม flavonoid glycosid (El-Toumy และ Rauwald, 2002) สาร ellagic acid และ ellagic tannin (Polyrazoglu และคณะ, 2002) และ organic acid (Heftmann และคณะ, 1966) ที่สำคัญพบสารกลุ่มสเตียรอยด์ คือ estrone (Dean และคณะ, 1988), estradiol (Abd El Wahab และคณะ, 1998) และ testosterone (Lau และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังพบสารประกอบอื่นๆ เช่น Laurie acid, manitol,

pelargonin, piperidine, punicalcortin (A, B, C), punicalin, steric acid, strictinin, tannin, tellimagrandin I, tricosanoic acid และ unicalin xanthoxylin เป็นต้น (นันทวัน และ อรุณช, 2541)



ภาพที่ 1 ผลทับทิม (Pomegranate)

เนื่องจากยารักษาเชื้อราที่ผิวหนังซึ่งต้องใช้ต่อเนื่องเป็นเวลานาน เป็นยาที่มีราคาแพง และ อาจมีฤทธิ์ข้างเคียง เช่น อาการระคายเคืองผิวหนัง, หน้าลอก, ผิวหน้าแดง, ตุ่มพอง, บวม, คัน และ ลมพิษ (หมอชาวบ้าน, 2531) ร่วมกับปัจจุบันมีกระแสความนิยมผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติมากขึ้น ทำให้ผู้ป่วยบางส่วนหันมานิยมใช้ยาจากธรรมชาติหรือสมุนไพรทดแทนยาแผนตะวันตกที่ทำมาจาก การสังเคราะห์ทางเคมี สมุนไพรเป็นส่วนหนึ่งในวิถีชีวิตและสังคมไทยมาโดยตลอด โดยนำมา ประกอบในอาหารคาว หวาน หรือใช้เป็นยารักษาโรคโดยตรงเพื่อการรักษาและฟื้นฟูสุขภาพ หรือใช้เพื่อการเสริมความงาม ภูมิปัญญาไทยเหล่านี้ได้รับการส่งเสริม สืบทอด และพัฒนาอย่าง ยาวนาน เนื่องจากประเทศไทยเป็นเขตร้อนชื้น มีพันธุ์พืชไม่น้อยกว่า 20,000 ชนิด ซึ่งสามารถนำมาใช้ เป็นสมุนไพรกว่า 1,800 ชนิด หาได้ง่ายราคาถูก สามารถปลูกได้เองภายในครัวเรือน อีกทั้งพืช สมุนไพรพื้นบ้านจัดว่าเป็นพืชที่มีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ที่มีประโยชน์ในทางเภสัชวิทยา สามารถใช้ในการรักษาโรค เช่น ลดการติดเชื้อของแผลอักเสบ ลดการเกิดหนอง รักษาและรักษาโรค ผิวหนังบางชนิดได้ แต่การพัฒนาสมุนไพรเพื่อทดแทนยาแผนปัจจุบันที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ต้องมีการวิจัยและพัฒนาสมุนไพรเพื่อใช้เป็นยาอย่างครบวงจร เพื่อพิสูจน์สรรพคุณและยืนยันความปลอดภัยในการใช้สมุนไพรในการรักษาโรค เพื่อประเมินประสิทธิภาพของยาจากสมุนไพรเทียบกับยา แผนปัจจุบัน และการวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อใช้สมุนไพรที่มีปริมาณสารสำคัญที่แน่นอน และ ควรส่งเสริมให้มีการผลิตยาจากสมุนไพรขึ้นใช้ในโรงพยาบาลจังหวัดหรืออำเภอที่มีศักยภาพและ มีบุคลากรสาธารณสุขเพียงพอ รวมทั้งให้ประชาชนในท้องถิ่นได้มีส่วนร่วมในการปลูกพืชสมุนไพร เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตยาของโรงพยาบาล เพื่อใช้ยาสมุนไพรนั้นในการรักษาผู้ป่วยในท้องถิ่น เพื่อลดอัตราการนำเข้าของยาแผนปัจจุบัน (thitima, 2016)

โรคผิวหนังจากเชื้อรา กลุ่ม cutaneous mycoses เป็นโรคจากการติดเชื้อราที่บริเวณผผ ขน และ เล็บ โดยเชื้อราสามารถลุกลามจากชั้น stratum corneum ไปอยู่ที่รูขุมขน ผผ โคนเล็บ และข้างเล็บ เชื้อราทำให้เกิดโรคกลุ่ม cutaneous mycoses ที่พบบ่อย ได้แก่ โรคที่เกิดจากเชื้อกลุ่ม dermatophytes เรียกว่า โรคกลาก หรือ dermatophytosis จัดเป็นโรคติดเชื้อราที่พบก่อโรคได้บ่อยที่สุดชนิดหนึ่ง โรคกลากเป็นการติดเชื้อที่ผิวหนังชั้นนอก ซึ่งเกิดจากเชื้อรากลุ่ม dermatophytic fungi เกิดจากการสัมผัสกับเชื้อรา โดยอาจได้รับเชื้อผ่านทางดิน, การสัมผัสโดยตรงกับสัตว์หรือผ่านทางขนของสัตว์ที่เป็นพาหะ ร่วมกับสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมของผิวหนังของผู้ติดเชื้อ เช่น ผิวหนังที่มีบาดแผล หรือ ผิวหนังที่เปียกอยู่จากความอับชื้น โรคผิวหนัง

จากเชื้อราสามารถก่อโรคได้ทั้งร่างกาย เช่น ศีรษะ ใบหน้า หนอง-ครา บริเวณขาหนีบ ผิวหนังบริเวณลำตัว ผิวหนังบริเวณมือ ผิวหนังบริเวณเท้า และ เล็บมือหรือเล็บเท้า เชื้อก่อโรคกลากที่พบบ่อยในคนมี 3 สกุล ได้แก่ *Trichophyton*, *Epidermophyton* และ *Microsporum* (พรพรรณ ภูมิรัตน์, วิทวัส ต้นหยง, & นัฏฐเนศวร์ ลับเลิศลอบ, 2013)



ภาพที่ 2 โรคกลาก (Dermatophytosis)

ที่มา: <https://basicmedicalkey.com/cutaneous-subcutaneous-mycoses/>

โรคกลุ่ม cutaneous mycoses ที่เกิดจากเชื้อรากลุ่มอื่นๆ เรียกว่า dermatomycosis โดยเชื้อที่พบบ่อย คือ *Candida* ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ฉวยโอกาส ที่ก่อโรคได้บ่อยที่สุด ได้แก่ *c. albicans* ในสภาวะที่ร่างกายแข็งแรง สามารถพบเชื้อกลุ่มนี้เป็นเชื้อแฝงที่ หู ตา ระบบทางเดินอาหาร อวัยวะสืบพันธุ์ ผิวหนัง และช่องคลอด เป็นต้น และจัดเป็นเชื้อประจำถิ่นที่มีความสำคัญต่อร่างกายของมนุษย์แต่เมื่อร่างกายอ่อนแอ ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่สมดุล จึงทำให้ *c. albicans* เพิ่มจำนวนมากกว่าปกติ และ ก่อให้เกิดการติดเชื้อ เรียกโรคติดเชื้อจาก *Candida* ว่า candidiasis หรือ candidosis ซึ่งส่วนใหญ่พบการ ติดเชื้อที่เยื่อบุผิวหนัง (mucous membrane) ของร่างกาย อาการที่พบบ่อย คือ การเกิดฝ้าขาวในช่องปาก และลำคอ ช่องคลอด ผิวหนัง ขาหนีบ *c. albicans* เป็นยีสต์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ (สุรชัย รัตนสุข, 2557)

ทับทิม (*Punica granatum* Linn.) เป็นพืชวงศ์ *Punicaceae* พบในประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน ตะวันออกกลาง เอเชียใต้ และหลายประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย ลักษณะของทับทิมเป็นไม้พุ่ม สูงไม่เกิน 3 เมตร ปลายกิ่งอ่อนห้อยลู่ลง ปลายกิ่งเล็กมักกลายเป็น หนามแหลม ใบของทับทิมเป็นใบเดี่ยว ออกเป็นคู่ตรงข้ามกัน รูปหอกกลับ เนื้อใบเนียน ดอกทับทิมมีสีแดง ออกเป็นดอกเดี่ยวๆ หรือรวมเป็นกระจุกประมาณ 5 ดอก ผลทับทิมนั้นมีลักษณะกลมโต ผิว นอกแข็งเป็นมัน ผลแก่จะแตกอ้าออกให้เห็นเมล็ดที่มีเนื้อเยื่อใสๆ สีขาวอมชมพูอยู่ภายใน ทับทิมมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ เช่น ลดน้ำตาลในเลือด ลดความดันโลหิตสูง ยับยั้งแบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ ขับพยาธิ ขับปัสสาวะ ป้องกันฟันผุ และมีฤทธิ์ในการคุมกำเนิด วิธีการใช้ทับทิมในตำหรับโบราณนั้นใช้โดยนำมาเมล็ดทับทิมมารับประทาน หรือนำมาตากแห้งป่นเป็นผงจากนั้นตวง 1-2 ช้อนชา ชงกับน้ำร้อนดื่ม เข้า-เย็น ก่อนอาหาร (มันทวัน และ อรุณ, 2541) นอกจากนี้มีรายงานความเป็นพิษของทับทิม โดยพบว่าสารสกัดส่วนที่มี gallotannin จากเปลือกของผลทับทิม ความเข้มข้น 0.5% เป็นพิษต่อตับ (Anon, 1978) สาร tannic acid จาก เปลือกผลป้อนกระต่าย ขนาด 1 กรัมต่อกิโลกรัม

เป็นเวลา 40 วัน ทำให้เกิดอาการเป็นพิษ สารสกัดจากผิวทับทิมด้วยน้ำ ขนาด 0.4 มิลลิกรัมต่อวัน ทำให้ นกกระจอกตัวผู้ตายได้ (Singh และ คณะ, 1980)

ในปี ค.ศ. 1978 มีการทำการทดลองสารสกัดจากเมล็ดทับทิมพบว่า สามารถลดระดับ น้ำตาลใน เลือดได้ (Carraz และคณะ, 1978; Comai และคณะ, 1978; Kazmi และคณะ, 1974) หากนำสารสกัดจาก เมล็ดทับทิมในสารละลายแอลกอฮอล์ในความเข้มข้น 300 และ 600 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม จากนั้นป้อนสาร สกัดเมล็ดทับทิมให้หนูที่เป็นเบาหวานกิน เมื่อเปรียบเทียบกับผลการลด น้ำตาลกับยาแผนปัจจุบัน chlorpropamide ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าสามารถลดน้ำตาลในเลือด 47 และ 52 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 12 ชั่วโมง (Das และคณะ, 2001)

จากคุณสมบัติต่างๆ มากมายของสารสกัดทับทิมที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ผู้วิจัยจึงมีความสนใจและให้ ความสำคัญกับสารสกัดทับทิมที่มีส่วนยับยั้งเชื้อราได้ โดยการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของสารสกัดทับทิม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของสารสกัดทับทิม

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยวิทยาศาสตร์ในสาขาวิทยา โดยใช้ระเบียบวิจัยเชิงทดลอง เพื่อ ทดสอบหาประสิทธิภาพของสารสกัดทับทิม ในการยับยั้งเชื้อรากลุ่ม dermatophyte โดยเปรียบเทียบขนาด ของ inhibition zone ของเชื้อราทดสอบกับสารสกัดทับทิมกับเชื้อรากลุ่ม Dermatophyte 5 ชนิดโดยใช้วิธี agar well diffusion และเปรียบเทียบผลที่ได้กับยา clotrimazole

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือ

- 1) เครื่องชั่งสาร
- 2) เครื่องนึ่งอบปลอดเชื้อ
- 3) Vortex mixer
- 4) ตู้อุ่นหมุมิเก็บเชื้อ
- 5) ตู้อบปลอดเชื้อ
- 6) เครื่องระเหยสาร

อุปกรณ์

- 1) Teasing needle
- 2) Loop
- 3) Glass Petri dish
- 4) Seropipet
- 5) Rack
- 6) slide
- 7) cover slip

สารเคมี และน้ำยาทดสอบ

อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบชีวภาพ
Potato dextrose agar; PDA

Mueller –Hinton agar

สารเคมีในการทดลอง

- 1) Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 2) Ethanol 95% Merck / Thailand
- 3) Alcohol 70% Merck / Thailand
- 4) McFarland standard No. 1.0
- 5) Clotrimazole New Life Pharma Co., Ltd. / Thailand
- 6) Lactophenol cotton blue

เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ

- 1) *Epidermophyton floccosum*

- | | |
|--|---------------------------------------|
| 8) slide culture set | 2) <i>Microsporium gypseum</i> |
| 9) Millipore filter membrane 0.45 um & FilterPapers No.1 | 3) <i>Microsporium canis</i> |
| 10) Volumetric flask | 4) <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 11) Autopipette | 5) <i>Trichophyton mentagrophytes</i> |
| 12) Forceps | |
| 13) Swab | |
| 14) Micropipette tip | |
| 15) scotch tape | |

สมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ

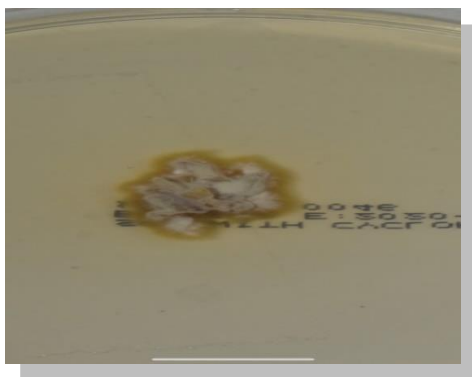
สารสกัดหับทิม หับทิมที่ใช้ในการทดลองเป็นหับทิมไทย ที่ปลูกในเขตพื้นที่ในประเทศไทย และเก็บเกี่ยว ผลผลิตในช่วงเดือนเมษายน ถึง พฤษภาคม ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช (Herbarium No.080252)

การตรวจหาสารสำคัญโดยวิธี Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) โดย GC-MS เป็นเครื่องมือที่ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของเครื่อง GC (Gas chromatography) ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ในการแยกองค์ประกอบของสารที่มีอยู่ในตัวอย่างให้ออกมาที่ละองค์ประกอบ ก่อนที่จะเข้าสู่ detector (Hewlett-Packard 5973) และอีกส่วนคือ เครื่อง MS (Mass spectrometry) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น detector ในการตรวจสอบดูว่าองค์ประกอบต่างๆ ที่ผ่านออกมาจากเครื่อง GC นั้น มีเลขมวล (mass number) เป็นเท่าไร เพื่อที่จะได้สามารถทำนายได้ว่า สารที่เราสนใจอยู่นั้นประกอบด้วยองค์ประกอบชนิดใดบ้าง และมีปริมาณเท่าไร (Hewlett Packard 6890) และจากการศึกษาพบว่า สารสกัดหับทิมและน้ำหับทิมมีสารฟีนอลิก (TPC) และสารฟลโวนอยส์ (FT) ปริมาณมาก และ TPC มากกว่า FT ปริมาณของ TPC ดังนี้ PPE/e > PPE/w > PSE/e > PSE/w > PJ 451.96 ± 4.29; 380.54 ± 5.87; 77.93 ± 1.62; 51.58 ± 0.85 และ 2.55 ± 0.42 pg GAE/mg ของสารสกัดตามลำดับ และ ปริมาณ FT ดังนี้ 37.61 ± 1.44; 26.05 ± 0.93; 16.66 ± 0.47; 10.55 ± 0.14 และ 0.24 ± 0.03 ug CAE/mg ของสารสกัด ในทำนองเดียวกันผลการวิเคราะห์ antioxidant activity ทั้ง 3 วิธี คือ scavenging DPPH radicals, ferric antioxidant reducing power (FRAP) และ lipid peroxidation inhibition / ferric thiocyanate (FTC) พิจารณาจากค่า IC₅₀ ที่ 24 ซม. พบว่า ประสิทธิภาพ ของ antioxidant activity ของ PPE มากกว่า PSE และ PJ และ ใกล้เคียงกับสาร antioxidants มาตรฐานคือ catechin (CA), epigallocatechin-3-gallate (EGCG) และ สารสังเคราะห์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารคือ 3-ferf-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxyl toluene (BHT) ปริมาณของ TPC และ FT ในแต่ละส่วนของหับทิมมีความสัมพันธ์ดี (correlation) กับคุณสมบัติ antioxidant และพบว่าหับทิมไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์มีชีวิตปกติ ซึ่งใช้ *Artemia scitinct* เป็นต้นแบบทดลองแต่มีความเป็นพิษยับยั้งการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งสาย พันธุ์ของคน ซึ่งใช้

เซลล์มะเร็งเต้านมของคน MCF-7 เป็นต้นแบบในการทดลอง สารสกัดเปลือกและเมล็ดทับทิมแสดงโปรไฟล์ทางพิษวิทยาเพื่อใช้ในการพัฒนาทางเภสัชวิทยาและการรักษาโดยการวิเคราะห์สถิติ ดังนั้น NOAEL (no-observed-adverse-effect-level) เรียงดังนี้ PPE/w > PSE/e > PPE/e > PSE/w ซึ่งมีค่า 1,250, 1,000, 750, and 100 ug/ml ตามลำดับ LOAEL (lowest-observed-adverse-effect-level) เรียงดังนี้ PPE/w = PSE/e > PPE/e > PSE/w มีค่า 1,500, 1,000, and 500 ug/ml ตามลำดับ ส่วนค่า MOS (margin of safety) และ TI (therapeutic index) ดังนี้ PPE/w > PSE/e > PPE/e > PSE/w โปรไฟล์ทางพิษวิทยาเหล่านี้เป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทับทิมทางเภสัชวิทยา ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองวิจัยผลิตภัณฑ์ของสารสกัดทับทิมยับยั้งการเจริญเติบโต และฆ่าเชื้อราในกลุ่ม dermatophytes ได้ โดยเปรียบเทียบขนาดของ inhibition zone ของเชื้อราทดสอบกับสารสกัดทับทิมกับเชื้อราในกลุ่ม Dermatophyte 5 ชนิดโดยใช้วิธี agar well diffusion และเปรียบเทียบผลที่ได้กับยา clotrimazole เพื่อเป็นทางเลือกในทางการแพทย์ให้มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต วิธีการทดลองโดยใช้เชื้อทดสอบเชื้อราที่นำมาทำการทดสอบ จำนวน 5 ชนิด ซึ่งอยู่ในกลุ่ม dermatophyte ได้แก่

- 1) *E. floccosum* 1 สายพันธุ์
- 2) *M. gypseum* 1 สายพันธุ์
- 3) *M. canis* 1 สายพันธุ์
- 4) *T. rubrum* 1 สายพันธุ์
- 5) *T. mentagrophytes* 1 สายพันธุ์

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบน PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 - 14 วัน นำมาย้อม lactophenol cotton blue เพื่อดูลักษณะ septate hyphae, macroconidia และ microconidia เพื่อยืนยันเชื้อแต่ละชนิด ซึ่งทำการจำแนกเชื้อราในกลุ่ม dermatophytes แต่ละ genus และ species ดังรูปภาพที่ ดังต่อไปนี้



รูปภาพ ที่ 1 *E. floccosum* 1



รูปภาพ ที่ 2 *M. gypseum*



รูปภาพ ที่ 3 *M. canis*

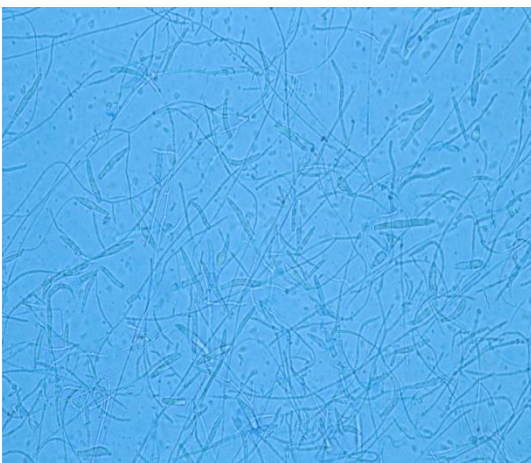


รูปภาพ ที่ 4 *T. rubrum*

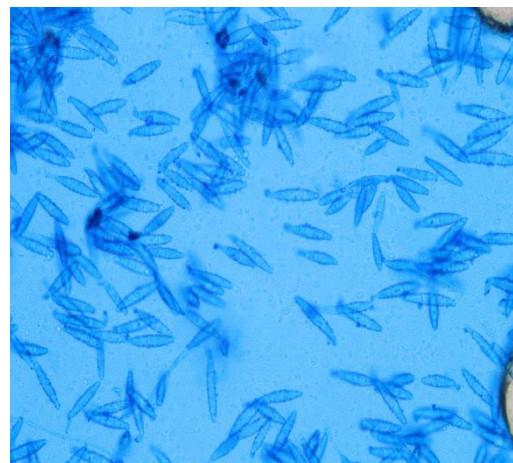


รูปภาพ ที่ 5 *T. mentagrophytes*

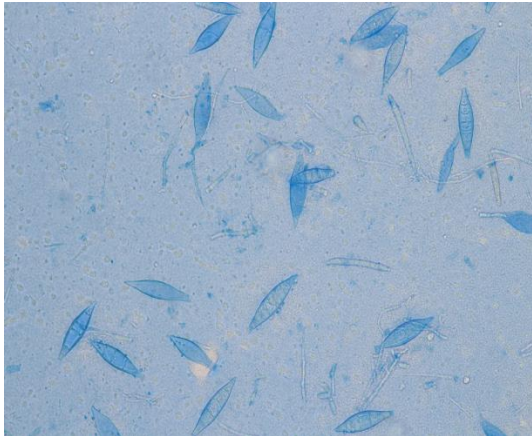
จากรูปภาพลำดับที่ 1-5 แสดงให้เห็นถึงลักษณะของ เชื้อรากลุ่ม dermatophytes จากกล้องซึ่งได้จากการย้อมสี Lactophenolcottonblue เป็นผลที่ได้จากการทดลอง ดังนี้



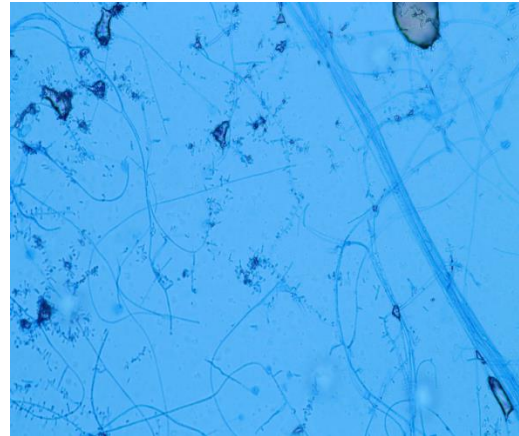
รูปภาพที่ 1 *E. floccosum*



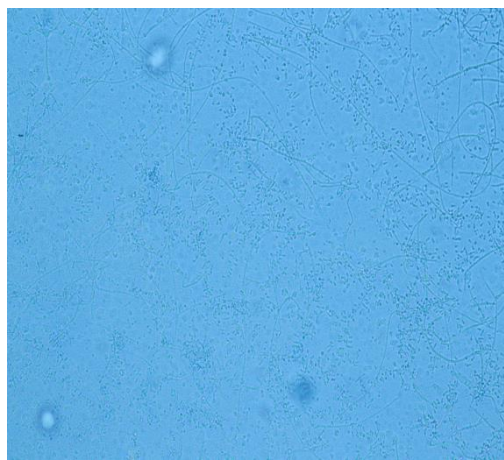
รูปภาพที่ 2 *M. gypseum*



รูปภาพที่ 3 *M. canis*



รูปภาพที่ 4 *T. rubrum*



รูปภาพที่ 5 *T. mentagrophytes*

ผลการวิจัย

ผลการวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยเชื่อว่า ทับทิมสามารถต้านการอักเสบและอาการแพ้ โดยเปลือกทับทิมมีสารสกัดชนิดฟุนิคาาลาจิน ฟุนิคาลิน สตริกไทนิน เอ และกรานาติน บี ซึ่งสารสกัดเหล่านี้ไปมีผลในการลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น นิวโทรฟิล มาโครฟาจ และโมโนไซต์ เป็นต้น และยังพบว่าสภาพภูมิอากาศที่ร้อนชื้นของทางภาคใต้จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมให้เชื้อราเจริญได้ดี ซึ่งส่งผลให้ประชากรเป็นโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อราและเชื้อยีสต์ได้ง่าย ซึ่งยารักษาเชื้อราที่ผิวหนัง ซึ่งต้องใช้ต่อเนื่องเป็นเวลานาน มีราคาแพง และอาจมีฤทธิ์ข้างเคียง เช่น อาการระคายเคืองผิวหนัง, หน้าลอก, ผิวหน้าแดง, ตุ่มพอง, บวม, คัน และลมพิษ การรักษาโรคกลากสามารถใช้วิธีการทายาหรือการกินยา โดยสารต้านเชื้อรา (Anti-fungal agents) ที่นิยมใช้ปัจจุบันมี 4 กลุ่มคือ Azole, Polyene, Griseofulvin และ Allylamine derivatives ทั้งนี้การเลือกวิธีการรักษาและชนิดของสารต้านเชื้อราเพื่อการรักษานั้นขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค และการตอบสนองของเชื้อต่อตัวยาที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อระยะเวลาและการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อราในผู้ป่วยแต่ละรายร่วมกับกระแสความนิยมผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติจึงเพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับ ทำให้ผู้ป่วยบางส่วนหันมานิยมใช้ยาจากธรรมชาติหรือสมุนไพรทดแทนยา ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาการสังเคราะห์หรือการสกัดทับทิมเพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของสาร

สกัดทับทิม ในกลุ่ม dermatophytes

อภิปรายผล

ผลการทดลองการยับยั้งเชื้อกลุ่ม dermatophytes ของสารสกัดทับทิม ความเข้มข้น 250 mg/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *M.canis* *M.gypseum* *T. mentagrophytes* *T.rubrum* *E.floccosum* เกิด inhibition zone บน MHA Plate และ PDA Plate เท่ากับ 20, 20, 23, 22, 20 ตามลำดับ และ สารสกัดทับทิม ความเข้มข้น 500 mg/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *M.canis* *M.gypseum* *T. mentagrophytes* *T.rubrum* *E.floccosum* เกิด inhibition zone บน MHA Plate 25, 24, 28, 26, 28 mm และบน PDA Plate 24, 24, 26, 25, 28 mm ในส่วนของ ยา clotrimazole ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *M.canis*, *M.gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T.rubrum*, *E.floccosum* เกิด inhibition zone บน MHA Plate 21, 20, 21, 21, 20 และ บน PDA Plate 21, 20, 21, 21, 20 mm และ ยา clotrimazole ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *M.canis*, *M.gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T.rubrum*, *E.floccosum* เกิด inhibition zone บน MHA Plate 24, 24, 25, 24, 24 mm และ บน PDA Plate 24, 24, 25, 24, 24mm

ผลการทดลองการยับยั้งเชื้อกลุ่ม dermatophytes ผลการยับยั้งเชื้อกลุ่ม dermatophytes ของสารสกัดทับทิม ความเข้มข้น 250 mg/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *M.canis* *M.gypseum* *T. mentagrophytes* *T.rubrum* *E.floccosum* เกิด inhibition zone บน MHA Plate และ PDA Plate เท่ากับ 20, 20, 23, 22, 20 ตามลำดับ และ สารสกัดทับทิม ความเข้มข้น 500 mg/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *M.canis* *M.gypseum* *T. mentagrophytes* *T.rubrum* *E.floccosum* เกิด inhibition zone บน MHA Plate 25, 24, 28, 26, 28 mm และบน PDA Plate 24, 24, 26, 25, 27 mm ในส่วน ยา clotrimazole ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *M.canis*, *M.gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T.rubrum*, *E.floccosum* เกิด inhibition zone บน MHA Plate 21, 20, 21, 21, 20 และ บน PDA Plate 21, 20, 21, 21, 20 mm และ ยา clotrimazole ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *M.canis*, *M.gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T.rubrum*, *E.floccosum* เกิด inhibition zone บน MHA Plate 24, 24, 25, 24, 24 mm และ บน PDA Plate 24, 24, 25, 24, 24mm

ผลการทดลองการยับยั้งเชื้อกลุ่ม dermatophytes ผลการยับยั้งเชื้อกลุ่ม dermatophytes ของสารสกัดทับทิม ความเข้มข้น 250 mg/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *M.canis* *M.gypseum* *T. mentagrophytes* *T.rubrum* *E.floccosum* เกิด inhibition zone บน MHA Plate และ PDA Plate เท่ากับ 20, 20, 23, 22, 20 ตามลำดับ และ สารสกัดทับทิม ความเข้มข้น 500 mg/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *M.canis* *M.gypseum* *T. mentagrophytes* *T.rubrum* *E.floccosum* เกิด inhibition zone บน MHA Plate 25, 24, 27, 26, 28 mm และบน PDA Plate 24, 24, 26, 25, 27 mm ในส่วน ยา clotrimazole ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *M.canis*, *M.gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T.rubrum*, *E.floccosum* เกิด

inhibition zone บน MHA Plate 21, 21, 21, 21, 20 และ บน PDA Plate 21, 20, 21, 21, 20 mm และ ยา clotrimazole ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งเชื้อ *M.canis*, *M.gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T.rubrum*, *E.floccosum* เกิด inhibition zone บน MHA Plate 24, 24, 25, 24, 24 mm และ บน PDA Plate 24, 24, 25, 24, 24mm

จากการทดลองพบว่า สารสกัดทับทิมมีผลต่อการยับยั้งเชื้อรา โดยได้ผลการทดลองที่สามารถยับยั้งเชื้อกลุ่ม dermatophytes แสดงว่าประสิทธิภาพของสารสกัดสารสกัดทับทิมของผู้วิจัยให้ผลใกล้เคียงกับผลการศึกษาของยา clotrimazole ได้เป็นอย่างดี จากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปรูปแบบกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดทับทิม (เมล็ดและเปลือก) ได้ว่า เป็นการออกฤทธิ์แบบผ่านยีน (genomic pathway) หมายถึง การให้สารชนิดใดชนิดหนึ่งเข้าไป ในสิ่งมีชีวิตแล้ว ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตนั้นสามารถแสดงกลไกการตอบสนองได้ในระดับยีน โดยส่วนใหญ่การออกฤทธิ์ในระดับนี้ร่างกายจะใช้เวลานานในการตอบสนอง สำหรับตัวชี้วัดของการออกฤทธิ์แบบผ่านยีนคือระดับของโปรตีนซึ่งร่างกายจะตอบสนองต่อโปรตีนเหล่านี้ในลักษณะหรือรูปแบบที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและกลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีนนั้นๆ ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากทับทิมแสดงการออกฤทธิ์แบบผ่านยีนคือ การเพิ่มขึ้นของเซลล์ แน่นอนที่สุดว่าพืชสมุนไพรชนิดนี้ย่อมมีความสำคัญต่อการรักษาโรคทั้งในปัจจุบันและอนาคต

สรุป/ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองสารสกัดทับทิมสามารถยับยั้งเชื้อของกลุ่ม dermatophytes ซึ่งเป็นเชื้อราชนิดหนึ่ง นอกจากสารสกัดทับทิมจะมีประโยชน์ในหลายๆ ประการแล้ว การที่ประเทศไทยมีผลทับทิมที่เจริญเติบโตได้ดีในประเทศซึ่งมีสภาพอากาศที่เอื้ออำนวยต่อการปลูกผลทับทิม ย่อมส่งผลต่อภาคการศึกษาในการต่อยอดโดยการนำผลทับทิมมาสกัดเพื่อใช้ในการรักษาโรค ซึ่งถือได้ว่า ประเทศไทยมีข้อได้เปรียบกว่าประเทศอื่นๆ ฤทธิ์ของสารสกัดทับทิมยังอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระอย่างดียิ่งเยี่ยม มีประสิทธิภาพในการลดริ้วรอย เนื่องจากมีสารกลุ่ม Polyphenol อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ศึกษาในห้องทดลองเท่านั้น ในอนาคตหากนำมาศึกษาในมนุษย์จะมีประโยชน์และเป็นที่น่าสนใจอย่างมาก

เอกสารอ้างอิง

- นันทวัน บุญยะประกฤษ และอรนุช โชคชัยเจริญพร. (2541). *สมุนไพร ไม้พื้นบ้าน เล่ม 1-2*. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- พรพรรณ ภูมิรัตน์ และคณะ. (2556). เชื้อราทางการแพทย์. *วารสารการแพทย์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ*, 2, 31-44.
- Abd El Wahab และคณะ. (1998). Characterization of certain steroid hormones in *Punica granatum* L. seeds. *Bulletin of Faculty of Pharmacy-Cairo University*, 36(1), 11-16.
- Carraz และคณะ. (1978). Penta-O-galloyl--glucose Useful as Hypoglycemic Agent. *Fr. Demande*, 2(380.299).

- Chauhan, D., & Chauhan, J. S. (2001). Flavonoid Diglycoside from *Punica granatum*. *Pharmaceutical Biology*, 39(2), 155-157.
- Choi และคณะ. (2006). Identification of steroid hormones in pomegranate (*Punica granatum*) using HPLC and GC–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 96(4), 562-571
- Comai และคณะ. (1978). Differences between lean and obese Zucker rats : the effect of poorly absorbed dietary lipid on energy intake and body weight again. *The Journal of Nutrition*, 108(5), 856-35.
- Das และคณะ. (2011). Drug utilization pattern and effectiveness analysis in diabetes mellitus at a tertiary care centre in Eastern. *Nepal Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 55(3), 272-80.
- Dean และคณะ. (1988). The conversion of nitrite to nitrogen oxide (s) by the constitutive NAD (P) H-nitrate reductase enzyme from soybean. *Plant Physiology*, 88(2), 389-395.
- Dean และคณะ. (1971). steroid oestrogens in plants:re-estimation of oestrone in pomegranate seeds. *Phytochemistry*, 10, 2215-2216.
- El-Toumy และคณะ. (2002). Two ellagitannins from *Punica granatum* heartwood. *Phytochemistry*, 61(8), 971-974.
- Lau และคณะ. (2003). Analysis of adulterants in a traditional herbal medicinal product using liquid chromatography -mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31, 401-406.
- Lau และคณะ. (2003). Superhydrophobic carbon nanotube forests. *Nano Letters*, 3(12), 1701-1705.
- [www.https://basicmedicalkey.com/cutaneous-subcutaneous-mycoses/](https://basicmedicalkey.com/cutaneous-subcutaneous-mycoses/)