

องค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดหยาบผักเป็ดยะล

ฤทธิพันธ์ รุ่งเรือง^{1*} อรทัย โกกิลกนิษฐ²

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต แขวงดุสิต เขตดุสิต กรุงเทพฯ 10300

อรพรรณ เสลา มาศกุล³ ณัฏฐพล ไช้แสงศรี³ อรพิน เกิดชูชื่น⁴ และ ณัฏฐา เลหากุลจิตต์⁴

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

* Corresponding Author : rittipun_run@dusit.ac.th

¹ อาจารย์ หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

² นักวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา และ ผู้จัดการหน่วยบริหารนวัตกรรมการวิจัย

³ นักวิจัย ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยเกษตรแปรรูปและอาหารเชิงหน้าที่ สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ

⁴ รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

ข้อมูลบทความ

บทคัดย่อ

ประวัติบทความ :

รับเพื่อพิจารณา : 17 เมษายน 2563

แก้ไข : 8 กรกฎาคม 2563

ตอบรับ : 24 สิงหาคม 2563

คำสำคัญ :

ผักเป็ดยะล /

แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ /

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ /

ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ /

ความเป็นพิษต่อเซลล์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยของผักเป็ดยะล พบว่า สารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 31.57 ± 1.83 และ 8.03 ± 1.44 mg GAE/g extract ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สารสกัดหยาบด้วย HPLC พบสารสำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ epicatechin, vanillic acid และ 2-hydroxycinnamic acids (*o*-coumaric acid) สำหรับน้ำมันหอมระเหย เมื่อวิเคราะห์ด้วย SPME-GC-MS พบ 2-methoxy-4-vinylphenol (2M4VP), β -damascenone และสารในกลุ่มเทอร์พีน โนแ่งของฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการแย่งจับโลหะ ฤทธิ์ในการยับยั้งคอลลาจีเนสสูงกว่าน้ำมันหอมระเหย เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์พบว่า สารสกัดหยาบสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Escherichia coli* ได้ ส่วนน้ำมันหอมระเหยผักเป็ดยะลสามารถยับยั้ง *S. aureus*, *E. coli* และ *Candida albicans* ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารสกัดหยาบมีประสิทธิภาพสูงกว่า น้ำมันหอมระเหยผักเป็ดยะล และสารสกัดหยาบผักเป็ดยะลไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ CCD-986 SK โดยมีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ เท่ากับ 87.28 ± 6.21

Phytochemical Compositions and Biological Activities of Essential Oil and Crude Extract of *Sesuvium portulacastrum*

Rittipun Rungruang^{1*}, Oratai Kokilakanishtha²,

Suan Dusit University, Dusit, Bangkok 10300

Orrapun Selamassakul³, Nattapon Kaisangsri³, Orapin Kerdchoechuen⁴ and Nutta Laohakunjit⁴

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thakam, Bangkokuntein, Bangkok 10150

* Corresponding Author : rittipun_run@dusit.ac.th

¹ Lecturer, Department of Cosmetic Science, Faculty of Science and Technology.

² Researcher, Research and Development Institute, Manager of Research Innovation Management Unit.

³ Researcher, Agricultural and Functional Foods Processing Laboratory, Pilot Plant Development and Training Institute.

⁴ Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

Article Info

Abstract

Article History:

Received: April 17, 2020

Revised: July 8, 2020

Accepted: August 24, 2020

Keywords:

Sesuvium portulacastrum /

SPME-GC-MS /

Antioxidant Activity /

Anti-microbial / Cytotoxicity

This research aimed to study phytochemical compositions of essential oil and crude extracts of *Sesuvium portulacastrum*. Results showed that total phenolics contents of the crude extract and essential oil were 31.57 ± 1.83 and 8.03 ± 1.44 mg GAE/g extract, respectively. Three major compounds, as analyzed by HPLC, were found in crude extract, namely, epicaechin, vanillic acid and 2-hydroxycinnamic acids (*o*-Coumaric acid). The essential oil was analyzed by SPME-GC-MS and 2-methoxy-4-vinylphenol (2M4VP), β -damascenone and terpene were found. In terms of bioactivities, the crude extract exhibited higher antioxidant, metal chelating and anti-collagenase activities than the essential oil. When antimicrobial activity was tested, results showed that crude extract could inhibit *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. On the other hand, the essential oil could inhibit *S. aureus*, *E. coli* and *Candida albicans*. These results revealed that the crude extract of *S. portulacastrum* has higher efficacy than the essential oil; crude extract did not show toxicity against CCD-986SK cells, of which the survival percentage of the cells was $87.28 \pm 6.21\%$.

1. บทนำ

ผักเบี้ยทะเล (*Sesuvium portulacastrum*) หรือ Sea Purslane อยู่ในวงศ์ Aizoaceae พบได้บริเวณชายฝั่งทะเล บริเวณเขตร้อนและกึ่งร้อน บางประเทศนำไปใช้เป็นไม้ประดับ [1] ลักษณะของผักเบี้ยทะเลมีใบอวบน้ำและหนา ลักษณะของต้นเจริญเติบโตราบกับพื้นดิน ดอกมีขนาดเล็กและเป็นสีชมพู สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งปี [2] มีงานวิจัยหลายฉบับกล่าวถึง การนำผักเบี้ยทะเลไปใช้เป็นยาพื้นบ้านเพื่อรักษาโรคลมชัก (epilepsy) โรคมะเร็ง (conjunctivitis) ปัสสาวะเป็นเลือด (hematuria) โรคติดเชื้อ (infectious diseases) รวมทั้งโรคทางผิวหนัง (dermatitis) ในประเทศซิมบับเวและแถบแอฟริกาใต้ [3] งานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่า ในผักเบี้ยทะเลมี fatty acid methyl esters ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา [4] และยังพบสารสำคัญ คือสารในกลุ่มทุติยภูมิ (secondary metabolite) เช่น ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ และ phytoecdysteroids เป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเมื่อถูกโจมตีโดยจุลชีพ [5] มีการนำสารที่พบในผักเบี้ยทะเลมาใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่สามารถเพิ่มขนาดของกล้ามเนื้อ และเพิ่มประสิทธิภาพในการฝึกซ้อมของนักกีฬา [6] จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าผักเบี้ยทะเลมีศักยภาพที่ดีในการใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ซึ่งเป็นวัชพืชที่หาได้ง่ายและมีปริมาณมาก ในปัจจุบันมีการส่งเสริมการนำทรัพยากรชีวภาพ เช่น วัชพืชต่าง ๆ มาสร้างมูลค่าให้สูงขึ้น เป็นการพัฒนาเศรษฐกิจแบบองค์รวมที่เน้นพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีมูลค่าสูง โดยเน้นนำวัสดุเหลือทิ้ง หรือทรัพยากรชีวภาพมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด เชื่อมโยงกับเศรษฐกิจหมุนเวียน หรือ circular economy ร่วมกับการรักษาสິงแวดล้อมได้อย่างสมดุลให้เกิดความมั่นคงและยั่งยืนตามแผน BCG Model การนำวัชพืชบริเวณชายฝั่งทะเลอย่างผักเบี้ยทะเล มาสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับเศรษฐกิจก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของผักเบี้ยทะเลยังมีการศึกษาน้อยมากในประเทศไทย อีกทั้งยังไม่มีผลการรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านเครื่องสำอาง เช่น ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส และการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของสารสกัดผักเบี้ยทะเล กอปรกับการสกัดสารจากพืชที่มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อสารสำคัญที่อยู่ในพืช ทั้งการที่สกัดแล้วอยู่ในรูปของสารสกัดหยาบ และน้ำมันหอมระเหย ดังนั้น งาน

วิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์คือลิชันของโลหะ ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของสารสกัดผักเบี้ยทะเล เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

ผักเบี้ยทะเล ได้จากห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยเกษตรแปรรูปและอาหารเชิงหน้าที่ สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เก็บในเดือนมกราคม ปี 2562 นำผักเบี้ยทะเลส่วนใบรวมลำต้นมาล้างน้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ความชื้นไม่เกินร้อยละ 10 จากนั้นนำตัวอย่างพืชแห้งมาบดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่น และกรองผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh และเก็บในถุงร้อนใส่ปิดสนิทที่อุณหภูมิห้อง

2.2 การสกัดตัวอย่างพืช

2.2.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

(Solvent extraction)

การสกัดด้วยตัวทำละลายประยุกต์จากงานวิจัยของ Al-Azzawi และคณะ [7] โดยนำผักเบี้ยทะเลมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ร้อยละ 50 ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ใน orbital shaker (Green S Serilker II, VS8480FSN, Vision scientific, South Korea) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ก่อนนำไปประเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (IKA, RV10, Germany) และนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) ได้สารสกัดหยาบและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.2 การกลั่นพร้อมสกัด (Simultaneous distillation extraction)

การสกัดด้วยการกลั่นพร้อมสกัด นำตัวอย่างผักเบี้ยทะเล 500 กรัม ใส่หม้อต้มกลั่นที่มีน้ำ 1,500 มิลลิลิตร และนำเฮกเซน (hexane) ใส่ขวดก้นกลมอีกใบ 300 มิลลิลิตร จากนั้น

นำขวดทั้งสองมาต่อเข้ากับ Likens-Nickerson apparatus ให้ความร้อนจนถึงจุดเดือดของตัวทำละลาย และทำการสกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำสารสกัดมาระเหยตัวทำละลายเฮกเซนออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ได้น้ำมันหอมระเหย และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของสารสกัด

2.3.1 ค่าสีของสารสกัด (Color measurement)

นำสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยมาวัดค่าสีโดยใช้เครื่อง colorimeter รุ่น CR-400 Konica Minolta แสดงเป็นค่า L^* , a^* , b^* และ h° ซึ่งค่า L^* คือค่าความสว่างของสี ค่า a^* คือค่าสีในช่วงสีเขียวถึงสีแดง ค่า b^* คือค่าสีในช่วงสีน้ำเงินถึงสีเหลือง และค่า h° คือมุมของฮิว (Hue angle)

2.3.2 ค่าดัชนีหักเห (Refractive index)

วัดค่าดัชนีหักเหแสงตามวิธีของ Limpaphayom และคณะ [8] โดยใช้ hand-held refractometer รุ่น R-5000 (Atago, Japan) โดยการหยดสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยลงบนแผ่นปริซึม สังเกตเส้นสเกลโดยบันทึกค่า refractive index (RI) ที่วัดได้

2.4 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบผักเบี้ยทะเล ทดสอบตามวิธีของ Ayoola และคณะ [9] และ Maria และคณะ [10] ดังนี้ อัลคาลอยด์ (alkaloids) ด้วยวิธี Dragendorff's test ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ด้วยวิธี Shinoda test ซาโปนิน (saponins) ด้วยวิธี Foam height test แอนทราควิโนน (anthraquinones) ด้วยวิธี Sulfuric acid test ฟีนอล/แทนนิน (phenol/tannin) ด้วยวิธี $FeCl_3$ test สเตอรอยด์ (steroids) ด้วยวิธี Salkowski test เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) ด้วยวิธี Libarman-Burchard's test คาร์ดิแอก ไกลโคไซด์ (cardiac glycosides) ด้วยวิธี Keller-Killani test

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

2.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของสารสกัดหยาบด้วย High performance liquid chromatography (HPLC)

วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วย HPLC ตามวิธีของ Rungruang และคณะ [11] คอลัมน์ที่ใช้ Agilent Eclipse XDB-C18 reverse phase (ขนาด 4.6 mm x 150 mm, 5 μ m) เฟสเคลื่อนที่มี 2 ชนิด คือ 0.03 M orthophosphoric acid และ methanol สภาวะที่ใช้วิเคราะห์เป็น Isocratic elution system อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ตัวตรวจวัดแบบ UV-visible diode-array ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน epicatechin, vanillic acid และ 2-hydroxycinnamic acids (*o*-Coumaric acid)

2.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยด้วย Gas chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

การวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยของสารสกัดผักเบี้ยทะเลโดยใช้ SPME-GC-MS ประยุกต์จากงานวิจัยของ Gaytán และคณะ [12] ใช้ gas chromatograph (HP-6890) คู่กับ mass detector (HP- 5973) โดยใช้คอลัมน์ HP-5ms capillary (5% phenyl methyl siloxane, 30 m x 250 μ m x 0.25 μ m) อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 6 องศาเซลเซียส ต่อนาที จนได้อุณหภูมิสุดท้ายคือ 230 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที injection port ที่อุณหภูมิ 240 องศาเซลเซียส ฉีดตัวอย่างแบบ splitless ในอัตราส่วน 10:1 ใช้ฮีเลียมเป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตั้งอุณหภูมิของ quadrupole ที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส และความดัน 0.98 psi จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจาก national institute of standards and technology (NIST) mass spectral search program และ chemstation wiley spectral library โดยเทียบกับสารที่มี % quality match มากกว่าร้อยละ 90 คำนวณค่า Retention index (RI) เทียบกับอัลเคนมาตรฐาน (C_8 - C_{22})

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolics content)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu ประยุกต์จากงานวิจัยของ Rungruang และคณะ [11] โดยนำสารสกัดผักเป็ดทะเล 20 ไมโครลิตร ผสมกับ 10% folin & ciocalteu's reagent 100 ไมโครลิตรใน 96-well plate เป็นระยะเวลา 7 นาทีแล้วเติม 7.5% Na₂CO₃ 80 ไมโครลิตร ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (Biochrom รุ่น EZ Read 2000, United kingdom) ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงหน่วยเป็น mgGAE/g extract

2.7 การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

2.7.1 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] (Antioxidant activity; DPPH[•] assay)

ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ทดสอบโดยใช้อนุมูลอิสระ DPPH[•] ประยุกต์จากงานวิจัยของ Rungruang และคณะ [11] โดยใส่สารละลายตัวอย่าง 30 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate จากนั้นเติมสารละลาย 0.16 mM DPPH[•] 170 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ ร้อยละ 50 (IC₅₀) โดยเปรียบเทียบระหว่างค่า IC₅₀ ของสารสกัดหยาบ และน้ำมันหอมระเหย กับสารมาตรฐาน trolox และ L-ascorbic acid

2.7.2 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} (Antioxidant activity; ABTS^{•+} assay)

ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ทดสอบโดยใช้อนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ประยุกต์จากงานวิจัยของ Cai และคณะ [13] โดยนำ 7 mM ABTS ผสมกับ 2.45 mM K₂S₂O₈ ในอัตราส่วน 2:1 บ่มในที่มืด 16 ชั่วโมง นำไปเจือจางด้วยเอทานอล และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรให้อยู่ในช่วง 0.700 ± 0.050 ได้อนุมูลอิสระ ABTS^{•+} วิธีการทดลองนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate จากนั้นเติมสารละลาย ABTS^{•+} ที่เตรียมได้ 195 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 โดยเปรียบเทียบระหว่างค่า IC₅₀ ของสารสกัดหยาบ และน้ำมันหอมระเหย กับสารมาตรฐาน Trolox และ L-ascorbic acid

2.7.3 การทดสอบความสามารถในการแย่งจับ กับโลหะหนัก Cu²⁺ (Copper chelating activity)

การศึกษาความสามารถในการแย่งจับ Cu²⁺ ประยุกต์จากงานวิจัยของ Carrasco-Castilla และคณะ [14] โดยเติม 50 mM sodium acetate buffer (pH 6) 290 ไมโครลิตร ลงในหลอด centrifuge tube จากนั้นเติมน้ำมันหอมระเหย หรือสารสกัดหยาบ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม 4 mM pyrocatechol violet 6 ไมโครลิตร และเติม CuSO₄•5H₂O 10 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 632 นาโนเมตร เทียบกับสาร EDTA โดยคำนวณดังสมการ %Chelating activity = [(A_{blank} - A_{sample}) / A_{blank}] × 100

2.8 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์คอลลาจีเนส (Anti-collagenase inhibitory activity)

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส ใช้ EnzChek[®] collagenase/gelatinase kit (molecular probes) ประยุกต์จากงานวิจัยของ Pientawee-ratch และคณะ [15] ใช้ซับสเตรต (substrate) 2 ชนิด คือ collagen และ gelatin และใช้เอนไซม์ collagenase (ChC) จาก *Clostridium histolyticum* ใช้ความเข้มข้นของสารสกัด และน้ำมันหอมระเหย 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบใน fluorescence-based 96-well assays นำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง microplate reader รุ่น Infinite 200Pro (Switzerland) โดยกำหนดค่า excitation wavelength เท่ากับ 485 นาโนเมตร และ emission wavelength เท่ากับ 538 นาโนเมตร

2.9 การทดสอบฤทธิ์ในการการต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity)

ฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้วิธี disk diffusion ประยุกต์จากงานวิจัยของ Budiman และคณะ [16] ทดสอบกับเชื้อ 6 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Candida albicans* เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.5×10^8 CFU/mL เทียบกับ McFarland standard no. 0.5 จากนั้นนำมา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้อาหาร mueller hinton agar ส่วน *Candida albicans* ใช้ potato dextrose agar จากนั้นนำ sterile filter paper discs (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ชุบด้วยน้ำมันหอมระเหยหรือสารสกัดหยาบผักเบียร์ทะเล ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ และวางบนเพลท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดบริเวณที่มีการยับยั้งเชื้อ แสดงหน่วยเป็นมิลลิเมตร

2.10 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay)

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบผักเบียร์ทะเลต่อเซลล์ human skin fibroblast ATCC no. CRL 1947 (CCD-986 SK ด้วยวิธี MTT colorimetric assay ประยุกต์จากวิธีของ Rungruang และคณะ [11] โดยเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหาร RPMI 1640 medium ที่มี 5%FCS ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ร่วมกับ 5%CO₂ จากนั้นนำไปเลี้ยงอีก 24 ชั่วโมง และนำมาเติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 7.81 – 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงต่ออีก 24 – 72 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลาย MTT 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเติม DMSO 150 ไมโครลิตรต่อหลุม และ glycine buffer (pH= 10.5) 25 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และคำนวณร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์

2.11 การประเมินผลทางสถิติ (Statistical analysis)

รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

(mean \pm S.D.) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance: ANOVA) และความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS (SAS Institute, USA)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของสารสกัด

การสกัดผักเบียร์ทะเลด้วยวิธีการที่ต่างกัน 2 วิธี พบว่า สารสกัดผักเบียร์ทะเลที่สกัดด้วยวิธีการกลั่นพร้อมสกัด ได้สารสกัดอยู่ในรูปน้ำมันหอมระเหย ส่วนการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลได้เป็นสารสกัดหยาบ โดยมีร้อยละสารสกัด ค่าสี ($L^* a^* b^*$ และ h^*) และค่าการหักเหแสงต่างกัน ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยสารสกัดหยาบมีร้อยละสารสกัดมากกว่าน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากตัวทำละลายเอทานอลสามารถสกัดสารอื่นๆ นอกจากสารทุติยภูมิที่อยู่ในพืชออกมาได้ด้วย เช่น ไขมันที่ไม่มีกลิ่น (odorless fats) เม็ดสี (pigments) แวกซ์ (waxes) และน้ำมันหอมระเหย [17] แต่การกลั่นพร้อมสกัดได้เพียงน้ำมันหอมระเหยเนื่องจากเมื่อให้ความร้อนกับตัวอย่างพืช ไอรระเหยจากตัวอย่างจะมาเจอกับไอของตัวทำละลายที่บริเวณตรงกลางของชุดสกัด และถูกแยกบริเวณตำแหน่งที่รูปลวดของชุดสกัด โดยที่ตัวอย่างพืชไม่ได้สัมผัสกับตัวทำละลายที่ใช้สกัดทำให้ได้แค่สารที่ระเหยออกมา ซึ่งปริมาณน้ำมันหอมระเหยจะมีปริมาณไม่มากขึ้นกับชนิดของพืช [18] ในส่วนของค่าสี และลักษณะปรากฏ (ตารางที่ 1) พบว่า น้ำมันหอมระเหยมีค่าความสว่างสูงกว่า มีค่า a^* และ b^* เป็นบวก มีค่า h^* เท่ากับ 60.82 ± 0.72 แสดงว่ามีแนวโน้มเป็นสีเหลือง ส่วนสารสกัดหยาบมีสีเขียวเข้ม โดยมีค่าความสว่าง (L^*) น้อยกว่าน้ำมันหอมระเหย มีค่า a^* และ b^* เป็นบวก และ h^* เท่ากับ 180.18 ± 0.06 แสดงว่ามีแนวโน้มเป็นสีเขียวเข้ม เนื่องจากการสกัดด้วยเอทานอลจะได้สารอื่น เช่น แวกซ์ คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) และเม็ดสีออกมาด้วย [17] สำหรับค่าดัชนีหักเหแสงที่เป็นค่าที่บอกความบริสุทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย Ospina และคณะ [19] รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยมีค่าน้อยกว่าสารสกัด เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยมีลักษณะใสและมีความบริสุทธิ์กว่าซึ่งสอดคล้องกับค่าสีและลักษณะปรากฏที่ได้

ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากผักเบี้ยทะเล

ตัวอย่าง	ร้อยละสารสกัด (%)	ค่าสี				ค่าดัชนีหักเหแสง (20°C)	ลักษณะปรากฏ
		L*	a*	b*	h°		
สารสกัดหยาบ	30.30	21.73±0.02 ^b	6.69±0.58 ^a	2.09±0.01 ^b	180.18±0.06 ^a	1.506±0.006 ^a	สีเขียวเข้ม
น้ำมันหอมระเหย	0.14	38.97±0.92 ^a	3.78±0.05 ^b	6.77±0.39 ^a	60.82±0.72 ^b	1.457±0.004 ^b	สีเหลืองใส

หมายเหตุ : Mean±SD ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (N=3)

^{a,b} ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

3.2 การทดสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นและปริมาณสารฟีนอลิกรวม

การทดสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นในสารสกัดหยาบ ผักเบี้ยทะเล พบสารพิษเคมี 6 ชนิด คือ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน ฟีนอล/แทนนิน สเตอรอยด์ เทอร์พีนอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cybulska และคณะ [20] และ El-Amier และคณะ [21] ที่ศึกษาสารพิษเคมีเบื้องต้นของพืชในวงศ์ Aizoaceae ที่อยู่ในกลุ่มพืชชอบเกลือ (halophyte) พบว่ามีสารในกลุ่มเดียวกันทั้ง 6 ชนิด โดยสารในกลุ่มดังกล่าวเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ พืชส่วนมากพบสารในกลุ่มนี้ [10] ส่วนในน้ำมันหอมระเหยพบเพียงฟีนอลและเทอร์พีนอยด์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaur และคณะ

[22] ที่พบเทอร์พีนอยด์ และฟีนอลในน้ำมันหอมระเหย โดยที่เทอร์พีนอยด์พบมากในน้ำมันหอมระเหย และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย สำหรับปริมาณฟีนอลิกรวม พบว่า สารสกัดหยาบมีปริมาณฟีนอลิก สูงกว่าน้ำมันหอมระเหย (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Semiz และคณะ [23] ที่พบว่า สารสกัดมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงกว่าน้ำมันหอมระเหย ทั้งนี้เนื่องจากกรรมวิธีการสกัด รวมถึงความเข้มข้นของตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยที่เอทานอลมีประสิทธิภาพในการสกัดสารในกลุ่มฟีนอลิกสูงกว่าตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นต่ำที่ใช้ในการสกัดน้ำมันหอมระเหย และมีความปลอดภัยต่อการใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องสำอาง [23]

ตารางที่ 2 การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นและปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากผักเบี้ยทะเล

สารพิษเคมี	สารสกัดหยาบ	น้ำมันหอมระเหย
อัลคาลอยด์	-	-
ฟลาโวนอยด์	+	-
ซาโปนิน	+	-
แอนทราควิโนน	-	-
ฟีนอล/แทนนิน	+	+
สเตอรอยด์	+	-
เทอร์พีนอยด์	+	+

ตารางที่ 2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นและปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากผักเป็ดยะล (ต่อ)

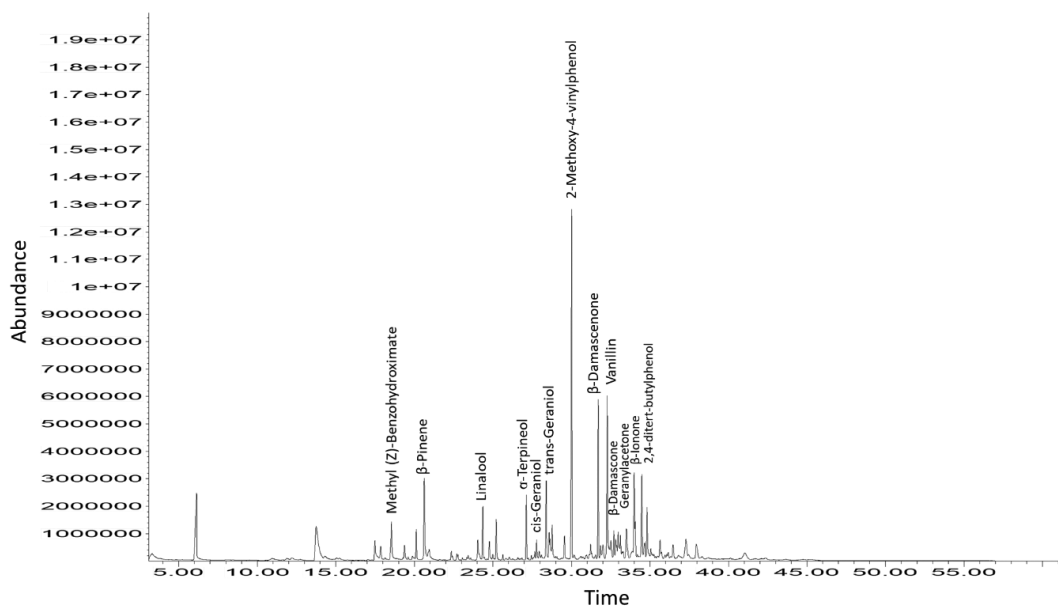
สารพฤกษเคมี	สารสกัดหยาบ	น้ำมันหอมระเหย
คาร์ดิแอก ไกลโคไซด์	+	-
ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g extract)	31.57±1.83	8.03±1.44

หมายเหตุ : (+) shows presence and (-) shows absence

3.3 ปริมาณสารสำคัญของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยผักเป็ดยะล

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารฟีนอลิกที่พบในสารสกัดหยาบผักเป็ดยะลด้วย HPLC พบสารในกลุ่มฟีนอลิก 3 ชนิด คือ epicatechin, vanillic acid และ 2-hydroxycinnamic acids โดยพบปริมาณ 2-hydroxycinnamic acids (190 µg/g extract) สูงสุด รองลงมาคือ epicatechin (90 µg/g extract) และ vanillic acid (40 µg/g extract) ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Al-Azzawi และคณะ [7] ที่พบว่า สารสกัดผักเป็ดยะลที่สกัดด้วยเอทานอลพบสาร (2R,3R)-(-)-epicatechin และยังพบว่าพืชในวงศ์เดียวกัน เช่น ผักเป็ดยะล (*Trianthema portulacastrum*) ก็พบสาร vanillic acid [24, 25, 26] นอกจากนี้ผักเป็ดยะลซึ่งเป็นพืชในกลุ่ม Halophyte species ส่วนมากจะพบสารฟีนอลิกในกลุ่ม hydroxycinnamic acids ที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [20] โดยที่สาร epicatechin มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ในการต้านชรา (anti-aging) [27] และยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น ต้านไวรัส HIV (anti-HIV) ต้านไวรัสตับอักเสบ (anti-hepatitic) ฤทธิ์ในการลดน้ำตาลในเลือด (anti-hyperglycemic) ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

เม็ดเลือดขาว (anti-leukemic) ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ (antimutagenic) ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ฤทธิ์ในการต้านไวรัส (antiviral) และฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย (anti-bacteria) [7] สำหรับการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยผักเป็ดยะลด้วยเทคนิค SPME-GC-MS ดังรูปที่ 1 พบว่ามีองค์ประกอบของสารทั้งหมด 13 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3 สารที่พบมากที่สุดคือ 2-Methoxy-4-vinylphenol (2M4VP) ร้อยละ 34.93 เป็นสารในกลุ่มฟีนอลที่พบในธรรมชาติ มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ และถูกใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งกลิ่นรส (Flavoring agent) สามารถพบ 2M4VP ได้ในแอปเปิล กานพลู ถั่วลิสง และสนเข็ม [28] สารที่พบรองลงมาคือ β -damascenone (14.82) เป็นสารในกลุ่มคีโตนที่เป็นส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยในพืชหลายชนิด เช่น กุหลาบ และผักบุ้งทะเล เป็นต้น สารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ และเป็นสารยับยั้งการหดเกร็งในลำไส้ (antispasmodic activity) [29] นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่มเทอร์พีน คือ β -pinene, linalool, α -terpineol, cis-geraniol และ trans-geraniol สารกลุ่มดังกล่าวมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ [30] สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaur [31] ที่พบว่าสารสกัดผักเป็ดยะลประกอบไปด้วยสารกลุ่ม เทอร์พีนอยด์ และฟีนอล



รูปที่ 1 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยผักเบ็ญทะเลที่วิเคราะห์ด้วย SPME-GC-MS

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันหอมระเหยผักเบ็ญทะเลที่วิเคราะห์ด้วย SPME-GC-MS

RT	RI	องค์ประกอบทางเคมี	% Relative peak area	Correlative peak area (*10 ⁷)	Molecular Formula	MW
17.49	648	Methyl (Z)-Benzohydroximate	3.48	4.1	C ₈ H ₉ NO ₂	151.16
20.95	898	β-Pinene	2.48	2.9	C ₁₀ H ₁₆	136.23
24.35	991	Linalool	4.35	5.1	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
27.13	1173	α-Terpineol	5.56	6.5	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
27.78	1175	cis-Geraniol	2.05	2.4	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
28.39	1177	trans-Geraniol	7.38	8.6	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
30.02	1272	2-Methoxy-4-vinylphenol	34.93	40.7	C ₉ H ₁₀ O ₂	150.17
31.71	1277	β-Damascenone	14.82	17.2	C ₁₃ H ₁₈ O	190.28
32.01	1368	Vanillin	2.60	3.0	C ₈ H ₈ O ₃	152.15
32.40	1369	β-Damascone	1.22	1.4	C ₁₃ H ₂₀ O	192.30
33.13	1371	Geranylacetone	1.99	2.3	C ₁₃ H ₂₂ O	194.31
33.99	1374	β-Ionone	9.32	10.8	C ₁₃ H ₂₀ O	192.30
34.48	1433	2,4-ditert-butylphenol	9.82	11.4	C ₁₄ H ₂₂ O	206.32

หมายเหตุ : * Retention time calculated (Wiley and National Institute Standards and Technology; NIST)

3.4 ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระและ ความสามารถในการแย่งจับโลหะ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยของผักเบียร์ทะเล ด้วยวิธี DPPH[•] assay และ ABTS^{•+} assay เป็นการทดสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระโดยดูจากการลดลงของสีที่เกิดจากปฏิกิริยา โดย ABTS^{•+} assay เกิดสีเขียวหรือฟ้าจาก ABTS^{•+} ส่วน DPPH[•] assay มีสีม่วง หากสารสกัดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ สีของอนุมูลอิสระดังกล่าวจะจางลง [32] ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] และ ABTS^{•+} แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดหยาบความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] และ ABTS^{•+} เท่ากับร้อยละ 78.17±0.55 และ 68.06±0.07 ตามลำดับ สูงกว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] และ ABTS^{•+} เท่ากับร้อยละ 10.43±1.38 และ 2.77±0.47 ตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•] และ ABTS^{•+} พบว่า สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ที่ต่ำกว่าน้ำมันหอมระเหย แต่มีฤทธิ์ที่น้อยกว่าสารมาตรฐาน trolox และ L-ascorbic acid (ตารางที่ 4) ทั้งนี้เนื่องจากในสารสกัดผักเบียร์ทะเลมีสารในกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งสารในกลุ่มฟีนอลิกมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และจากผลการวิเคราะห์สารสำคัญด้วย HPLC ที่พบในสารสกัดหยาบของผักเบียร์ทะเล คือสาร epicatechin, vanillic acid และ 2-hydroxycinnamic acids (o-Coumaric acid) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] และ ABTS^{•+} และความสามารถในการแย่งจับโลหะหนัก Cu²⁺ chelating ของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากผักเบียร์ทะเล

ตัวอย่าง	ฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระ DPPH [•] IC ₅₀ (mg/mL)	ฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระ ABTS ^{•+} IC ₅₀ (mg/mL)	ฤทธิ์คีเลชัน Cu ²⁺ (mg EDTA/g extract)
สารสกัดหยาบ	1.90±0.0200 ^b	2.77±0.0058 ^b	37.18±0.86 ^a
น้ำมันหอมระเหย	>5.00 ^a	>5.00 ^a	15.82±0.50 ^b
Trolox	0.04±0.0057 ^c	0.06±0.0001 ^c	-
L-ascorbic acid	0.03±0.0057 ^c	0.02±0.0003 ^d	-

หมายเหตุ : Mean±SD ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (N=3)

^{a,b} ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

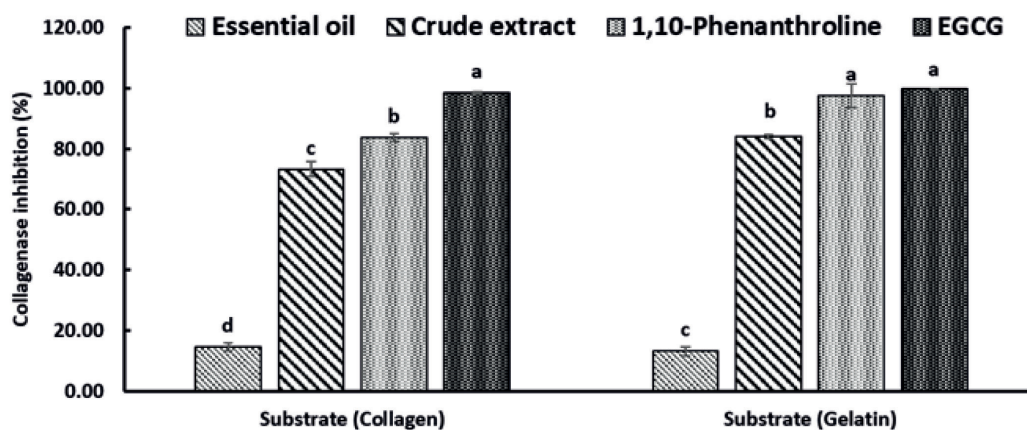
และสารประกอบฟีนอลิกมีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ เมื่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระจะสูงขึ้น โดยสารฟีนอลิกมีคุณสมบัติในการปกป้องเซลล์จากอนุมูลอิสระได้ด้วย [20, 23, 33]

สำหรับ Cu²⁺ chelating เป็นการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สามารถจับกับโลหะหนักได้ เช่น Fe²⁺ หรือ Cu²⁺ ซึ่งการที่ไอออนของโลหะมากเกินไปจะเร่งการเกิดปฏิกิริยา oxidation ส่งผลต่อการสร้างอนุมูลอิสระ เช่น reactive oxygen species (ROS) และมีผลต่อการทำลาย DNA การเกิด lipid peroxidation และส่งผลต่อการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น มะเร็ง (cancer) โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) เบาหวาน (diabetes) ภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) และการอักเสบชนิดเรื้อรัง (chronic inflammation) [34] การวัดความสามารถในการแย่งจับโลหะด้วยวิธี Cu²⁺ chelating เป็นการวัดค่าสีฟ้าที่เกิดจาก Cu²⁺-pyrocatechol violet complex และสีฟ้าจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือสีจางลงหากสารนั้นมีความสามารถในการจับกับ Cu²⁺ ได้ ผลการศึกษาสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยของผักเบียร์ทะเลสอดคล้องกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ที่พบว่ามีฤทธิ์ในการจับกับโลหะหนักว่าน้ำมันหอมระเหยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4 เนื่องจากสารสกัดหยาบพบสารฟีนอลิกปริมาณมากกว่าน้ำมันหอมระเหย และสารฟีนอลิกที่พบ เช่น ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และ epicatechin มีคุณสมบัติในการจับกับโลหะหนัก [35]

3.5 ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส

เอนไซม์คอลลาจิเนส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายคอลลาเจนได้ผิวหนัง และมีส่วนในการยับยั้งการสร้าง procollagen type I ที่บริเวณผิวหนังส่งผลต่อความยืดหยุ่นของผิวหนังและทำให้เกิดริ้วรอย [36] ผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสของสารสกัดหยาบ และน้ำมันหอมระเหยผักเบ็ญทะเลโดยใช้ epigallocatechin gallate (EGCG) และ 1,10-phenanthroline เป็นสารมาตรฐาน พบว่า สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหย ทั้งการใช้คอลลาเจนและเจลาตินเป็นซับสเตรต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 2) แต่มีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐานทั้ง 2 ชนิด โดยสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งเอนไซม์คอลลา-

จิเนสชนิดที่ใช้เจลาตินเป็นซับสเตรตได้สูงที่สุด โดยมีร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 83.95 ± 0.73 และใช้คอลลาเจนเป็นซับสเตรต มีร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 73.27 ± 2.40 ส่วนน้ำมันหอมระเหย ทั้งการใช้เจลาตินและคอลลาเจนเป็นซับสเตรต มีร้อยละการยับยั้งเพียง 13.12 ± 1.52 และ 14.52 ± 1.44 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดหยาบมีสารในกลุ่มฟีนอลิกปริมาณสูง ซึ่งโครงสร้างของของสารในกลุ่มฟีนอลิกมีส่วนของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่สามารถไปจับกับหมู่ฟังก์ชันที่บริเวณ side chain ของเอนไซม์ นอกจากนี้สารในกลุ่มฟีนอลิกส่วนมากมีคุณสมบัติเป็น chelators ที่สามารถจับกับ Zn^{2+} ไอออน บริเวณ active site ของเอนไซม์ ส่งผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ [11,15]



รูปที่ 2 ฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากผักเบ็ญทะเล

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากผักเบ็ญทะเล

ตัวอย่าง	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>C. albicans</i>
สารสกัดหยาบ	9.17±1.26	2.00±0.50	1.17±0.72	1.29±0.31	3.17±1.26	–
น้ำมันหอมระเหย	3.54±2.09	1.54±0.79	–	–	–	2.25±0.00
Gentamicin	17.42±0.19	10.58±0.72	8.50±0.65	11.42±0.51	10.92±1.46	–

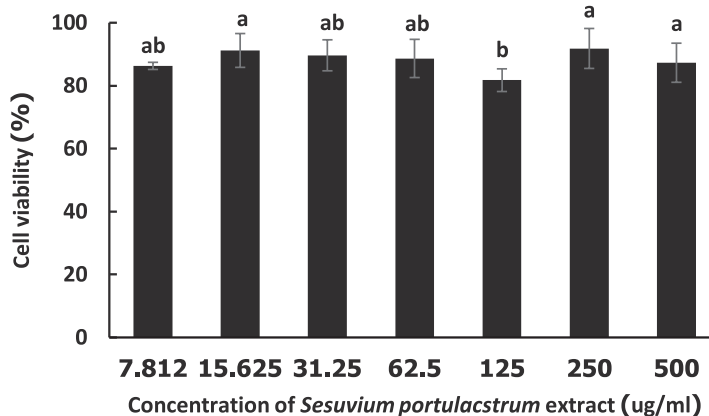
หมายเหตุ : เครื่องหมาย – หมายถึง ไม่พบ Zone of inhibition

3.6 ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

การทดสอบการยับยั้งการเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยผักเบ็ญทะเลเทียบกับยา gentamicin (2 µg/mL) พบว่า สารสกัดหยาบผักเบ็ญทะเลที่ ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* และ *S. epidermidis* แต่ไม่ยับยั้ง *C. albicans* ดังแสดงในตารางที่ 5 สำหรับน้ำมันหอมระเหย พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *E. coli* และ *C. albicans* ส่วนสารมาตรฐาน gentamicin มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีกว่าสารสกัดหยาบ และน้ำมันหอมระเหยผักเบ็ญทะเล แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *C. albicans* สอดคล้องกับงานวิจัยของ Al-Azzawi และคณะ [7] พบว่า สารสกัดผักเบ็ญทะเลสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เนื่องจากสารสกัดหยาบมีสารในกลุ่มฟีนอลิกส่วนน้ำมันหอมระเหยมีสารในกลุ่มเทอร์พีน ซึ่งสารในกลุ่มฟีนอลิก และสารในกลุ่มเทอร์พีนของน้ำมันหอมระเหยเข้าไปมีผลต่อบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียตำแหน่ง cytoplasmic membrane และ membrane proteins [37,38,41,42] ส่งผลให้ของเหลวภายในเซลล์รั่วออกมาภายนอกเซลล์ เกิดการ coagulation ของไซโทพลาซึม และเกิดความไม่สมดุลภายในเซลล์ทำให้เซลล์ตาย นอกจากนี้ยังส่งผลต่อปัจจัยต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น แรงขับเคลื่อนโปรตอน (proton-motive force) การไปยับยั้ง respiratory chain การถ่ายเทอิเล็กตรอน (electron transfer) และกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรม (DNA และ RNA) [41,43]

3.7 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง CCD-986 SK ของสารสกัดหยาบผักเบ็ญทะเล

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังเลือกสารสกัดหยาบมาทำการศึกษา เนื่องจากสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดีกว่าน้ำมันหอมระเหย สามารถที่จะพัฒนาต่อยอดเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและความงามได้ โดยศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง Human skin fibroblast ATCC no. CRL 1947 (CCD-986 SK) ด้วยวิธี MTT colorimetric assay เป็นวิธีการศึกษาความสามารถของ Cofactor และเอนไซม์ในไมโทคอนเดรียที่รีดิวซ์สาร MTT ที่มีสีเหลืองให้กลายเป็นผลึก Formazan ที่มีสีม่วง เซลล์ที่ตายมีลักษณะใสไม่มีสี ส่วนผลึกสีม่วงแสดงถึงความมีชีวิตของเซลล์ [44] โดยทดสอบกับสารสกัดผักเบ็ญทะเล ความเข้มข้น 7.812–500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เซลล์มีร้อยละการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 ทุกความเข้มข้นของสารสกัด ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยที่ความเข้มข้นสารสกัดผักเบ็ญทะเล 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มีร้อยละการรอดชีวิต เท่ากับ 87.28 ± 6.21 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผักเบ็ญทะเลไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และมีค่า IC_{50} มากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถนำสารสกัดไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นได้โดยที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ [45]



รูปที่ 3 ความเป็นพิษต่อเซลล์ Human skin fibroblast ATCC no.CRL 1947 (CCD-986 SK) ของสารสกัดหยาบผักเบ็ญทะเล ($p \leq 0.05$)

4. สรุป

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบผักเบี้ยทะเลพบสารฟลาโวนอยด์ 6 กลุ่ม คือ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน ฟีนอล/แทนนิน สเตอรอยด์ เทอร์พีนอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่ามีสาร epicatechin, vanillic acid และ 2-hydroxycinnamic acids (o-coumaric acid) ส่วนน้ำมันหอมระเหยพบฟีนอล และเทอร์พีนอยด์ เมื่อวิเคราะห์ด้วย SPME-GC-MS พบว่ามีองค์ประกอบของสารระเหยทั้งหมด 18 ชนิด สารที่พบมากที่สุดคือ 2M4VP, β -damascenone และสารในกลุ่มเทอร์พีน เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส และยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ดีกว่าน้ำมันหอมระเหย โดยที่สารสกัดหยาบของผักเบี้ยทะเลที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง ผลการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า ผักเบี้ยทะเลที่เป็นวัชพืชที่พบปกคลุมหน้าดินสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหรือใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพได้อย่างปลอดภัย

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสวนดุสิตที่ให้ทุนสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณคณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

1. Rabhi, M., Giuntini, D., Castagna, A., Remorini, D., Baldan, B., Smaoui, A. and Ranieri, A., 2010, "Sesuvium portulacastrum Maintains Adequate Gas Exchange, Pigment Composition, and Thylakoid Proteins Under Moderate And High Salinity," *Journal of Plant Physiology*, 167 (16), pp. 1336-1341.
2. Magwa, M.L., Gundidza, M., Gweru, N. and Humphrey, G., 2006, "Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil From the Leaves of *Sesuvium portulacastrum*," *Journal of Ethnophar-*

macology, 103 (1), pp. 85-89.

3. Kumar, A., Kumari, P.S. and Somasundaram, T., 2014, "Gas Chromatography-Mass Spectrum (GC-MS) Analysis of Bioactive Components of the Methanol Extract of Halophyte, *Sesuvium portulacastrum* L.," *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, 3 (3), pp. 766-772.
4. Chandrasekaran, M., Senthilkumar, A. and Venkatesalu, V., 2011, "Antibacterial and Antifungal Efficacy of Fatty Acid Methyl Esters from the Leaves of *Sesuvium portulacastrum* L.," *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15, pp. 775-780.
5. Siphimalani, A.T., Banerji, A. and Chadha, M.S., 1972, "Biosynthesis and Interconversion Phytoecdysones in *Sesuvium portulacastrum* L.," *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 11, pp. 692-693.
6. Wilborn, C.D., Taylor, L.W., Campbell, B.I., Kerksick, C., Rasmussen, C.J., Greenwood, M. and Kreider, R.B., 2006, "Effects of Methoxyisoflavone, Ecdysterone, and Sulfo-polysaccharide Supplementation on Training Adaptations in Resistance-Trained Males," *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 3 (2), p. 19.
7. Al-Azzawi, A., Alguboori, A., Hachim, M. Y., Najat, M., Al Shaimaa, A. and Sad, M., 2012, "Preliminary Phytochemical and Antibacterial Screening of *Sesuvium portulacastrum* in the United Arab Emirates," *Pharmacognosy research*, 4 (4), p. 219.
8. Limpaphayom, V., Laohakunjit, N., Duzzadeelawon, P. and Vamasiri, K., 2014, "Chemical Compositions and Antioxidant Activity of *Zingiber officinale* Roscoe Essential Oils," *KMUTT Research and Development Journal*, 37 (3), pp. 297-312. (In Thai)
9. Ayoola, G.A., Coker, H.A., Adesegun, S.A., Adepoju-Bello, A.A., Obaweya, K., Ezennia, E.C. and

- Atangbayila, T.O., 2008, "Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (3), pp. 1019-1024.
10. Maria, R., Shirley, M., Xavier, C., Jaime, S., David, V., Rosa, S. and Jodie, D., 2018, "Preliminary Phytochemical Screening, Total Phenolic Content and Antibacterial Activity of Thirteen Native Species from Guayas province Ecuador," *Journal of King Saud University-Science*, 30 (4), pp. 500-505.
11. Rungruang, R., Modsuwan, J., Srisukong, A. and Kaisangsri, N., 2019, Antioxidant and Anti-wrinkle Activities of Tubtim Chumphae Rice Extract for Application in Facial Cosmetics," *KMUTT Research & Development Journal*, 49 (1), pp. 95-107. (In Thai)
12. Gaytán, V.G., Mendoza, M., Hernández, S.M., Trejo-Téllez, L.I., Martha E. Pedraza Santos, M.E. and Ponce G.V., 2013, "Volatile Components in the Flower, Pedicellate Ovary and Aqueous Residue of *Cymbidium* sp. (ORCHIDACEAE)," *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, 3, pp. 212-218.
13. Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H., 2004, "Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer," *Life Sciences*, 75, pp. 2157-2184.
14. Carrasco-Castilla, J., Hernández-Álvarez, A. J., Jiménez-Martínez, C., Jacinto-Hernández, C., Alaiz, M., Girón-Calle, J. and Dávila-Ortiz, G., 2012, "Antioxidant and Metal Chelating Activities of Peptide Fractions from Phaseolin and Bean Protein Hydrolysates," *Food Chemistry*, 135 (3), pp. 1789-1795.
15. Pientaweeratch, S., Panapisal, V. and Tansirikongkol, A., 2016, "Antioxidant, Anti-Collagenase and Anti-Elastase Activities of *Phyllanthus emblica*, *Manilkara zapota* and Silymarin: An *in vitro* Comparative Study for Anti-Aging Applications," *Pharmaceutical Biology*, 54 (9), pp. 1865-1872.
16. Budiman, A., Aulifa, D.L., Kusuma, A.S., Kurniawan, I.S. and Sulastris, A., 2017, "Peel-Off Gel Formulation from Black Mulberries (*Morus nigra*) Extract as Anti-Acne Mask," *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 7 (9), pp. 1-8.
17. Oztekin, S. and Martinov, M., 2014, *Medicinal and Aromatic Crops: Harvesting, Drying, and Processing*, CRC Press, Boca Raton.
18. Liao, P.H., Yang, H.H., Wu, P.C., Abu Bakar, N.H. and Urban, P.L., 2019, "On-Line Coupling of Simultaneous Distillation-Extraction Using the Likens-Nickerson Apparatus with Gas Chromatography," *Analytical Chemistry*, 92 (1), pp. 1228-1235.
19. Ospina, J.D., Tovar, C.D.G., Flores, J.C.M. and Orozco, M.S.S., 2016, "Relationship Between Refractive Index and Thymol Concentration in Essential Oils of *Lippia origanoides* Kunth Chilean," *Journal of Agricultural and Animal Sciences (ex Agro-Ciencia)*, 32 (2), pp. 127-133.
20. Cybulska, I., Brudecki, G., Alassali, A., Alassali, M. and Brown, J. J., 2014, "Phytochemical Composition of Some Common Coastal Halophytes of the United Arab Emirates," *Emirates Journal of Food and Agriculture*, pp. 1046-1056.
21. El-Amier, Y.A., Haroun, S.A., El-Shehaby, O.A. and Al-hadithy, O.N., 2016, "Antioxidant and Antimicrobial of Properties of Some Wild Aizoaceae Species Growing in Egyptian Desert," *Journal of Environmental Sciences*, 45 (1), pp. 1-10.
22. Kaur, K., Kaushal, S. and Rani, R., 2019, "Chemical Composition, Antioxidant and Antifungal Potential of Clove (*Syzygium aromaticum*) Essential Oil, its Major Compound and its Derivatives," *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22 (5), pp. 1195-1217.
23. Semiz, G., Semiz, A. and Mercan-Doan, N., 2018, "Essential Oil Composition, Total Phenolic Content,

- Antioxidant and Antibiofilm Activities of Four Origanum Species from Southeastern Turkey,” *International Journal of Food Properties*, 21 (1), pp. 194-204.
24. Gaddeyya, G. and Kumar, P.R., 2016, “A Comprehensive Review on Ethnobotany and Photochemistry of an Herbal Weed *Trianthema portulacastrum* L.,” *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5 (4), pp. 25.
25. Al Sherif, E.A. and Gharieb, H.R., 2011, “Allelochemical Effect of *Trianthema portulacastrum* L. on *Amaranthus viridis* L. Supports the Ecological Importance of Allelopathy,” *African Journal of Agricultural Research*, 6 (32), pp. 6690-6697.
26. Bashir, S., Abbas, S., Mandukhail, S.R. and Gilani, A.H., 2018, “The Airway Relaxant Effect of Horse Purslane, *Trianthema portulacastrum*, Linn. (Aizoaceae), is Mediated through Dual Blockade of Muscarinic Receptors and Ca^{2+} Influx,” *Journal of Pharmaceutical Research International*, pp. 1-9.
27. Si, H., Lai, C. Q. and Liu, D., 2019, “Dietary Epicatechin, A Novel Anti-Aging Bioactive Small Molecule,” *Current Medicinal Chemistry*.
28. Jeong, J.B., Hong, S.C., Jeong, H.J. and Koo, J.S., 2011, “Anti-Inflammatory Effect of 2-Methoxy-4-Vinylphenol via the Suppression of NF-KB and MAPK Activation, And Acetylation of Histone H3,” *Archives of Pharmacal Research*, 34 (12), pp. 2109-2116.
29. Pongprayoon, U., Baeckström, P., Jacobsson, U., Lindström, M. and Bohlin, L., 1992, “Antispasmodic Activity of β -damascenone and E-phytol Isolated from Ipomoea Pes-caprae,” *Planta Medica*, 58 (01), pp. 19-21.
30. Joshi, S., Chanotiya, C.S., Agarwal, G., Prakash, O., Pant, A.K. and Mathela, C.S., 2008, “Terpenoid Compositions, and Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Rhizome Essential Oils of Different Hedychium Species,” *Chemistry and Biodiversity*, 5 (2), pp. 299-309.
31. Kaur, M., 2015, “Review on Sea purslane,” *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3 (5).
32. Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S.I. and Chun, O.K., 2011, “Comparison of ABTS/DPPH Assays to Measure Antioxidant Capacity in Popular Antioxidant-Rich US Foods,” *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (7), pp. 1043-1048.
33. Ghorbanpour, M., 2015, “Major Essential oil Constituents, Total Phenolics and Flavonoids Content and Antioxidant Activity of *Salvia officinalis* Plant in Response to Nano-Titanium Dioxide,” *Indian Journal of Plant Physiology*, 20 (3), pp. 249-256.
34. Jomova, K. and Valko, M., 2011, “Advances in Metal-Induced Oxidative Stress and Human Disease,” *Toxicology*, 283, pp. 65-87.
35. Guo, M., Perez, C., Wei, Y., Rapoza, E., Su, G., Bou-Abdallah, F. and Chasteen, N.D., 2007, “Iron-binding Properties of Plant Phenolics and Cranberry’s Bio-effects,” *Dalton Transactions*, 43, pp. 4951-4961.
36. Madan, K. and Nanda, S., 2018, “*In-vitro* Evaluation of Antioxidant, Anti-Elastase, Anti-Collagenase, Anti-Hyaluronidase Activities of Safranal and Determination of its Sun Protection Factor in Skin Phototaging,” *Bioorganic chemistry*, 77, pp. 159-167.
37. Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X. and Ren, L., 2015, “Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism,” *Current Medicinal Chemistry*, 22 (1), pp. 132-149.
38. Mandalari, G., Bennett, R.N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C.B. and Narbad, A., 2007, “Antimicrobial Activity of Flavonoids Extracted from Bergamot (*Citrus bergamia* Risso) Peel, a Byproduct of the Essential Oil Industry,” *Journal of Applied Microbiology*, 103 (6), pp. 2056-2064.
39. Proestos, C., Boziaris, I.S., Nychas, G.J. and Komaitis, M., 2006, “Analysis of Flavonoids and Phe-

- nolic Acids in Greek Aromatic Plants: Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity,” *Food Chemistry*, 95 (4), pp. 664-671.
40. Bahraminejad, S., Asenstorfer, R. E., Riley, I.T. and Schultz, C.J., 2008, “Analysis of the Antimicrobial Activity of Flavonoids and Saponins Isolated from the Shoots of Oats (*Avena sativa* L.),” *Journal of Phytopathology*, 156 (1), pp. 1-7.
41. Burt, S., 2004, “Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods-A Review,” *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3), pp. 223-253.
42. Shan, B., Cai, Y., Brooks, J. and Corke, H., 2007, “Antibacterial Properties and Major Bioactive Components of Cinnamon Stick (*Cinnamomum burmannii*): Activity Against Foodborne Pathogenic Bacteria,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (14): pp. 5484-5490.
43. Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R. and Martin-Belloso, O., 2009, “Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-Cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials,” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8 (3), pp. 157-180.
44. Sylvester, P.W., 2011, Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability, Drug Design and Discovery, Humana Press, pp. 157-168.
45. Limtrakul, P., Yodkeeree, S., Thippraphan, P., Punfa, W. and Srisomboon, J., 2016, “Anti-Aging and Tyrosinase Inhibition Effects of *Cassia fistula* Flower Butanolic Extract,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16 (1), pp. 497.