

การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดใบนางดำ เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

Solvent Optimization of Pitang Leaves (*Gynochthodes sub lanceolata* Miq.) Extraction for Bacterial Growth Inhibition

จารุวรรณ ประดับแสง^{1*}, สุชาดา แสงวิมาน¹, สุพัตน์ ศรีสวัสดิ์², และไอนุน ยีปอง¹

Charuwan Pradabsang^{1*}, Suchada Saengwiman¹, Supat Srisawat², and Inun Yipong¹

(Received: 15 May,2023 ; Revised: 1 June,2023 ; Accepted 15 June,2023)

บทคัดย่อ

ย่านนางดำหรือปีแด (*Gynochthodes sub lanceolata* Miq.) เป็นพืชสมุนไพรที่พบได้ในภาคใต้ของประเทศไทย ส่วนใหญ่นำไปมาใช้เป็นสผสมอาหารที่ได้จากธรรมชาติฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชชนิดนี้มีความน่าสนใจจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้คือเพื่อเปรียบเทียบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดใบนางดำและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ตัวทำละลายที่ใช้สกัดในการทดลองนี้ คือ น้ำ เอทานอล อะซิโตน และเอทิลอะซิเตต พบว่า ค่าร้อยละของผลผลิต (%yield) ของสารสกัดอยู่ในช่วงระหว่าง 1.14 ถึง 3.2 โดยสารสกัดจากตัวทำละลายน้ำมีค่า %yield สูงที่สุด คือ 3.2 เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย โดยใช้วิธี disc diffusion พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดใบนางดำ คือ อะซิโตน มีค่าเฉลี่ยวงใสของการยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 6051 เท่ากับ 10.00 ± 0.667 มิลลิเมตร และของ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P เท่ากับ 6.90 ± 0.875 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดจากตัวทำละลายอะซิโตนของใบนางดำสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าตัวทำละลายอื่น อย่างไรก็ตามสมุนไพรชนิดนี้ต้องมีการศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาต่อไป เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษในสิ่งมีชีวิต

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวราชนครินทร์

² คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏวราชนครินทร์

¹ Science and Technology Princess of Naradhiwas University

² Medicine Princess of Naradhiwas University

*Corresponding Author, E-mail: charuwan.p@pnu.ac.th

คำสำคัญ: ใบนางดำ ตัวทำละลาย การสกัด คุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรีย

Abstract

Nang dam or Pitang (*Gynochthodes subanceolata* Miq.) is a medicinal plant, found in southern Thailand. The leaves are mostly used as a natural food coloring agent and the studies on the pharmacological properties of this plant are needed. The aim of this study was to compare the effectiveness of solvents used for extracting Nang dam leaves and investigate their antibacterial activity. Water, ethanol, acetone, and ethyl acetate were used to extract the leaves. The extraction yield of the crude ranged from 1.14 to 3.2. The highest yield was found in the water-soluble extract (3.2%). However, acetone-soluble extract rendered the highest antibacterial activity using the disc diffusion method, this concluded that acetone was the suitable solvent for extracting Nang dam leaves. The average inhibition zone for *Bacillus subtilis* ATCC 6051 was 10.00 ± 0.667 mm, and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P was 6.90 ± 0.875 mm, respectively. Therefore, the acetone extract of Nang dam leaves inhibited Gram-positive bacteria more effective than other solvents. However, its pharmacological properties, such as antioxidant activity and toxicity in living organisms required further studies.

Keywords: Pitang leaves, Solvent, Extraction, Antibacterial property

บทนำ

พืชพรรณธรรมชาติในสามจังหวัดชายแดนใต้มีความหลากหลายของสายพันธุ์ทำให้ประชาชนรู้จักการนำพืชเหล่านี้มาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เช่น เป็นอาหาร สร้างที่อยู่อาศัย และใช้เป็นยารักษาโรค รวมทั้งพืชสมุนไพรบางชนิดถูกนำมาใช้รักษาบาดแผลและยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แต่ยังไม่มีการศึกษาทางจุลชีววิทยาถึงประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ของสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์มากนัก จากการวิจัยพบว่าปัจจุบันสามจังหวัดชายแดนภาคใต้นิยมใช้สมุนไพรในการรักษาโรคมามากถึงร้อยละ 73.8 และรู้จักการนำสมุนไพรมาใช้

หลากหลายประมาณ 44 ชนิด เพื่อรักษาโรคและกลุ่มอาการต่างๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในภูมิภาคอื่นๆ ในประเทศไทย (อรุณพร และคณะ, 2543; เกศริน, 2544; พิสิฐ, 2552) พืชพรรณประจำถิ่นที่นำมาใช้รักษาโรคแตกต่างกันไปตามแต่ละพื้นที่ โดยมากการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคจะนำมาใช้รักษาโรคหรือกลุ่มอาการพื้นฐานที่ประสบอยู่เป็นประจำ

พืชใบย่านางดำ (Pitang leaves) หรือใบพันสมอเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Rubiaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Gynochthodes sub lanceolata* Miq. เป็นไม้ลำต้นเกลียวเลื้อยตามต้นไม้และดิน ส่วนใหญ่พบมากทางภาคใต้โดยเฉพาะในสามจังหวัดชายแดนภาคใต้ และปัจจุบันประชาชนในสามจังหวัดชายแดนภาคใต้จะใช้ใบย่านางมาทำเป็นสผสมอาหารโดยเฉพาะนำมาใช้เป็นสีของข้าวยา เพราะในใบย่านางมีส่วนประกอบของสารสีม่วง หรือสารแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ดังรูปที่ 1 ต้นนางดำ และรูปที่ 2 ใบและผลของนางดำ จากการศึกษาพบว่าใบย่านางมีสารต้านอนุมูลอิสระและพฤกษศาสตร์เคมี เช่น แอนโทไซยานิน ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ ไกลโคไซด์ ซาโปนิน กรดไขมัน และกรดอะมิโน โดยเฉพาะสารแอนโทไซยานินที่พบในพืชชนิดนี้มีปริมาณมาก รวมทั้งสารแอนโทไซยานินมีคุณสมบัติเป็นสารรงควัตถุ (Pigment) ที่สามารถให้สีแดง สีม่วงและสีน้ำเงิน ใช้เป็นสารให้สี (Coloring agent) พบในพืชทั้งในดอกและผลของผักและผลไม้ (Adisakwattana *et al.*, 2020) โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดแอนโทไซยานิน ได้แก่ น้ำ เอทานอล เมทานอลและ อะซีโตน โครงสร้างของแอนโทไซยานินเป็นสารประกอบกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) โดยประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ อะไกลโคน (Aglycone) น้ำตาล (Sugar) และหมู่เอซิล (Acyl group) แอนโทไซยานินมีโครงสร้างหลักเป็น anthocyanidins หรือเรียกว่า aglycone โดยมีคาร์บอนทั้งหมด 15 อะตอม โครงสร้างพื้นฐานเป็นแบบ C6-C3-C6 คือ glycoside ของ 2-phenyl benzopyrylium หรือ flavylum cation (Fang, Haider, Pervaiz & Songtao, 2017) เชื่อมต่อกัน โดยมีอยู่ประมาณ 6 ชนิด ที่จะเจอบ่อยในพืช ได้แก่ เดลฟินิดิน (Delphinidin) ไซยานิดิน (Cyanidin) เพทูนิดิน (Petunidin) เพลาโกนิดิน (Pelargonidin) พีโอนิดิน (Peonidin) และมอลวิดิดิน (Malvidin) (Promyos *et al.*, 2020) แอนโทไซยานินสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ นอนอะซิลเลตเทด แอนโทไซยานิน (Non-acylated anthocyanin) และอะซิลเลตเทด แอนโทไซยานิน (Acylated anthocyanin) นอกจากนี้ประโยชน์ของแอนโทไซยานินจัดเป็นพืชที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) โดยช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โรคเบาหวาน โรคมะเร็งชนิดนี้เองก็มีฤทธิ์ช่วยเสริมให้ร่างกายต่อต้านเชื้อโรค สมานแผล เสริมภูมิคุ้มกันในร่างกายให้ดีขึ้น รวมทั้งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Bacteria) ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคท้องร่วง และอาหารเป็นพิษ (Hagiwara *et al.*, 2001; Pradabsang, Saengwiman, Srisawat & Srichuay, 2015) จากงานวิจัยพบว่าวิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid Phase Extraction)

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทำให้แอนโทไซยานินบริสุทธิ์ โดยการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินสามารถแบ่งเป็น 2 แบบ คือ การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด เช่น วิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล (pH-Differential) ด้วยสเปกโตรมิเตอร์และการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแอนโทไซยานิน โดยใช้เครื่อง โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) การย่อยด้วยกรด และการย่อยด้วยด่างหรือการใช้แมสสเปกโตรมิเตอร์เป็นเทคนิคที่ใช้ร่วมกับเครื่อง HPLC เพื่อการวิเคราะห์แอนโทไซยานินที่ไม่ทราบชนิด (กรกต สุกานดา และ คณิต, 2555) นอกจากนี้การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแอนโทไซยานินโดยใช้วิธี HPLC จะอาศัยความมีขั้วของสารแอนโทไซยานินในการแยก โดยใช้วิธี reverse—phase HPLC จะแยกตามความเป็นขั้วได้แก่ delphinidin < cyaniding < Petunidin < Pelargonidin < Peonidin < Malvidin (สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553)



รูปที่ 1 ลักษณะต้นของย่านางดำ (*G. subulanceolata* Miq., Pitang)



รูปที่ 2 ลักษณะใบและผลของย่านางดำ (*G. subulanceolata* Miq., Pitang)

ปัจจุบันเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคมียากหลายสามารถพบได้ทั้งในดิน น้ำและอากาศ ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ก่อโรค ได้แก่ *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเป็นแท่ง (Rod) อยู่ใน Family *Enterobacteriaceae* สามารถพบได้ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเกือบทุกชนิด นอกจากนี้ยังเป็น

เชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วง และโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะสามารถติดต่อได้ทางอาหาร โดยมีการกระจายเชื้อผ่านมือที่ปนเปื้อนแมลงสาบและแมลงวัน (มัลลีย์, 2545) ส่วน *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (Cocci) โดยอยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ต้องการอากาศในการเติบโต (Aerobic) และไม่สร้างสปอร์ นอกจากนี้ *S. aureus* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญ มีการเพิ่มจำนวนในบาดแผลซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดฝีหนอง รวมทั้งเป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีร่างกายอ่อนแอทำให้เกิดโรคปอดบวมที่ทำให้มีอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 50 (นิติพงษ์ และเอกชัย, 2554) ส่วน *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง (Rod) สามารถสร้างสปอร์ โดยเป็นตัวแทนของเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการคออักเสบ ปวดท้องอย่างรุนแรง มีไข้ อาเจียน ท้องเสียเป็นเลือด และซ็อก มีอัตราการตายสูง (นงลักษณ์, 2547)

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ต้องการศึกษาสารออกฤทธิ์เพื่อยับยั้งแบคทีเรียในสมุนไพรท้องถิ่นที่นิยมใช้ในสามจังหวัดชายแดนภาคใต้ เพื่อทราบถึงคุณสมบัติ การออกฤทธิ์ และเป็นแนวทางในการใช้พืชสมุนไพรที่ถูกต้องและเพิ่มมูลค่าของพืชสมุนไพรท้องถิ่นในสามจังหวัดชายแดนภาคใต้เหล่านี้ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำ เอทานอล อะซิโตน และเอทิลอะซิเตทที่เหมาะสมในการสกัดใบนางดำ
2. เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดหยาบจากใบนางดำในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยใช้แบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6051, *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 6538P

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย

ใบนางดำ เก็บจากตำบลยี่งอ อำเภอ ยี่งอ จังหวัดนราธิวาส ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน โดยวิธีการเด็ดใบไม่แก่หรืออ่อนเกินไป รวมทั้งใบต้องไม่เป็นโรค

2. การสกัดสารจากใบนางดำ

2.1 การสกัดด้วยน้ำ

นำใบนางคำมาล้างให้สะอาดผึ่งให้แห้ง และนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นชั่ง 50 กรัม ใส่ใน ปีกเกอร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำปริมาตร 250 มิลลิลิตรในปีกเกอร์ นำมาต้มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมากรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ ผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 สารสกัดที่ได้นำมาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) เมื่อได้สารสกัดนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) จะได้สารสกัดหยาบ ซึ่งน้ำหนักของสารที่สกัดได้มาคำนวณหาร้อยละของผลผลิต (%yield)

2.2 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

นำใบนางคำมาล้างให้สะอาดผึ่งให้แห้ง และนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบแห้งด้วยเครื่องอบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำใบนางคำที่อบแห้งมาชั่ง น้ำหนัก 50 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ (Flask) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายคือ เอทานอล 95% อะซิโตน และเอทิลอะซิเตท ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรปิดฝาให้สนิทด้วยกระดาษฟอยล์ (Foil) ตั้งทิ้งไว้พร้อมเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำไปกรองแยกสารสกัดหยาบโดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศโดยผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 จากนั้นนำสารที่สกัดได้มาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) เมื่อได้สารสกัดนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) ซึ่งน้ำหนักของสารที่สกัดได้มาคำนวณหาร้อยละของผลผลิต (%yield)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

3.1 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อ

นำเข็มเย็บเชื้อแบบห่วง (Loop) ลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อ นำไปเย็บเชื้อทั้ง 3 ชนิดจากหลอดเก็บเชื้อ คือ *B. subtilis* ATCC 6051, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538P แล้วนำมาลากหรือขีด (Streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร NA เชื้อละ 2 จาน โดยในการขีดทุกแนวควรเปลี่ยน Loop ที่ใช้หรือมีการเผาไฟทุกครั้งเพื่อฆ่าเชื้อที่มากเกินไป จากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละชนิด จำนวน 1 โคโลนี ใช้เข็มเย็บเชื้อแบบปลายแหลมเลือกแต่ละส่วนบนของโคโลนี ใส่ในอาหารเพาะเชื้อ NB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร NB มาทำการเจือจางตั้งแต่ความเจือจางเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-7} CFU/ml จากนั้นนำเชื้อที่ dilution ที่ความเข้มข้น 10^{-7} CFU/ml ดูดมาปริมาณ 0.1 มิลลิตร ในอาหารเหลว NB มาใส่ในอาหาร NA จากนั้นทำการป้ายเชื้อ (Swab) โดยใช้สำลีพันปลายไม้ที่มีเชื้อแบคทีเรียลงบนจานเพาะเลี้ยง โดยทำเชื้อละ 10 จาน (3 ซ้ำ) ซึ่งสารสกัดที่สกัดจากแต่ละตัวทำละลายมาอย่างละ 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ในปริมาณ 500 ไมโครลิตร แล้วดูดมาปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในดิสก์ยา นำไปวางบนอาหารที่ทำการ swab เชื้อและนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการวัดขนาดความกว้างของบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบดิสก์ยา (Clear zone)

3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

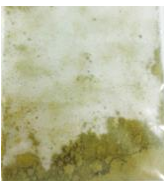
ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 16.0 ในการวิเคราะห์ Independent-Samples T-test และ One-way ANOVA

ผลการวิจัย

1. ลักษณะ และร้อยละของผลผลิต (%yield) ของสารสกัดหยาบใบนางคำในตัวทำละลายแต่ละชนิด

การสกัดหยาบจากใบนางคำด้วยตัวทำละลาย น้ำ เอทานอล อะซิโตน และเอทิลอะซิเตต ในอัตราส่วนใบนางคำต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 ต่อ 5 ใช้เวลาในการสกัด 24 ชั่วโมง เมื่อผ่านเครื่อง Freeze dry จะได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะแตกต่างกัน คือ สารสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำให้ลักษณะเป็นผงมีสีเทา สารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลให้ลักษณะเป็นผงสีเขียวเข้ม สารสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนให้ลักษณะเป็นผงสีเขียวเข้มอมเหลือง และสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตให้ลักษณะเป็นผงสีเขียวอ่อน หลังจากซึ่งสารสกัดใบนางคำจากตัวทำละลายแต่ละชนิดแล้วนำค่าที่ได้ไปคิดร้อยละของผลผลิต (%yield) พบว่า สารสกัดหยาบที่ใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิดมีค่า %yield อยู่ในช่วงระหว่าง 3.20-1.14 โดยสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำจะให้ค่า %yield สูงสุด คือ 3.20 รองลงมา คือสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต 1.32 สารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 1.24 และสารสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน ต่ำสุด คือ 1.14 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะสีและร้อยละของผลผลิต (%yield) ของสารสกัดใบนางดำและตัวทำละลายแต่ละชนิด

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	ลักษณะและสีของสารสกัดหยาบ	%yield
ใบนางดำ	น้ำ	 ผงสีเทา	3.20
	เอทานอล	 ผงสีเขียวเข้ม	1.24
	อะซิโตน	 ผงเขียวเข้มอมเหลือง	1.14
	เอทิลอะซิเตต	 ผงเขียวอ่อน	1.32

2.ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบนางดำในตัวทำละลายต่างๆ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอล อะซิโตน และเอทิลอะซิเตต จากใบนางดำ โดยทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิดคือ *B. subtilis* ATCC 6051, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538P ด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนสามารถยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6051 และ *S. aureus* ATCC 6538P ได้ดีที่สุด คือ 10.00 ± 0.667 มิลลิเมตร และ 6.90 ± 0.875 มิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตที่สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6051, *S. aureus* ATCC 6538P เช่นเดียวกันคือ 8.90 ± 0.568 มิลลิเมตร และ 5.80 ± 0.632 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6051 ได้เพียงชนิดเดียว คือ 7.40 ± 0.516 มิลลิเมตร และ 6.80 ± 0.919 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วน *E. coli*

ATCC 25922 ไม่มีสารสกัดจากตัวทำละลายชนิดใดสามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ ดังนั้นพืชสมุนไพรบางชนิดมีขีดจำกัด เช่น สารเมือก (Polysaccharide) ทำให้พืชที่สกัดมีความหนืด และเป็นอุปสรรคต่อการสกัด ดังนั้นตัวทำละลายที่มีลักษณะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนต่างๆ ของพืชด้วย

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบนางดำในตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลายที่ใช้ใน					หมา
สมุนไพร	การสกัด	ค่าเฉลี่ยของการยับยั้งแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)			ย
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	เหตุ
		ATCC 6051	ATCC 6538P	ATCC 25922	चना
ใบนางดำ	น้ำ	6.80±0.919	-	-	ด
	เอทานอล	7.40±0.516	-	-	เส้น
	อะซิโตน	10.00±0.667	6.90±0.875	-	ผ่าศูนย์กลาง
	เอทิลอะซิเตด	8.90±0.568	5.80±0.632	-	นัยก
	Control (H ₂ O)	-	-	-	ล่าง
	Control (Ethanol)	-	-	-	ของ
	DMSO	-	-	-	ดิสก์
					ย ำ

0.5 มิลลิเมตร, - คือ ไม่มีการเกิดวงใสการยับยั้งเชื้อ

แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.D. , n=10)

จากตารางที่ 3 พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสการยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 6051 ของสารสกัดหยาบจากอะซิโตน และเอทิลอะซิเตต มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 6051 ของสารสกัดหยาบทั้ง 4 ชนิด

	สารสกัด	จำนวน	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	F
<i>B. subtilis</i> ATCC 6051	น้ำ	10	6.80	0.919	44.787*
	เอทานอล	10	7.40	0.516	
	อะซิโตน	10	10.00	0.667	
	เอทิลอะซิเตต	10	8.90	0.568	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

จากตารางที่ 4 พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 6538P จากสารสกัดหยาบใบนางดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 6538P ของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด

	สารสกัด	จำนวน	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	F
<i>S. aureus</i>					
ATCC 6538P	อะซิโตน	10	6.90	0.875	3.220
	เอทิลอะซิเตต	10	5.80	0.632	

อภิปรายผล และสรุปผล

จากการสกัดสารจากใบนางดำโดยใช้ตัวทำละลายทั้งหมด 4 ชนิด คือ น้ำ เอทานอล อะซิโตน และเอทิลอะซิเตต พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายพวก Polar aprotic solvents คือ ตัวทำละลายอะซิโตนสามารถยับยั้งได้ดีที่สุด เนื่องจากแอลคิลเฮไลด์มีหมู่ฟังก์ชันคือเฮไลด์มีสูตรทั่วไปเป็น R-X เมื่อ R คือ หมู่แอลคิลเฮไลด์ ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปราศจากไฮโดรเจนที่แตกตัวได้ ทำให้สามารถสกัดสารได้ดีในใบนางดำ ส่วนการสกัดด้วยน้ำด้วยวิธีการต้มมีผลต่อการสกัด เนื่องจากการต้มมีอุปสรรคต่อการออกสีของสารแอนโทไซยานิน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ณัฏฐาวุฒิ นูรดาน่า ชูรายา และจารุวรรณ (2560) พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดใบนางดำ คือ อะซิโตนและเมทานอล แต่พบสารซาโปนินในสารสกัดใบนางดำสดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนและน้ำ ทำให้มีอุปสรรคต่อการสกัดเช่นเดียวกัน

เมื่อนำใบนางดำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยทำการสกัดใบนางดำด้วยตัวละลาย 4 ชนิด คือ น้ำ เอทานอล อะซิโตน และเอทิลอะซิเตต พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลาย อะซิโตน มีการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี คือ *B. subtilis* ATCC 6051 และ *S. aureus* ATCC 6538P คือ 10.00 ± 0.667 มิลลิเมตร และ 6.90 ± 0.875 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ วรยุทธ ประเวทย์ และพรณี (2550) ที่ศึกษาสารสกัดหยาบที่มีสารแอนโทไซยานินเช่นเดียวกันด้วยตัวทำละลายเอทานอลและอะซิโตน พบว่ามีการออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีในแบคทีเรียแกรมบวก คือ *B. subtilis* และ *S. aureus* เท่ากับ 11.00 มิลลิเมตร และ 10.30 มิลลิเมตร ส่วนในตัวทำละลายเอทานอล คือ 15.00 มิลลิเมตร และ 12.50

มิลลิเมตรในตัวทำละลายอะซิโตน ตามลำดับ ในสารสกัดหยาบทั้งใบนางดำและสารสกัดหีบหิมไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Azuara, Beristain, Castillo & Jimenez (2011) ได้ศึกษาสารสกัดจาก Capulin (*Prunus serotina* subsp. capuli) ในตัวทำละลายต่างๆ เพื่อยับยั้งแบคทีเรีย พบว่า สารสกัดจาก Capulin (*P. serotina* subsp. capuli) จากตัวทำละลายอะซิโตน ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 ได้เล็กน้อย โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสการยับยั้งประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ซึ่งต่างจากใบนางดำ (*G. subanceolata* Miq.) ซึ่งมีการยับยั้งได้ดีกว่า คือ 6.90 ± 0.875 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดจาก Capulin (*P. serotina* subsp. capuli) ในตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้เล็กน้อย โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสการยับยั้งประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ซึ่งต่างจากสารสกัดจากใบนางดำ (*G. subanceolata* Miq.) ซึ่งไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียสามารถจำแนกได้ 2 ชนิด ขึ้นกับความแตกต่างของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย แกรมบวก (*B. subtilis* ATCC 6051 และ *S. aureus* ATCC 6538P) และแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* ATCC 25922) โดยแบคทีเรียมีส่วนประกอบของเปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ประกอบด้วยไกลแคนसानเปิน รวากับเปปไทด์สายสั้น ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นเปปติโดไกลแคนและพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) ที่หนากว่าแบคทีเรียแกรมลบทำให้มีความซับซ้อนมากกว่า เนื่องมาจากการมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วยฟอสโฟลิปิดถึง 2 ชั้น โดยเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide) เป็นส่วนประกอบ โดยจากการทดลองพบว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) อาจเกิดจากกระบวนการสกัดและตัวทำละลายที่เลือกใช้ ทำให้สามารถสกัดสารประเภทอื่นๆ ออกมาโดยเฉพาะสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีลักษณะเฉพาะ และส่วนใหญ่เป็นสารที่มีสรรพคุณทางยาหรือมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สามารถมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี นอกจากนี้พบว่าพืชใบนางดำมีสารทุติยภูมิที่น่าสนใจในการต้านอนุมูลอิสระ จากงานวิจัยของ ณัฐฐาจุฑิ และคณะ (2560) พบว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์จากสารสกัดใบนางดำแห้งด้วยตัวทำละลายอะซิโตน มีค่า 1.28 ± 0.01 mgQE/g sample การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay มีค่า 2.28 ± 0.40 mgTEAC/g sample ส่วนวิธี FRAP assay มีค่า 4.34 ± 0.16 mg TEAC/g sample และวิธี DPPH assay มีค่า 1.29 ± 0.03 mg TEAC/g sample ทำให้สารสกัดจากตัวทำละลายอะซิโตนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอื่นๆ คือ เมทานอล เอทานอล และน้ำ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าการสกัดจะขึ้นอยู่กับตัวทำละลายซึ่งต่างชนิดกันโดยเปรียบเทียบการเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดภายใต้สารอินทรีย์ที่เป็นตัวกลางต่างชั่วคราว รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดขึ้นกับองค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่แตกต่างกันในแต่ละสารสกัดซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเป็นตัวแปรสำคัญเพราะตัวทำ

ละลายสามารถเป็นตัวกำหนดปริมาณของสารแอนโทไซยานิน และสารทุติยภูมิอื่นๆ ที่สกัดได้ นอกจากนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนประกอบของพืช เช่น เปลือก ใบ หรือผล ซึ่งมีความแตกต่างกัน รวมทั้งปริมาณสารที่อยู่ในพืช วิธีในการเก็บที่ถูกต้อง เช่น ใบ เก็บในช่วงที่พืชมีการเจริญเติบโตมากที่สุด บางชนิดอาจจะบุช่วงเวลาเก็บที่ชัดเจน อาจเก็บใบที่ไม่อ่อนหรือแก่เกินไป ดอกตูม ดอกเริ่มบานหรือบานเต็มที่ เป็นต้น การกำหนดช่วงการเก็บจะสัมพันธ์กับปริมาณสารในใบของพืชแต่ละชนิด และวิธีการเก็บเป็นวิธีการเด็ดหรือตัด (รุจิจันทร์, 2554) รวมทั้งพืชสมุนไพรบางชนิดมีขี้ดจำกัด เช่น สารเมือก (Polysaccharide) ทำให้พืชที่สกัดมีความหนืด และเป็นอุปสรรคต่อการสกัดได้ ส่งผลถึงสารที่เราต้องการนั้นมีปริมาณน้อย และมีผลต่อการออกฤทธิ์ ในส่วนของการเลือกตัวทำละลายในการสกัดถือว่าเป็นปัจจัยหลักในการสกัดเพราะในตัวทำละลายแต่ละประเภทมีความเหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น น้ำ เป็นตัวทำละลายที่สำคัญไม่ไวไฟ ไม่เป็นพิษ หาง่าย ราคาถูก และสามารถสกัดสารได้มากแต่ไม่มีความคงตัวอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ง่าย ก่อนนำมาใช้ต้องผ่านกระบวนการกำจัดเชื้อก่อน เอทานอลเป็นที่นิยมใช้เพราะมีความเป็นพิษต่ำ มีความสามารถในการละลายสารกว้างมาก และยังใช้ทำละลายเอนไซม์ในพืชได้ ลดปฏิกิริยาการสลายตัวของน้ำ สามารถจัดออกได้ง่ายโดยไม่ต้องใช้ความร้อนสูง และอะซิโตน เป็นตัวทำละลายที่กำจัดไขมันได้ดี และสามารถละลายสารพื้นฐานในพืชได้บ้าง แต่มีกลิ่นฉุน และกำจัดออกได้ยาก (กัลทิมา, 2555)

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากใบนางคำ เป็นพืชท้องถิ่นและเป็นแหล่งที่ให้สารแอนโทไซยานินที่น่าสนใจเมื่อเทียบกับแหล่งแอนโทไซยานินจากพืชอื่นๆ ดังนั้นการพัฒนากำหนดเอาสารแอนโทไซยานินที่มีอยู่ในใบนางคำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมทางด้านเภสัชภัณฑ์จึงควรมีการศึกษาและพัฒนาต่อไปอย่างต่อเนื่อง

ข้อเสนอแนะ

1. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด และสารทุติยภูมิอื่นๆ (Secondary metabolite) รวมทั้งการทดสอบด้วยวิธี TLC, HPLC หรือ HPTLC เพิ่มเติม เพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ ต่อไปในอนาคต
2. ทำการศึกษาสารสกัดกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น เชื้อรา ยีสต์ และเชื้อก่อโรคลำไส้ที่สำคัญ เช่น เชื้อ 0157:H7, เชื้อ MRSA และเชื้อดื้อยา เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อดังกล่าว เช่น ทดสอบค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) และค่า Minimal bactericidal concentration (MBC)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ที่อนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์สำหรับในการทำวิจัยครั้งนี้

อ้างอิง

- กรกต สุนทรกุล, สุกานดา วิจิตพันธุ์ และคณิต วิจิตพันธุ์. (2555). ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญ ของแบคทีเรียก่อโรคของสาโทแดง ที่ผลิตจากข้าวเหนียวดำร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR-3 0 0 2 . วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- กัลทิมา พิชัย. (2555). การศึกษาการใช้สารสกัดพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา สาเหตุโรคพืชที่สำคัญในพื้นที่สละวง อ.แมริม จ.เชียงใหม่ เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ ท้องถิ่น. รายงานวิจัย. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.
- เกศริน มณีมน. (2544). พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชนเผ่าชาวกูในจังหวัดตรัง พัทลุง และยะลา. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ณัฐฐาวุฒิ จิตติปราโมทย์, นูรดาน่า ลาเตะ, ชูรายา ตีมะ และจารุวรรณ ประดับแสง. (2560). การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดของสารสกัดใบนางคำเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. *การประชุมวิชาการ 9th Annual Conference of Northeastern Pharmacy Research 2017: Innovative Pharmaceutical Products and Services in Thailand 4.0*, 1-9.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2547). แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ศูนย์หนังสือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์. (2554). อุบัติการณ์ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะซึ่งแยกได้จากโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงรายประเทศไทย. [ออนไลน์]. *การประชุมวิชาการ 33rd Congress on Science and Technology of Thailand*.
- พิสิฏฐ์ บุญไชย. (2552). ความรู้ความเชื่อในการใช้ประโยชน์พืชสมุนไพรในวนอุทยานถ้ำเพชร-ถ้ำทอง อำเภอตากลี จังหวัดนครสวรรค์. สำนักงานบริหารพื้นที่อนุรักษ์ที่ 12 (นครสวรรค์) กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.

มาลัย วรวิจิตร. (2545). แบคทีเรียก่อโรค. สยามศิลปะการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

รุจิจันทร์ วิชวานิเวศน์. (2554). การพัฒนาระบบฐานความรู้ด้านการรักษาโรคด้วยสมุนไพร. รายงาน วิจัย . คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.

วรยุทธ ยอดบุญ, ประเวทย์ ต้อยเต็มวงศ์ และขรรณี ต้อยเต็มวงศ์. 2550. ผลของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (2553, มิถุนายน). แอนโทไซยานิน (Anthocyanin). ประมวลสารสนเทศพร้อมใช้.

อรุณพร อธิรัตน์, เพชรน้อย สิงห์ช่างชัย, ภาควิชา ศุโรปกรณ์พงศ์, ณรงค์ศักดิ์ สิงห์ไพบูลย์พร, ปราณี รัตนสุวรรณ และโสภา คามี่. (2543). พฤติกรรมและความพร้อมในการใช้สมุนไพรตามโครงการสาธารณสุขมูลฐานของบุคลากรทางการแพทย์ในจังหวัดภาคใต้ของประเทศไทย. *สงขลานครินทร์เวช-สาร*, 18(2), 93-103.

Adisakwattana, S., Aksornchu, P., Chamnansilpa, N., Dahlan, W., Mäkynen, K, Ngamukote, S., & Thilavech, T. (2020). Anthocyanin-rich fraction from Thai berries interferes with the key steps of lipid digestion and cholesterol absorption. *Heliyon* 6, 6(11), e05408.

Hagiwara, A., Kadota, T., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Shirai, T., & Tamano, S. (2001). Pronounced Inhibition by a Natural Anthocyanin, Purple Corn Color, of 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo [4,5-b] Pyridine (PhIP)- Associated Colorectal Carcinogenesis in Male F344 Rats Pretreated with 1,2-Dimethylhydrazine. *Cancer Letters*, 171(1), 17-25.

Fang, J. Haider, M. S., Pervaiz, T., & Songtao, J. (2017). Naturally Occurring Anthocyanin, Structure, Functions and Biosynthetic Pathway in Fruit Plants. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, 5(2), 1-9.

Pradabsang, C., Saengwiman, S., Srisawat, S., & Srichuay, W. (2015). Screening for Antibacterial Activity of Local Herb Extracts. The International Conference on Herbal and Traditional Medicine (HTM 2015), January 28-30.

- Promyos, N., Suttisansanee, U., & Temviriyankul, P. (2020). Investigation of Anthocyanidins and Anthocyanins for Targeting α -Glucosidase in Diabetes Mellitus. *Preventive Nutrition and Food Science*, 25(3), 263.
- Azuara, E., Beristain, C., Castillo, I., & Jimenez, M. I. (2011). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Capulin (*Prunus serotina* subsp. capuli) Extracts. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(1), 29-37.