

การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เรียที่พบบ่อยใน แผลติดเชื้อของผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวกและเป็นสาเหตุ ที่ทำให้ผู้ป่วยติดเชื้อ โดยใช้สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม

พจนันธิ์ ธิธคุปต์ พ.บ., อ.ว. ศัลยศาสตร์ตกแต่ง

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อยในแผลติดเชื้อของผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวก

รูปแบบการวิจัย: การวิจัยเชิงทดลอง

กลุ่มตัวอย่าง: สารสกัดจากเปลือกทับทิม และแบคทีเรียที่พบบ่อยจากแผลผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวก ได้แก่เชื้อ *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* ที่เตรียมจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและวชิรพยาบาล ในระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึง เดือนสิงหาคม พ.ศ.2550

วิธีดำเนินการวิจัย: นำสารสกัดจากเปลือกทับทิม ที่ผ่านกระบวนการสกัดด้วยตัวทำละลาย และทำให้เข้มข้นโดยระเหยเอาตัวทำละลายออกในภาวะสุญญากาศ จากนั้นนำสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่มีลักษณะขางเหนียวสีน้ำตาล นำไปละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 300 มก./มล. นำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่พบบ่อยจากแผลผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวก โดยวาง paper disc ที่มีสารสกัดเปลือกผลทับทิมลงในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว แล้วนำไปเข้าตูบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C

ตัววัดที่สำคัญ: ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเขตปราศจากเชื้อโดยรอบ paper disc หน่วยเป็น ซม. ที่เวลา 24 ชม.

ผลการวิจัย: ในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ MRSA พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของเขตปราศจากเชื้อโดยรอบ paper disc เท่ากับ 2.1 ± 0.1 และ 2.0 ± 0.2 ซม. แต่ไม่พบเขตปราศจากเชื้อโดยรอบ paper disc ในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*

สรุป: สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่มีความเข้มข้น 300 มก./มล. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ MRSA ได้

Abstract

Effect of *Punica granatum Linn.* Peel Extracts on the Growth of Common Bacteria Causing Infection in Burn Patients

Poth Thirakhupt MD

Department of Surgery, BMA Medical College and Vajira Hospital

Objective: To study the effect of *Punica granatum Linn.* peel extracts on the growth of common bacteria causing infection in burns patients.

Study design: Experimental study.

Materials: *Punica granatum Linn.* peel extracts and common bacteria causing infection in burn patients. These bacteria consisted of *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acenitobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* prepared from microbiology laboratory, BMA Medical College and Vajira Hospital during May to August 2007.

Methods: The extract was prepared by solvent extraction technique using hexane and methanol. Then, the extract was dissolved in distilled water to make a concentration of 300 mg/ml. for testing. Each bacteria was prepared in three agar plates. Paper disc with the extracts was laid in the culture plate of the bacteria and incubated at 37°C for 24 hours.

Main outcome measure: The diameter of inhibition zone (clear zone) was recorded in cm.

Results: There were clear zones only in *Staphylococcus aureus* and MRSA plates. The average diameter of clear zones were 2.1 ± 0.1 and 2.0 ± 0.2 cm. On the contrary, there were no clear zones in *Pseudomonas aeruginosa*, *Acenitobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* plates.

Conclusion: *Punica granatum Linn* peel extract at the concentration of 300 mg/ml inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* and MRSA.

Key words: *Punica granatum Linn.* extract, *Staphylococcus aureus*, MRSA, burns, clear zone

บทนำ

จากการศึกษาสาเหตุการเสียชีวิตของผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อน ลวกพบว่าร้อยละ 75 ของผู้ป่วยที่เสียชีวิตเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียรุนแรงในกระแสเลือด เนื่องจากผิวหนังของผู้ป่วยถูกทำลายทำให้เชื้อโรคต่าง ๆ เข้าสู่ร่างกายได้โดยง่าย จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าเชื้อ Staphylococcus, Pseudomonas, Klebsiella และ Acinetobacter species เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อยตามลำดับ^{1,2}

โดยทั่วไปแล้วในการป้องกันไม่ให้ผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อน ลวกมีภาวะติดเชื้อ แพทย์ผู้ให้การรักษายาจะใช้น้ำเงิน silver sulfadiazine เป็นยาต้านจุลชีพหลัก ทาบริเวณบาดแผล^{3,4} แม้ว่าจะมีการพัฒนายาฆ่าเชื้อชนิดใหม่ ๆ ขึ้นแต่ส่วนใหญ่จะใช้ความสามารถของ silver ion ในการฆ่าเชื้อเป็นหลัก ทำให้ยามีราคาแพง ส่งผลให้การรักษายาบาลของผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อน ลวกมีค่าใช้จ่ายสูง ในปี 2535 รัฐบาลได้พยายามให้มีการผสมผสานการแพทย์แผนไทยและสมุนไพร เข้ากับบริการสาธารณสุขชุมชนโดยกำหนดเป็นนโยบายและสนับสนุนการวิจัย การพัฒนาสมุนไพรมาเป็นยาแผนปัจจุบัน

ทับทิม (*Punica granatum Linn.*) เป็นพืชสมุนไพรที่โครงการสาธารณสุขมูลฐานได้คัดเลือกเพื่อส่งเสริมประชาชนนำไปใช้รักษาโรคสามัญต่าง ๆ เช่น โรคบิด พยาธิตัวตืด บาดแผลที่ผิวหนัง และโรคผิวหนังเนื่องจากพบว่าอยู่ในตำรายาพื้นบ้าน ในปี พ.ศ. 2542 ได้มีการวิจัยพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่มีความเข้มข้น 300 มก./มล. สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Shigella flexneri* และ *Shigella sonnei* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคบิดได้⁵⁻⁷ ดังนั้นจึงเป็นที่คาดว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม ที่มีองค์ประกอบสำคัญหลายชนิด ได้แก่ hydrolyzable tannin, resin, pectin, manitol, inulin, mucilage, gallic acid, calcium oxalate, citric acid, malic acid และ isoquercitrin⁷ น่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ซึ่งทำให้เกิดแผลติดเชื้อได้ และพบว่ามีฤทธิ์ใช้เปลือกผลทับทิมในการรักษาบาดแผลที่ผิวหนัง^{8,9} ซึ่งหากใช้ได้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของแผลติดเชื้อในผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อน ลวก จะช่วยประหยัดค่ารักษาพยาบาลผู้ป่วยในกลุ่มนี้ได้อย่างมากและทำให้สมุนไพรไทยสามารถนำมาใช้ร่วมกับการรักษาพยาบาลแผนปัจจุบันได้

วัตถุประสงค์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุประสงค์

ได้แก่สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม และแบคทีเรียที่พบบ่อยในแผลติดเชื้อของผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อน ลวก จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* สำหรับขั้นตอนในการเตรียมสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีขั้นตอนดังนี้

1. การสกัดเปลือกผลทับทิม

1.1 การสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction)

นำเปลือกทับทิมที่ต้องการสกัดมาทำให้แห้งด้วยการผึ่งลม (air-dried) บดให้ละเอียด นำไปใส่ในถุงสกัด หลังจากนั้นนำไปสกัดด้วย hexane ใน soxhlet apparatus เพื่อกำจัดไขมันออก นำถุงสกัดมาทำให้แห้งแล้วจึงนำมาสกัดต่อด้วย methanol สารสกัดจะละลายออกมาใน methanol นำไประเหย methanol ออก โดยใช้ rotary evaporation ที่อุณหภูมิ 35°C ภายใต้สภาวะสุญญากาศ นำสารสกัดที่ได้ใส่ขวดเปล่าเพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป

วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสมสำหรับการสกัดองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อนและใช้น้ำยาสกัดน้อย ไม่สิ้นเปลือง แต่มีข้อเสียคือไม่เหมาะที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนต่อความร้อน และน้ำยาสกัดที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสม เพราะจะเกิดการแยกของตัวทำละลายแต่ละชนิดเนื่องจากมีจุดเดือดต่างกัน จะมีผลให้สัดส่วนของน้ำยาสกัดแตกต่างไปจากเดิม และผลการสกัดไม่ดีเท่าที่คาดเอาไว้^{10,11}

1.2 การทำสารสกัดให้เข้มข้น (concentration)

สารสกัดอย่างหยาบที่ได้จะมีปริมาณมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนด้วยวิธีต่าง ๆ การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (distillation in vacuum) จัดเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัด โดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า โรตารี

อีวาโพเรเตอร์ (rotary evaporator) ซึ่งสารละลายที่ได้สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ใหม่ได้^{10,11}

2. การเตรียมผลสกัดจากเปลือกผลทับทิมให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

นำสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่มีลักษณะยางเหนียวสีน้ำตาลซึ่งน้ำหนักละเอียด นำไปละลายน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 300 มก./มล. เก็บในหลอดแก้วปราศจากเชื้อเพื่อนำไปทดสอบต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดสอบสารสกัดเปลือกผลทับทิมกับเชื้อแบคทีเรียมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อยจากแผลผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวกจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและวชิรพยาบาล ได้แก่ เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, *Acenitobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* และ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

2. วาง paper disc ที่มีสารสกัดเปลือกผลทับทิมลงในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียชนิดละ 3 จาน แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลานาน 24 ชม.

3. สังเกตหาเขตปราศจากเชื้อโดยรอบ paper disc (clear

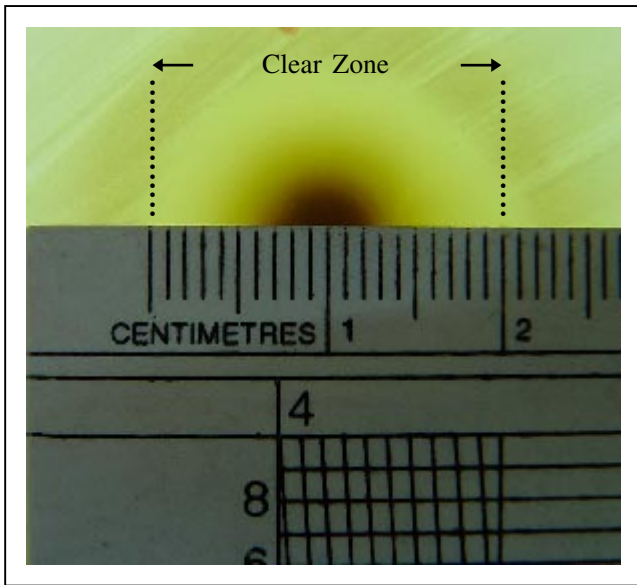
zone) ในจานเพาะเชื้อแต่ละจาน ถ้าไม่พบและมีแบคทีเรียขึ้นเต็มจาน แสดงว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในจานนั้นได้ ถ้าพบ clear zone แสดงว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในจานนั้นได้ จากนั้นจะนำไปวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone

ผลการวิจัย

จากการทดลองใช้สารสกัดเปลือกผลทับทิม 300 มก./มล. ใส่ลงในจานเพาะเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Acenitobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* และ MRSA แล้วนำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. พบว่าสารสกัดเปลือกผลทับทิมไม่สามารถทำให้เกิด clear zone ได้ในจานเพาะเชื้อของ *Pseudomonas aeruginosa*, *Acenitobacter baumannii* และ *Klebsiella pneumoniae* แต่สามารถทำให้เกิด clear zone ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 2.1 ± 0.1 และ 2.0 ± 0.2 ซม. ได้ในจานเพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ MRSA ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1

ตารางที่ 1 เส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ในจานเพาะเชื้อแต่ละชนิด ที่ระยะเวลา 24 ชม.

ชนิดของแบคทีเรีย	เส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone (ซม.)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
<i>Acenitobacter baumannii</i>	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.1 ± 0.1
MRSA	2.0 ± 0.2



รูปที่ 1 Clear zone ในจานเพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus*

วิจารณ์

การดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียในปัจจุบัน ทำให้แพทย์และเภสัชกรต้องทำการค้นคว้าหายาด้านจุลชีพชนิดใหม่ ๆ ขึ้นมาเพื่อนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อที่ดื้อยา ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการค้นพบและพัฒนาายาด้านจุลชีพใหม่ ๆ โดยนำยาด้านจุลชีพที่มีอยู่แล้วมาผสมกับสารเคมี หรือพัฒนาายาด้านจุลชีพจากสารประกอบเดิม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อที่ดื้อยา อย่างไรก็ตามยาด้านจุลชีพเหล่านี้พัฒนามาจากแนวคิดที่เกิดจากการใช้เชื้อราไปฆ่าแบคทีเรียจนทำให้แทบจะไม่มีเชื้อราตัวไหนไม่ถูกทดลองนำมาพัฒนาเป็นยาด้านจุลชีพ

ทับทิมเป็นพืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติรักษาโรคได้หลายชนิด โดยเฉพาะเปลือกผลทับทิม มีการนำไปใช้รักษาแผล แต่ยังไม่มีการพิสูจน์ว่ามีคุณสมบัติอย่างไร มีผู้ศึกษาเรื่องทับทิมเป็นจำนวนมากจนกระทั่งสามารถพิสูจน์ได้ว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมขนาดความเข้มข้น 300 มก./มล. สามารถฆ่าเชื้อ *Shigella species* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคบิดได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำสารสกัดเปลือกผลทับทิมความเข้มข้นดังกล่าว มาทดสอบหาคุณสมบัติของการฆ่าเชื้อโรคที่พบบ่อยในแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก และพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมสามารถทำให้เกิด clear zone ได้ในจานเพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus* รวมทั้ง MRSA ด้วย ทำให้น่าจะนำมาพัฒนาเป็นยาด้านจุลชีพชนิดใหม่เพื่อนำมาใช้รักษาแผลไฟ

ไหม้น้ำร้อนลวกและบาดแผลอื่น ๆ ที่ติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยเฉพาะเชื้อ MRSA ซึ่งเป็นเชื้อที่พบบ่อยและดื้อต่อยาต้านจุลชีพจำนวนมาก

การเกิด clear zone นั้น สามารถบอกได้ว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ แต่การจะนำมาเป็นยาจริง ๆ นั้น ต้องผ่านขบวนการอีกหลายอย่าง จากการทดลองครั้งนี้สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม ที่มีความเข้มข้น 300 มก./มล. สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้เพียงชนิดเดียว ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าถ้าความเข้มข้นมากกว่านี้อาจจะสามารถยับยั้งเชื้อชนิดอื่น ๆ ได้เพิ่มขึ้น ซึ่งควรจะมีการทดลองค้นคว้าต่อไป อย่างไรก็ตามจากตำรายาสมุนไพรไทยได้มีการใช้เปลือกทับทิมในการรักษาแผลมานานแล้ว แต่ยังไม่มีการพิสูจน์ว่าเปลือกผลทับทิมมีคุณสมบัติใดในการช่วยให้แผลหาย จากการทดลองครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิมอย่างน้อยที่สุดสามารถฆ่าเชื้อโรคได้ คุณสมบัตินี้น่าจะช่วยทำให้แผลไม่ติดเชื้อ ดังนั้นแผลพุพองต่าง ๆ จึงหายได้เร็วขึ้น และในสารสกัดของเปลือกผลทับทิมยังมีสารประกอบอีกหลายชนิดซึ่งควรจะศึกษาต่อว่าสารชนิดใดที่มีคุณสมบัติเป็นยาต้านจุลชีพได้ หรือว่าจะต้องรวมกันเพื่อให้มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อ ซึ่งจำเป็นต้องมีการวิจัยต่อไป รวมทั้งการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในแง่ของความปลอดภัยที่จะนำมาใช้ในผู้ป่วยที่มีบาดแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวกและความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์สาธารณสุข

สรุป

สารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่มีความเข้มข้น 300 มก./มล. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ MRSA ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, *Acenitobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* ได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณ สุมิตรา เมืองขวา, คุณ เมษมาศ กาญจนพันธ์ และ คุณ นิรมล วิทิตภัทรภาส ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Altoparlak U, Erol S, Akcay MN, Celebi F, Kadanali A. The time-related changes of antimicrobial resistance patterns and predominant bacterial profiles of burn wounds and body flora of burned patients. *Burns* 2004; 30: 660-4.
2. Singh NP, Goyal R, Manchanda V, Das S, Kaur I, Talwar V. Changing trends in bacteriology of burns in the burns unit, Delhi, India. *Burns* 2003; 29: 129-32.
3. Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM. *Grabb and Smith's plastic surgery*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p.161-79.
4. Mathes SJ, Hentz VR. *Plastic surgery*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. p.811-33.
5. จูไรรัตน์ เกิดดอนแฝก. สมุนไพรวัยทอง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: เซเวนพรีนติ้งกรุ๊ป; 2550. หน้า 171-2.
6. สุนทรี่ สิงหนุตตรา. สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: ศุภาลักษณ์มีเดีย; 2542. หน้า 52.
7. สุนทรธา ห่องแขง. ผลของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม (*Panica granatum Linn*) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Shigella* บางชนิดซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมืด. มหาสารคาม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยมหาสารคาม; 2542. หน้า 1-54.
8. บุษพา ไตรโรจน์, พวงทอง ผู้กฤตยาคามิ. สมุนไพรในช่องปาก. กรุงเทพฯ; 2534. หน้า 24.
9. กัญญา ดิวิเศษ .น้ำสมุนไพร 108. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2543. หน้า 64-5.
10. รัตนา อินทรานุปกรณ์. การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร: การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2547. หน้า 83-102.
11. Sudjaroen Y, Haubner R, Wurtele G. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica L.*) seeds and pericarp. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 1673-82.