

การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่พบบ่อยใน แผลติดเชื้อของผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวกและเป็นสาเหตุ ที่ทำให้ผู้ป่วยติดเชื้อ โดยใช้สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม

พจน์ รีศคุปต์ พ.บ., อ.ว. ศัลยศาสตร์ตักษะ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อยในแผลติดเชื้อของผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวก

รูปแบบการวิจัย: การวิจัยเชิงทดลอง

กลุ่มตัวอย่าง: สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม และแบคทีเรียที่พบบ่อยจากแผลผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวก ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acenitobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* ที่ได้รับการขูดตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและวิชรพยาบาล ในระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึง เดือนสิงหาคม พ.ศ.2550

วิธีดำเนินการวิจัย: นำสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม ที่ผ่านกระบวนการสารสกัดด้วยตัวทำละลาย และทำให้เข้มข้นโดยระเหยาตัวทำละลาย ออกในภาวะสุญญากาศ จำนวนนำสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่มีลักษณะยางเหนียวสีน้ำตาล นำไปละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 300 มก./มล. นำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่พบบ่อยจากแผลผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวก โดยวิธี paper disc ที่มีสารสกัดเปลือกผลทับทิมลงในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว และนำไปเข้าตู้น้ำแข็งที่อุณหภูมิ 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*, *Acenitobacter 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 ลักษณะร้อยละ 75 ของผู้ป่วยที่เสียชีวิตเกิดจากการติดเชื้อ แบคทีเรียรุนแรงในกระแสเลือด เนื่องจากผิวนังของผู้ป่วยถูกทำลายทำให้เชื้อโรคต่าง ๆ เข้าสู่ร่างกายได้โดยง่าย จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าเชื้อ *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* และ *Acinetobacter* species เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อยตามลำดับ^{1,2}

โดยทั่วไปแล้วในการป้องกันไม่ให้ผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวก มีภาวะติดเชื้อ แพทท์ผู้ให้การรักษาจะใช้ยา silver sulfadiazine เป็นยาต้านจุลชีพหลัก ทابริเวนนาดแพลต^{3,4} แม้ว่าจะมีการพัฒนายาฆ่าเชื้อชนิดใหม่ ๆ ขึ้นแต่ส่วนใหญ่จะใช้ความสามารถของ silver ion ในการฆ่าเชื้อเป็นหลัก ทำให้ยาเรียกแพง ส่งผลให้รักษาพยาบาลของผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวกมีค่าใช้จ่ายสูง ในปี 2535 รัฐบาลได้พยายามให้มีการผสมผสานการแพทท์แพนไทร์และสันนูไฟร์ เข้ากับบริการสาธารณสุขชุมชนโดยกำหนดเป็นนโยบายและสนับสนุนให้ ภาควิจัย การพัฒนาสันนูไฟร์มาเป็นยาแพนปั๊บจุบัน

ทับทิม (*Punica granatum* Linn.) เป็นพืชสันนูไฟร์ที่ โครงการสาธารณสุขชุมชนได้คัดเลือกเพื่อส่งเสริมประชาชนนำไปใช้รักษาโรคสามัญต่าง ๆ เช่น โรคบิด พยาธิตัวตืด นาดแพลต์ผิวนัง และโรคผิวนังเนื่องจากพบว่าอยู่ในตำราพื้นบ้าน ในปี พ.ศ. 2542 ได้มีการวิจัยพนว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่มีความเข้มข้น 300 ㎎./㎖. 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 ซึ่งทำให้เกิดแพลตติดเชื้อได้ และพบว่า มีการใช้เปลือกผลทับทิมในการรักษานาดแพลต์ผิวนัง^{8,9} ซึ่งหากใช้ได้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของแพลตติด เชื้อในผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวก จะช่วยประหยัดค่ารักษาพยาบาล ผู้ป่วยในกลุ่มนี้ได้อย่างมากและทำให้สันนูไฟร์ไทยสามารถนำมาใช้ร่วมกับการรักษาพยาบาลแพนปั๊บจุบันได้

วัตถุและวิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุ

ได้แก่สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม และแบคทีเรียที่พบบ่อยในแพลตติดเชื้อของผู้ป่วยไฟไหม้น้ำร้อนลวก 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 สารสกัดจะละลายออกมานใน methanol นำไปประเทย methanol ออก โดยใช้ rotary evaporation ที่อุณหภูมิ 35°C ภายใต้สภาวะสูญญากาศ นำสารสกัดที่ได้ใส่ภาชนะเพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป

วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้หมายความว่าสกัดน้อย ไม่สิ้นเปลือง แต่เมื่อเสียค่าไม่แพงที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนต่อความร้อน และน้ำยาสกัดที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสม เพราะจะเกิดการแยกของตัวทำลายแต่ละชนิดเนื่องจากมีจุดเดือดต่างกัน จะมีผลให้สัดส่วนของน้ำยาสกัดแตกต่างไปจากเดิม และผลการสกัดไม่ดีเท่าที่คาดเอาไว้^{10,11}

1.2 การทำสารสกัดให้เข้มข้น (concentration)

สารสกัดอย่างหยาบที่ได้จะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนด้วยวิธีต่าง ๆ การกลั่นในภาวะสูญญากาศ (distillation in vacuum) จัดเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เป็นการระเหยเอตัวทำลายออกจากน้ำยาสกัด โดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสูญญากาศโดยใช้ปั๊มสูญญากาศ (vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า โรตารี

อีว่าโพเรเตอร์ (rotary evaporator) ซึ่งสามารถที่ได้สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ใหม่ได้^{10,11}

2. การเตรียมผลสกัดจากเปลือกผลทับทิมให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

นำสารสกัดเปลือกผลทับทิมที่มีลักษณะยางเหนียวสีน้ำตาลซึ่งน้ำหนักละเอียด นำไปคลายน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 300 มก./มล. เก็บในหลอดแก้วปราศจากเชื้อเพื่อนำไปทดสอบต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดสอบสารสกัดเปลือกผลทับทิมกับเชื้อแบคทีเรียมีขั้นตอนดังนี้

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

2. วาง paper disc ที่มีสารสกัดเปลือกผลทับทิมลงในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียชนิดละ 3 จาน แล้วนำไปบนเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม.

3. สังเกตหาเขตปราศจากเชื้อโดยรอบ paper disc (clear

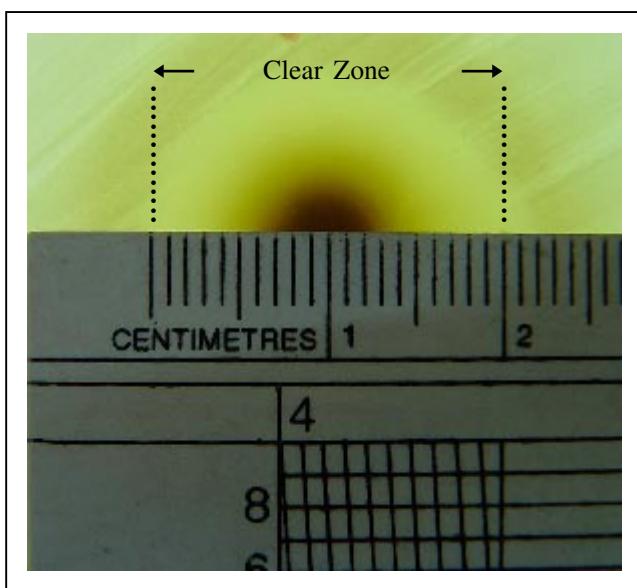
zone) ในจานเพาะเชื้อแต่ละจาน ถ้าไม่พบและมีแบคทีเรียขึ้นเต็มจาน แสดงว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในจานนั้นได้ ถ้าพบ clear zone แสดงว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในจานนั้นได้ จากนั้นจะนำไปวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone

ผลการวิจัย

จากการทดลองใช้สารสกัดเปลือกผลทับทิม 300 มก./มล. ใส่ลงในจานเพาะเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Acenitobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* และ MRSA แล้วนำไปบนในตู้เพาะเชื้อเป็นเวลา 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 ชม. ได้ในจานเพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ MRSA ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1

ตารางที่ 1 เส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ในจานเพาะเชื้อแต่ละชนิด ที่ระยะเวลา 24 ชม.

ชนิดของแบคทีเรีย	เส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone (ชม.)
<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 ในงานเพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus*

วิจารณ์

การดื้อต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแบคทีเรียในปัจจุบัน ทำให้แพทย์และเภสัชกรต้องทำการค้นคว้าหายาต้านจุลชีพนิดใหม่ ๆ ขึ้นมาเพื่อนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อที่ดื้อต่อยา ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมามีการค้นพบและพัฒนายาต้านจุลชีพใหม่ ๆ โดยนิยามต้านจุลชีพที่มีอยู่แล้วมาพัฒนาขึ้นกับสารเคมี หรือพัฒนายาต้านจุลชีพจากสารประกอบเดิม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดื้อเชื้อที่ดื้อยาอย่างไรก็ได้ยาต้านจุลชีพเหล่านี้พัฒนามาจากแนวคิดที่เกิดจาก การใช้เชื้อร้าไปมาระบบที่เรียกว่าทำให้แทบจะไม่มีเชื้อร้าตัวใหม่ในถุงทดลองนำมาเป็นยาต้านจุลชีพ

ทับทิมเป็นพืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติรักษาโรคได้หลายชนิด โดยเฉพาะเปลือกผลทับทิม มีการนำไปใช้รักษาแพล แต่ยังไม่มีการพิสูจน์ว่ามีคุณสมบัติอย่างไร มีผู้ศึกษาเรื่องทับทิมเป็นจำนวนมากจนกระตุ้นสามารถพิสูจน์ได้ว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมขนาดความเข้มข้น 300 มก./มล. สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ แต่การนำมาเป็นยาต้านจุลชีพนิดใหม่ ๆ นั้น ต้องผ่านกระบวนการอีกหลายอย่าง จากการทดลองครั้งนี้สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม ที่มีความเข้มข้น 300 มก./มล. สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้เพียงนิดเดียว ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าถ้าความเข้มข้นมากกว่านี้อาจจะสามารถยับยั้งเชื้อชนิดอื่น ๆ ได้เพิ่มขึ้น ซึ่งควรจะทำการทดลองกันคัวต่อไป อย่างไรก็ได้จากตำราสมุนไพรไทยไม่มีการใช้เปลือกทับทิมในการรักษาแพลเมนานาแผล แต่ยังไม่มีการพิสูจน์ว่าเปลือกผลทับทิมมีคุณสมบัติในการช่วยให้แพลหาย จากการทดลองครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมอย่างน้อยที่สุดสามารถฆ่าเชื้อโรคได้ คุณสมบัตินี้น่าจะช่วยทำให้แพลไม่ติดเชื้อ ดังนั้นแพลผู้พองต่าง ๆ จึงหายได้เร็วขึ้น และในสารสกัดของเปลือกผลทับทิมยังมีสารประกอบอีกหลายชนิดซึ่งกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นยาต้านจุลชีพได้ หรือว่าจะต้องรวมกันเพื่อให้มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อ ซึ่งจำเป็นต้องมีการวิจัยต่อไป รวมทั้งการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในเรื่องของความปลอดภัยที่จะนำมาใช้ในผู้ป่วยที่มีบาดแผลไฟไหม้หรือร้อนลวกและความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ สาธารณสุข

สรุป

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

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณ สุนิตรा เมืองขาว, คุณ เมย์มาส กาญจนพันธ์ และ คุณ นิรนล วิทิตภัทรภัส 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. จุไรรัตน์ เกิดอนแฟก. สมุนไพรวัยทอง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: เช่วนพรินติ้งกรุ๊ป; 2550. หน้า 171-2.
6. สุนทรี สิงหมุตรา. สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: ศุภालัยมีเดีย; 2542. หน้า 52.
7. สุนทรี ห้องแขง. ผลของสารสกัดจากเปลือกผลทับทิม (*Panica granatum Linn*) ต่อการขับยั้งการเจริญของเชื้อ *Shigella* บางชนิดซึ่งเป็นสาเหตุของโรคบิด. มหาสารคาม: โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยมหาสารคาม; 2542. หน้า 1-54.
8. บุนพา ไตรโรจน์, พวงทอง ผู้ก่อตยามี. สมุนไพรในช่องปาก. กรุงเทพฯ; 2534. หน้า 24.
9. กัญญา ดีวิเศษ . น้ำสมุนไพร 108. กรุงเทพฯ: โรงพยาบาลสหกิจสัมพันธ์; 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.