นิพนธ์ต้นฉบับ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ของสารสกัดเดี่ยว และสารสกัดผสมจากใบพญายอ ใบกระดูกไก่ดำ และใบหนาดใหญ่

สิรินภา จิระกิตติเจริญ[1*] นัชชา มานักฆ้อง[1] ปฐม จูจันทร์[1] และ ธัมมะธิดา พัฒนพงศา[1]

[1] วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดพิษณุโลก คณะสาธารณสุขศาสตร์และสหเวชศาสตร์
สถาบันพระบรมราชชนก กระทรวงสาธารณสุข
*ผู้นิพนธ์ที่ให้การติดต่อ E-mail: Sirinapha.j@scphpl.ac.th

Received date: October 26, 2024; Revised date: December 10, 2024; Accepted date: December 13, 2024

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย วิธี DPPH radical scavenging และความสามารถในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* จากสารสกัดสมุนไพรเดี่ยว ผสมสองชนิดและผสมรวม 3 ชนิด จากใบพญายอ (*Clinacanthus nutans*), ใบกระดูกไก่ดำ (*Justica gendarussa*), และใบหนาดใหญ่ (*Blumea balsamifera*) ทดสอบปริมาณฟีนอลิกรวมทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยเทียบสารมาตรฐาน Gallic acid ทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ทดสอบโดยวิธี Aluminium chloride colorimetric โดยเทียบกับสารมาตรฐาน Quercetin ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทดสอบโดยวิธี DPPH เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox และทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี broth dilution รายงานผลเป็นค่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และฆ่าทำลายเชื้อ (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) ผลการวิจัยพบว่าใบหนาดใหญ่มีปริมาณสารฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 194.82 มิลลิกรัม(กรดแกลลิก)/กรัมของสารสกัด, 191.23 มิลลิกรัม(เควอซิทิน)/กรัมของสารสกัด, ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 56.99 ตามลำดับ และการผสมสารสกัดคู่ใบพญายอและใบหนาดใหญ่ และคู่ใบกระดูกไก่ดำและใบหนาดใหญ่ ให้ผลลัพธ์ในการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างทางสถิติ การทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* พบว่าใบหนาดใหญ่และคู่ผสมใบพญายอและใบกระดูกไก่ดำมีค่า MIC ที่ 0.625 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผลการศึกษาชี้ให้เห็นศักยภาพของสมุนไพรเป็นแหล่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ และสนับสนุนการใช้สมุนไพรผสมในตำรับตามการแพทย์แผนไทยและพื้นบ้านเพื่อการพัฒนาต่อไป

คำสำคัญ: ฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์, สารต้านอนุมูลอิสระ

Original Article

Antioxidant activity and Antibacterial potential of Single and Combined extracts from the Leaves of *Clinacanthus nutans*, *Justica gendarussa*, and *Blumea balsamifera*

Sirinapha Jirakitticharoen[1]*, Natcha Manakkhong [1], Pathom Jujun[1], and Tummatida Pattanapongsa[1]

[1] Sirindhorn College of Public Health, Phitsanulok, Faculty of Public Health and Allied Health Sciences, Praboromarajchanok Institute, Ministry of Public Health

*Corresponding Author E-mail: Sirinapha.j@scphpl.ac.th

Abstract

This study aimed to evaluate the total phenolic and flavonoid contents, antioxidant activity using the DPPH radical scavenging method, and the antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from single, the mixtures contained two and three types of leaves extracts. The herbs included *Clinacanthus nutans*, *Justica gendarussa*, and *Blumea balsamifera*. Total phenolic content was assessed using the Folin-Ciocalteu method and expressed as gallic acid equivalents (GAE). Total flavonoid content was determined using the aluminum chloride colorimetric method and expressed as quercetin equivalents (QE). Antioxidant activity was evaluated using the DPPH method with Trolox as a standard, and antibacterial activity was tested using the broth dilution method to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The results showed that *B. balsamifera* had the highest total phenolic content (194.82 mg GAE/g of extract), total flavonoid content (191.23 mg QE/g of extract), and DPPH radical scavenging activity (% inhibition at 56.99). Antioxidant activity of the binary mixtures of *C. nutans* with *B. balsamifera* and *J. gendarussa* with *B. balsamifera* did not show significant statistical differences. Antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli* revealed that *B. balsamifera* and the binary mixture of *C. nutans* with *J. gendarussa* exhibited an MIC of 0.625 mg/mL. These findings demonstrate the potential of these herbs as significant sources of bioactive compounds. Furthermore, The results of this study highlight the potential of herbs as a significant source of bioactive compounds and support the use of herbal combinations in traditional Thai and folk medicine for further development.

Keywords: Phenolic, Flavonoid, Antioxidant

บทนำ

สมุนไพรเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการนำไปใช้เพื่อรักษาโรคและส่งเสริมสุขภาพมาอย่างยาวนาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสมุนไพรไทยซึ่งมีการใช้ในตำรับยาแผนโบราณสำหรับรักษาโรคต่างๆ มานับร้อยปี หนึ่งในกลุ่มสารสำคัญที่พบในสมุนไพรคือสารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลกเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์[1] สารเหล่านี้มีคุณสมบัติที่สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันซึ่งเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อของร่างกาย อันเป็นสาเหตุของโรคร้ายแรงหลายชนิด เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด รวมถึงโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของเซลล์ เช่น โรคเบาหวานและโรคอัลไซเมอร์[2]

สารต้านอนุมูลอิสระ มีบทบาทสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตในการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ กลไกการทำงานในการต้านอนุมูลอิสระทำหน้าที่แตกต่างกัน เช่น การเสริมฤทธิ์ (synergism) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) การจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Metal chelation) การดักจับอนุมูลอิสระ[3] นอกเหนือจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว สารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบในสมุนไพรยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในมนุษย์ แบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* มักเป็นสาเหตุของการติดเชื้อทางผิวหนัง, เนื้อเยื่ออ่อน และการติดเชื้อในทางเดินหายใจ รวมถึงการติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteraemia) และเยื่อหุ้มหัวใจ (endocarditis)[4] ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* มักทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะและทางเดินอาหาร[5] การค้นพบสมุนไพรที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียจึงมีความสำคัญต่อการพัฒนาวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยมากขึ้น โดยเฉพาะในยุคที่การดื้อยาปฏิชีวนะกำลังเป็นปัญหาใหญ่ทั่วโลก

ใบกระดูกไก่ดำ (*Justica gendarussa*), ใบพญายอ (*Clinacanthus nutans*) และใบหนาดใหญ่ (*Blumea balsamifera*) เป็นสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ในตำรับยาพื้นบ้านและมีการศึกษาในเชิงวิทยาศาสตร์เพื่อประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพ การศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรเหล่านี้มีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูง ซึ่งสารกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรีย[1] ใบกระดูกไก่ดำมีการใช้ในการรักษาแผล ช่วยหยุดเลือดและต้านการอักเสบของผิวหนัง รวมถึงการรักษาโรคทางเดินอาหารและแผลไฟไหม้ ในยาแผนโบราณของประเทศเวียดนาม[6] ในขณะที่ใบพญายอมีการใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาการติดเชื้อไวรัส เช่น งูสวัดและเริม[7] ส่วนใบหนาดใหญ่นั้นมีการใช้ในการรักษาอาการปวดและการอักเสบ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าใบหนาดใหญ่มีฤทธิ์ในการต้านการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ดี[8] จากความสำคัญของสมุนไพรเหล่านี้ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสมุนไพรเดี่ยวและผสมจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น เพื่อที่จะค้นหาว่าสารประกอบใดในสมุนไพรเหล่านี้มีบทบาทในการต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุด การวิจัยยังได้พยายามที่จะเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรเดี่ยวและผสมเพื่อตรวจสอบว่าการใช้สมุนไพรในรูปแบบผสมสามารถเสริมฤทธิ์ของสารประกอบต่างๆ ได้หรือไม่ งานวิจัยที่เกี่ยวข้องยังแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่มีความปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยาและผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพได้ในอนาคต[9]

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ของสารสกัดเดี่ยว ผสม 2 ชนิด และผสมรวม 3 ชนิด จากใบกระดูกไก่ดำ ใบพญายอ และใบหนาดใหญ่

ระเบียบวิธีศึกษา

1. อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Evolution 201, Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา), เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (V-855, Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์), อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (WTB15, Memmert ประเทศเยอรมนี), เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo), เครื่องปั่นผลไม้ (BL3091, Tefal ประเทศไทย), Folin Ciolcalteu reagent, aluminum chloride hexahydrate และ sodium carbonate (LOBA ประเทศอินเดีย), 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazl (DPPH), Trolox, Quercetin, Gallic acid (Sigma-Aldrich ประเทศอเมริกา), Sodium hydroxide, Aluminum chloride (Merck ประเทศเยอรมนี)

2. การเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่าง ใบกระดูกไก่ดำ ใบพญายอ ใบหนาดใหญ่ จากสวนสมุนไพร (รูปที่ 1) ที่ปลูกและดูแลอยู่ในวิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดพิษณุโลก ล้างทำความสะอาดแล้วนำมาตากแห้งในที่ร่ม เป็นเวลา 8-10 วัน เพื่อให้ตัวอย่างมีความชื้นที่ 12-13% จากนั้นนำตัวอย่างพืชแห้งมาปั่นบดด้วยเครื่องปั่นละเอียด สกัดโดยวิธี Maceration โดยแช่ด้วย 95% เอทานอล เป็นเวลา 3 วัน[10] ในอัตราส่วน 1:10 g/mL เมื่อครบกำหนดวัน นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วทำการระเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporators) จนได้สารสกัดหยาบ (crude extract) นำตัวอย่างสารสกัดหยาบมา 10 mg ละลายในเอทานอล 95% ปริมาตร 1 mL สารสกัดคู่ผสมระหว่างสมุนไพร 2 ชนิดนำสารสกัดมาอย่างละ 5 mg รวมกันเป็น 10 mg (อัตราส่วน 1:1) ส่วนสารสกัดรวม 3 อย่าง นำมาอย่างละ 3.33 mg รวมกันเป็น 10 mg ละลายในเอทานอล 95% ปริมาตร 1 mL (อัตราส่วน 1:1:1) เพื่อใช้เป็นสารละลายสารสกัดตัวอย่าง ในการทำการทดลองหาปริมาณฟีนอลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ การทดลองทั้งหมดดำเนินการซ้ำ 3 ครั้ง ของแต่ละตัวอย่างของสารสกัด

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์ของ Pérez[11] นำสารสกัดตัวอย่างมาจำนวน 10 µL และเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่ทำการเจือจางลง 10 เท่า ทิ้งไว้เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นเติม 10% Na_2CO_3 ปริมาตร 1.995 mL ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิก จากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรด Gallic acid ในช่วงความเข้มข้น 0-2000 µg/mL จากสมการกราฟมาตรฐาน y = 0.0002x + 0.0767 ; R^2 = 0.9998 ปริมาณสารฟีนอลิกที่ได้แสดงผลในหน่วย mgGAE/g ของสารสกัด

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric

วิเคราะห์โดยวิธี Aluminium chloride colorimetric โดยดัดแปลงการทดลองจาก Aparna and Hema[12] นำสารสกัดตัวอย่างมาจำนวน 10 µL และเติม 0.1 mL ของ 5% $NaNO_2$ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 0.1 mL ของ 10% $AlCl_3$ วางทิ้งไว้อีก 6 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ให้เติม 0.5 mL ของ NaOH ความเข้มข้น 1M วางทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ เทียบกับสารมาตรฐาน Quercetin ที่ช่วงความเข้มข้น 0-2000 µg/mL จากสมการกราฟมาตรฐาน y = $8x10^{-5}$ X + 0.0011 ; R^2 = 0.9998 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่ได้แสดงผลในหน่วย mg QE/g ของสารสกัด

5. การวิเคราะห์หาปริมาณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging โดยดัดแปลงจากวิธีการวิเคราะห์ของ Hwang and Lee[13] โดยนำสารสกัดมา 10 µL แล้วทำการเติม 1.990 mL ของสารละลาย DPPH (2.4 mg ละลายในเอทานอล 100 mL) เก็บในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm คำนวณเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 0-2000 µg/mL จากสมการกราฟสารมาตรฐาน y = 0.0002x - 0.0048 ; R^2 = 0.9992 หลังจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) คำนวณจากสมการ

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_S = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน Trolox

6. การหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดโดยวิธี broth dilution

ในการทดลองนี้ใช้สารสกัดของแข็งที่ได้จากการสกัดจากใบพญายอ ใบกระดูกไก่ดำ ใบหนาดใหญ่ สารสกัดผสมคู่กันระหว่าง อัตราส่วน 1:1 และสารสกัดผสม 3 อย่าง ในการอัตราส่วน 1:1:1 ให้มีความเข้มข้น 10.000 mg/mL, 5.000 mg/mL, 2.500 mg/mL, 1.250 mg/mL, 0.625 mg/mL และ 0.3125 mg/mL ทำการทดลองหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration; MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration; MBC) ทดลองตามวิธีของ CLSI M7-A7[14] โดยทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* (ATCC 25922) เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมบวก และเชื้อ *E. coli* (ATCC 25923) เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ

โดยการเลี้ยงแบคทีเรีย *S.aureus* และ *E.coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton broth (MHB) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการเจือจางเชื้อให้มีความเข้มข้น $1x10^8$ CFU/mL หลังจากนั้นหยอดปริมาณสารสกัดลงในหลอดทดลอง ที่มีเชื้อ *S. aureus* และ *E.coli* ที่ความเข้มข้น $1x10^8$ CFU/mL ให้มีความเข้มข้น 10.000 mg/mL, 5.000 mg/mL, 2.500 mg/mL, 1.250 mg/mL, 0.625 mg/mL และ 0.3125 mg/mL หลังจากนั้นนำหลอดทดลองที่ได้ ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในหลอดทดลองที่ใส จะได้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) หลังจากนั้น นำหลอดใสไปทำการ steak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่พบว่ามีการเจริญของเชื้อ จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC)

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

แสดงผลการทดลองในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)

ผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดจากใบหนาดใหญ่ มีปริมาณสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดผสมระหว่างใบหนาดใหญ่และใบกระดูกไก่ดำ, ใบหนาดใหญ่และใบพญายอ, สารสกัดผสม 3 ชนิด (ใบหนาดใหญ่ ใบกระดูกไก่ดำ และใบพญายอ) ตามลำดับ และพบว่า สารสกัดจากใบพญายอ และใบกระดูกไก่ดำ มีปริมาณสารฟีนอลิกน้อยที่สุด ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ปริมาณฟลาโวนอยด์ พบว่า สารสกัดจากใบหนาดใหญ่ มีปริมาณสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดผสมระหว่างใบหนาดใหญ่และใบพญายอ, ใบหนาดใหญ่และใบกระดูกไก่ดำ, สารสกัดผสม 3 ชนิด (ใบหนาดใหญ่ ใบกระดูกไก่ดำ และใบพญายอ) ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดเดี่ยวจากใบกระดูกไก่ดำ และใบพญายอ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์น้อยที่สุด ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging ของสารสกัดจากสมุนไพรแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างที่ทำการศึกษา โดยใบหนาดใหญ่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ที่ร้อยละ (% inhibition) 56.99 ซึ่งอาจอธิบายได้จากการมีสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูงที่ช่วยให้มีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระที่ดี[15] เนื่องจากสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันและส่งเสริมการทำงานของระบบต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย[16] ในทางกลับกัน ใบกระดูกไก่ดำแสดงค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุดที่ร้อยละ 22.36 ซึ่งอาจเป็นผลจากปริมาณสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในใบกระดูกไก่ดำ อาจมีความเหมาะสมกับการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีอื่นๆ เช่น

ABTS หรือ FRAP เป็นต้น เพราะวิธีการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแต่ละวิธีมีความแตกต่างกัน ในด้านขั้วของสารต้านอนุมูลอิสระ วิธี DPPH เหมาะกับการวัดสารต้านอนุมูลอิสระชนิด Hydrophobic ที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ส่วนวิธี ABTS เหมาะกับการวัดสารต้านอนุมูลอิสระชนิด Hydrophilic และ Lipophilic นอกจากนี้ FRAP เหมาะกับการวัดสารต้านอนุมูลอิสระชนิด Hydrophilic ที่ละลายได้ดีในน้ำเป็นส่วนใหญ่[17] เนื่องจากการทดลองด้วยวิธีการ DPPH จะไม่เหมาะสมกับการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่มีความเป็นขั้วสูง หรือที่สามารถละลายน้ำได้ดี (Hydrophilic antioxidants)[18] แต่ทั้งนี้ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบกระดูกไก่ดำ มีความสอดคล้องกับปริมาณฟลาโวนอยด์ที่พบ ซึ่งมีปริมาณน้อยที่สุด จากตัวอย่างสารสกัดทั้งหมดในการทดลอง

อภิปรายผล

ใบหนาดใหญ่มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดผสม และเดี่ยวของพืชสมุนไพรอื่น ๆ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบทางเคมีของใบหนาดใหญ่ที่สามารถผลิตสารฟีนอลิกได้มากกว่าสมุนไพรชนิดอื่น ในขณะที่ใบพญายอมีปริมาณสารฟีนอลิกต่ำที่สุด ถึงแม้ว่าก่อนหน้านี้ ได้มีการศึกษาและค้นพบว่า ใบพญายอ ใบกระดูกไก่ดำ และใบหนาดใหญ่ มีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ[8,19-20] ซึ่งอาจสะท้อนถึงการมีสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่มีอยู่ในปริมาณมากกว่า อย่างไรก็ตาม การผสมระหว่างพืชสมุนไพรแสดงให้เห็นถึงปริมาณฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้นและลดลงในปริมาณที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจากข้อมูลนี้หากต้องการใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติของฟีนอลิก ในลักษณะสมุนไพรผสมควรเลือกผสมระหว่างใบกระดูกไก่ดำและใบหนาดใหญ่

จากการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ พบว่า ในใบหนาดใหญ่มีค่าที่สูงที่สุด ซึ่งสามารถอธิบายได้จากการมีสารฟลาโวนอยด์ที่ส่งเสริมคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการต้านอนุมูลอิสระและการต้านเชื้อแบคทีเรีย[21] ส่วนใบกระดูกไก่ดำมีปริมาณฟลาโวนอยด์ต่ำที่สุด ซึ่งอาจสะท้อนถึงการมีสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่อยู่ในปริมาณมากกว่า แม้ว่าปริมาณฟลาโวนอยด์จะมีความสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ก็ไม่ได้หมายความว่าความสามารถทางชีวภาพของสารสกัดจะถูกจำกัดอยู่เพียงแค่ปริมาณฟลาโวนอยด์เพียงอย่างเดียว[22] ดังนั้น หากต้องการเลือกใช้สมุนไพรผสมของพืชสมุนไพรในสามชนิดนี้ โดยมุ่งเน้นที่คุณสมบัติของฟลาโวนอยด์ ควรเลือกผสมระหว่างใบพญายอกับใบหนาดใหญ่

ถึงแม้ว่าการผสมสมุนไพร จะส่งผลให้ทั้งปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ไม่ได้มีปริมาณมากกว่าในสมุนไพรเดี่ยว จากใบหนาดใหญ่เพียงอย่างเดียว แต่ก็ควรคำนึงถึงสารประกอบทุติยภูมิของพืชชนิดอื่น [22] ที่เมื่อนำมาประยุกต์ใช้จริงไม่ว่าจะเป็นการกินพืชสมุนไพรหรือการพัฒนาเป็นยาใช้ภายนอกร่างกาย ย่อมมีโอกาสที่จะส่งผลส่งเสริมฤทธิ์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น[15,23] โดยอาศัยแนวคิดดั้งเดิมจากภูมิปัญญาโบราณในการใช้สมุนไพรตำรับตามตำราการแพทย์แผนไทยที่ได้มีการใช้และถ่ายทอดกันมาอย่างยาวนาน โดยมีความเชื่อที่ว่ารักษาสมดุลของธาตุดิน น้ำ ลม ไฟ ในร่างกาย โดยคำนึงถึงรสยา ซึ่งหมายถึงโครงสร้างโมเลกุลและหมู่ฟังก์ชันทางเคมีที่แตกต่างกันในรสยาแต่ละรสชาติ ได้มีแนวคิดว่าการใช้ยาเดี่ยวจะส่งผลกระทบหรือผลข้างเคียงกระทบต่อธาตุใดธาตุหนึ่งเพียงอย่างเดียวในร่างกาย จากการทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นว่าในแง่มุมของปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เพียงเท่านั้น

จากผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging เนื่องด้วยการทดลองนี้ต้องการทราบความแตกต่างของการผสมสมุนไพร จึงเลือกใช้วิธีการวัดปริมาณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่มีข้อดี คือ ราคาไม่แพง เตรียมได้ง่าย และสามารถทำให้เห็นความแตกต่างในแง่มุมของสารประกอบที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธี DPPH ในการศึกษาเพราะมีความเหมาะสมในการวัดสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์[17] สอดคล้องกับวิธีการสกัดในการทดลองที่ใช้เอทานอลในการสกัดสาร ผลการทดลองพบว่า ร้อยละความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ของสารสกัดจากใบหนาดใหญ่เพียงชนิดเดียวมีค่าสูงสุดที่ร้อยละ 56.99 ส่วนสมุนไพรผสมระหว่างใบพญายอกับใบหนาดใหญ่ และ ผสมระหว่างใบกระดูกไก่ดำกับใบหนาดใหญ่มี ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้น หากต้องการเลือกผสมสมุนไพรโดยสนใจในด้านของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ที่เน้นสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายได้ดี

ในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิด Hydrophobic ควรเลือกผสมสมุนไพร ผสมระหว่างใบพญายอกับใบหนาดใหญ่ และใบกระดูกไก่ดำกับใบหนาดใหญ่

ในส่วนการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *S. aureus* และ *E.coli* พบว่า สารสกัดจากใบหนาดใหญ่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดผสม และสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวอื่น ๆ ที่ศึกษา ซึ่งอาจเป็นผลจากปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในสารสกัดจากใบหนาดใหญ่ ที่มีปริมาณสูงที่สุด ซึ่งเป็นเหตุผลหนึ่งที่ส่งผลให้ส่งเสริมฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย[24] ก่อนหน้านี้ได้มีการรายงานผลของสารสกัดจากใบหนาดใหญ่ ว่ามีศักยภาพอย่างมากในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบฟลาโวนอยด์ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต เมื่อนำมาทำการแยกสารประกอบโมโนเมอร์ พบว่า vanillin สามารถยับยั้ง *S. aureus* ที่ค่า MIC เข้มข้น 32 µg / mL[25] จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าสมุนไพรในรูปแบบผสมทำให้เกิดฤทธิ์ร่วมที่สามารถเสริมความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการใช้สมุนไพรในรูปแบบผสมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพระหว่างสารสกัดจากใบพญายอ และใบกระดูกไก่ดำ และอาจมีความเป็นไปได้ว่า สารสกัดจากใบพญายอและใบกระดูกไก่ดำ มีสารประกอบทางชีวภาพอื่นๆ เช่น alkaloids, triterpenoids, carotenoids[22] ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย[26] นอกจากนี้ยังมีหลักฐานยืนยันว่าสารสกัดจากใบกระดูกไก่ดำ มีสารประกอบ **O-methyl ethers**, **2-aminobenzyl alcohol**, และ **sitosterol** ซึ่งช่วยทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้มีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ดี เช่น *S. aureus, E. coli, Bacillus subtilis*, และ *Shigella sp*. โดยการสกัดด้วยเมทานอลและเอทิลอะซิเตตที่แสดงผลการยับยั้งแบคทีเรียดีที่สุด[27] ผลการทดลองที่ได้จากการผสมพญายอและใบหนาดใหญ่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีนัยสำคัญ ทั้งที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าสารสกัดจากใบพญายอที่สกัดด้วยเอทานอล, อะซิโตน, และ คลอโรฟอร์ม ไม่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* แต่มีศักยภาพที่ดีในการสมานแผล[28] จากผลการศึกษาน่าจะเป็นแนวทางเลือกที่น่าสนใจในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม ค่าความเข้มข้นที่สูงขึ้นในบางการผสม เช่น การผสมพญายอและใบกระดูกไก่ดำที่แสดง MBC ที่สูงกว่า 10 mg/ml แสดงให้เห็นถึงความจำเป็นในการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับการปรับปรุงสูตรผสมเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด การศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของสมุนไพรไทยในการเป็นแหล่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ การใช้สมุนไพรในรูปแบบผสมอาจเป็นกลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มีประโยชน์ต่อร่างกายต่อไป

ข้อสรุป

ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ พบว่า สารสกัดจากใบหนาดใหญ่มีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดสมุนไพรอื่นในการทดลอง โดยมีค่าปริมาณฟีนอลิกที่ 194.82 mg GAE/g และฟลาโวนอยด์ที่ 191.23 mg QE/g ในขณะที่สารสกัดสมุนไพรเดี่ยว จากใบพญายอ มีปริมาณฟีนอลิกน้อยที่สุด และสารสกัดจากสมุนไพรเดี่ยวจากใบกระดูกไก่ดำมีปริมาณฟลาโวนอยด์น้อยที่สุด

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดจากใบหนาดใหญ่ แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ร้อยละ 56.99 (% inhibition) และการผสมคู่ระหว่างใบพญายอและใบหนาดใหญ่, และคู่ระหว่างใบกระดูกไก่ดำและใบหนาดใหญ่ให้ผลลัพธ์ใกล้เคียงไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่า ใบหนาดใหญ่และสารสกัดคู่ผสมระหว่าง ใบพญายอและใบกระดูกไก่ดำ มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุด โดยมี MIC และ MBC ที่ความเข้มข้น 0.625 mg/ml สำหรับเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli*

จากการศึกษาพบว่า การใช้สมุนไพรในรูปแบบผสม แสดงให้เห็นถึงปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งแสดงถึงศักยภาพของสารสกัดจาก ใบกระดูกไก่ดำ ใบพญายอ และใบหนาดใหญ่ ทั้งแบบสมุนไพรเดี่ยวและผสม ในการเป็นแหล่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ สมุนไพรทั้งสามชนิดนี้มีความโดดเด่นด้านการแพทย์แผนไทยโดยเฉพาะการ

ใช้เป็นสมุนไพรใช้ภายนอกร่างกาย จากข้อมูลงานวิจัยนี้ ต้องการแสดงให้เห็นถึงการเข้าตำรับ หรือการเข้ารวมกันของสมุนไพร ในแง่มุมของปริมาณสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เพื่อเป็นข้อมูลในการพิจารณาเพื่อพัฒนาตำรับยาสมุนไพรเพื่อไว้ใช้ภายนอกที่มีศักยภาพด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงคุณสมบัติตามความสามารถของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ที่พบได้ในธรรมชาติ เพื่อเป็นแนวทางและแนวคิดในการพัฒนาสารจากธรรมชาติให้มีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีศักยภาพสูงมากยิ่งขึ้นในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย จนสำเร็จ

ตาราง ภาพ และแผนภาพ

ตารางที่ 1 ปริมาณสารฟีนอลิก (Total Phenolic Contents; TPC) ของสารสกัดเดี่ยว สารสกัดผสม 2 ชนิด และสารสกัดผสม 3 ชนิด ของใบพญายอ ใบกระดูกไก่ดำและใบหนาดใหญ่

ชนิดของสารสกัด	TPC (mg GAE / g of extract)
ใบพญายอ	$11.98^{f} \pm 1.44$
ใบกระดูกไก่ดำ	$38.15^{e} \pm 2.29$
ใบหนาดใหญ่	$194.82^{a} \pm 10.26$
ใบพญายอ + ใบกระดูกไก่ดำ	$32.48^{e} \pm 2.47$
ใบพญายอ + ใบหนาดใหญ่	$118.98^{c} \pm 8.69$
ใบกระดูกไก่ดำ + ใบหนาดใหญ่	$131.82^{b} \pm 9.29$
ใบพญายอ + ใบกระดูกไก่ดำ + ใบหนาดใหญ่	$99.65^{d} \pm 3.91$
F-test	**
C.V. (%)	5.67

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ P<0.05 ตามการทดสอบของ Duncan's multiple range test;

** = ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P<0.01

ตารางที่ 2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total Flavonoid Contents; TFC) ของสารสกัดเดี่ยว สารสกัดผสม 2 ชนิด และสารสกัดผสม 3 ชนิด ของใบพญายอ ใบกระดูกไก่ดำและใบหนาดใหญ่

ชนิดของสารสกัด	TFC (mg QE / g of extract)
ใบพญายอ	$58.62^{e} \pm 6.79$
ใบกระดูกไก่ดำ	$27.78^{g} \pm 5.30$
ใบหนาดใหญ่	$191.23^{a} \pm 5.13$
ใบพญายอ + ใบกระดูกไก่ดำ	$43.28^{f} \pm 2.36$
ใบพญายอ + ใบหนาดใหญ่	$123.95^{b} \pm 9.64$
ใบกระดูกไก่ดำ + ใบหนาดใหญ่	$100.45^{c} \pm 6.24$
ใบพญายอ + ใบกระดูกไก่ดำ + ใบหนาดใหญ่	$83.12^{d} \pm 9.64$
F-test	**
C.V. (%)	8.46

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ P<0.05 ตามการทดสอบของ Duncan's multiple range test;

** = ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P<0.01

ตารางที่ 3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging ของสารสกัดเดี่ยว สารสกัดผสม 2 ชนิด และสารสกัดผสม 3 ชนิด ของใบพญายอ ใบกระดูกไก่ดำและใบหนาดใหญ่

ชนิดของสารสกัด	% inhibition
ใบพญายอ	$26.20^{d} \pm 0.84$
ใบกระดูกไก่ดำ	$22.36^{e} \pm 0.69$
ใบหนาดใหญ่	$56.99.^{a} \pm 3.10$
ใบพญายอ + ใบกระดูกไก่ดำ	$22.55^{e} \pm 0.69$
ใบพญายอ + ใบหนาดใหญ่	$41.62^{b} \pm 2.51$
ใบกระดูกไก่ดำ + ใบหนาดใหญ่	$39.31^{b} \pm 2.65$
ใบพญายอ + ใบกระดูกไก่ดำ + ใบหนาดใหญ่	$35.37^{c} \pm 2.01$
F-test	**
C.V. (%)	4.75

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าที่มีตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ P<0.05 ตามการทดสอบของ Duncan's multiple range test;

** = ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P<0.01

ตารางที่ 4 ความสามารถในการยับยั้ง (MIC) และฆ่า (MBC) เชื้อ *S.aureus* และ *E.coli* ของสารสกัดเดี่ยว สารสกัดผสม 2 ชนิด และสารสกัดผสม 3 ชนิด ของใบพญายอ ใบกระดูกไก่ดำและใบหนาดใหญ่

ชนิดของสารสกัด	MIC ที่ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/mL)		MBC ที่ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/mL)	
	S.aureus	*E.coli*	*S.aureus*	*E.coli*
ใบพญายอ	5.000	2.500	5.000	10.000
ใบกระดูกไก่ดำ	2.500	5.000	5.000	10.000
ใบหนาดใหญ่	0.625	0.625	1.250	10.000
ใบพญายอ + ใบกระดูกไก่ดำ	0.625	0.625	10.000	>10.000
ใบพญายอ + ใบหนาดใหญ่	1.250	2.500	1.250	2.500
ใบกระดูกไก่ดำ + ใบหนาดใหญ่	2.500	2.500	2.500	2.500
ใบพญายอ + ใบกระดูกไก่ดำ + ใบหนาดใหญ่	2.500	2.500	10.000	>10.000

ก) ข) ค)

ง) จ) ฉ)

ภาพที่ 1 ก) และ ง) แสดงภาพต้นกระดูกไก่ดำ และใบกระดูกไก่ดำที่ใช้ในการทดลอง *J. gendarussa* (Kai Dam)
ข) และ จ) แสดงภาพต้นพญายอ และใบพญายอที่ใช้ในการทดลอง *C. nutans* (Phaya Yaw)
ค) และ ฉ) แสดงภาพต้นหนาดใหญ่ และใบหนาดใหญ่ที่ใช้ในการทดลอง *B. balsamifera* (Nard Yai)

เอกสารอ้างอิง

1. Tungmunnithum D, et al. (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: an overview. **Medicines (Basel)**. 5(3), 93.
2. Ahmed SI, et al. (2016). Pharmacologically active flavonoids from the anticancer, antioxidant, and antimicrobial extracts of Cassia angustifolia Vahl. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 16, 460.
3. Losada-Barreiro S, et al. (2022). Biochemistry of antioxidants: mechanisms and pharmaceutical applications. **Biomedicines**. 10(12), 3051.
4. Turner NA, et al. (2019). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**. 17, 203-218.
5. Kaper J, et al. (2004). Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**. 2, 123-140.
6. Hanh TTH, et al. (2011). Anti-inflammatory effects of fatty acids isolated from Chromolaena odorata. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. 4(10), 760-763.
7. Lin CM, et al. (2023). Antiviral and immunomodulatory activities of Clinacanthus nutans (Burm. f.) Lindau. **International Journal of Molecular Sciences**. 24(13), 10789.
8. Pang Y, et al. (2014). Blumea balsamifera: a phytochemical and pharmacological review. **Molecules**. 19(7), 9453-9477.
9. Wang H, et al. (2023). Advancing herbal medicine: enhancing product quality and safety through robust quality control practices. **Frontiers in Pharmacology**. 14, 1265178.
10. Bitwell C, et al. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. **Scientific African**. 19(2023) e01585.
11. Pérez M, et al. (2023). The chemistry behind the Folin-Ciocalteu method for the estimation of (poly)phenol content in food: total phenolic intake in a Mediterranean dietary pattern. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 71(46), 17543-17553.
12. Aparna B & Hema BP. (2022). Preliminary screening and quantification of flavonoids in selected seeds of Apiaceae by UV-visible spectrophotometry with evaluation study on different aluminium chloride complexation reaction. **Indian Journal of Science and Technology**. 15(18), 857-868.
13. Hwang SJ & Lee JH. (2023). Comparison of antioxidant activities expressed as equivalent of standard antioxidant. **Food Science and Technology**. 43.
14. Wikler MA, et al. (2006). Broth dilution procedures. In: Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard M7-A7. 7th ed. **Clinical and Laboratory Standards Institute**; Wayne, PA, USA.
15. Hassanpour SH & Doroudi A. (2023). Review of the antioxidant potential of flavonoids as a subgroup of polyphenols and partial substitute for synthetic antioxidants. **Avicenna Journal of Phytomedicine**. 13(4), 354-376.
16. Lobo V, et al. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**. 4(8), 118-126.

17. Rumpf J, et al. (2023). Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. **International Journal of Biological Macromolecules.** 233(2023), 123470.
18. Echegaray N, et al. (2021). Measurement of antioxidant capacity of meat and meat products: methods and applications. **Molecules**. 26(13), 3880.
19. Sarega N, et al. (2016). Phenolic-rich extract from Clinacanthus nutans attenuates hyperlipidemia-associated oxidative stress in rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2016, 4137908.
20. Marliani N. (2022). Optimization extraction for total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity with different solvents and UPLC-MS/MS metabolite profiling of Justicia gendarussa Burm.f. **Chiang Mai University (CMU) Journal of Natural Sciences**. 21(3), 1-12.
21. Rodríguez B, et al. (2023). Mechanisms of action of flavonoids: antioxidant, antibacterial and antifungal properties. **Ciencia, Ambiente y Clima**. 6(2), 33-66.
22. Kavitha K, et al. (2016). Phytochemical and pharmacological profile of Justicia gendarussa Burm f.: review. **Journal of Pharmacy Research**. 10, 990-997.
23. Dadzie I, et al. (2020). Cytotoxic and antioxidant effects of antimalarial herbal mixtures. **International Journal of Microbiology**. 2020, 8645691.
24. Shamsudin NF, et al. (2022). Antibacterial effects of flavonoids and their structure-activity relationship study: a comparative interpretation. **Molecules**. 27(4), 1149.
25. Wang J, et al. (2023). Chemical constituents and bioactivities of Blumea balsamifera (Sembung): a systematic review. **Food Science and Technology**. 43, e132322, 2023.
26. Huang W, et al. (2022). Biosynthesis investigations of terpenoid, alkaloid, and flavonoid antimicrobial agents derived from medicinal plants. **Antibiotics (Basel)**. 11(10), 1380.
27. Jain T, et al. (2024). Review on pharmacology activities of Justicia Gendarussa Burm F. **Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine**. 10(2024), 100339.
28. Ban WK, et al. (2022). Wound Healing, Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Clinacanthus nutans* (Burm.f.) *Lindau* and *Strobilanthes crispus* (L.) *Blume* Extracts. **Molecules**. 27(5),1722.