

ผลการยับยั้งของสารสกัดรังไหมจาก *Bombyx mori* ต่อแบคทีเรียและอนุมูลอิสระ
Inhibitory Effects of Cocoon Extract from *Bombyx mori* on Bacteria
and Free Radical

พวงผกา คุ่มสีไว^{1*} และยิ่งมณี ตระกูลพั่ว²

Puangphaka kumseewai^{1*} and Yingmanee Tragoolpua²

¹ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

¹ Graduate Student, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาจุลชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

² Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University

* Corresponding author, E-mail: paew.ppty@hotmail.com

บทคัดย่อ

เส้นไหมเป็นเส้นใยธรรมชาติสร้างจากหนอนไหม (*Bombyx mori*) นิยมนำเส้นไหมมาใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เซอริซินเป็นโปรตีนกาวไหมถูกนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านเภสัชกรรม การแพทย์ เครื่องสำอาง ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารสกัดจากรังไหมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* sp. Methicillin resistan *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดจากรังไหมมีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุดต่อเชื้อ *Corynebacterium* sp. โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 16.67 ± 0.89 mm ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 25 mg/ml และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ เท่ากับ 50 mg/ml นอกจากนี้สารสกัดจากรังไหมสามารถยับยั้ง MRSA, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Shigella* sp. และ *E. coli* เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังไหม พบว่า ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ เท่ากับ 9.66 ± 1.51 mg gallic/g extract และมีสารประกอบฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 1.12 ± 0.56 mg quercetin /g extract

คำสำคัญ: *Bombyx mori* เซอริซิน สารสกัดรังไหม แบคทีเรีย ต้านสารอนุมูลอิสระ

Abstract

Silk is a natural fiber produced from *Bombyx mori* silkworm. Silk is a highly used in textile industry. Sericin is a protein that can be used in pharmaceutical application of cosmetics. Therefore, this research aims to study cocoon extract using for the inhibition of bacteria; *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* sp., methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. and *Pseudomonas aeruginosa*.

The extracts were screened for activity by the agar-well diffusion method. The cocoon extract showed highest antibacterial activity against *Corynebacterium* sp. with inhibition zone of 16.67 ± 0.89 mm. Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of the cocoon extract were 25 and 50 mg/ml. Moreover, the cocoon extract also showed antibacterial activity against MRSA *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Shigella* sp. and *E. coli*. The anti-free radical activity of cocoon extract was tested and found that there were anti-free radical activity (9.66 ± 1.51) mg gallic/g extract and flavonoid compound (1.12 ± 0.56) mg quercetin /g extract.

Keywords: *Bombyx mori*, Sericin, Cocoon extract , Bacteria, Anti-free radical

บทนำ

เส้นไหมเป็นเส้นใยธรรมชาติสร้างจากหนอนไหม หนอนไหมมี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มไหมมัลเบอร์รี่ (mulberry silkworms) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่ากลุ่มไหมบ้าน (domesticated silkworm) เช่น *Bombyx mori* และกลุ่มที่สอง คือ กลุ่มที่ไม่ใช่มัลเบอร์รี่ (non-mulberry silkworm) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่ากลุ่มไหมป่า (wild silkworm) เช่น ไหมทาทาร์ (*Antheraea mylitta* หรือ *A. pernyi*) และไหมอีรี่ (*Samia* spp.) เส้นไหมมีลักษณะ เหนียว และทนทาน จึงนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เส้นใยไหมประกอบด้วย โปรตีน 2 ชนิด คือ ไฟโบรอิน (Fibroin, $C_{15}H_{26}N_6O_6$) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในรังไหมมีประมาณ 70% เป็นโปรตีนเส้นใยชนิดที่ไม่มีขั้ว (กนกพร พลเยี่ยม และสินีนากู ศิริ, 2556) และเซอริซิน (Sericin, $C_{15}H_{23}N_5O_8$) มีประมาณ 20-30% ของรังไหม (Caper et al., 2009) และส่วนประกอบอื่นๆ เช่น ไขมัน แวกซ์ 0.4-0.8% สารไฮโดรคาร์บอน 1.2-1.6% สารสี 0.2% ปริมาณเถ้า 0.7% (ศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2553) เซอริซินเป็นโปรตีนที่สร้างต่อมได้สมองส่วนกลางของหนอนไหมและถูกขับออกมาเคลือบแกนไหม เพื่อเป็นตัวยึดโปรตีนไฟโบรอินให้เชื่อมติดกันเป็นเส้นใย เซอริซินประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด เช่น กรดอะมิโน aspartic glycine กรดอะมิโนของหมู่ไฮดรอกซิล กรดอะมิโนที่มีขั้ว และกรดอะมิโนไม่มีขั้ว (Pushpa et al., 2013) เซอริซินมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Dash et al., 2009) ยับยั้งการตายของเซลล์ ป้องกันการเกิดเนื้องอก ป้องกันการแข็งตัวของเลือด รักษาบาดแผล ป้องกันรังสี UV จากแสงแดด และยับยั้งแบคทีเรีย (Capar et al., 2009)



เชื้อแบคทีเรียก่อโรคพบได้ทั่วไปใน ดิน อากาศ อาหาร น้ำ เมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกายจะส่งผลกระทบต่อระบบในร่างกายของมนุษย์ เช่น ผิวหนัง ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น โดยเชื้อก่อโรคจะก่อความรุนแรงที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Staphylococcus intermedius*, *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. และ *Escherichia coli* (Sahu et al., 2015) *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* (Cogen et al., 2007) ส่วน *Corynebacterium* sp. เป็นเชื้อที่พบทั่วไปบนผิวหนังแต่สามารถเป็นเชื้อฉวยโอกาสก่อโรคบริเวณผิวหนังได้ นอกจากนี้ *Corynebacterium diphtheria* เป็นเชื้อก่อโรคสาเหตุของโรคคอตีบ (วันทนีย์ โลหะประภิตกุล, 2555)

การรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไปจะใช้ยาปฏิชีวนะ แต่เมื่อใช้เป็นเวลานานจะทำให้เชื้อเกิดการดื้อยา โดยมีรายงานการดื้อยาปฏิชีวนะของ methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรคบริเวณผิวหนัง ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ methicillin, penicillin และ vancomycin (Ho et al., 2014) ในปัจจุบันยังพบว่ามีเชื้อก่อโรคประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์ คือ *E. coli* O157:H7 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะจำพวก kanamycin, spectinomycin, ampicillin, streptomycin และ tetracycline ซึ่งมีแนวโน้มดื้อยาเพิ่มขึ้นทุกปี (Ahmed และ Shimamoto, 2014)

นอกจากนี้สารอนุมูลอิสระสร้างได้จากกระบวนการเมตาโบลิซึมภายในร่างกาย ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นในการรับหรือให้อิเล็กตรอน ดังนั้นเมื่อมีสารอนุมูลอิสระมาก อนุมูลอิสระเหล่านี้จะเข้าจับกับสารชีวโมเลกุลของเซลล์ ก่อให้เกิดสารพิษที่ทำลายเนื้อเยื่อหรืออาจไปเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมใน DNA ทำให้เซลล์ปกติเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์มะเร็ง (อนันต์ สกฤตภูมิ, 2551) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาสารสกัดรางไหมในการยับยั้งแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสารสกัดรางไหม ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดรางไหมที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบกับ gallic acid และ quercetin

ประโยชน์ที่จะได้รับ

1. ทราบผลของสารสกัดรางไหมที่มีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ
2. ทราบผลของสารสกัดรางไหมที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยกับเทียบกับ gallic acid และ quercetin



แนวคิด ทฤษฎี กรอบแนวคิด

เชื้อก่อโรคมีการแพร่กระจายเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากเชื้อก่อโรคบางกลุ่มมีการดื้อยาปฏิชีวนะ และบางชนิดเป็นเชื้อฉวยโอกาสเช่น *Corynebacterium* sp. เป็นเชื้อที่พบทั่วไปบนผิวหนังแต่สามารถเป็นเชื้อฉวยโอกาสก่อโรคบริเวณผิวหนังได้ ส่วน *Corynebacterium diphtheriae* เป็นเชื้อก่อโรคสาเหตุของโรคคอตีบ (วันทนี โลหะประภิตกุล, 2555) นอกจากนี้ผู้ป่วยจะติดเชื้อมีอาการรุนแรงมากขึ้น เมื่อติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา เช่น methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) โดยพบเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ methicillin, penicillin และ vancomycin (Ho et al., 2014) จากการศึกษาวิจัยมีการนำสารสกัดรังไหมมาใช้ควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โคโตซานและเซอร์ซิซินนาโนไฟเบอร์ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาบาดแผลสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ (Zhao et al., 2014) นอกจากนี้ Pushpa et al. (2013) สามารถนำนาโนเซอร์ซิซินมาเป็นส่วนผสมหลักในการผลิตไฮโดรเจล เพื่อใช้ประโยชน์ด้านการแพทย์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Proteus mirabilis* และ *E. coli* และพบว่าสารสกัดเซอร์ซิซินจากรังไหมอีรีสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* และ *S. aureus* โดยสัญญาณวิทยาของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีความผิดปกติไปจากเดิม เมื่อวิเคราะห์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Senakoon et al., 2009) นอกจากนี้การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดเซอร์ซิซินจากรังไหม *Bombyx mori* พบว่าสามารถยับยั้ง *Micrococcus luteus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบใน ดิน ผุ่น น้ำ บนผิวหนังของคน สัตว์ และซากสัตว์ (Jassim และ Asaree, 2010)

สารอนุมูลอิสระสร้างได้จากกระบวนการเมตาโบลิซึมภายในร่างกาย ดังนั้นเมื่อมีสารอนุมูลอิสระมากอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเข้าจับกับสารชีวโมเลกุลของเซลล์ ก่อให้เกิดสารพิษที่ทำลายเนื้อเยื่อหรืออาจไปเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมใน DNA ทำให้เซลล์ปกติเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์มะเร็ง (อนันต์ สกุลกิม, 2551) ซึ่งวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธีโดยวิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ DPPH และ ABTS radical scavenging assay จากการศึกษาสารสกัดรังไหมทาชาร์ *Antheraea assamensis* มีค่า IC₅₀ ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ เท่ากับ 25.83 µg/ml และมีสารต้านอนุมูลอิสระคือสารประกอบกลุ่ม flavonoid เท่ากับ 2.69±0.61 mg quercetin/g extract (Deori et al., 2013) ดังนั้นการศึกษารังไหมจึงได้ศึกษาสารสกัดรังไหม *Bombyx mori* ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดรังไหม

ซังรังไหมเหลือง *Bombyx mori* ในอัตราส่วน 1 g ต่อน้ำกลั่น 25 ml ทำการต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กรองสารสกัดด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1 เพื่อเอาเศษรังไหมหรือดักแด้ออก นำน้ำต้มรังไหม ไประเหยน้ำออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ทำให้สารสกัดแห้งด้วยเครื่อง lyophilization เก็บสารสกัดไว้ในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง และละลายสารสกัดหยาบด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 100% ซึ่งปริมาณของสารสกัดมี % yield เท่ากับ 11.25%

$$\text{สูตรคำนวณ \% yield} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของสารสกัด} - \text{น้ำหนักขวด}}{\text{น้ำหนักรังไหมที่ต้ม}} \times 100$$

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี Agar well diffusion (Devi et al., 2008)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. aureus*, *Corynebacterium* sp., methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), *E. coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. และ *P. aeruginosa* ใน Mueller Hinton broth (MHB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ปรับปริมาณเชื้อให้เทียบ เท่ากับ McFarland No.0.5 และใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อจุ่มลงในหลอดเพาะเชื้อ นำมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) ใช้ Cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 mm เจาะบนอาหารที่เกลี่ยเชื้อแล้ว หยดสารสกัดความเข้มข้น 200 mg/ml ปริมาตร 100 µl ลงในหลุมที่เจาะไว้ และใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin เป็นชุดควบคุมผลบวก และตัวทำละลายเป็นชุดควบคุมผลลบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

เพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบทั้ง 7 ชนิด จากนั้นเจือจางสารสกัดแบบลำดับส่วน 2 เท่า โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้น เท่ากับ 200 mg/ml ในอาหาร MHB เติมแบคทีเรียก่อโรคที่ปรับความขุ่นแล้วในหลอดทดลองรวมกับสารสกัด อัตราส่วน 1:1 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอ่านค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในหลอดทดลองเทียบกับหลอดควบคุมใช้ห้วงถ่ายเชื้อจุ่มในหลอดทดลองที่ไม่มีความขุ่น นำไป Streak plate บนอาหาร MHA อ่านผลโดยดูการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยค่า MBC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ 99.99% โดยไม่พบการเจริญของเชื้อ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังไหมโดยวิธี DPPH radical scavenging assay (Devi et al., 2008)

เตรียมสารละลาย 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM ละลายใน methanol เก็บให้พ้นแสง จากนั้นเติมสารสกัดรังไหม ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.5 ml ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 1.5 ml ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าดูดกลืนแสง 517 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ methanol เป็น blank และใช้ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารละลายมาตรฐาน นำค่าที่ได้มาคำนวณหาการยับยั้งอนุมูลอิสระเทียบกับ gallic acid

การหาปริมาณ flavonoid compound ของสารสกัดรังไหม (Deori et al., 2013)

เตรียมสารละลายสารสกัดรังไหม โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย เติมสารสกัดรังไหมความเข้มข้น เท่ากับ 100 mg/ml ปริมาตร 0.5 ml สารละลาย 10% aluminium chloride ปริมาตร 100 μ l methanol ปริมาตร 1.5 ml 1M potassium acetate ปริมาตร 100 μ l และน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 2.80 ml บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสง ที่ 415 nm โดยใช้ methanol เป็น blank ใช้ quercetin ที่ความเข้มข้น 7.812-125 μ g/ml เป็นสารละลายมาตรฐาน และค่าความเข้มข้นของสารประกอบ flavonoid ในสารสกัด คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน และนำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณ flavonoid compound เทียบกับ quercetin

ผลการวิจัย

การทดสอบความสามารถของสารสกัดรังไหมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion

การทดสอบความสามารถของสารสกัดรังไหมความเข้มข้น 200 mg/ml ปริมาตร 100 μ l ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 7 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *Corynebacterium* sp., methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), *E. coli*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp. และ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส พบว่าสารสกัดจากรังไหมสามารถยับยั้ง *Corynebacterium* sp. ได้ดีที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 16.67 mm และยับยั้ง *Shigella* sp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, MRSA โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 10, 10.33, 10.67, 13.67 และ 14.67 mm ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งพบว่า DMSO ที่ใช้ในการละลายสารสกัดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดรังไหมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

เมื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดรังไหมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี broth dilution พบว่าสารสกัดรังไหมมีค่า MIC ต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของ *Corynebacterium* sp., *S. aureus* *P. aeruginosa* และ MRSA เท่ากับ 25 mg/ml รองลงมา คือ *Shigella* sp., *E. coli* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 50 mg/ml สำหรับความเข้มข้นของสารสกัดรังไหมที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ (MBC) พบว่าสารสกัดรังไหมสามารถฆ่าเชื้อ *Corynebacterium* sp., *S. aureus*, *Shigella* sp., *E. coli* และ MRSA โดยมีค่า MBC ต่ำสุด เท่ากับ 50 mg/ml และมีค่า MBC เท่ากับ 100 mg/ml ในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดแห้งด้วยวิธี Agar well diffusion

สารสกัดแห้ง ใหม่ (200 mg/ml)	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (mm)						
	<i>Corynebacterium</i> sp.*	<i>Shigella</i> sp.	<i>Samonella</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA
Gentamicin 10 µg/ml	16.67 ± 0.89	10.00±0.00	0.00±0.00	10.33±0.44	10.67±0.44	13.67±0.44	14.67±0.44
	15.00 ± 0.00	15.33±0.58	16.67±1.15	15.00±0.00	12.33 ±1.15	17.00±1.00	0

หมายเหตุ * หมายถึง เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ถูกยับยั้งการเจริญได้มากที่สุด

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดแห้ง ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในหลอดทดลอง (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดแห้งที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ 99.99% (MBC)

สารสกัดแห้งใหม่ (200 mg/ml)	ความเข้มข้น (mg/ml)													
	<i>Corynebacterium</i> sp.		<i>Shigella</i> sp.		<i>Samonella</i> sp.		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		MRSA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
	25	50	50	50	0	0	50	50	25	100	25	50	25	50
Gentamicin 10 µg/ml	0.16	0.16	1.25	1.25	2.50	2.50	0.31	0.31	0.16	0.16	0.04	0.04	0	0



การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรังไหมโดยวิธี DPPH radical scavenging assay (Devi et al., 2008)

เมื่อนำสารสกัดรังไหมมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH radical เพื่อคำนวณหา % inhibition จากนั้นนำค่าที่ได้มา plot กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) จากนั้นนำค่า (IC_{50}) ของสารสกัดที่ได้มา คำนวณหาค่าการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) เพื่อหาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดรังไหมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่าอนุมูลอิสระเท่ากับ 9.66 ± 1.51 mg gallic/g extract

การหาปริมาณ flavonoid compound ของสารสกัดรังไหม (Deori et al., 2013)

จากการวิเคราะห์ปริมาณ flavonoid จากสารสกัดรังไหม วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 415 nm โดยแสดงค่าออกมาในรูปของน้ำหนักเป็นมิลลิกรัมของ quercetin เทียบกับน้ำหนักของสารสกัดพบว่า สารสกัดรังไหมที่ใช้ทดสอบมีปริมาณ flavonoid เท่ากับ 1.12 ± 0.56 mg quercetin /g extract

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดรังไหมต้ม โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 7 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *Corynebacterium* sp. MRSA, *E. coli*, *Shigella* sp., *Samonella* sp. และ *P. aeruginosa* พบว่าสารสกัดรังไหมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีต่อเชื้อ *Corynebacterium* sp., *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ MRSA โดยมีค่า MIC เท่ากับ 25 mg/ml ซึ่งเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการก่อโรคแตกต่างกันไปแต่ละสายพันธุ์ ผลที่ได้จากการทดลองมีความสอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าสารสกัดรังไหมจาก *Bombyx mori* สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *S. aureus* แสดงว่าสารสกัดรังไหมสามารถยับยั้งกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกได้ โดยสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ได้แก่ โพรตีนเซอร์ริซิน (Zhao et al., 2014) นอกจากนี้สารสกัดเซอร์ริซินจากไหมอิตาลีสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* และ *S. aureus* โดยสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีความผิดปกติไปจากเดิม (Senakoon et al., 2009) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารสกัดจากรังไหมบ้าน *Bombyx mori* ในการศึกษาครั้งนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคน้อยกว่าสารสกัดรังไหมป่า ได้แก่ ไหมอิตาลี *Samia ricini* (Senakoon et al., 2009)

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดรังไหมที่มีฤทธิ์ต่อการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าสารสกัดรังไหมจากการทดลองครั้งนี้มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 9.66 ± 1.51 mg gallic/g extract มีค่า IC_{50} เท่ากับ 505.03 μ g/ml

และมีสารประกอบ flavonoid เท่ากับ 1.12 ± 0.56 mg quercetin/g extract เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า IC_{50} ของสารสกัดรังไหมจาก *Antheraea assamensis* มีค่าเท่ากับ 25.83 μ g/ml และมีสารประกอบ flavonoid เท่ากับ 5.12 mg quercetin/g (Deori *et al.*, 2013) ดังนั้น สาร flavonoids พบได้ในปริมาณที่แตกต่างกันในไหมบ้าน เช่น *Bombyx mori* และกลุ่มไหมป่า เช่น ไหมทาชาร์ *Antheraea mylitta* หรือ *A. pernyi* (Deori *et al.*, 2013) และ ไหมอีรี *Samia* spp. (Prommuaka *et al.*, 2008) สาร flavonoid เป็นสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) ประเภทพอลิฟีนอล (polyphenol) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบ flavonoids ได้แก่ flavonol, flavonone, flavone, isoflavone, flavonol catechin และ anthocyanins (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, 2558) ดังนั้นแหล่งที่มาต่างกันของสารสกัดรังไหมจากกลุ่มไหมป่าและกลุ่มไหมบ้านจะทำให้สารสกัดรังไหมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำนักงานคณะกรรมการนโยบายวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และนวัตกรรมแห่งชาติ (สวทน) ภายใต้โครงการ Talent Mobility และบริษัท เพียรกุลไหมและฝ้าย จำกัด และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัย และงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ประจำปี 2558

เอกสารอ้างอิง

- กนกพร พลเยี่ยม และสินีนานู ศิริ. (2556). *การสกัดเซอรีซินจากรังไหม Bombyx mori and Samia cynthia ricini*. ขอนแก่น: ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. (31 มกราคม 2558). *ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร*. สืบค้นจาก <http://www.foodnetworksolution.com>
- วันทนี โลหะประกิตกุล. (10 มีนาคม 2558). *โรคคอตีบ ต้องรีบสยบ (ตอนที่1)*. สืบค้นจาก www.haamor.com/th
- ศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมภาคที่ 6 กรมส่งเสริมอุตสาหกรรมร่วมกับภาควิชาวิทยาการสิ่งทอ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (2553). *โครงการศึกษาวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตการย้อมสีธรรมชาติ. กลุ่มจังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างงบประมาณไทยเข้มแข็ง.*
- อนันต์ สกฤตภูมิ. (2551). *อนุมูลอิสระ สารอันตรายต่อสุขภาพและร่างกาย. บทความวิชาการ ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์. สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.*

- Ahmed, A.M., & Shimamoto, T. (2014). Molecular analysis of multidrug resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 193, 68–73.
- Capar, G., Aygun, S. S., & Gecit, M. R. (2009). Separation of sericin from fatty acids towards its recovery from silk degumming wastewaters. *Journal of Membrane Science*, 342, 179–189.
- Cogen, A. J., Nizet, V. & Gallo, R. I. (2007). Skin microbiota: a source of disease or defence. *Journal of Dermatology*, 158, 442-455.
- Dash, B. C., Mandal, B. B., & Kundu, S. C. (2009). Silk gland sericin protein membranes: Fabrication and characterization for potential biotechnological applications. *Journal of Biotechnology*, 144, 321–329.
- Deori, M., Boruah, D. C., Devi, D., & Dev, R. (2013). Antioxidant and antigenotoxic effects of pupae of the muga silkworm *Antheraea assamensis*. *Journal of Food Bioscience*, 5, 108-114.
- Devi, K. P., Suganthy, N., Kesika P., & Pandian, S. K. (2008). Bioprotective Properties of Seaweeds: *In vitro* Evaluation of Antioxidant Activity and Antimicrobial Activity Against Food Borne Bacteria in Relation to Polyphenolic Content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8(38), 1-11.
- Jassim, K.N. & Asaree., O.J. (2010). Study of the antimicrobial activity of silk sericin from silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Medical Sciences*, 23(2), 130-133.
- Ho, C. M., Lin, C. Y., Ho, M. W., Lin, H. C., Peng, C. T. & Lu, J. J. (2014). Concomitant genotyping revealed diverse spreading between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in central Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 1, 1-8.
- Prommuaka, C., Eknankulb, W. D. & Shotipruka, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. *Journal of Separation and Purification Technology*, 62, 444–448.
- Pushpa, A., Vishnu, B. V. G. & K. S., T. R. (2013). Preparation of nano silk sericin based Hydrogels from silk industry waste. *Journal of Environmental Research and Development*, 8, 243-253.

- Sahu, M. C., Dubey, D., Rath, S., Panda, T., & Padhy, R.N. (2015). Monograph: *In vitro* efficacy of 30 ethnomedicinal plants used by Indian aborigines against 6 multidrug resistant Gram-positive pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(2), 136-150.
- Senakoon, W., Nuchadomrong, S., Sirimungkararat, S., Senawong ,T. & Kitikoon, P. (2009). Antibacterial action of eri (*Samia ricini*) sericin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 1, 222-228.
- Zhao, R., Li, S. B., Zhangb, Y., Zhangb, D., & Tangb, Z. (2014). Electrospun chitosan/sericin composite nanofibers with antibacterial property as potential wound dressings . *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 92-97.