

# ผลของสารสกัดจากกะทกรก (*Passiflora foetida* Linn.) ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ

## Effect of *Passiflora foetida* Linn. extract on antioxidant, tyrosinase inhibition, antimicrobial and anti-inflammatory activity

ณพัชญ์ บัวจูน<sup>1\*</sup> และ วิริยาภรณ์ กล่อมสังข์เจริญ<sup>1</sup>

Napattaorn Buachoon<sup>1\*</sup> and Wiriyabhorn Klomsungcharoen<sup>1</sup>

Received: 21 January 2025 ; Revised: 10 March 2025 ; Accepted: 9 April 2025

### บทคัดย่อ

กะทกรกเป็นพืชสมุนไพรที่พบได้ทั่วไปทุกภาคของประเทศไทย เป็นพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งจุลินทรีย์ ต้านการอักเสบ และต้านแบคทีเรีย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของกะทกรก ได้แก่ ใบ ดอก และเมล็ด โดยสกัดด้วยเทคนิคอัลตราโซนิคร่วมกับเอทานอล 70% จากนั้นนำสารสกัดมาวิเคราะห์หาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี dopachrome ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 4 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี microdilution และฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่ง Nitric oxide ในเซลล์ RAW 264.7 ผลการทดลอง พบว่า สารสกัดหยาบส่วนใบ ดอก และเมล็ด พบสารพฤกษเคมี ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน และเทอร์ปีนอยด์ และสารสกัดหยาบใบกะทกรกมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และ ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด (47.06 mg GAE/g extract และ 50.87 mg QE/g extract ตามลำดับ) นอกจากนี้ สารสกัดหยาบใบกะทกรกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีที่สุด โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 612.25 µg/mL, 202.39 µg/mL และ 15.26 µg/mL ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า สารสกัดหยาบใบกะทกรกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากดอกและเมล็ดกะทกรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นศักยภาพของสารสกัดจากใบกะทกรกมีในฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบส่วนดอกและเมล็ด ซึ่งผลที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมสำหรับพัฒนาผลิตภัณฑ์ เช่น ผลิตภัณฑ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และต้านการอักเสบ

**คำสำคัญ:** กะทกรก, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

### Abstract

*Passiflora foetida* Linn. is a medicinal plant found throughout regions of Thailand that possesses various biological properties, including antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and antibacterial. This study investigated the phytochemical composition and biological activities of extracts from different plant parts (leaves, flowers, and seeds) using ultrasonic extraction with 70% ethanol. Preliminary phytochemical screening, total phenolic and flavonoid content determination, and biological activity assessments revealed the presence of flavonoids, coumarins, saponins, tannins, and terpenoids, with leaf extracts demonstrating the highest total phenolic content and total flavonoid content. (47.06 mg GAE/g extract and 50.87 mg QE/g extract, respectively). Furthermore, the leaf extract demonstrated the most potent antioxidant activities, tyrosinase inhibition, and anti-inflammatory activities. (IC<sub>50</sub> 612.25 µg/mL, 202.39 µg/mL, and

<sup>1</sup> คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

<sup>1</sup> Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage, Pathum Thani Province

\* Corresponding author, e-mail: napattaorn@vru.ac.th

15.26 µg/mL, respectively.) The antimicrobial efficacy test conclusively showed that the crude leaf extract of *Passiflora foetida* Linn. significantly outperformed flower and seed extracts in inhibiting the growth of four microbial species ( $p < 0.05$ ). The findings indicate that *Passiflora foetida* Linn. leaf extract possesses the most potent bioactive properties compared to flower and seed extracts. These results suggest its potential use as an ingredient for developing antioxidant, tyrosinase inhibitory, antimicrobial, and anti-inflammatory products.

**Keywords:** *Passiflora foetida* Linn., antioxidant activity, tyrosinase inhibition, anti-microbial activity, anti-inflammatory activity

## บทนำ

พืชสกุล *Passiflora* ในวงศ์ Passifloraceae ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในวงการวิจัยพืชสมุนไพรเนื่องจากมีศักยภาพทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย โดยเฉพาะคุณสมบัติในการบำบัดอาการวิตกกังวล (anxiety) และภาวะหงุดหงิด (Simão *et al.*, 2018) ทำให้พืชในสกุลนี้มีคุณค่าอย่างยิ่งต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรมและเวชสำอาง (Casierra & Jarma, 2016) งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่าพืชในสกุล *Passiflora* มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญหลายชนิด รวมถึงสารประกอบฟีนอลิก อัลคาลอยด์ ไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยด์ และไซยาโนเจนิก ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ (Dhawan *et al.*, 2004; Gadioli *et al.*, 2017)

กะทกรก หรือ *Passiflora foetida* Linn. เป็นพืชในวงศ์ PASSIFLORACEAE ที่พบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย มักขึ้นในบริเวณป่าเบญจพรรณ ป่าดิบแล้ง หรือพื้นที่รกร้าง ลักษณะเป็นไม้เถาเนื้ออ่อนที่มีขน ปกคลุมทั่วลำต้น ใบคล้ายรูปหัวใจ ผลทรงกลมมีใบประดับเป็นเส้นฝอยหุ้ม เมื่อสุกมีสีเหลืองอมส้ม ภายในมีเนื้อสีส้มเมล็ดคล้ายเมล็ดแมงลักแช่น้ำและมีรสหวาน ในทางการแพทย์พื้นบ้าน มีการนำส่วนต่างๆ ของกะทกรกมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ทางการแพทย์หลายประการ เช่น รากใช้ชงเป็นชาเพื่อแก้ไข้ ผลสุกช่วยบำรุงปอด ใบตำพอกศีรษะแก้หัวดีและคัดจมูก ดอกใช้แก้อาการไอ ช้ำเชื้อในบาดแผล รักษาโรคผิวหนัง และลดอาการปวดบวม (Mohanasundari *et al.*, 2007)

งานวิจัยที่ผ่านมาได้รายงานฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายของสารสกัดจาก *Passiflora foetida* Linn. ทั้งที่สกัดด้วยน้ำเอทานอล และเมทานอล เช่น ฤทธิ์แก้ท้องเสีย ป้องกันแผลในกระเพาะอาหาร บรรเทาอาการปวด ลดความซึมเศร้า ด้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งจุลินทรีย์ ด้านการอักเสบ ลดความดันโลหิต ปกป้องตับ ต้านมะเร็ง และระดับความเจ็บปวด (Mohanasundari *et al.*, 2007; Sasikala *et al.*, 2011; Sutar & Bhosale, 2013; Anandan *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2011; Santosh *et al.*, 2011; Asadujjaman *et al.*, 2014) การศึกษาองค์ประกอบ

ทางเคมีพบ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์หลายชนิด เช่น ลูทีโอลิน (luteolin) และคริโซอีริโอล (chrysoeriol) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่มีประสิทธิภาพสูง (Nguyen *et al.*, 2015)

แม้จะมีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของกะทกรก แต่การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพระหว่างส่วนต่างๆ ของกะทกรก (ใบ ดอก และเมล็ด) ยังมีข้อมูลจำกัด โดยเฉพาะการใช้เทคนิคการสกัดด้วยอัลตราโซนิค ซึ่งเป็นวิธีการสกัดสมัยใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากสามารถเพิ่มอัตราเร็วในการสกัดและลดเวลาที่ใช้ในกระบวนการลง (Vitkhu *et al.*, 2008) กลไกของการสกัดด้วยอัลตราโซนิคอาศัยคลื่นเสียงความถี่สูงที่ปล่อยออกมาในตัวทำละลาย ทำให้เกิดฟองก๊าซที่มีการหดตัวและขยายตัวเป็นวัฏจักร เมื่อฟองก๊าซขยายตัวจะดึงสารจากภายในเซลล์พืชออกมาสู่ตัวทำละลาย และเมื่อฟองแตกจะเกิดความดันและความร้อนสูงในบริเวณนั้น ทำให้เนื้อเยื่อพืชฉีกขาดและสารออกฤทธิ์ละลายในตัวทำละลายได้ดีขึ้น (ดวงกมล เรืองงาม, 2557) วิธีการนี้มีข้อดีคือมีประสิทธิภาพในการสกัดสูง ใช้ตัวทำละลายน้อย มีต้นทุนต่ำ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Tao *et al.*, 2014)

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาเปรียบเทียบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของกะทกรก (ใบ ดอก และเมล็ด) ที่สกัดด้วยเทคนิคอัลตราโซนิคร่วมกับตัวทำละลายเอทานอล 70 % ซึ่งเป็นนวัตกรรมการสกัดที่แตกต่างจากงานวิจัยก่อนหน้าที่มักใช้วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม เช่น การแช่หมัก (maceration) หรือการสกัดด้วยตัวทำละลายร้อน (hot solvent extraction) ผลการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลสำคัญในการเลือกส่วนของกะทกรกที่มีศักยภาพสูงสุดสำหรับการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพ และยังเป็นการสนับสนุนการใช้ประโยชน์จากกะทกรกตามภูมิปัญญาพื้นบ้านด้วยข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ทันสมัย

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. แผนการทดลอง

การทดลองครั้งนี้วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยกำหนด ทรีตเมนต์ จากส่วนต่าง ๆ ของพืชกะทกรก (*Passiflora foetida* Linn.) จำนวน 3 ทรีตเมนต์ ได้แก่ สารสกัดจาก ใบ ดอก และเมล็ด ซึ่งได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอลความเข้มข้น 70% ด้วยเทคนิคอัลตราซาวด์ (Ultrasound-assisted extraction)

ในการทดลองแต่ละทรีตเมนต์ทำการทดลองซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง (triplicate) เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการทดลอง และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean  $\pm$  standard deviation) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการทดลองระหว่าง ทรีตเมนต์

### 2. วิธีการทดลอง

#### 2.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัด

ตัวอย่างพืชที่ใช้คือ กะทกรก จากอำเภอวังน้ำเย็น จังหวัดสระแก้ว เก็บช่วงเดือน มกราคม 2566 โดยได้ทำพิธีขออนุญาตของพืชสำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กรุงเทพมหานคร โดยใช้ส่วนใบ ดอก และเมล็ด แต่ละส่วนล้างให้สะอาดด้วยน้ำ ผึ่งให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็ก แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C จนน้ำหนักคงที่ บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด ซึ่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน

#### 2.2 การสกัดสารด้วยวิธีอัลตราซาวด์ (Ultrasound-Assisted Extraction)

โดยนำผงส่วนใบ ดอก และเมล็ดกะทกรกที่ บดละเอียด มาตัวอย่างละ 10 g ละลายในสารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 70%v/v ปริมาตร 100 mL และนำไปสกัดใน เครื่องอัลตราซาวด์ ที่ความถี่ 40 kHz ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที นำไปกรองผ่านผ้าขาวบาง จำนวน 1 ครั้ง นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ให้ได้สารสกัดที่ใสและไม่มี ตะกอน ทำการสกัดซ้ำ 5 ครั้ง นำไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่อง Rotary evaporator ภายใต้ความดัน 175 mbar 121 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 45 °C นำไปชั่งน้ำหนัก เพื่อคำนวณหาร้อยละของน้ำหนักสารสกัด (% yield) ของสารสกัดจากใบ ดอก และเมล็ดกะทกรก เทียบกับน้ำหนักเริ่มต้นในการสกัด (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมีและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในขั้นตอนต่อไป

### 3. วิธีทดสอบทางชีวภาพ

#### 3.1 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

ทำการตรวจสอบสารพฤกษเคมีในสารสกัด หยาดส่วนต่างๆ ของกะทกรก ได้แก่ ใบ ดอก และเมล็ดของ กะทกรก เพื่อหาสารสำคัญ 9 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โพลบาแทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน ซึ่งตัดแปลงจาก วิธีการของ Harborne (1973), Koleva *et al.* (2002) และ Ayoola *et al.* (2008) แต่ละการทดสอบทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ดังนี้

3.1.1 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งสารสกัดจากใบ ดอก และเมล็ดของกะทกรก อย่างละ 0.1 g ละลายด้วย 50% เอทานอล เขย่ากรองและนำของเหลวที่ได้จากการกรอง ใส่หลอดแมกนีเซียมลงไป หยดกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น เขย่าอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 3 นาที ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเหลืองเข้ม แสดงว่า พบฟลาโวนอยด์

3.1.2 การตรวจสอบแอนทราควิโนน (Anthraquinones) ซึ่งสารสกัดจากใบ ดอก และเมล็ดของ กะทกรก อย่างละ 0.1 g เติมสารละลาย 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> เขย่า อุ่นบนเครื่องอังน้ำ 3 นาที กรองและนำของเหลวที่ได้เติม สารละลายแอมโมเนีย (10% NH<sub>3</sub>) เขย่า หากสารละลายเป็น สีชมพูแดง แสดงว่า พบแอนทราควิโนน

3.1.3 การตรวจสอบคูมาริน (Coumarins) ซึ่งสารสกัดจากใบ ดอก และเมล็ดของกะทกรก อย่างละ 0.1 g ละลายด้วย 50 % เอทานอล เขย่า กรอง เติมสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (6M NaOH) เขย่า ถ้าสารละลายเป็นสี เหลืองเข้ม แสดงว่า พบคูมาริน

3.1.4 การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins) ซึ่งสารสกัดจากใบ ดอก และเมล็ดของกะทกรก อย่างละ 0.1 g เติมน้ำกลั่น อุ่น 5 นาที เขย่า ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นใน หลอดทดลอง แสดงว่า พบซาโปนิน

3.1.5 การตรวจสอบแทนนิน (Tannins) ซึ่งสารสกัดจากใบ ดอก และเมล็ดของกะทกรก อย่างละ 0.1 g เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 mL อุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรอง เติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (1% FeCl<sub>3</sub>) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำ แสดงว่า พบแทนนิน

3.1.6 การตรวจสอบโพลบาแทนนิน (Phlobatannins) ซึ่งสารสกัดจากใบ ดอก และเมล็ดของ กะทกรก อย่างละ 0.1 g เติมน้ำกลั่น อุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรอง เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (10% HCl) เขย่า แล้วนำไปอุ่น 5 นาที ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำ หรือน้ำเงินดำ แสดงว่า พบโพลบาแทนนิน

3.1.7 การตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) ซึ่งสารสกัดจากใบ ดอก และเมล็ดของกะทกรก อย่างละ 0.1 g ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม เขย่า กรอง ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริก เข้มข้นลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่าง ชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริก แสดงว่า พบเทอร์ปีนอยด์

3.1.8 การตรวจสอบสเตียรอยด์ (Steroids) ซึ่งสารสกัดจากใบ ดอก และเมล็ดของกะทกรก อย่างละ 0.1 g ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม เขย่า กรอง เติมกรดแกลเซียลและซีตริก เขย่าแล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ถ้าปรากฏสารละลายเป็น สีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียว แสดงว่า พบ สเตียรอยด์

### 3.2 การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

เตรียมสารละลายสารสกัดจากใบ ดอก และ เมล็ดของกะทกรก โดยนำสารสกัดหยาบแต่ละชนิดมาอย่างละ 0.1525 g ละลายด้วย Absolute ethanol ปริมาตร 40 mL จะได้สารละลายตัวอย่างแต่ละชนิด นำสารละลายตัวอย่างแต่ละ ชนิดมา 0.1 mL ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 mL เติมสารละลาย 10% Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 0.25 mL เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที เติม สารละลาย 7.5% โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ปริมาตร 2 mL เขย่าให้เข้ากัน บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น เป็น 2, 4, 8, 10, 12 และ 14 mg/mL สำหรับการทดลองชุด ควบคุมใช้น้ำกลั่น ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ในสารสกัดหยาบตัวอย่างโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของ กรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม น้ำหนักสารสกัด (mg GAE/ g extract) แต่ละตัวอย่างทำการ ทดลอง 3 ซ้ำ (Singleton *et al.*, 1999)

### 3.3 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

เตรียมสารสกัดจากใบ ดอก และเมล็ดของ กะทกรกให้มีความเข้มข้น 1.0 mg/mL ปิเปตสารละลายแต่ละ ตัวอย่างมาอย่างละปริมาตร 1 mL เติมสารละลาย 10% อะลูมิเนียมคลอไรด์ ( $\text{AlCl}_3$ ) ปริมาตร 1 mL เขย่าให้เข้ากัน บ่ม ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 10% กรดอะซิติก ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) ปริมาตร 0.5 mL ปรับปริมาตรด้วย น้ำกลั่นจนครบ 5 mL เขย่าให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm ด้วยเครื่องสเปก โทโรโฟโตมิเตอร์และเตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน (Quercetin) ความเข้มข้นเป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 mg/mL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัม น้ำหนักสารสกัด

(mg QE/ g extract) แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Gracelin *et al.*, 2013)

### 3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Radical scavenging activity

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ที่ความเข้มข้น 100  $\mu\text{M}$  ในสารละลาย Absolute ethanol และทำการเตรียมสารสกัดจากใบ ดอก และ เมล็ดของกะทกรก ที่ความเข้มข้น 25, 50, 250, 500 และ 1,000  $\mu\text{g/mL}$  ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัดแต่ละ ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ หยดลงใน 96 well plate หลุมละ 100  $\mu\text{L}$  เติมสารละลาย DPPH 100  $\mu\text{L}$  เขย่าให้เข้า กัน บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 515 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis microplate reader ใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน แต่ละตัวอย่างทำการ ทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหา % Radical scavenging จากสูตร

$$\% \text{ Radical scavenging} = [(Ac - As)/Ac] \times 100$$

Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

As คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่าง ผสมกับ DPPH

นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า 50% Inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) จากกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด และ % Radical scavenging โดยใช้ Trolox เป็นสารละลาย มาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบ (Alves *et al.*, 2008; Butsat & Siriamornpun, 2010)

### 3.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ทำการทดสอบด้วยวิธี Dopachrome method เทียบกับสารมาตรฐานเชิงบวก คือ กรดโคจิก (Kojic acid) เตรียมสารสกัดจากใบ ดอก และเมล็ดของกะทกรกและนำมา ละลายด้วย 95 % เอทานอล และเตรียมที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25, 0.625 และ 0.3125 mg/mL นำสารละลายที่ได้ไปทดสอบ ฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เทียบกับ สารละลายมาตรฐานกรดโคจิกความเข้มข้น 0.05 mg/mL โดย ปิเปตสารสกัดหรือสารมาตรฐานมาปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  ลงใน 96- well plate เติม Phosphate buffer pH 6.5 เข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  เติมเอนไซม์ไทโรซิเนส ความเข้มข้น 100 unit/mL ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  ผสม เติม L-DOPA (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine) เข้มข้น 2.5 mM ปริมาตร 50  $\mu\text{L}$  บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$  นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืน แสงที่ 490 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis microplate reader แต่ละ

ตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณ %Inhibition ดังสมการ

$$\%Inhibition = \left[ \frac{A_{490 \text{ control}} - A_{490 \text{ sample}}}{A_{490 \text{ control}}} \right] \times 100$$

เปรียบเทียบกับกรดโคจิก (Kojic acid) ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50 % (IC<sub>50</sub>) พล็อตกราฟระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และความเข้มข้นของสารสกัด (Masuda *et al.*, 2005)

### 3.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

โดยทำการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) โดยวิธี Microdilution ทำการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด โดยเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ประมาณ  $1 \times 10^8$  cfu/mL เพื่อให้ได้ความขุ่นของแบคทีเรียเทียบเท่า McFarland standards 0.5 มิลลิเมตร ทำการกระจายเชื้อแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหาร Muller Hinton agar เจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เติมสารสกัดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 22.5, 11.25, 5.625, 2.81, 1.40, 0.703, 0.35 และ 0.175 mg/mL หลุมละ 30  $\mu$ L นำไปเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (Zone of inhibition) ในหน่วยมิลลิเมตร เปรียบเทียบกับ 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นตัวควบคุมเชิงลบที่ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และสารปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ทดสอบ คือ Ampicillin (Antibiotic) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก เตรียมที่ความเข้มข้น 10  $\mu$ g/mL ทำการเจือจางครั้งละ 2 เท่าจะได้ความเข้มข้นของ Ampicillin เท่ากับ 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156 และ 0.0781  $\mu$ g/mL แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Eiamthaworn *et al.*, 2022; Balouiri *et al.*, 2016; Bagul & Sivakumar, 2016)

**3.7 การศึกษาความเข้มข้นขั้นต่ำในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibition concentration; MIC) โดยวิธี Tube dilution method**

นำสารสกัดแต่ละตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้มาเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton broth

เติมเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27863 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบผลในการยับยั้ง โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารที่ผ่านการบ่มเชื้อไปขีดเชื้อแบบง่ายลงบนผิวหน้าอาหารแข็งและบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบการเจริญ โดยค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อบนจานอาหาร แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Eiamthaworn *et al.*, 2022; Balouiri *et al.*, 2016; Bagul & Sivakumar, 2016)

**3.8 การศึกษาค่าความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC) ด้วยวิธี Plate dilution**

นำสารสกัดแต่ละตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ มาทำการเจือจางลงในอาหาร Mueller Hinton broth เพาะเชื้อแบคทีเรียโดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาตรวจการทำลายเชื้อทดสอบดูการกระจายเชื้อบนผิวอาหาร Mueller Hinton agar ในปริมาตร 100  $\mu$ L บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรีย อ่านค่า MBC โดยค่า MBC ที่อ่านได้คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ทำให้ไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อในจานอาหารที่ทดสอบ แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Eiamthaworn *et al.*, 2022; Balouiri *et al.*, 2016; Bagul & Sivakumar, 2016)

**3.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity) ด้วยวิธียับยั้งการหลั่ง Nitric oxide**

เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ใน 96-well microplates (เซลล์มีความเข้มข้น  $1 \times 10^5$  cells/well) ด้วยอาหาร RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (100 /mL) และ streptomycin (100  $\mu$ g/mL) เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub> incubator) ที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายเก่าออกและทำการเติม Lipopolysaccharide (LPS) 5 ng/mL ที่อยู่ใน RPMI-1640 หลุมละ 100  $\mu$ L จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100  $\mu$ g/mL อย่างละ 100  $\mu$ L นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจาก 48 ชั่วโมง ดูด supernatant แต่ละหลุมมา 100  $\mu$ L ใส่ใน 96-well plates เติม Griess reagent หลุมละ 100  $\mu$ L ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis microplate reader แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ การคำนวณร้อยละการยับยั้งการหลั่ง NO ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(A-B) / (A-C)] \times 100$$

โดยที่ A-C: nitrite concentration; A : LPS (+), sample (-), B : LPS (+), sample (+), C : LPS (-), sample (-)

สร้างกราฟระหว่าง % Inhibition และความเข้มข้นของตัวอย่างเพื่อหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้ง NO ที่ 50% ( $IC_{50}$ ) (Tewtrakul & Subhadhirasakul, 2008)

### 3.10 การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

โดยนำเซลล์ที่บ่มกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ 48 ชั่วโมง เติมสารละลาย 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) หลุมละ 10  $\mu$ L บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูด Supernatant ออกทุกหลุม เติม Isopropanol ใน 0.04 M กรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 100  $\mu$ L เขย่า วัดทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis microplate reader โดยแต่ละการทดลองทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณ % survival ตามสมการ

$$\text{The Percentage of survival} = (\text{Abs.Sample} / \text{Abs.Control}) \times 100$$

โดยสารสกัดที่จะนำไปคำนวณหา  $IC_{50}$  ต้องมีค่า % Survival มากกว่า 70 (Tewtrakul & Subhadhirasakul, 2008)

**Table 1** Physical characteristics of *Passiflora foetida* Linn. extracts.

sample	(% yield)	Characteristics of Extracts
Leaves extracts	30	Dark brown viscous liquid
flowers extracts	14	Dark brown viscous liquid
seeds extracts	21	Dark brown viscous liquid

ค่าร้อยละของน้ำหนักรสสารสกัดหยาบจากใบกะทกรก แสดงให้เห็นว่าใบกะทกรกมีปริมาณสารที่ละลายในเอทานอลสูงกว่าส่วนอื่นๆ อาจเป็นเพราะใบมีการสะสมของสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) เช่น สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบเชิงซ้อนอื่น ๆ ที่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายเอทานอล ส่งผลให้ได้ปริมาณสารสกัดสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่นของพืช ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dhawan *et al.* (2004) ที่พบว่า ใบของพืชในสกุล *Passiflora* มีการสะสมสารทุติยภูมิในปริมาณสูง ส่วนค่า

## 4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองวางแผนแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 3 ทรีตเมนต์ ได้แก่ สารสกัดจากใบ ดอก และเมล็ดของกะทกรก โดยแต่ละทรีตเมนต์ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean  $\pm$  SD) ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี One-way Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$

## ผลการทดลองและอภิปรายผล

### 1. ผลการสกัดกะทกรก

จากผลการทดลอง พบว่า การสกัดส่วนต่างๆ ของกะทกรก ได้แก่ ส่วนใบ ดอก และเมล็ด ด้วยวิธีอัลตราโซนิค โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 70%v/v ให้ค่าร้อยละของน้ำหนักสารสกัด (%yield) ที่แตกต่างกันในแต่ละส่วนของพืช โดยส่วนใบจากกะทกรกให้ค่าร้อยละของน้ำหนักสารสกัดสูงที่สุด (30%) รองลงมาคือ เมล็ด (21%) และดอก (14%) ตามลำดับ ลักษณะของสารสกัดหยาบที่ได้เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม ผลดัง Table 1

ร้อยละของน้ำหนักรสสารสกัดหยาบจากเมล็ดกะทกรกสูงกว่าดอกกะทกรก อาจเกิดจากในเมล็ดมีการสะสมสารประเภทน้ำมันและไขมันที่ละลายได้บางส่วนในเอทานอล รวมถึงสารประกอบฟีนอลิก แทนนิน และ ซาโปนิน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ingale and Hivrale (2010) ที่รายงานว่าเมล็ดพืชมักมีการสะสมสารประกอบที่เป็นแหล่งพลังงาน รวมถึงสารที่ช่วยป้องกันเมล็ดจากสภาพแวดล้อมและการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ และการที่ดอกกะทกรกมีค่า % yield ต่ำที่สุด (14 %) อาจเนื่องมาจากส่วนดอกของพืชหลายชนิดมักมีการสะสม

สารทุติยภูมิในปริมาณที่น้อยกว่าส่วนใบ เนื่องจากดอกมีหน้าที่หลักในการสืบพันธุ์มากกว่าการป้องกันตัวเองจากสภาพแวดล้อมภายนอก (Jiang *et al.*, 2016)

นอกจากนี้ประสิทธิภาพของการสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิคในการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chemat *et al.* (2017) ที่รายงานว่า การสกัดด้วยอัลตราโซนิคช่วยเพิ่มการแพร่ของสารละลายเข้าสู่เซลล์พืชและช่วยให้การสกัดมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยเฉพาะสำหรับสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแอลคาลอยด์ และงานวิจัยของ

Annegowda *et al.* (2012) ที่พบว่าการสกัดพืชสมุนไพรด้วยอัลตรา โซนิคใช้เวลาน้อยกว่าและได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม

## 2. ผลการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

เมื่อนำสารสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ ของกะทกรก ได้แก่ ส่วนใบ ดอก และเมล็ดมาทำการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน พบว่า สารสกัดหยาบส่วนใบ ดอก และเมล็ด ตรวจพบ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน และ เทอร์ปีนอยด์ ผลดัง Table 2

**Table 2** Preliminary phytochemical screening of *Passiflora foetida* Linn. extracts.

sample	Flavonoids	Anthaquinones	Coumarins	Saponins	Tannins	Phlobatannins	Terpenoids	Steroids
Leaves extracts	+	-	+	+	+	-	+	-
flowers extracts	+	-	+	+	+	-	+	-
seeds extracts	+	-	+	+	+	-	+	-

**Note:** - = no detected ; + = detected

ผลการวิเคราะห์ครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dhawan *et al.* (2004) ที่ได้รายงานว่าพืชสกุล *Passiflora* มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ ส่วนการตรวจพบคูมารินในสารสกัดทุกส่วนนั้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Madikizela *et al.* (2012) ที่ระบุว่าสารประกอบนี้มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ DNA gyrase ของแบคทีเรีย ซึ่งอธิบายประสิทธิภาพการต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ปรากฏในสารสกัด สำหรับซาโปนินที่ตรวจพบนั้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Farha *et al.* (2020) ที่รายงานว่าซาโปนินในพืชสมุนไพรสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียและยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอักเสบ การพบแทนนินในทุกส่วนของกะทกรกสอดคล้องกับงานวิจัยของ Agunu *et al.* (2005) ที่ชี้ให้เห็นว่าพืชที่มีแทนนินสูงมักมีฤทธิ์ต้านจุลชีพและต้านการอักเสบ โดยสามารถจับกับโปรตีนและเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้เสียสภาพและยับยั้งการเจริญเติบโต รวมถึงจับกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ และเทอร์ปีนอยด์ที่ตรวจพบยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Trombetta *et al.* (2005) ที่พบว่าสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยการแทรกซึมเข้าไปในผนังเซลล์ของแบคทีเรียและทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ

## 3. ผลการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

จากการนำสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดส่วนต่าง ๆ ของกะทกรก ได้แก่ ส่วนใบ ดอก และเมล็ดมาทำการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin-ciocalteu และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric พบว่า สารสกัดหยาบส่วนต่างๆ ของกะทกรกมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 13.11-47.06 mg GAE /g extract โดยสารสกัดหยาบใบกะทกรกมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 47.06 mg GAE /g extract รองลงมาคือ สารสกัดหยาบเมล็ด และ ดอกกะทกรก เท่ากับ 33.36 และ 13.11 mg GAE /g extract ตามลำดับ ผลดังตารางที่ 3 และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 18.25-50.87 mg QE/g extract โดยสารสกัดหยาบใบกะทกรกมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 50.87 mg QE/g extract รองลงมาคือ สารสกัดหยาบเมล็ด และ ดอกกะทกรก เท่ากับ 31.12 และ 18.25 mg QE/g extract ผลดัง Table 2

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิจัยครั้งนี้กับงานวิจัยก่อนหน้า พบว่ามีทั้งความคล้ายคลึงและความแตกต่างที่โดยจากการศึกษาของ Revathy and Sunilkumar (2019) พบว่า สารสกัดเมทานอลจากผลกะทกรกมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 24.1 mg GAE/g extract ซึ่งสูงกว่าผลการวิจัยครั้งนี้

ที่พบในส่วนใบ (47.06 mg GAE/g extract) ค่อนข้างมาก ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมในการเพาะปลูก ช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยว หรือความแตกต่างของส่วนของพืชที่นำมาศึกษา เนื่องจากส่วนผลอาจมีการสะสมสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณที่แตกต่างจากส่วนใบ

ผลการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์จะพบมากในส่วนของใบ เนื่องจากใบจะมีการสะสมสารประกอบโพลีฟีนอลมาก เพื่อที่จะใช้ในการป้องกันและกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากความเข้มแสงที่พืชได้รับ (Chua, 2016) และจากการศึกษาของ Revathy and Sunilkumar (2019) พบว่า สารสกัดเมทานอลจากผลกระทกรกมีปริมาณ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 9.066 mg RE/ g extract ซึ่งสูงกว่าค่าที่พบในงานวิจัยนี้ แม้จะใช้สารมาตรฐานที่ต่างกัน (RE กับ QE) ซึ่งอาจเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ทำให้ผลการวิเคราะห์มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้การวิเคราะห์สารพิษเคมีของสารสกัดน้ำและเมทานอลจากต้นกระทกรก แสดงค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 22.28–36.91 mg GAE/ g extract และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด อยู่ในช่วง 3.22–50.11 mg RE /g (Chiavaroli *et al.*, 2020) ซึ่งค่าที่ได้สูงกว่าผลการวิจัยในครั้งนี้ ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากวิธีการสกัด ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ซึ่งล้วนเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญที่สกัดได้

ผลการศึกษาของ Tandoro *et al.* (2020) พบว่า สารสกัดหยาบจากใบและดอกของกระทกรกที่ทำการสกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 22.92±0.18 mg GAE/g extract และ 6.53±1.02 mg GAE/g extract ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าผลการวิจัยครั้งนี้ที่พบในส่วนใบ (47.06 mg GAE/g extract) และดอก (13.11 mg GAE/g extract) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาสัดส่วนความแตกต่างระหว่างปริมาณสารในใบและดอก จะพบว่าแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ ใบจะมีปริมาณสารสำคัญสูงกว่าในดอกและสารสกัดหยาบจากใบและดอกของกระทกรกมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 7.01±0.10 mg CE/g สารสกัดแห้ง และ 1.56±0.27 mg CE/g extract ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผลการวิจัยครั้งนี้ที่พบในส่วนใบ (50.87 mg QE/g extract) และดอก (18.25 mg QE/g extract) จะเห็นว่าค่าที่ใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะในส่วนของดอก ทั้งนี้ ความแตกต่างเล็กน้อยอาจเกิดจากการใช้สารมาตรฐานที่ต่างกัน

ความแตกต่างของปริมาณสารสำคัญที่พบในงานวิจัยต่างๆ นั้น นอกจากจะมีสาเหตุจากวิธีการวิเคราะห์ ตัวทำละลาย และส่วนของพืชที่ใช้แล้ว ยังอาจเกิดจากปัจจัยทาง

สภาพแวดล้อมในการเพาะปลูก เช่น องค์ประกอบของดิน สภาพภูมิอากาศ ความสูงของพื้นที่ปลูก ช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยว (พืชจะสะสมสารประกอบที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงการเจริญเติบโต) อายุของพืช และสภาพการเก็บรักษาวัตถุดิบก่อนนำมาสกัด ซึ่งล้วนเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญในพืช อย่างไรก็ตาม แม้จะมีความแตกต่างในเชิงปริมาณ แต่แนวโน้มที่พบว่าส่วนใบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงกว่าส่วนอื่นๆ ยังคงเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับข้อสังเกตของ Chua (2016) ที่ว่าใบมีการสะสมสารประกอบโพลีฟีนอลในปริมาณมากเพื่อป้องกันความเครียดออกซิเดชันที่เกิดจากการสัมผัสกับแสง

#### 4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี

##### DPPH Radical scavenging activity

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ออนุมูล DPPH• ด้วยวิธีทางสเปกโทรเมทรี เป็นหนึ่งในวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด ในการหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของอาหาร เครื่องดื่ม และสารสกัดจากพืชผัก โดยจะเลือกใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 515 นาโนเมตร สารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน คือ Trolox (Miller *et al.*, 1995) จากการนำส่วนใบ ดอก และเมล็ด มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สกัดหยาบใบกระทกรกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 612.25 µg/L รองลงมาคือ สารสกัดหยาบเมล็ด และ ดอกกระทกรก โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 642.33 และ 671.68 µg/mL ตามลำดับ โดยมีประสิทธิภาพดีกว่าสารมาตรฐาน Trolox ที่มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 701.09 µg/mL ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ajane and Patil (2019) ที่พบว่าสารสกัดน้ำจากใบกระทกรกมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดย มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 614.405 µg/L แตกต่างจากการศึกษาของ de Melo Filho *et al.* (2018) ที่พบว่าสารสกัดเอทเชนจากใบกระทกรกมีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเพียง 17.97% และค่า IC<sub>50</sub> อยู่ระหว่าง 10-20 mg/L งานวิจัยของ สุรพล พหลภคย์ และคณะ (2556) ยังพบว่าสารสกัดชั้นเอทานอล ชั้นน้ำที่อุณหภูมิห้อง และน้ำต้มเดือดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 74.37, 48.08 และ 47.21 ตามลำดับ ผลดัง Table 3 ทั้งนี้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ อาทิ ชนิดของสารสกัด ตัวทำละลายที่ใช้ ความเข้มข้นของสารสกัด และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ตามที่ Alara *et al.* (2019) ได้รายงานไว้ โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ตามที่ เนตรนภา เมยกลาง และเฉลิม เรืองวิริยะชัย (2557) ได้ศึกษา ดังนั้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้น ตามปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และ

ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่เพิ่มขึ้น (อารีรัตน์ ไสสอง และขวัญเรือน นาคสุวรรณกุล, 2566)

### 5. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดส่วนต่างๆ ของกะทกรก ได้แก่ ส่วนใบ ดอก และเมล็ดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล โดยวิธี Dopachrome method โดยใช้สารมาตรฐานชิงบวก คือ กรดโคจิก ผลการทดสอบ พบว่า สกัดหยาบใบกะทกรกมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนสสูงที่สุดโดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 202.39  $\mu\text{g/mL}$  รองลงมาคือ สารสกัดหยาบเมล็ด และ ดอกกะทกรก โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ เท่ากับ 249.80 และ 301.38  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ ผลดังตารางที่ 2 และสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิก ที่มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 312.94  $\mu\text{g/mL}$  ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า สารสกัดเอทานอลจากใบ ดอก และเมล็ดของกะทกรกมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของกะทกรกอาจจะมาจากกลุ่มของไฮดรอกซิลของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนในตำแหน่ง active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ทำให้ความสามารถของเอนไซม์ลดลง และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส อาจเป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอลที่พบในตัวอย่างพืช สารประกอบฟีนอลหลายชนิด เช่น kojic acid, kaempferol และ quercetin (Kim & Uyama, 2005; Solano *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยัง พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยกลไกที่สำคัญคือ สารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิก สามารถจับกับทองแดงที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในบริเวณเร่งของเอนไซม์ไทโรซิเนส และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระยังสามารถลดระดับการเกิดออกซิเดชันในกระบวนการสร้างเมลานินได้ด้วย (Chang, 2009; Masuda *et al.*, 2005) ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้สารสกัดจากใบกะทกรกซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด จึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุดด้วย

**Table 3** Total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), and antioxidant activity (DPPH radical scavenging) of *Passiflora foetida* Linn. extracts.

Sample	Total phenolic content (mg GAE/g extract)	Total Flavonoid Content (mg QE/g extract)	Antioxidant Activity $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tyrosinase Inhibition Activity $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Leaves extracts	47.06 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>	50.87 $\pm$ 0.88 <sup>A</sup>	612.25 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>	202.39 $\pm$ 0.02 <sup>A</sup>
flowers extracts	13.11 $\pm$ 0.01 <sup>B</sup>	18.25 $\pm$ 0.02 <sup>B</sup>	671.68 $\pm$ 0.01 <sup>B</sup>	301.38 $\pm$ 0.06 <sup>B</sup>
seeds extracts	33.36 $\pm$ 0.01 <sup>C</sup>	31.12 $\pm$ 0.03 <sup>C</sup>	642.33 $\pm$ 0.02 <sup>C</sup>	249.80 $\pm$ 0.06 <sup>C</sup>
trolox	-	-	701.09 $\pm$ 0.02	-
kojic acid	-	-	-	312.94 $\pm$ 0.01 <sup>D</sup>

**Note:** Values are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3). Different uppercase letters (A–D) within the same column denote significant differences among samples at  $p < 0.05$  Trolox and kojic acid were used as positive controls for antioxidant and tyrosinase inhibition assays, respectively.

จาก Table 3 จะพบว่า สารสกัดหยาบจากใบ ดอก และเมล็ดของกะทกรกมีปริมาณ Phenolic, Flavonoid, Antioxidant Activity, Tyrosinase Inhibition Activity และ Anti-inflammatory Activity แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

### 6. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia Coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas*

*aeruginosa* ATCC 27853 ของสารสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ ของกะทกรก พบว่า สารสกัดหยาบใบกะทกรกมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด โดยจะสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และสามารถยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากดอก และเมล็ดของกะทกรก ตามลำดับ ผลดัง Table 4 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานยาปฏิชีวนะ ampicillin

เมื่อทำการหาความเข้มข้นขั้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC) พบว่า มีค่า MIC ของสารสกัดหยาดต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด แสดงดัง Table 5 อยู่ที่ 1-2.5 mg/mL และสารสกัดหยาดใบกะทกรกมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC ของสารสกัดอยู่ที่ 1.40 mg/mL และเมื่อทำการทดสอบหาค่า MBC ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 พบว่า สารสกัดหยาดใบ ดอก และเมล็ดจากกะทกรกที่ความเข้มข้น 22.5 mg/mL สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ และผลที่ได้จากการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Akila & Haroon (2022) ที่รายงานว่า สารสกัดจากใบกะทกรกด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ความเข้มข้น 100–200 µg/mL และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mohanasundari *et al.* (2007) ที่พบว่า สารสกัดจากใบและผลกะทกรกด้วยเอทานอลและอะซิโตนสามารถยับยั้งเชื้อเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ *Pseudomonas putida*, *Vibrio cholera*, *Shigella flexneri* และ *Staphylococcus pyogenes* ได้ดีกว่าสารสกัดจากผลกะทกรกโดยใช้วิธี well-in Agar สอดคล้องกับงานวิจัยของ Baby *et al.* (2010) พบว่า สารสกัดจากรากพวงแห้งกะทกรกใน เมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* เมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน และสอดคล้องกับงานวิจัยของ de Melo

Filho *et al.* (2018) พบว่า สารสกัดใบกะทกรกที่สกัดด้วยเฮกเซนสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ได้สูงที่สุด โดยมีค่าการยับยั้ง 88.25% ที่ความเข้มข้น 250 µg/mL สำหรับเชื้อ *B. cereus* แสดงการยับยั้งที่ 77.93% ที่ความเข้มข้น 250 µg/mL สำหรับกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ *Salmonella typhimurium* แสดงการยับยั้งที่ 83.21% ที่ความเข้มข้น 62.5 µg/mL แบคทีเรีย *Citrobacter Freudii* แสดงการยับยั้งที่ 82.74% ที่ความเข้มข้น 62.5 µg/mL โดยใช้ยาปฏิชีวนะ ampicillin ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ส่วน miconazole ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวกในการยับยั้งเชื้อรา พบว่า สามารถแสดงการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ที่ 93.7% ในขณะที่สารสกัดจากใบกะทกรกที่ความเข้มข้น 250 µg/mL สามารถยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ได้ 53.29% ซึ่งจากผลการทดลองสารสกัดหยาดจากใบกะทกรกมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่สูงกว่าส่วนอื่นๆ ของพืช ซึ่งน่าจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบในใบมากกว่า (Mohanasundari *et al.*, 2007; Sasikala *et al.*, 2011) และอาจเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อสารสกัดมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งอาจเกิดจากโครงสร้างของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน (Tegos *et al.*, 2002; Nikaido, 2003; Cowan, 2011) สำหรับประสิทธิภาพที่พบอาจเกี่ยวข้องกับสารพิษเคมีหลายชนิดที่พบในพืช เช่น ฟลาโวนอยด์ แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ และซาโปนิน ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ หรือรบกวนการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย (Cushnie & Lamb, 2005; Scalbert, 1991; Dhawan *et al.*, 2004; Trombetta *et al.*, 2005; Sparg *et al.*, 2004)

**Table 4** Antibacterial activities of crude extracts from different parts of *Passiflora foetida* Linn.

Bacterial Strains	Inhibition zone, mm ± SD			
	Leaves extracts	flowers extracts	seeds extracts	ampicillin
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	8.60 ± 0.07 <sup>B</sup>	5.12 ± 0.10 <sup>D</sup>	6.80 ± 0.07 <sup>C</sup>	12.39 ± 0.05 <sup>A</sup>
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	6.55 ± 0.30 <sup>B</sup>	4.41 ± 0.12 <sup>D</sup>	5.36 ± 0.07 <sup>C</sup>	10.38 ± 0.30 <sup>A</sup>
<i>E. Coli</i> , ATCC 25922	5.43 ± 0.29 <sup>B</sup>	3.29 ± 0.09 <sup>D</sup>	4.11 ± 0.09 <sup>C</sup>	8.43 ± 0.04 <sup>A</sup>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	4.75 ± 0.09 <sup>B</sup>	1.73 ± 0.05 <sup>D</sup>	3.47 ± 0.06 <sup>C</sup>	5.91 ± 0.07 <sup>A</sup>

**Note:** Values are expressed as mean ± SD (n = 3). Different uppercase letters (A–D) within the same row indicate significant differences among treatments ( $p < 0.05$ ). Ampicillin was used as a positive control.

**Table 5** Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of crude extracts from different parts of *Passiflora foetida* Linn.

Bacterial Strains	Leaves Extracts		Flowers extracts		Seeds extracts	
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1.40	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1.40	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5
<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922	2.81	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	5.625	22.5	22.5	22.5	22.5	22.5

### 7. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity)

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการหลั่ง Nitric oxide ของเซลล์ RAW 264.7 เป็นการทดสอบที่ใช้ในการประเมินความสามารถของสารหรือสารสกัดในการลดการอักเสบ โดยการวัดปริมาณการหลั่ง Nitric oxide ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบในร่างกาย ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดใบดอก และเมล็ดตะทกรก พบว่า สารสกัดใบตะทกรกมีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีที่สุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 15.26  $\mu\text{g}/\text{mL}$  รองลงมาคือ สารสกัดจากดอก และใบ มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 29.65 และ 33.79  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ตามลำดับ เมื่อใช้สารมาตรฐาน penicillin-streptomycin และ streptomycin เปรียบเทียบกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง NO จากเซลล์ RAW 264.7 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 34.56 และ 35.92  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ตามลำดับ ผลดัง Table 6 การที่ค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดหยาบใบตะทกรกมีค่าต่ำกว่าสารสกัดหยาบจากดอกและเมล็ดตะทกรก แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่เหนือกว่าในการยับยั้งการหลั่ง NO จากเซลล์ RAW 264.7 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Montanher *et al.* (2007) ที่พบว่า สารสกัดจากใบของพืชในสกุล *Passiflora* มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่โดดเด่น โดยยับยั้งการเกิด edema ในเท้าหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย carrageenan

กลไกการต้านการอักเสบของสารสกัดจากตะทกรกที่พบในการศึกษานี้ มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shanmugam *et al.* (2015) ที่รายงานว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และซาโปนินในพืชสกุล *Passiflora* สามารถยับยั้ง NF-KB pathway ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการกระตุ้นการสร้าง inducible nitric oxide synthase (iNOS) ที่เป็นเอนไซม์สำคัญในการสร้าง NO ในกระบวนการอักเสบ นอกจากนี้ Ginwala *et al.* (2019) ยังพบว่าสารพฤกษเคมีหลายกลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ และแทนนิน แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 และการลดการผลิตไซโตไคน์อักเสบในเซลล์ แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์สารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่พบในสารสกัดหยาบจากตะทกรกในการศึกษานี้

### 8. ผลการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์

จากผลการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT พบว่า การที่สารสกัดจากใบ ดอก และเมล็ดตะทกรก ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 ที่ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  โดยมี %survival เกิน 70% แสดงถึงความปลอดภัยในการใช้สารสกัดจากตะทกรก โดยมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sathish *et al.* (2011) ที่พบว่า สารสกัดเอทานอลจากตะทกรกมีความปลอดภัยสูงในการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูทดลอง โดยไม่พบความผิดปกติที่ระดับความเข้มข้นสูงถึง 2000 mg/kg

**Table 6** Anti-inflammatory activities of crude extracts from different parts of *Passiflora foetida* Linn.

Sample	Anti-inflammatory Activity $IC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Leaves extracts	15.26 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>
flowers extracts	29.65 $\pm$ 0.02 <sup>B</sup>
seeds extracts	33.79 $\pm$ 0.30 <sup>C</sup>
penicillin-streptomycin	34.56 $\pm$ 34.56 <sup>D</sup>
streptomycin	35.92 $\pm$ 0.01 <sup>E</sup>

**Note:** Values are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3). Different uppercase letters (A–E) within the same column indicate significant differences among samples ( $p < 0.05$ ). Penicillin–streptomycin and streptomycin were used as positive controls.

จากผลการทดลองพบว่า มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ingkaninan *et al.* (2013) ที่พบว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมักมีความสามารถในการต้านการอักเสบที่ดีที่สุด เนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นตัวกระตุ้นกระบวนการอักเสบโดยการกระตุ้น NF-KB และส่งผลให้เกิดการหลั่ง inflammatory mediators รวมถึง NO และจากการศึกษาของ Fawole *et al.* (2013) พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและ ฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ซึ่งสอดคล้องกับการที่สารสกัดใบกะทกรกในการศึกษานี้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงที่สุด และยังคงแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีที่สุดด้วย

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษา สารพฤกษเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบจากสารสกัดหยาดจากใบ ดอก และเมล็ดกะทกรก ผลการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นพบ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน และเทอร์ปีนอยด์ในสารสกัดทั้งหมด ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกิจกรรมทางชีวภาพของพืช โดยเฉพาะคุณสมบัติการต้าน อนุมูลอิสระ ต้านจุลินทรีย์ และต้านการอักเสบ สารสกัดหยาดจากใบกะทกรกมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด ซึ่งสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางชีวภาพที่เพิ่มขึ้น การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาดจากใบกะทกรกมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด และยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูงที่สุด ซึ่งสามารถที่จะนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการรักษาภาวะเม็ดสีผดผื่น และในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า สารสกัดหยาดจากใบกะทกรกสามารถยับยั้งทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีโซนยับยั้งที่ใหญ่กว่าอย่างสม่ำเสมอเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาดจากดอกและเมล็ดจากกะทกรก นอกจากนี้ การประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้การทดสอบการยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW 264.7 แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาดจากใบกะทกรกมีคุณสมบัติต้านการอักเสบได้ดี ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากผลการทดลองอาจเป็นผลมาจากการเสริม

ฤทธิ์ของสารพฤกษเคมีหลากหลายชนิดที่มีอยู่ในสารสกัดหยาดกะทกรก โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และต้านการอักเสบ ผลที่ได้จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความเชื่อมโยงระหว่างสารพฤกษเคมีที่พบในสารสกัดหยาดจากกะทกรก โดยเฉพาะสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ กับฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย และประสิทธิภาพของสารสกัดใบกะทกรกในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในอนาคต สามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมสำหรับพัฒนาผลิตภัณฑ์หลากหลายประเภท เช่น ผลิตภัณฑ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้ง ไทโรซิเนส ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และต้านการอักเสบ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Carvalho *et al.* (2011) พบว่า *Passiflora foetida* มีสารไซยาโนเจนิกซึ่งก่อให้เกิดพิษหากรับประทานใบสดจะทำให้เกิดอาการเช่น ชีม หัวใจเต้นเร็ว หายใจเร็ว เดินเซ โดยความเป็นพิษจะแตกต่างกันตามฤดูกาลและความเข้มข้นของไซยาโนไซด์สัมพันธ์กับระดับความเป็นพิษ ดังนั้นควรมีการศึกษากลไกในระดับโมเลกุลเพิ่มเติม ทดสอบในสิ่งมีชีวิตและมนุษย์เพื่อยืนยันความปลอดภัย และพัฒนาวิธีสกัดและกระบวนการที่ได้มาตรฐาน เพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ

### เอกสารอ้างอิง

- ดวงกมล เรือนงาม. (2557). การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง*, 23(2), 120-139.
- เนตรนภา เมฆกลาง และเฉลิม เรืองวิริยะชัย. (2557). การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มน้ำผลไม้. *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น*, 14(4), 60-79.
- สุรพล พหลภาคย์, จุฑาทิพย์ พหลภาคย์ และสัณฐิตา ดังคิวางกูร. (2556). *การอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรกะทกรก*. ในการประชุมวิชาการประจำปี ภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา (HERP) ครั้งที่ 1 (น. 196-203). มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.
- อารีรัตน์ ไส่สอง และขวัญเรือน นาคสุวรรณกุล. (2566). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาดของไลเคน. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*, 25(2), 26-37.
- Agunu, A., Yusuf, S., Andrew, G. O., Zezi, A. U., & Abdurahman, E. M. (2005). Evaluation of five medicinal plants used in diarrhoea treatment in Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1-3), 27-30. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.03.025>.

- Ajane, G., & Patil, A. S. (2019). Evaluation of antioxidant potential of *Passiflora foetida* extract and quantitative evaluation of its phytochemical content: A possible natural antioxidant. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 6, 14–24.
- Akila, E., & Haroon, M. (2022). Preliminary phytochemical screening and antibacterial activity of leaves of *Passiflora foetida* Linn. *RGUHS Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(2), 37–43. [https://doi.org/10.26463/rjps.12\\_2\\_5](https://doi.org/10.26463/rjps.12_2_5)
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Ukaegbu, C. I., & Kabbashi, N. A. (2019). Extraction and characterization of bioactive compounds in *Vernonia amygdalina* leaf ethanolic extract comparing Soxhlet and microwave-assisted extraction techniques. *Journal of Taibah University for Science*, 13(1), 414–422. <https://doi.org/10.1080/16583655.2019.1582460>.
- Alves, C. Q., Brandão, H. N., David, J. M., David, J. P., & Lima, L. S. (2007). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids. *Dialogues Sci*, 12, 1–8.
- Anandan, R., Jayakar, B., Jeganathan, S., Manavalan, R., & Kumar, S. R. (2009). Effect of ethanol extract of fruits of *Passiflora foetida* Linn. on CCl<sub>4</sub> induced hepatic injury in rats. *Journal of Pharmacy Research*, 2(3), 413–415.
- Annegowda, H. V., Bhat, R., Min-Tze, L., Karim, A. A., & Mansor, S. M. (2012). Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits. *Journal of Food Science and Technology*, 49(4), 510-514. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0435-8>.
- Asadujjaman, M., Mishuk, A. U., Hossain, A. M., & Karmakar, U. K. (2014). Medicinal potential of *Passiflora foetida* L. plant extracts: biological and pharmacological activities. *Journal of Integrative Medicine*, 12(2), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S2095-4964\(14\)60017-0](https://doi.org/10.1016/S2095-4964(14)60017-0).
- Ayoola, G. A., Coker, H. A. B., Adesegun, S. A., Adepoju-Bello, A. A., Obaweya, K., Ezennia, E. C., & Atangbayila, T. O. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1019–1024.
- Baby, E., Balasubramaniam, A., Manivannan, R., Jose, J., & Senthilkumar, N. (2010). Antibacterial activity of methanolic root extract of *Passiflora foetida* Lin. *Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 2(1), 38–40.
- Bagul, U. S., & Sivakumar, S. M. (2016). Antibiotic susceptibility testing: A review on current practices. *International Journal of Pharmaceutics*, 6(3), 11–17.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, K. S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- Butsat, S., & Siriamornpun, S. (2010). Phenolic acids and antioxidant activities in husk of different Thai rice varieties. *Food Science and Technology International*, 16(1), 329–336. <https://doi.org/10.1177/108201321036696>.
- Carvalho, F. K. L., Medeiros, R. M. T., Araujo, J. A. S., & Riet-Correa, F. (2011). Experimental poisoning by *Passiflora foetida* (Passifloraceae) in goats. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 31(6), 477–481.
- Casierra-Posada, F., & Jarma-Orozco, A. (2016). Nutritional composition of *Passiflora* species. In *Nutritional Composition of Fruit Cultivars* (pp. 517–534). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00022-2>.
- Chang, T. S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2440–2475. <https://doi.org/10.3390/ijms10062440>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products: Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chiavaroli, A., Simone, S. C. D., Sinan, K. I., Ciferri, M. C., Flores, G. A., Zengin, G., Etienne, O. K., Ak, G., Mahomoodally, M. F., Jugreet, S., Cziáky, Z., Jekó,

- J., Recinella, L., Brunetti, L., Leone, S., Angelini, P., Venanzoni, R., Menghini, L., Ferrante, C., & Orlando, G. (2020). Pharmacological properties and chemical profiles of *Passiflora foetida* L. extracts: Novel insights for pharmaceuticals and nutraceuticals. *Processes*, 8(1034), 1-23. <https://doi.org/10.3390/pr8091034>.
- Chua, L. S. (2016). Untargeted MS-based small metabolite identification from the plant leaves and stems of *Impatiens balsamina*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.040>.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343-356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>.
- de Melo Filho, A. A., Kamezaki, Â. K., Ribeiro, P. R. E., de Melo, A. C. G. R., Fernández, I. M., Santos, R. C., Chagas, E. A., & Chagas, P. C. (2018). Chemical composition, antioxidant, and biological activity of leaves of *Passiflora foetida*. *Chemical Engineering Transactions*, 64, 241–246.
- Dhawan, K., Dhawan, S., & Sharma, A. (2004). *Passiflora*: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.023>.
- Eiamthaworn, K., Kaewkod, T., Bovonsombut, S., & Tragoolpua, Y. (2022). Efficacy of *Cordyceps militaris* extracts against some skin pathogenic bacteria and antioxidant activity. *Journal of Fungi*, 8(4), 327. <https://doi.org/10.3390/jof8040327>.
- Farha, A. K., Yang, Q.-Q., Kim, G., Li, H.-B., Zhu, F., Liu, H.-Y., Gan, R.-Y., & Corke, H. (2020). Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience*, 38, 100751. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100751>.
- Fawole, O. A., Ndhlala, A. R., Amoo, S. O., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2013). Anti-inflammatory and phytochemical properties of twelve medicinal plants used for treating gastro-intestinal ailments in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(2), 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.012>
- Gadioli, I. L., Cunha, M. D. S. B. D., De Carvalho, M. V. O., Costa, A. M., & Pineli, L. D. L. D. O. (2017). A systematic review on phenolic compounds in *Passiflora* plants: Exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(5), 785–807. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1224805>.
- Ginwala, R., Bhavsar, R., Chigbu, D. G. I., Jain, P., & Khan, Z. K. (2019). Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. *Antioxidants*, 8(2), 35. <https://doi.org/10.3390/antiox8020035>
- Gracelin, D. H. S., Britto, A. J. D., & Kumar, B. J. R. (2013). Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals in five *Pteris* species. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 105–107.
- Harborne, J. B. (1973). *Phytochemical methods*. Chapman and Hall.
- Ingale, A. G., & Hivrale, A. U. (2010). Pharmacological studies of *Passiflora* sp. and their bioactive compounds. *African Journal of Plant Science*, 4(10), 417-426.
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., & Thongnoi, W. (2013). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(2-3), 261-264. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.08.008>.
- Jiang, N., Doseff, A. I., & Grotewold, E. (2016). Flavones: From biosynthesis to health benefits. *Plants*, 5(2), 27. <https://doi.org/10.3390/plants5020027>
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2017). Farmakope herbal Indonesia (Edisi II). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kim, Y. J., & Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism, and prospective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(15), 1707–1723. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5054-y>.

- Koleva, I. I., Van Beek, T. A., Linssen, J. P., Groot, A. D., & Evstatieva, L. N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis : An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(1), 8-17. <https://doi.org/10.1002/pca.611>.
- Madikizela, B., Ndhala, A. R., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2012). Ethnopharmacological study of plants from Pondoland used against diarrhoea. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(1), 61-71. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.053>.
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., & Yonemori, S. (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(1), 197–201. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.197>.
- Miller, N. J., Diplock, A. T., & Rice-Evans, C. A. (1995). Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice oil storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7), 1794–1801. <https://doi.org/10.1021/jf00055a009>.
- Mohanasundari, C., Natarajan, D., Srinivasan, K., Umamaheswari, S., & Ramachandran, A. (2007). Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L., a common exotic medicinal plant. *African Journal of Biotechnology*, 6(23), 2650–2653.
- Montanher, A. B., Zucolotto, S. M., Schenkel, E. P., & Frode, T. S. (2007). Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2), 281-288. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.031>.
- Nguyen, T. Y., To, D. C., Tran, M. H., Lee, J. S., Lee, J. H., Kim, J. A., Woo, M. H., & Min, B. S. (2015). Anti-inflammatory flavonoids isolated from *Passiflora foetida*. *Natural Product Communications*, 10(6), 929–931. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000634>
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593-656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>.
- Rahman, M. A., Hossain, M. A., Hasan, M. S., & Hossain, M. G. (2011). Antinociceptive, antidiarrhoeal and cytotoxic activities of *Passiflora foetida* Linn. *Pharmacologyonline*, 1, 228–236.
- Revathy, S., & Sunilkumar, T. (2019). Phytochemical and nutritional studies on the fruit pulp extract of *Passiflora foetida* Linn. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(4), 732-734.
- Santosh, P., Venugopl, R., Nilakash, S., Kunjibhari, S., & Mangala, L. (2011). Antidepressant activity of methanolic extract of *Passiflora foetida* leaves in mice. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 112–115.
- Sasikala, V., Saravanan, S., & Parimelazhagan, T. (2011). Analgesic and anti-inflammatory activities of *Passiflora foetida* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(8), 600–603. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60155-7](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60155-7).
- Sathish, R., Sahu, A., & Natarajan, K. (2011). Antiulcer and antioxidant activity of ethanolic extract of *Passiflora foetida* L. *Indian Journal of Pharmacology*, 43(3), 336-339. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.81501>.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875-3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)
- Shanmugam, S., Thangaraj, P., dos Santos Lima, B., Chandran, R., de Souza Araújo, A. A., Narain, N., Serafini, M. R., & Quintans Júnior, L. J. (2016). Effects of luteolin and quercetin 3-β-D-glucoside identified from *Passiflora subpeltata* leaves against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 1278-1285. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.044>.
- Simão, M. J., Barboza, T. J. S., Vianna, M. G., Garcia, R., Mansur, E., Ignacio, A. C. P. R., & Pacheco, G. (2018). A comparative study of phytoconstituents and antibacterial activity of in vitro derived materials of four *Passiflora* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(3), 2805–2813. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170809>.

- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- Solano, F., Briganti, S., Picardo, M., & Ghanem, G. (2006). Hypopigmenting agents: An updated review on biological, chemical, and clinical aspects. *Pigment Cell Research*, 19(6), 550–571. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00334>.
- Sparg, S. G., Light, M. E., & van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2-3), 219-243. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.016>
- Sutar, V., & Bhosale, U. P. (2013). Screening of *Passiflora foetida* extracts as anticancer agents on MCF-7 cell line. *Bioinfolet-A Quarterly Journal of Life Sciences*, 10(3a), 808–810.
- Tandoro, Y., Widyawati, P. S., Budianta, T. D. W., & Sumargo, G. (2020). Phytochemical identification and antioxidant activity of *Passiflora foetida* fruits and leaves extracts: A comparative study. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 12(6), 55–58. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2020v12i6.31505>.
- Tao, Y., Wu, D., Zhang, Q.-A., & Sun, D.-W. (2014). Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling optimization and stability of extracts during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(2), 706–715. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.09.005>
- Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O., & Lewis, K. (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10), 3133-3141. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.10.3133-3141.2002>.
- Tewtrakul, S., & Subhadhirasakul, S. (2008). Effects of compounds from *Kaempferia parviflora* on nitric oxide, prostaglandin E2, and tumor necrosis factor-alpha productions in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 81–84. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.033>.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2474-2478. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005>.
- Vitkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound-assisted extraction in the food industry: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.014>.