สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2548

เรื่อง

คุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์และการต้านการเกิดอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากชาสมุนไพรไทย

(Antimicrobial and antioxidative properties of crude extracts of Thai herbal teas)

โดย

ผศ. ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ หัวหน้าโครงการวิจัย

RCH
QK
99
ส8675
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 69581
วัน,เดือน,ปี 15 ก.พ. 2550

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

b 11907460
i

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการสกัดชาสมุนไพรไทยทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ ผลมะตูม (*Aegle marmelos* Correa) ใบน้อยหน่า (*Annona squamosa* Linn) ใบชา (*Camella sinensis*) ใบบัวบก (*Centella asiatica* Linn. Urban) ใบหม่อน (*Morus alba*) ใบเตย (*Pandanus amaryllifolius* Roxb) ใบมะยม (*Phyllanthus acidus* Skeels) และใบพลู (*Piper betle* Linn.) ด้วยเอทานอล นำสารสกัดหยาบจากชาสมุนไพรไทยเหล่านี้มาศึกษากิจกรรมการต้านแบคทีเรียทั้งหมด 9 ชนิดและยีสต์ทั้งหมด 6 ชนิด โดยใช้เทคนิค Agar diffusion เพื่อการคัดเลือกสารสกัดชนิดที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีในขั้นแรก ในบรรดาสารสกัดเหล่านี้สารสกัดจากชาสมุนไพรไทย 5 ชนิด ได้แก่ ผลมะตูม ใบชา ใบบัวบก ใบเตย และใบพลู มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีจึงได้คัดเลือกมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ค่า MIC) ด้วยเทคนิค Microbroth dilution สารสกัดจากใบชาและผลมะตูมมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้สูงที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดจากใบพลู ใบเตย ใบบัวบก ใบหม่อน ใบน้อยหน่าและใบมะยม แบคทีเรียก่อโรคชนิดที่ไวต่อการยับยั้งด้วยสารสกัดจากใบชาและผลมะตูมมากที่สุดได้แก่ *B. cereus*, *E. coli* และ *S. aureus* (ค่า MIC 10.4-41.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสียที่ไวต่อการยับยั้งโดยสารสกัดทั้ง 2 ชนิดนี้มากที่สุดคือ เชื้อ *L. mesenteroides* (ค่า MIC 10.4-20.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับยีสต์ที่ไวต่อสารสกัดจากใบชามากที่สุดได้แก่ *H. uvarum* และ *R.glutinis* (ค่า MIC 41.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนยีสต์ที่ไวต่อสารสกัดจากผลมะตูมที่สุดคือ *C. lipolytica* และ *P. membranaefaciens* (ค่า MIC 83.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ในการศึกษาถึงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากชาสมุนไพรไทย 8 ชนิด พบว่าสารสกัดจากใบพลูมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดจากใบชา ใบน้อยหน่า ใบหม่อน ใบบัวบก ผลมะตูม ใบมะยม และใบเตย ค่า EC_{50} ของสารสกัดจากชาสมุนไพรทั้ง 8 ชนิด อยู่ในช่วง 699.29-13,886.94 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัมของ DPPH ในขณะที่การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากชาสมุนไพรไทย 8 ชนิด พบว่าชาจีนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุด รองลงมาคือ ใบพลู ใบเตย ผลมะตูม ใบน้อยหน่า ใบมะยม ใบบัวบก และใบหม่อน ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากชาสมุนไพรไทย 8 ชนิด อยู่ในช่วง 6.0-546.0 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัดแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

In this study, eight species of medicinal plant teas, including fruits of *Aegle marmelos* Correa, and leaves of *Annona squamosa* Linn., *Camella sinensis*, *Centella asiatica* Linn. Urban, *Morus alba*, *Pandanus amaryllifolius* Roxb, *Phyllanthus acidus* Skeels, and *Piper betle* Linn. were extracted using ethanol as a solvent, and tested for their antimicrobial activity against 9 species of bacteria and 6 species of yeasts using agar diffusion method as preliminary screening. Of these, five ethanolic extracts of plants, including *A. marmelos*, *C. sinensis*, *C. asiatica* , *P. amaryllifolius*, and *P. betle* showed great antimicrobial effect on microbial strains tested, and were selected to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) using microbroth dilution test. Crude ethanolic extracts of *C. sinensis* and *A. marmelos* showed the highest antimicrobial activity, followed by *P. betle* , *P. amaryllifolius*, *C. asiatica*, *M. alba*, *A. squamosa*, and *P. acidus*. The most susceptible pathogenic bacteria to *C. sinensis* and *A. marmelos* extracts were *B. cereus*, *E. coli*, and *S. aureus* (the MIC of 10.4-41.7 mg/ml). The most sensitive food spoilage bacteria to those extracts was *L. mesenteroides* (the MIC of 10.4-20.8 mg/ml). The most vulnerable yeasts to *C. sinensis* extract were *H. uvarum* and *R. glutinis* (the MIC of 41.7 mg/ml), while *C. lipolytica* and *P. membranaefaciens* were the most sensitive yeast strains to *A. marmelos* extract (the MIC of 83.3 mg/ml).

Antioxidant activity of eight herbal tea extracts was determined. *P. betle* had the highest antioxidant activity, followed by *C. sinensis*, *A. squamosa* , *M. alba*, *C. asiatica*, *A. marmelos*, *P. acidus*, and *P. amaryllifolius*. The EC_{50} values of the extracts were in the range of 699.29-13,886.94 μg extract/mg DPPH. Total phenolic contents of these extracts were also analyzed. *C. sinensis* had the highest phenolic content, followed by *P. betle*, *P. amaryllifolius*, *A. marmelos*, *A. squamosa*, *P. acidus*, *C. asiatica*, and *M. alba*. The total phenolic contents of these extracts were in the range of 6.0-546.0 μg gallic acid/ mg dry extract.

คำสำคัญ (Keywords): ชาสมุนไพร (medicinal plant teas) กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ปริมาณสารประกอบฟีนอล (total phenolics)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญ

	หน้า
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	2
ผลการทดลองและวิจารณ์	6
สรุปผลการทดลอง	16
เอกสารอ้างอิง	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยพืชสมุนไพรมากมาย ซึ่งสมุนไพรประกอบด้วยสารหลายชนิดมีทั้งอินทรีย์สาร วิตามิน แร่ธาตุ เอนไซม์ และเกลือแร่ต่างๆที่จะแปรสภาพไปเป็นพลังงานเพื่อกระตุ้นและแสดงปฏิกิริยาต่อต้านการทำลายของเชื้อโรคต่างๆให้หยุดการเจริญเติบโตและเพื่อควบคุมระบบต่างๆของร่างกายให้มีพละกำลังที่จะสามารถทำงานต่อไปได้เป็นปกติ มนุษย์ได้รู้จักเอาประโยชน์ที่ได้จากการอุปโภคบริโภคสมุนไพรมาผูกพันกับชีวิตความเป็นอยู่ประจำวันมากขึ้น บางชนิดมีประโยชน์เป็นยารักษาโรค ทั้งนี้เพราะพืชบางชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆได้ (รุ่งรัตน์, 2540)

การใช้ประโยชน์ของสมุนไพรไทยเป็นยารักษาโรคได้มีมานานแล้ว ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากสมุนไพรมีคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ การทดลองของ Alzoreky และ Nakahara (2002) ได้พบว่าสารสกัดจากชาเขียว (*Camella sinensis*) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* ได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ซึ่งในใบชามีสารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenols) ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและคุณสมบัติต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคน สัตว์ และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Sakanaka และคณะ, 2000) นอกจากนี้ Sohn และคณะ (2004) ได้ศึกษาผลการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารฟลาโวนอยด์ 18 ชนิดซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในใบหม่อนพบว่า Papyriflavonol A, Kuraridin และ Sophoraisoflavanone A สามารถยับยั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียได้ดี และ Shoba และ Thomas (2001) ได้ศึกษาผลการต้านอาการท้องร่วงจากสมุนไพร พบว่าสารสกัดจากผลมะตูมด้วยเมทานอลมีประสิทธิภาพในการต้านอาการท้องร่วงได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากในผลมะตูมดิบประกอบด้วยสารแทนนิน (tannin) และสารที่มีลักษณะเป็นเมือก ส่วนในสารสกัดจากใบพลูมีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและแบคทีเรีย ได้แก่ Eugenol และ Hydroxychavicol (Yang และ Chou, 1997) ต่อมา Linda และคณะ (2004) ได้สกัดสาร Pandanin ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งพบว่าสารนี้มีฤทธิ์ต้านไวรัสที่ติดเชื้อในคน แต่ยังไม่พบรายงานการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดจากใบเตย

นอกจากสมุนไพรจะมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์แล้ว สมุนไพรบางชนิดยังมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากในสมุนไพรประกอบด้วยสารเคมีธรรมชาติที่เรียกว่า โพลีฟีนอล ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งสารนี้จะช่วยพัฒนากระบวนการป้องกันสารพิษในร่างกายและมีผลยับยั้งอนุมูลอิสระ ช่วยต่อต้านโรคหัวใจ เบาหวาน ความดันโลหิตสูง บิดหอบหืด โพลีฟีนอลเป็นฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่ง พบทั่วไปในชาหลายประเภท ในผักและผลไม้ และยังเชื่อว่าสารโพลีฟีนอลช่วยป้องกันโรคมะเร็งบางชนิดได้ (Hertog และ Feskens, 1993) ในการทดลองนี้ได้นำสารสกัดจากชาสมุนไพรไทย ได้แก่ ชาจีน ใบเตย ใบน้อยหน่า ใบบัวบก ใบพลู ใบหม่อน ใบมะยม และผลมะตูมมาศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิดที่เป็นสาเหตุทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดการเน่าเสียในอาหาร เพื่อคัดเลือกสารสกัดจากชาสมุนไพรที่มีคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระได้ดีไปประยุกต์ใช้เป็นสารถนอมอาหารจากธรรมชาติต่อไป เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีที่เติมลงในอาหารเพื่อป้องกันการเน่าเสียของอาหารจากจุลินทรีย์และเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงทางเคมี เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมัน นอกจากนี้ยังทำให้ทราบถึงชนิดของชาสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้สูง ซึ่งเป็นแนวทางในการตัดสินใจเลือกซื้อมาชงดื่มหรือรับประทานเพื่อเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายและป้องกันโรคภัยไข้เจ็บต่างๆได้เช่นกัน

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ผลมะตูม *(Aegle marmelos)* ใบชาอูหลง *(Camella sinensis)* ตรารระมิงค์ ใบเตย *(Pandanus amaryllifolius* Roxb*)* ใบน้อยหน่า *(Annona squamosa* Linn.) ใบบัวบก *(Centella asiatica* Linn. Urban) ใบพลู *(Piper betle* Linn.) ใบหม่อน *(Morus alba)* และใบมะยม *(Phyllanthus acidus* Skeels) จากตลาดในกรุงเทพมหานคร

2.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256 และ *Salmonella* Enteritidis DMST 10633 ได้มาจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358, *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Candida lipolytica* TISTR 5655, *Hanseniaspora uvarum* TISTR 5153, *Pichia membranaefaciens* TISTR 5093, *Rhodotolurular glutinis* TISTR 5159, *Schizosaccharomyces pombe* TISTR 5205 และ *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และ *Lactobacillus fermentum* BCC 4398 ได้มาจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ

2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ได้แก่ Nutrient Agar / Nutrient Broth (NA/NB, pH 6.8 ± 0.2 , Difco laboratories), Potato Dextose Agar (PDA, pH 5.6 ± 0.2, Difco), deMan Rogosa Sharpe Agar (MRS, pH 6.5 ± 0.2 Difco), Mueller Hinton Agar/Mueller Hinton Broth (MHA/MHB, pH 7.3 ± 0.2 Difco), Brain Heart Infusion (BHI, pH 7.4 ± 0.2, Difco) และ Saboraud Dextose Agar /Saboraud Dextrose Broth (SDA/SDB, pH 5.6 ± 0.2, Difco)

2.1.4 สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), DMSO (dimethyl sulphoxide), เอทานอล เมทานอล แอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B, Bistol-Myers Squibb), กระดาษกรองที่มีเพนนิซิลินจีความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อแผ่น วิตามินอี (α-tocopherol), Folin-

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ciocatteu (folin-ciocalteu's phenol) กรดแกลลิก (gallic acid, Fluka), Sodium carbonate (Na_2CO_3, Ajax Finechem)

2.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ ได้แก่ เครื่องปั่น เครื่องปั่นเหวี่ยง เครื่อง Rotary Evaporator (BUCHI Rovapor R-200/205, Model R205V800) ตู้อบลมร้อน ไมโครเวฟ ตู้บ่มเชื้อ ตู้เย็น ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow) หม้อนึ่งความดัน เครื่องเขย่า เครื่องฟรีสดรายซ์ (freeze drier, Labconco Model Lyph.Lockb) เครื่อง microplate reader (iEMS Reader MF, Labsystems) เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (Model, HACH DR/4000V Spectophotometer) จานหลุมปราศจากเชื้อ (microtiter plate) กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากชาสมุนไพรไทย

2.2.1.1 การเตรียมสารสกัดจากชาสมุนไพรด้วยเอทานอล

นำสมุนไพรมาทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ ผลมะตูม ใบชา ใบเตย ใบน้อยหน่า ใบบัวบก ใบพลู ใบหม่อน และใบมะยม มาล้างน้ำให้สะอาดและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น แล้วชั่งสมุนไพรให้ได้ 20 กรัมใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงไป นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 4 วัน แล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบางทิ้งส่วนที่เป็นกาก จากนั้นนำสารละลายของสารสกัดในเอทานอลไประเหยโดยเครื่อง Rotary Evaporator ให้เหลือปริมาตรประมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายสารสกัดของสมุนไพรลงในบีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร นำไปทำให้แห้งในอากาศที่อุณหภูมิ 40°C นำสารสกัดไปชั่งหาน้ำหนัก จากนั้นทำการเจือจางสารสกัดด้วยตัวทำละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ10 ในอัตราส่วนของสารสกัดต่อสารละลาย DMSO เท่ากับ 1 กรัมต่อ 2.5 มิลลิลิตรจะได้สารสกัดหยาบของสมุนไพรที่มีความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.1.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากหลอดอาหารที่เก็บไว้ลงในหลอดอาหาร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้ออีกหนึ่งครั้ง บ่มที่อุณหภูมิและเวลาเช่นเดียวกัน สำหรับเชื้อยีสต์ทำเช่นเดียวกันแต่ถ่ายเชื้อลงในอาหาร SDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อได้เชื้อทุกชนิดที่เจริญบนหลอดอาหารแล้ว ในกรณีที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย เขี่ยเชื้อแต่ละชนิด 1 ลูปลงในหลอดอาหาร NB แต่ละหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อยีสต์ทำเช่นเดียวกันแต่ถ่ายเชื้อลงในอาหาร SDB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เจริญในอาหารเหลวทุกหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งไป เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันกับเซลล์นำไปปั่นเหวี่ยงและเทส่วนใสทิ้งไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นการล้างเซลล์ 1 ครั้ง จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วยวิธีการเช่นเดียวกันนี้อีกหนึ่งครั้ง ทำให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอยของเซลล์ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับความขุ่นของเซลล์ให้เท่ากันทุกหลอดด้วย McFarland Standard เบอร์ 5 ยกเว้นเชื้อแบคทีเรียแลคติกปรับความขุ่นด้วย McFarland Standard เบอร์ 0.5 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^7 CFUต่อมิลลิลิตร

2.2.1.3 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากชาสมุนไพรไทยด้วยเทคนิคการแพร่บนอาหารวุ้น (agar diffusion technique)

ทำการทดลองด้วยวิธีการของ Jorgensen และคณะ (1999) ดังนี้ เขียนระบุตำแหน่งที่วางแผ่นกระดาษขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรบนจานอาหาร MHA ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมไว้ ทำการป้าย (swab) ให้ทั่วผิวอาหาร MHA ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที จากนั้นใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรวางตรงตำแหน่งที่ระบุไว้ หยดสารสกัดแต่ละชนิดที่จะทดสอบความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนแผ่นกระดาษกรองรวมทั้งหยดสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรซึ่งใช้เป็น Negative control ทิ้งไว้ 15 นาที สังเกตดูว่าสารสกัดซึมเข้าสู่ผิวหน้าอาหารแล้วจากนั้นจึงคว่ำจานอาหาร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดโซนใสรอบๆแผ่นกระดาษกรองที่หยดสารสกัดจากชาสมุนไพร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2.2.1.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากชาสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธีการเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution technique)

ทำการทดลองด้วยวิธีการของ Jorgensen และคณะ (1999) ดังนี้ สำหรับการทดลองที่ใช้เชื้อแบคทีเรียทดสอบ เติมอาหาร MHB ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในจานหลุมที่ปราศจากเชื้อทุกหลุมจากนั้นเติมสารสกัดหยาบของสมุนไพรแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ซึ่งมีความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลุมแรกของแต่ละแถว (หนึ่งแถวต่อสารสกัดหนึ่งชนิด) ทำการเจือจางสารสกัด (2 เท่า) ด้วยอาหาร MHB ที่เติมไว้แล้วในหลุมไปเรื่อยๆจนครบ 7 หลุม จากนั้นเติมสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมไว้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดสุดท้ายเป็น 166.7, 83.3, 41.7, 20.8, 10.4, 5.2 และ 2.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับในแต่ละหลุม ในกรณีที่ใช้ยีสต์ทดสอบใช้อาหาร SDB แทนอาหาร MHB ทำการเจือจางกับสารสกัดเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น สำหรับ Positive control ใช้สารปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือ เพนนิซิลินจี และแอมโฟเทอริซินบี ในกรณีของเพนนิซิลินจี ทำการเจือจางเพนนิซิลินจี 10 เท่า ตั้งแต่ 5,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในหลอดทดลองไปเรื่อยๆจนกระทั่งได้ความเข้มข้นเป็น 0.005 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปิเปตเพนนิซิลินจีแต่ละความเข้มข้นลงไปในหลุม ส่วนกรณีของแอมโฟเทอริซินบี ทำการเติมแอมโฟเทอริซินบีความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงในหลุมแรกปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำ

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจือจาง 2 เท่าไปเรื่อยๆ จนครบ 7 หลุมและเติมสารแขวนลอยของเซลล์ 20 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโฟเทอริซินบีเป็น 4.17, 2.08, 1.04, 0.52, 0.26, 0.13 และ 0.065 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ Negative control เติมสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรแทนสารสกัดหยาบจากสมุนไพร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง Microplate reader ก่อนที่จะนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสำหรับแบคทีเรีย และเป็นเวลา 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสำหรับยีสต์ หลังบ่มนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้ง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก็คือ ค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) ถ้าหากค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นหลังบ่มเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนบ่ม แสดงว่า สารสกัดหยาบของชาสมุนไพรสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

2.2.2 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสารสกัดหยาบจากชาสมุนไพรไทย

2.2.2.1 การวิเคราะห์หาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากชาสมุนไพร

ทำการทดลองตามวิธีการทดลองของ Brand-Williams และคณะ (1995) โดยนำตัวอย่างของสารสกัดแต่ละชนิดที่ได้จากข้อ 2.2.1.1 นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 6 ระดับได้แก่ 1,000, 500, 100, 50, 10 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 75 ไมโครลิตรมาผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.025 กรัมต่อลิตร(ในเมทานอล) ปริมาตร 2.925 มิลลิลิตรและใช้เมทานอลแทนสารสกัดเพื่อใช้เป็นแบลงค์ (Blank) จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ หลังบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตรของ DPPH ที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 0.025, 0.0125, 0.00625, 0.003125, 0.001527 และ 0.000781 กรัมต่อลิตร เพื่อทำกราฟมาตรฐานและหาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

คำนวณหาความเข้มข้นของ DPPH ที่เหลืออยู่ (ร้อยละของ $DPPH_{REM}$) จากปฏิกิริยาของสารสกัดแต่ละความเข้มข้นโดยใช้สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของ DPPH ที่ความเข้มข้นต่างๆ การหาร้อยละของ DPPH ที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์ $DPPH^{\cdot}_{REM}$) คำนวณได้โดยใช้สมการดังนี้

$$[\%\ DPPH^{\cdot}_{REM}] = [DPPH^{\cdot}]_T/[DPPH^{\cdot}]_{T=0} \times 100$$

โดย $[DPPH^{\cdot}]_T$ หมายถึงความเข้มข้นของ $[DPPH^{\cdot}]$ ที่เวลาใดๆ และ $[DPPH^{\cdot}]_{T=0}$ หมายถึงความเข้มของ$DPPH^{\cdot}$ ที่เวลา 0 นาที จากนั้นจึงนำค่าร้อยละของ DPPH ที่เหลือของสารสกัดแต่ละชนิด ณ เวลา 30 นาทีมาพลอตกราฟกับอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดต่อความเข้มข้นของ DPPH (ไมโครกรัมของสกัดต่อมิลลิกรัมของ DPPH) เพื่อใช้ในการหาค่า EC_{50} (Effective Concentration) ซึ่งเป็นปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่จำเป็นต้องใช้ในการลดปริมาณ DPPH ไปร้อยละ 50 ค่า EC_{50}หาได้จากสมการเส้นตรงดังนี้

$$[\%DPPH^{\cdot}_{REM}] = b\,[\text{g antioxidant/ kg } DPPH^{\cdot}] + a$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากชาสมุนไพรไทย

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดตามวิธีการของ Tepeและคณะ(2005) ดังนี้ เตรียมสารสกัดหยาบของชาสมุนไพรให้มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารสกัดความเข้มข้นนี้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใสในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 46 มิลลิลิตรและเติมสาร Folin-Ciocalteu reagent ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นเติมสารละลายแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงไป ทิ้งไว้นาน 2 ชั่วโมง เขย่าเป็นระยะๆ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลทั้งหมดจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก การทำกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกทำได้ดังนี้

ทำการเตรียมสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 10, 1 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองตามวิธีการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธีการเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น แต่ใช้สารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆแทนสารสกัดจากชาสมุนไพร เมื่อได้ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตรของสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาพลอตกราฟกับความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิกจะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง หาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของตัวอย่างที่วิเคราะห์

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 คุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากชาสมุนไพรไทย

3.1.1 การศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากชาสมุนไพรไทยด้วยเทคนิค Agar diffusion

จากผลการทดลองศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ชนิดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทยด้วยเทคนิค Agar diffusion (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบจากใบพลูมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้กว้างที่สุด โดยสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้เกือบทั้งหมด (14 ชนิด) รองลงมาเป็นสารสกัดหยาบจากใบชาจีน (11 ชนิด) ผลมะตูม (10 ชนิด) ใบหม่อน (8 ชนิด) ใบเตย (7 ชนิด) ใบบัวบก (6 ชนิด) ใบมะยม (4 ชนิด) และน้อยหน่า (4 ชนิด) ซึ่งชนิดของจุลินทรีย์ที่สารสกัดจากใบพลูสามารถยับยั้งได้ดีที่สุดคือ *H. uvarum* (เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส 14 มิลลิเมตร) สารสกัดหยาบจากชาจีนสามารถยับยั้งเชื้อ *L. mesenteroides*, *P. membranaefaciens* และ *Z. rouxii* ได้ดีที่สุด (มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส 20 มิลลิเมตรทั้ง 3 ชนิด) สารสกัดจากผลมะตูมสามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Enteritidis ได้ดีที่สุด (10 มิลลิเมตร) สารสกัดหยาบจากใบหม่อนสามารถยับยั้งเชื้อ *B.*

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cereus ได้ดีที่สุด (10 มิลลิเมตร) สารสกัดหยาบจากใบเตยสามารถยับยั้งเชื้อ *P. fluorescens* ได้ดีที่สุด (10 มิลลิเมตร) สารสกัดหยาบจากใบบัวบกสามารถยับยั้งเชื้อ *L. fermentum* ได้ดีที่สุด (20 มิลลิเมตร) สารสกัดหยาบจากมะยมแทบไม่มีการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เลย ส่วนสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าสามารถยับยั้งเชื้อ *C. lipolytica* ได้ดีที่สุด (9 มิลลิเมตร)

เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทย พบว่าสารสกัดหยาบจากใบพลูมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ได้ดี ยกเว้น *L. plantarum* ซึ่งไม่ถูกยับยั้งโดยสารสกัดจากใบพลู สารสกัดหยาบจากชาจีนมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อยีสต์ (7.5-20 มิลลิเมตร) และเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย (*P. fluorescens*, *L. fermentum*, *L. plantarum* และ *L. mesenteroides*, 12-20 มิลลิเมตร) ได้ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่มก่อให้เกิดโรคซึ่งยับยั้งได้เพียง 2 ชนิดคือ *L. monocytogenes* (8.5 มิลลิเมตร) และ *S.* Enteritidis (7.7 มิลลิเมตร) สารสกัดหยาบจากผลมะตูมและใบหม่อนมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (8.5-10 มิลลิเมตร) ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียและเชื้อยีสต์ (7.5-9.3 มิลลิเมตร) สารสกัดจากใบเตยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้มากชนิดกว่าเชื้อยีสต์ โดยเฉพาะแบคทีเรียพวกที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย สารสกัดหยาบจากใบบัวบกมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย (10-20 มิลลิเมตร) ได้แก่ *L. fermentum* และ *L. mesenteroides* ได้ดีกว่ายีสต์และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (7-7.7 มิลลิเมตร) สารสกัดหยาบจากใบมะยมไม่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียส่วนใหญ่ยกเว้น *L. mesenteroides* ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเพียงเล็กน้อย (7.5 มิลลิเมตร) ส่วนยีสต์ก็มีการยับยั้งเพียงเล็กน้อยเช่นกัน (7.5 มิลลิเมตร) และสารสกัดจากใบน้อยหน่าแทบไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งยีสต์และแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสีย ยกเว้น *C. lipolytica* และ *L. mesenteroides* ซึ่งถูกยับยั้งโดยสารสกัดจากใบน้อยหน่า ส่วนแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค สารสกัดจากใบน้อยหน่ายับยั้งได้เพียง 2 ชนิดเท่านั้น คือ *B. cereus* (8 มิลลิเมตร) และ *S.* Enteritidis (8.5 มิลลิเมตร) ดังนั้นจากผลการทดลองนี้จึงได้คัดเลือกสารสกัดจากชาจีน ใบบัวบก ใบพลู ใบเตย และผลมะตูม ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ต่อไป สำหรับผลการตรวจสอบของ Negative control โดยใช้ DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 พบว่าไม่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทุกชนิดที่ทดสอบ ส่วนการใช้เพนนิซิลินจีเป็น Positive control พบว่าให้ผลยับยั้งจุลินทรีย์ทุกชนิดได้

3.1.2 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากชาสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธีการเจือจางในอาหารเหลว

จากการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งจุลินทรีย์ (MIC) ของสารสกัดจากชาสมุนไพรไทย 5 ชนิด ได้แก่ ชาจีน ใบบัวบก ใบพลู ใบเตย และผลมะตูม ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ชนิด ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อพิจารณาจากค่า MIC โดยรวมพบว่าสารสกัดจากผลมะตูม ชาจีน และใบพลูสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (ค่า MIC ส่วนใหญ่น้อยกว่า 166.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบบัวบกและใบเตย (ค่า MIC ส่วนใหญ่มากกว่า 166.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และเมื่อพิจารณาค่า MIC ของชาจีน ผลมะตูม และใบพลู พบว่าชาจีนและผลมะตูมมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์สูงกว่าใบพลูเนื่องจากมีค่าความความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ต่ำกว่าของใบพลู ในบรรดากลุ่มจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบพบว่า *B. cereus*, *E. coli* และ *S. aureus* ค่อนข้างไวต่อสารสกัดจากชาจีนและผลมะตูม (ค่า MIC อยู่ในช่วง 10.4-41.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มากกว่า *L. monocytogenes* และ *S.* Enteritidis (ค่า MIC อยู่ในช่วง 83.3-มากกว่า 166.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับกลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียจะเห็นได้ว่าเชื้อ *L. mesenteroides* สามารถถูกยับยั้งโดยสารสกัดทั้งสองชนิดนี้ได้ดีที่สุด (ค่า MIC อยู่ในช่วง 10.4-20.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาได้แก่ *L. plantarum*, *P. fluorescens* และ *L. fermentum* สำหรับยีสต์ที่ไวต่อสารสกัดจากชาจีนมากที่สุดคือ *H. uvarum* และ *R. glutinis* (ค่า MIC เท่ากับ 41.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และยีสต์ที่ไวต่อสารสกัดจากผลมะตูมมากที่สุดได้แก่ *C. lipolytica* และ *P. membranaefaciens* (ค่า MIC เท่ากับ 83.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับผลการตรวจสอบของ Negative control โดยใช้ DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 พบว่าไม่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทุกชนิดที่ทดสอบ ส่วนการใช้เพนนิซิลินจีเป็น Positive control พบว่าให้ผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี (ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.005-5,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อเพนนิซิลินจีมากที่สุดคือ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* (ค่า MIC เท่ากับ 0.005 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ส่วนยีสต์ที่ไวต่อเพนนิซิลินจีมากที่สุดคือ *H. uvarum* (ค่า MIC เท่ากับ 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) การใช้แอมโฟเทอริซิน บี เป็น Positive control พบว่าให้ผลยับยั้งเชื้อยีสต์ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย (ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.065-4.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งยีสต์ที่ไวต่อแอมโฟเทอริซินบี คือ *S. pombe* (ค่า MIC เท่ากับ 0.065 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาได้แก่ *P. membranaefaciens*, *R. glutinis*, *H. uvarum*, *C. lipolytica* และ *Z. rouxii* สำหรับแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียจะไวต่อแอมโฟเทอริซินบีมากกว่าแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (ค่า MIC อยู่ในช่วง 1.04-4.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

คุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิดพิจารณาได้จากค่า MIC ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่นำมาทดสอบ ค่า MIC ที่ต่ำแสดงถึงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดี ผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่า ใบพลูมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีเนื่องจากใบพลูมีน้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ Chavicol, Chavibetol, Eugenol, p-Cymene, Eugenol, Methyl Ether, Cadinene และ Caryophyllene ใบพลูมีคุณสมบัติด้านชีวภาพหลายประการ ซึ่งได้แก่ คุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ การต้านไวรัส การต้านการอักเสบ การต้านการแข็งตัวของเลือด (antiplatelet) การต้านอนุมูลอิสระ การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น และคุณสมบัติทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Harborne และ Williams, 2002) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของอุไรวรรณและคณะ (2543) ซึ่งได้ทำการสกัดใบพลูด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์และนำกากที่ได้มาสกัดต่อด้วยเอทานอลและได้ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากสารสกัดจากใบพลู 148 ตัวอย่างในการยับยั้ง *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *S. aureus*, *Streptococcus* sp. ด้วยวิธี Agar diffusion พบว่า

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดจากใบพลูมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *T. mentagrophytes* ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ *S. aureus*, *A niger* และ *Streptococcus* sp.

สำหรับสารสกัดจากผลมะตูมซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยเฉพาะยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี เช่น *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* และ *Salmonella* Enteritidis ได้ดี ดังเช่นการรายงานของ Shoba และThomas (2001) ซึ่งพบว่าสารสกัดจากมะตูมด้วยเมทานอลมีประสิทธิภาพในการต่อต้านโรคท้องเสียได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากมะตูมประกอบด้วยสารแทนนินและสารที่มีลักษณะเป็นเมือก ส่วนฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของมะตูมได้มีผู้ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยที่แยกได้จากใบของมะตูม พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อราได้หลายชนิด ซึ่งเชื้อรามีความต้านทานต่อน้ำมันหอมระเหยจากใบมะตูม คือ *Fusarium udum* ซึ่งถูกยับยั้ง 80 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 400 พีพีเอ็ม นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยจากมะตูมยังยับยั้งการงอกของสปอร์ทุกชนิดเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ (Rana และคณะ, 1997)

ในการทดลองนี้สารสกัดจากใบชา มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดีโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ *B. cereus* และ *S. aureus* รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียได้แก่ *L. plantarum*, *L. mesenteroides* และ *P. fluorescens* ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Chou และคณะ (1999) ซึ่งได้ทำการทดลองพบว่า *P. fluorescens* เป็นแบคทีเรียที่ไวต่อสารสกัดจากชามากที่สุด ขณะที่ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่ไวต่อสารสกัดนี้น้อยที่สุด นอกจากนี้ Yam และคณะ (1997) พบว่าสารสกัดจากชาเขียวสามารถทำลายเชื้อ *S. aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* โดยมีค่า MIC เป็น 0.28 และ 0.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากชาเขียวคาดว่าอาจเป็นผลจากการที่ชามีโพลีฟีนอลเป็นส่วนประกอบ โดยทั่วไปชาประกอบด้วยสารโพลีฟีนอล 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ Catechins, Theaflavins และ Thearubigins Catechins ชนิดที่เรียกว่า (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG) (Yanishlieva-Maslarova, 2001) EGCG มีมากในชาเขียว (green tea) ชาอูหลง (oolong tea) และชาดำ (black tea) สาร Gallocatechins และ gallates ของสารนี้ในชาเขียว เป็นสารประกอบหลักที่ให้ผลยับยั้งจุลินทรีย์ (Toda และคณะ, 1990) ดังการทดลองของ Sakanaka และคณะ (2000) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารโพลีฟีนอลจากชาเขียวต่อการยับยั้งแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงที่สร้างสปอร์ (thermophillic sporeforming bacteria) พบว่าในบรรดาแบคทีเรียตระกูล *Bacillus* ที่ทดสอบสารโพลีฟีนอลจากชาเขียวสามารถยับยั้งเชื้อ *B. stearothermophilus* ได้ดี สาร EGCG มีฤทธิ์ต้าน *B. stearothermophilus* และ *Clostridium thermoceticum* ได้สูง สำหรับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของชาจีน Limsong และคณะ (2004) ได้ทดลองพบว่าชาจีนมีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะของเชื้อ *Streptococcus mutans* ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสมุนไพรชนิดอื่นที่ศึกษาอีก 5 ชนิด ได้แก่ *Casia alata* (ชุมเห็ดเทศ), *Psidium guajava* (ฝรั่ง), *Andrographis paniculata*, *Harrisonia perforate* และ *Streblus asper*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับสารสกัดจากใบเตย เป็นพืชที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับสารสกัดชนิดอื่น ซึ่งในการทดลองนี้ ค่า MIC ส่วนใหญ่ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบมีค่ามากกว่า 166.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Linda และคณะ (2004) ได้สกัดสาร Pandanin จากใบเตยซึ่งสารนี้เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง (unglycosylate protein) ที่มีมวลโมเลกุล 8 กิโลดาลตัน พบว่าสาร Pandanin นี้มีฤทธิ์ต้านไวรัสที่ติดเชื้อในคน เช่น Herpes simplex virus type-1 (HSV-1) และ Influenza virus (H1N1) สำหรับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและยีสต์ของสารสกัดจากใบเตยยังไม่มีผู้ใดรายงานไว้ เนื่องมาจากใบเตยประกอบด้วยสารประกอบระเหยหลายชนิด โดยเฉพาะ 2- acethyl-1-pyroline (Laksanalamai และ Ilangantileke, 1993) นอกจากนี้ยังพบสารแอลคาลอยด์ เช่น Pandanamineและ Pandanamerilactones ที่มีโครงสร้างที่เรียกว่า Pyrroline-derived (Takayama และคณะ, 2001) อย่างไรก็ตามสารที่เป็นส่วนประกอบของใบเตยชนิดใดที่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ยังไม่ทราบแน่ชัด

สำหรับสารสกัดจากใบบัวบก ในการทดลองนี้มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ไม่มากนักโดยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้ ซึ่งเกือบทั้งหมดของเชื้อที่ใช้ทดสอบมีค่า MIC มากกว่า 166.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Cheeptham และ Towers (2002) ได้ศึกษาคุณสมบัติการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบบัวบกด้วยเอทานอล พบว่าสารสกัดจากใบบัวบกมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* และ *B. subtilis* บัวบกเป็นพืชที่ได้มีการรายงานการใช้ประโยชน์ในการรักษาแผล ช่วยให้ความจำดี จิตใจแจ่มใส รักษาโรคหลอดลมอักเสบ หอบหืด บิด โลหิตจาง โรคไต และท่อปัสสาวะอักเสบ (Jaganath และ NG, 1999) นอกจากนี้ยังป้องกันการเกิดภูมิแพ้ และสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งได้ด้วย (Kan, 1986) คุณสมบัติของสารสกัดจากบัวบกที่ให้ประโยชน์ เนื่องมาจากสารสำคัญในบัวบกได้แก่ Asiatic acid, Asiaticoside, Madecassic acid และ Madecassoside (Inamdar และคณะ, 1996)

สำหรับฤทธิ์ต้าจุลินทรีย์จากใบหม่อน ได้มีผู้รายงานไว้โดย Nomura (1998) ได้พบว่าเปลือกของรากหม่อนมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *Sreptococcus faecalis*, *B. subtilis* และ *Mycobacterium smegmatis* นอกจากนี้ Park และคณะ (2003) ยังได้แยกสาร Kuwanon G จากสารสกัดของเปลือกรากหม่อน พบว่าสารนี้สามารถยับยั้ง *S. mutans* ซึ่งเป็นสาเหตุของฟันผุ และมีค่า MIC เท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร Kuwanon G นี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus sobrinus*, *S. sanguis* และ *Porpyromonas gingivalis* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเยื่อหุ้มฟันอักเสบ (Kim และคณะ, 1993)

จากการทดลองนี้ซึ่งพบว่าสารสกัดจากใบน้อยหน่า สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kotkar และคณะ (2002) ซึ่งพบว่าฟลาโวนอยด์ที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนของสารสกัดจากใบน้อยหน่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์และฆ่าแมลงได้ สำหรับสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ยังไม่ทราบแน่ชัด

ส่วนสารสกัดจากใบมะยมจากการทดสอบพบว่ามีฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ค่อนข้างน้อย โดยยังไม่เคยมีผู้รายงานถึงฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบมะยม Hadi และ Bremner (2001)

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้เก็บตัวอย่างพืช 100 ชนิดที่คาดว่ามีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์รวมถึงฤทธิ์ต้านมาลาเรียตามที่ได้มีการใช้ประโยชน์กันทั่วไปในทางยา โดยพืชทั้งหมดที่ทดสอบอยู่ใน 49 Family และ 80 ตระกูล ปรากฏว่า 23 เปอร์เซ็นต์ของพืชที่ทดสอบมีสารฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการมีคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์ สำหรับสารสกัดจากใบ เปลือก และรากของมะยมไม่พบว่ามีสารแอลคาลอยด์เป็นส่วนประกอบ

ตารางที่ 1 คุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากชาสมุนไพรไทยด้วยเทคนิค agar diffusion

ชนิดของจุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มม.)[a]							
	ใบชา	ใบเตย	ใบน้อยหน่า	ใบบัวบก	ใบพลู	ใบหม่อน	ใบมะยม	ผลมะตูม
<u>แบคทีเรียก่อโรค</u>								
Bacillus cereus	-[b]	-	8.0±0.0	7.0±0.0	9.7±3.8	10.0±1.4	-	-
Escherichia coli	-	-	-	-	10.3±1.2	-	-	9.7±3.8
Listeria monocytogenes	8.5±0.7	8.5±0.7	-	-	9.5±0.7	9.5±2.1	-	9.7±1.2
Salmonella Enteritidis	7.7±1.2	-	8.5±0.7	-	7.3±0.6	8.5±2.1	-	10.±1.4
Staphylococcus aureus	-	8.5±0.7	-	7.0±0.0	9.3±2.1	8.5±0.7	-	9.0±3.5
<u>แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสีย</u>								
Pseudomonas fluorescens	12.7±4.4	10.0±4.0	-	-	8.0±1.4	-	-	8.0±1.4
Lactobacillus fermentum	12.0±5.3	8.5±2.1	-	20.0±0.0	10.0±1.4	-	-	-
Lactobacillus plantarum	12.3±5.9	-	-	-	-	7.5±0.7	-	-
Leuconostoc mesenteroides	20.0±0.0	9.0±1.0	7.5±0.7	10.0±1.4	11.3±2.5	8.5±1.6	7.5±0.7	8.3±0.6
<u>ยีสต์ที่ทำให้อาหารเสีย</u>								
Candida lipolytica	10.0±4.2	9.0±1.0	9.0±0.0	7.0±0.0	8.3±0.6	9.3±2.3	7.5±0.7	9.3±1.5
Hanseniaspora uvarum	9.0±2.0	-	-	-	14.0±0.0	-	-	-
Pichia membranaefaciens	20.0±0.0	-	-	-	9.3±0.6	-	-	8.3±0.6
Rhodotolurular glutinis	7.5±0.7	8.3±1.2	-	-	8.0±1.4	7.7±1.2	7.5±0.7	8.5±2.1
Schizosaccharomyces pombe	-	-	-	-	11.7±1.5	-	-	-
Zygosaccharomyces rouxii	20.0±0.0	-	-	7.7±0.6	10.7±0.6	-	7.5±0.7	7.3±0.6

[a] ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

[b] ไม่พบการยับยั้ง (เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส < 6 มม.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากชาสมุนไพรไทย

เชื้อจุลินทรีย์	ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (mg/ml) / (units/ml)*						
	ใบชา	ใบเตย	ใบบัวบก	ใบพลู	ผลมะตูม	Penicillin G	Amphotericin B
แบคทีเรียก่อโรค							
Bacillus cereus	10.4	>166.7	>166.7	>166.7	41.7	5.0	2.08
Escherichia coli	83.3	166.7	166.7	83.3	41.7	5.0	4.17
Listeria monocytogenes	166.7	>166.7	>166.7	>166.7	83.3	0.005	2.08
Salmonella Enteritidis	>166.7	166.7	>166.7	83.3	83.3	5,000	>4.17
Staphylococcus aureus	20.8	>166.7	>166.7	>166.7	41.7	0.005	>4.17
แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสีย							
Pseudomonas fluorescens	41.7	>166.7	>166.7	>166.7	83.3	0.5	2.08
Lactobacillus fermentum	166.7	>166.7	>166.7	>166.7	83.3	5.0	4.17
Lactobacillus plantarum	20.8	166.7	>166.7	166.7	83.3	5,000	1.04
Leuconostoc mesenteroides	20.8	>166.7	>166.7	>166.7	10.4	0.5	4.17
ยีสต์ที่ทำให้อาหารเสีย							
Candida lipolytica	83.3	166.7	>166.7	>166.7	83.3	5,000	1.04
Hanseniaspora uvarum	41.7	>166.7	>166.7	>166.7	>166.7	50	1.04
Pichia membranaefaciens	166.7	>166.7	>166.7	166.7	83.3	>5,000	0.26
Rhodotolurular glutinis	41.7	>166.7	>166.7	83.3	166.7	>5,000	0.52
Schizosaccharomyces pombe	>166.7	>166.7	>166.7	>166.7	>166.7	5,000	0.07
Zygosaccharomyces rouxii	>166.7	>166.7	>166.7	>166.7	166.7	>5,000	4.17

* หน่วยความเข้มข้นของ Penicillin G เท่านั้น

4.2 คุณสมบัติทางเคมีของสารสกัดจากชาสมุนไพรไทย

4.2.1 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

ในการทดลองนี้ได้ศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากชาสมุนไพรไทยทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ ชาจีน ใบเตย ใบน้อยหน่า ใบบัวบก ใบพลู ใบมะยม ใบหม่อน และผลมะตูม ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของชาสมุนไพรไทยแสดงได้ในรูปของค่า EC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัดที่จำเป็นต้องใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการลดความเข้มข้นของ DPPH เริ่มต้นลง 50 เปอร์เซ็นต์ (Sánchez-Moreno และคณะ, 1998) ค่า EC_{50} เป็นค่าที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สำหรับค่า AE (Antiradical Efficiency, $AE = 1/EC_{50}$) หรือ Antiradical power (ARP) เป็นค่าอีกค่าหนึ่งที่ใช้ในการวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าถ้าหากค่า EC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระยิ่งต่ำมากเท่าใดหรือมีค่า AE ยิ่งสูงมาก นั่นแสดงว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารนั้นก็จะยิ่งมาก (Brand-Williams และคณะ, 1995) จากการทดลองเมื่อพิจารณาค่า EC_{50} และค่า AE จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากใบพลูมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ค่า EC_{50} เท่ากับ 699.29 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัมของ DPPH หรือ ค่า $AE = 1.43 \times 10^{-3}$) รองลงมาเป็นสารสกัดจากใบชา ใบน้อยหน่า ใบหม่อน ใบบัวบก ผลมะตูม ใบมะยม และใบเตย สำหรับ Positive control ที่ใช้คือ วิตามินอี มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าใบบัวบกคือ มีค่า EC_{50} เท่ากับ 314.47 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัมของ DPPH ($AE = 3.18 \times 10^{-3}$)

4.2.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากชาสมุนไพรไทย

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากชาสมุนไพรไทย ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารสกัดจากชาสมุนไพรไทยที่มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงที่สุดคือ ใบชา (546.00 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด) รองลงมาเป็นสารสกัดจากใบพลู ใบเตย ผลมะตูม ใบน้อยหน่า ใบมะยม ใบบัวบก และใบหม่อน

การที่พบว่าสารสกัดจากใบชามีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากใบชาประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลปริมาณมากซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (Wu และ Wei, 2002) สารนี้มีอยู่ทั้งในชาเขียว (ยังไม่ผ่านการหมัก) และชาที่ผ่านการหมักแล้ว (Yamamoto และ Chu, 1997) และยังพบว่าสารสกัดจากชาดำ (black tea) ซึ่งเป็นชาที่ผ่านการหมักเป็นเวลานานมากที่สุดจะมีปฏิกิริยาในการต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุดเนื่องจากสารคาเทชิน ซึ่งเป็นสารประกอบที่สำคัญในสารฟีนอลิกได้ถูกออกซิไดซ์ในระหว่างกระบวนการหมัก Atoui และคณะ (2004) ได้ตรวจสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่างๆ ได้แก่ Chinese green tea (ชาจีน), Black tea (ชาดำ), Dictamnus, Eucalyptus, Sage, Linden, Mint, Chamomile และ Mountain tea พบว่าชาจีนมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.15 มิลลิกรัม quercetin ต่อมิลลิกรัม DPPH และค่า AE เท่ากับ 6.65 รองลงมาได้แก่ Black tea ขณะที่ Mountain tea มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ในส่วนของการทดลองนี้พบว่าใบชามีค่า EC_{50} เท่ากับ 729.93 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัมของ DPPH มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 546.00 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัดซึ่งสูงกว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัดจากชาสมุนไพรชนิดอื่นๆที่ทำการทดลอง ด้วยเหตุนี้ใบชาจึงมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูง

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองนี้สารสกัดจากใบพลูมีค่า EC_{50} เท่ากับ 699.29 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัมของ DPPH และมีสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 59.7 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัดเช่นเดียวกับ Runnie และคณะ (2004) ซึ่งได้วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในใบพลูพบว่ามีปริมาณ 67 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดแห้ง

จากการทดลองนี้สารสกัดจากใบหม่อนมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูงคือมีค่า EC_{50} เท่ากับ 1021.7 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัมของ DPPH ซึ่งไม่สัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลซึ่งพบเพียง 6 ไมโครกรัม GAE ต่อมิลลิกรัมของสารสกัดแห้ง Ohsugi และคณะ (1999) พบว่าในสารสกัดจากผลหม่อนที่สกัดด้วยน้ำ มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูง สำหรับสารสกัดจากใบบัวบกมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูงถัดจากใบหม่อน การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลในใบบัวบก แต่ในการทดลองนี้พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดที่พบในสารสกัดจากใบบัวบกไม่สูงคือมี 6 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด Zainol และคณะ (2003) ได้วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในใบบัวบกพบว่าส่วนของใบมีสารประกอบฟีนอลสูงสุด (8.13-11.7 กรัมต่อ100 กรัมของตัวอย่างแห้ง) เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่นๆของบัวบก สารประกอบฟีนอลเป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ ซึ่งพบได้ทั่วไปในเครื่องเทศและสมุนไพร ได้มีผู้แยกและจำแนกสารประกอบฟีนอลที่สำคัญจากเครื่องเทศและสมุนไพรหลายชนิดได้แก่ Rosemary, Sage, Mace, Oregano ไทม์ ขมิ้น ขิง พริกไทย กานพลู และพริก สารประกอบส่วนใหญ่ที่แยกได้มีปฏิกิริยาในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ดีพอกับสาร BHA, BHT หรือ α-tocopherol (Rajilakshmi และ Narasimhan, 1996) สารประกอบในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ จัดเป็นสารประกอบฟีนอลกลุ่มหนึ่งซึ่งพบได้ในผักผลไม้หลายชนิดรวมทั้งในใบน้อยหน่าซึ่งสารนี้เป็นสารที่ให้กลิ่นรสและสี สารประกอบนี้มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยจะไปแตกสลายปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical chain reaction) สารประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จะต้องสามารถชะลอหรือป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นของสารตั้งต้นเมื่อมีสารนี้ในความเข้มข้นต่ำ และอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างขึ้นจะต้องมีความเสถียรเพื่อที่จะป้องกันตัวเองไม่ให้เป็นอนุมูลที่จะไปก่อให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระต่อไป(Croft, 1999) ปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจกับสารประกอบฟีนอลมาก เนื่องจากสามารถป้องกันการเกิดโรคหัวใจและการเกิดโรคมะเร็งได้ดังการทดลองของ Gnanapragasam และคณะ (2004) พบว่าบัวบกมีผลป้องกันโรคหัวใจในหนู

สำหรับสารสกัดจากผลมะตูมพบว่ามีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงรองจากใบบัวบก ใบหม่อน และใบน้อยหน่า ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Kamalakanan และ Prince (2003) ซึ่งได้รายงานว่าสารสกัดจากผลมะตูมมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระในหนู Lampronti และคณะ (2003) ได้รายงานว่าสารสกัดจากเปลือกของต้นมะตูมสามารถยับยั้งการเกิดเนื้องอกใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คน และได้วิเคราะห์หาสารสำคัญในสารสกัดจากมะตูมด้วย GC-MS พบสารสำคัญได้แก่ Butyl p-tolyl sulfide, 6-methyl-4-chromanone และ Butylated hydroxyanisole

สำหรับสารสกัดจากใบมะยม จากผลการทดลองนี้พบว่าสารสกัดจากใบมะยมมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างน้อย ซึ่งยังไม่เคยมีผู้ศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากใบมะยมมาก่อน ส่วนในสารสกัดจากใบเตยได้มีผู้รายงานว่าในสารสกัดจากใบเตยประกอบด้วยสารสำคัญได้แก่ น้ำมันหอมระเหย, 2-acetyl-1-pyrroline (Apintanapong และ Noomhorn, 2003) และมีผู้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากใบเตยที่สกัดโดยเมทานอล พบว่ามีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับผักชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Anacardium occidentale*, *Cosmos caudatus*, *Curcuma mangga*, *Melicope ptelefolia*, *Persicaria tenella* และ *Portulaca oleracea* (Abas และคณะ, 2005) จากผลการทดลองนี้ สารสกัดจาก ใบพลู และใบชามีค่าคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดค่อนข้างสูงกว่าพืชชนิดอื่น

ตารางที่ 3 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของชาสมุนไพรไทย

ชนิดของชาสมุนไพรไทย	EC_{50} (ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัมของ DPPH)[a] ± SD	AE[b]
ใบชา	729.93 ± 40.01	1.37 ± 0.02
ใบเตย	13,886.94 ± 111.63	0.07 ± 0.009
ใบน้อยหน่า	911.65 ± 21.04	1.10 ± 0.05
ใบบัวบก	1054.64 ± 62.89	0.95 ± 0.01
ใบพลู	699.29 ± 29.10	1.43 ± 0.03
ใบหม่อน	1021.70 ± 60.57	0.98 ± 0.02
ใบมะยม	5926.82 ± 34.86	0.17 ± 0.03
ผลมะตูม	1201.99 ± 90.44	0.83 ± 0.01
α-tocopherol	314.47 ± 24.59	3.18 ± 0.04

[a] ค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้ง 3 ซ้ำ

[b] ค่า AE คำนวณจาก $1/EC_{50}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลในชาสมุนไพรไทย

ชนิดของชาสมุนไพรไทย	ปริมาณสารประกอบฟีนอล[a] (ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด)
ใบชา	546 ± 0.00
ใบเตย	46 ± 2.00
ใบน้อยหน่า	26.03 ± 0.82
ใบบัวบก	8.03 ± 1.89
ใบพลู	59.7 ± 1.04
ใบหม่อน	6.00 ± 0.00
ใบมะยม	26 ± 0.00
ผลมะตูม	42.53 ± 3.48

[a] ค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้ง 3 ซ้ำ

4. สรุปผลการทดลอง

เมื่อศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 15 ชนิด ของสารสกัดหยาบจากชาสมุนไพรไทยด้วยเทคนิค Agar diffusion และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบด้วยเทคนิค Broth dilution ปรากฏว่า สารสกัดจากใบชาและผลมะตูมมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์สูง รองลงมาเป็นใบพลู ใบเตย ใบบัวบก ใบหม่อน ใบน้อยหน่าและใบมะยม เมื่อพิจารณาชนิดของแบคทีเรียที่ทดสอบ *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคที่ค่อนข้างไวต่อการยับยั้งต่อสารสกัดจากใบชาและผลมะตูมซึ่งมีค่า MIC อยู่ในช่วง 10.4-41.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มที่ทำให้อาหารเน่าเสีย *L. mesenteroides* เป็นเชื้อที่ถูกยับยั้งโดยสารสกัดทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุด (10.4-20.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับยีสต์ที่ไวต่อสารสกัดจากชามากที่สุดได้แก่ *H. uvarum* และ *R. glutinis* (ค่า MIC เท่ากับ 41.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และยีสต์ที่ไวต่อสารสกัดจากมะตูมมากที่สุดได้แก่ *C. lipolytica* และ *P. membranaefaceins* (ค่า MIC เท่ากับ 83.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

เมื่อศึกษาถึงกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากชาสมุนไพรไทย 8 ชนิด ปรากฏว่า สารสกัดจากใบพลูมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (ค่า EC_{50} เท่ากับ 699.29 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัมของ DPPH) รองลงมาคือ ใบชา ใบน้อยหน่า ใบหม่อน ใบบัวบก ผลมะตูม ใบมะยม และใบเตย สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

พบว่าสารสกัดจากใบชามีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงที่สุดเป็น 546 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด รองลงมาเป็นสารสกัดจากใบพลู ใบเตย ผลมะตูม ใบน้อยหน่า ใบมะยม ใบบัวบก และใบหม่อน

เอกสารอ้างอิง

รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ. 2540. พืชเครื่องเทศและสมุนไพร. กรุงเทพฯ:โอ. เอส. พริ้นท์ติ้งเฮาส์.

อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, ยุพา มงคลสุข, วารุณี ธนะแพสย, วิชัย หฤทัยธนาสันติ์, บุญส่ง คงคาทิพย์, อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, วิภารัตน์ รัตนะ, พงษ์ศิริ วินิจฉัย, กวิศร์ วานิชกุล, รักเกียรติ ชอบเชื้อ, ประภัสสร รักถาวร, นิธิวดี วงษ์เจริญ และ พัสตราภรณ์ ห้วยศรีจันทร์. 2543. การพัฒนาการผลิตสารสกัดจากพลูและการใช้ประโยชน์เพื่อวิสาหกิจขนาดกลางและย่อม. การสัมมนาการเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพร. กรุงเทพฯ:สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

Abas, F., Lajis, N. H., Israf, D. A., Khozirah, S. and Kalsom, Y. U. 2005.Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of selected Malay Traditional vegetables. Food Chemistry. xx: xxx-xxx.

Alzoreky, N. S. and Nakahara, K. 2002. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. Journal of food Microbiology. 80:223-230.

Apintanapong, M. and Noomhorn, A. 2003. The use of spray drying to microencapsulate 2-acetyl-1- pyrroline, a major flavour compoment of aromatic rice. International Journal Food Science Technology. 38:95-102.

Atoui, K., Mansouri, A., Boskou, G. and Kefalas, P. 2004. Tea and herbal infusion :their antioxidant activity and phenolic profile. Food Chemistry. xx:xx.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. and Bersert, E. C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittle wissenschaft and-Technologie. 28(1): 25-30.

Cheeptham, N. and Tower G.H.N. 2002. Light-mediated activities of some Thai medical plant teas. Fitoterapia. 73:651-662.

Chou, C.-C., Lin, L. and Chung, K-T. 1999. Antimicrobial activity of tea as effected by the degree of fermentation and manufacturing season. International Journal of food Microbiology. 48:125-130.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
69581

Croft, K. D. 1999. Antioxidant effects of plant phenolic compounds. In: Antioxidants in human health and disease, pp. 100-121. Basu, T. K.; Temple, N. J. and Garg, M. L.,eds. UK: CABI Publishing.

Gnanapragasam, A., Ebenezar, K. K., Sathish, V., Govindaraju, P. and Devaki, T. 2004. Protctive effect of *Centella asiatica* on antioxidant tissue defence system against adrismycin induced cardiomyopathy in rats. Life Sciences. 76:585-504.

Hadi, S. and Bremner, J. 2001. Initial studies on alkaloids from Lombok medical plants. Molecules. 6:117-129.

Haeborne, J. B. and Williams, C. A. 2002. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry. 55: 481-504.

Hertog, M. G. L. and Feskens E. J. M. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease:the zulphen Elderly study. The Lancet. 432(8878):1001-1007.

Jaganath, I. B. and NG L. T. 1999. Herbs: the green pharmacy of Malaysia. Kuala Lumper : Vinpress Sdn. Bhd.

Jorgensen, J. H., Turnidge, J. D. and Washington, J. A. 1999. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray, P. R., Barron, E. J., Praller, M.A., Tenover, F. C., and Yolken, R. H., Eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D. C. ASM Press, pp. 1526-1562.

Kamalakkanan, N. and Princ, P.S.M. 2003. Effects of *Angle marmelos* Correa (Bael) fruit extract on tissue antioxidants in streptozotocin diabetic rats. Indian Journal of Experimental Biology. 41: 1285-1288.

Kan, W.S. 1986. Pharmaceutical botany. Taiwan: National Reserch Institable of Chinese Medicine.

Kim, S. H.; Kim, N. J.; Choi, J. S. and Park, J. C. 1993. Determination of flavonoid by HPLC and biological activities from the leaves of cudrania tricuspidata bureau. Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition. 22: 67-68.

Kotkar, H. M., Mendki, P. S., Sadan, S. V., Jhs, S. R., Upasani, S.M. and Mahoshwari, V. V. 2002. Antimicrobial and posticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa.* Pest Management Science. 58: 33-37.

Laksanalamai, V. and Ilangantileke, S. 1993. Comparison of aroma compound (2-acethyl-1-pyrroline) in leaves from pandan (*Pandanus amaryllifolius*) and Thai fragment rice (Khao Dawk Mali 105). Cereal Chemistry. 70:381-384.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lampronti, I., Martello, D., Bianchi, N., Borgatii, M., Lambertini, E., Piva, R., Jabbar, S., Choudhuri, M. S. K., Khan, M. T. H. and Gambari, R. 2003. *In vitro* antiproliferative effects on human tumor cell lines of extract from the Bangladeshi medicinal plant *Aegle marmelos* Correa. Phytomedicine. 10:300-308.

Linda, S. M., Ooi, S. S. M. and Sun, V. E. 2004. Purification and characterization of a new antiviral protein from the leaves of *Pandanus amaryllifolius* (Pandanaceae). The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 36:1440-1446.

Limsong, J., Benjavongkulchai, E. and Kuvatanasuchai, J. 2004. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. Journal of Ethnopharmacology. 92:281-289.

Inamdar, P. K.; Yeole, R.D.; Ghogare, A.B. and Souza, N.J. d. 1996. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. Journal of Chromatography A. 742:127-130.

Nomura, T. 1998. Biological activities of phenolic constituents of mulberry tree and relate plants. In: Progress in Chemistry of organic National Products, p.189. Herz, W.; Griscbach, H.; Kirby, G.W. and Tamm, C.H., eds. Springer: Verlag.

Ohsugi, M., Fan, W., Hase, K., Xiong, Q., tezuka, Y., Komatsu, K., Namba, T., Kenji, T. T. and Kadota, S. 1999. Active-oxigen scavenging activity of traditional nourishingtonic herbal medicines and active constituents of *Rhodiola sacra*. Journal of Ethnopharmacology. 67:111-119.

Park, K. M.; You, J. S.; Lee, H. Y.; Beak, N. I., and Hwang, J. K. 2003. Kuwanon G:an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. Journal of Ethnopharmacology. 84:181-185.

Rajalakshmi, D. and Narasimhan, S. 1996. Food antioxidants technological, toxicological, and health perspectives. In: Food Antioxidants : Sources and Methods of Evalution, pp. 65-265. Madhavi, D. L.; Deshpande, S. S. and Sulunkhe, D. K., eds.xx: xx.

Rana, B.K., Singh, U. P. and Teneja, V. 1997. Antifungal activity and kinentics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. Jounal of Ethopharmacology. 57:29-34.

Runnie I., Salleh, M. N., Mohamed, S., Head, R. J. and Abeywardena, M. Y. 2004. Vasorelaxation induced by common edible tropical plant extracts in isolated rat arota and mesenteric vascular bed. Journal of Ethnopharmacology. 92:311-316.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., and Saura-Calixto, F. 1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture. *76*: 270-276.

Sakanaka, S., Lekh, R. J. and Makoto, T. 2000. Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. Journal of Bioscience and Bioengineering. 90(1):81-85.

Shoba, F. G. and Thomas M. 2001. Study of antidiarrhoeal activity of four medicinal plants in castor-oil induced diarrhoea. Journal of Ethnopharmacology. 76:73-76.

Sohn, H. Y., Son, K. H., Kwon, C. S., Kwon, G. S. and Kang, S. S. 2004. Antimicrobial and cytotoxic activity of prenylated flavonoids isolated from medicinal plant : *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussnetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai, *Phytomedicine*, *11*, 666-672.

Takayama, H.; Ichikawa, T.; Kitajima, M.; Aimi, D. L. and Nonato, M. G. 2001. A new alkaloid, pandanamine; finding of an anticipate biogenic intermediate in *Pandanus amyryllifolius* Roxb.Tetrahedron Letters. 42:2995-2996.

Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M. and Polissiou, M. 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). Food Chemistry, 90, *333*-340.

Toda, M., Okubo, S., Ikigai, H. and Shimamura, T. 1990. Antibacterial and antihaemolysin activities of tea catechins and their structural relatives. Japanese Journal of Bacteriology. 45, 561-566.

Wu, C. D. and Wei, G. 2002. Tea as a functional food for oral health, Nutrition, *18*, 443-444.

Yam, T. S., Saroj, S. and Hamilton-Miller, J. M. T. 1997. Microbiology activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camella sinensis*), and of tea components. FEMS Microbiology Letters, 152, 169-174.

Yamamoto, T. J. and Chu, D. C. K. M. 1997. Chemistry and Application of Green Tea. Berlin Boca Raton: Springeer CRC Press.

Yang, J. and Chou, C. 1997. Antimicrobial activity of various solvent extracts of betel quid ingredients. Chemistry Abstracts. 128:8407bb.

Yanishlieva-Maslarova. 2001. Source of natural antioxidants vegetables, fruits, herbs, spices and tea. In: Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordan, M., Eds. Antioxidants in food: Practical application. Boca Raton, CRC Press, pp. 210-263.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zainol, M. K., Add-Hamid, S. and Yusof, R. M. 2003. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* Urban. Food Chemistry. 81:575-581.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้