

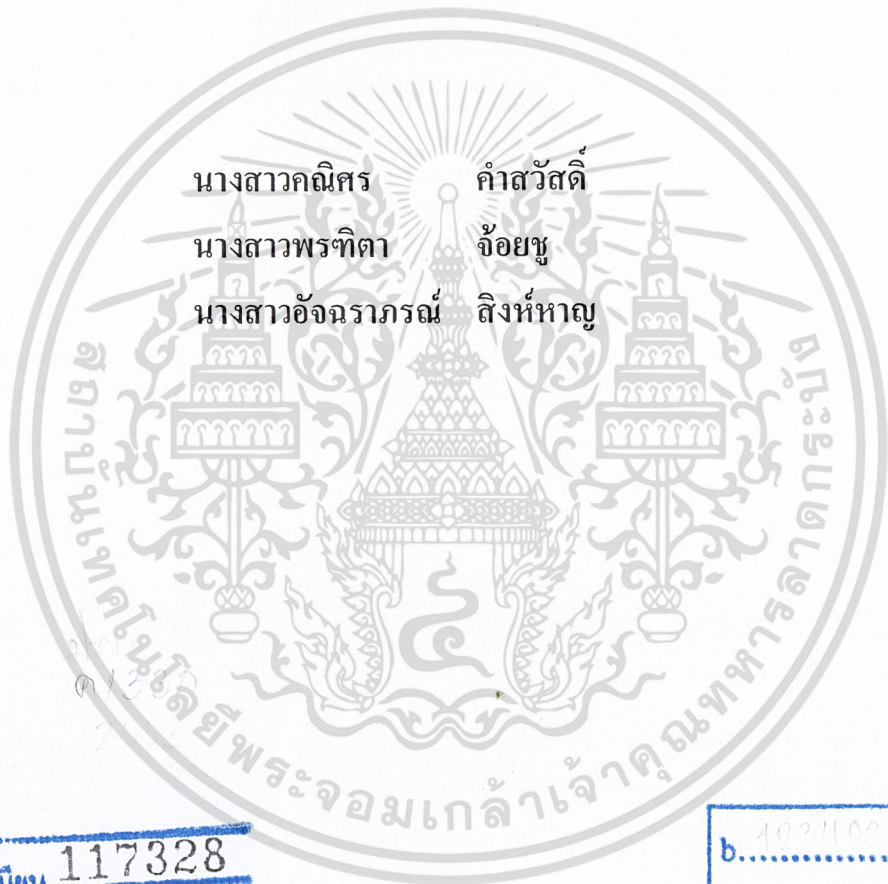
**สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง**

การศึกษาดูวิธีทางชีวภาพจากสารสกัดสาบเสือ

Bioactivity tests of crude extract from *Eupatorium odoratum*



T117328



นางสาวกนิศร คำสวัสดิ์  
นางสาวพรทิศา จ้อยชู  
นางสาวอัจฉราภรณ์ สิงห์หาญ

เลขที่ 117328  
เลขทะเบียน  
ในเดือนปี 20 ก.ค. 2554

102110218  
b.....  
i.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานปีการศึกษา 2553 นั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**BIOACTIVITY TESTS OF CRUDE EXTRACT FROM**

*Eupatorium odoratum*



**MISS KANISORN KHAMSAWAT**

**MISS PORNTHITA JOYCHOO**

**MISS AUJSHARAPRON SINGHAN**

**A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE**

**IN BIOTECHNOLOGY PROGRAM**

**FACULTY OF SCIENCE**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ **ACADEMIC YEAR 2010** อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดสาบเสือ  
 ชื่อนักศึกษา นางสาวคณิศร คำสวัสดิ์  
 นางสาวพรทิตา จ้อยชู  
 นางสาวอัจฉราภรณ์ สิงห์หาญ  
 ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต  
 สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ  
 อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้  
 โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา  
 เทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.สุขใจ ชูจันทร์	
ผศ. ถิ่นจง สุขคำกู	
ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล	

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

ประธานสาขาชีววิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์ อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดสาบเสือ	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวคณิศร	คำสวัสดิ์
	นางสาวพรจิตา	จ้อยชู
	นางสาวอัจฉราภรณ์	สิงห์หาญ
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.สุทธิจิต	ศรีวัชรกุล

### บทคัดย่อ

จากการวิจัยฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากสาบเสือ (*Eupatorium odoratum*) โดยการนำส่วนใบมาสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และไดคลอโรมีเทนจะได้สารสกัดหยาบ จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 4 ประการ ผลจากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้วิธี disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบทั้งเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และไดคลอโรมีเทนจากสาบเสือที่ได้จากจังหวัดอุบลราชธานี มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* และ *Bacillus subtilis* ได้ดีกว่าสารสกัดที่ได้จาก จังหวัดขอนแก่น ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* นั้น สารสกัดจากทั้ง 2 แหล่งไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ที่ความเข้มข้นสูงสุด 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picryl-hyrazyl (DPPH) radical scavenging พบว่า สารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดจากเอทานอลนั้นมีค่า  $IC_{50}$  (การดักจับอนุมูลอิสระ 50 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าสารสกัดจากไดคลอโรมีเทนคือ 1.88 และ 2.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเมื่อดูค่าร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระ มีค่าเท่ากับ 71.56 และ 54.19 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด มีค่าเทียบเท่า 0.041 และ 0.30 มิลลิกรัมของแกลกติกต่อกรัมสารสกัด ในส่วนของการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และการมีชีวิตของเซลล์ โดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ได้ผลว่าสารสกัดจากสาบเสือที่สกัดจากเอทานอลที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าสารสกัดจากไดคลอโรมีเทน โดยค่าความเป็นพิษเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้น แต่จะแปรผกผันกับค่าการมีชีวิตของเซลล์

**คำสำคัญ:** สาบเสือ ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

**ความเป็นพิษต่อเซลล์ และการมีชีวิตของเซลล์**

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	Bioactivity tests of crude extract <i>Eupatorium odoratum</i>	
<b>Student</b>	Miss Kanisorn	Khamsawat
	Miss Pornthita	Joychoo
	Miss Aujsharapron	Singhan
<b>Major Program</b>	Biotechnology	
<b>Academic Year</b>	2010	
<b>Seminar Advisor</b>	Dr. Suttijit	Sriwacharakul

### ABSTRACT

Screening for bioactivities of *Eupatorium odoratum* leaves from 2 provinces ; Ubonratchatani and Khon Kaen, extracted with dichloromethane and 95% ethanol. The Ubonratchatani crude extract inhibit the growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus subtilis* better than Kon Kaen crude extract at concentration 50 mg/ml were carried out by disc diffusion method. But both of crude extracts could not inhibit the growth of *Pseudomonas aeruginosa* at the highest concentration 100 mg/ml. The result from DPPH free radical scavenging assay showed that IC<sub>50</sub> (Inhibition Concentration at 50%) of ethanolic extract (1.88 mg/ml) was better than dicloromethane extract (2.89 mg/ml) and percentage of scavenging was 71.56 and 54.19, respectively. To measure total phenolic contents by Folin-Ciocalteau reagent found that ethanolic and dicloromethane extracts contained 0.041 and 0.030 GAE, respectively. The results of MTT cytotoxicity test against MCF-7, ethanolic extract more toxic than dicloromethane extract at 1000 mg/ml and toxicity varied on concentration of the extracts.

**Key words:** *Eupatorium odoratum*, antimicrobial, antioxidant, and cytotoxicity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากท่านอาจารย์ ซึ่งผู้จัดทำโครงการพิเศษขอกราบขอบพระคุณ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่กรุณาให้คำแนะนำช่วยเหลือ ชี้แนะและปรับปรุงแก้ไข ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งตลอดมา

ผู้จัดทำโครงการพิเศษขอขอบพระคุณ รศ.สุขใจ ชูจันทร์ และ ผศ. ถินจง สุขคำภู กรรมการสอบโครงการพิเศษ ที่ให้ทั้งคำแนะนำ ตรวจสอบ ชี้แนะในการแก้ไขโครงการพิเศษให้มีความเรียบร้อย และสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น อีกทั้ง บิดา มารดา รวมถึงเพื่อนๆ ทุกคนที่เป็นกำลังใจ และการสนับสนุนช่วยเหลือมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. วิชัย เชิดชูวิศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ ตลอดให้ความช่วยเหลือ และช่วยชี้แนะ

ขอขอบพระคุณ คุณสุชานุช อ่อนดี หัวหน้างานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) มาใช้ในโครงการพิเศษครั้งนี้

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงการพิเศษฉบับนี้จะมีประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจหรือผู้ที่ต้องการค้นคว้า และศึกษางานวิจัยทางด้านนี้ไม่มากนัก

นางสาวกณิศร	คำสวัสดิ์
นางสาวพรทิตา	จ้อยชู
นางสาวอัจฉราภรณ์	สิงห์หาญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูปภาพ	VIII
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ขั้นตอนการทำงาน	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ</b>	<b>3</b>
2.1 สาบเสื่อ ( <i>Eupatorium odoratum</i> Linn.)	3
2.2 ความหมายของอนุมูลอิสระ (Free radical)	4
2.2.1 ปฏิกริยาการเกิดอนุมูลอิสระ	4
2.2.2 อนุมูลอิสระกับการเกิดโรค	5
2.2.3 การป้องกันอันตรายและความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ	6
2.3 ความหมายของสารต้านอนุมูลอิสระ	6
2.4 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)	7
2.4.1 ฟลาโวนอยด์ (ไบโอฟลาโวนอยด์)	8
2.4.2 การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH (DPPH radical scavenging assay)	8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

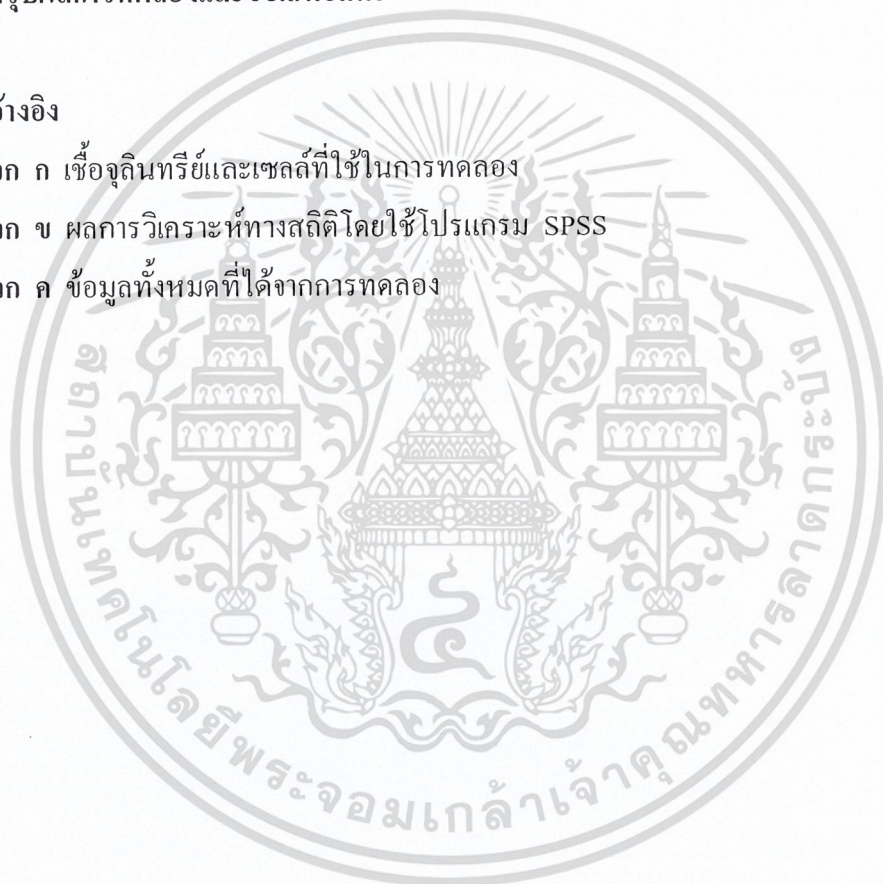
# สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5 การศึกษาการสกัดจากพืช	9
2.5.1 การเลือกใช้ตัวทำละลาย	9
2.5.2 คุณสมบัติของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	10
2.5.3 การทำสารสกัดให้เข้มข้น (concentration)	10
2.6 กลไกการออกฤทธิ์ของสารพฤษเคมีต่อคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์	12
2.7 การศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยวิธี disc diffusion	14
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวกับการศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของใบสาบเสือ	15
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานโครงการพิเศษ</b>	17
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	17
3.2 พืชที่ใช้ในการทดสอบ	17
3.3 สารเคมี	17
3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์	17
3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ	18
3.6 วิธีดำเนินการทดลอง	18
3.6.1 กระบวนการสกัดสารจากสาบเสือ	18
3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์	18
3.6.3 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH	19
3.6.4 การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยวิธี MTT	20
3.6.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบจากพืช	21
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล</b>	22
4.1 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพสารสกัดจากพืช	22
4.1.1 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบจากพืช	22
4.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ	28
4.1.2.1 การตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของ	28
สารสกัดหยาบจากพืชโดยวิธี DPPH radical Scavenging	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.2.2 การวิเคราะห์หาสารฟีนอลิกทั้งหมด ที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบจากสาบเสือ	30
4.1.2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ของสารสกัดหยาบจากสาบเสือโดยใช้วิธี MTT	31
<b>บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ</b>	34
<b>เอกสารอ้างอิง</b>	36
ภาคผนวก ก เชื้อจุลินทรีย์และเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง	40
ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS	45
ภาคผนวก ค ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการทดลอง	58



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
2.1	แสดงความสามารถในการละลายของสารพฤษเคมีในตัวทำละลายชนิดต่างๆ	10
2.2	แสดงสารประกอบเคมีสำคัญที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์	13
4.1	แสดงค่าเฉลี่ยบริเวณที่สารสกัดหยาบของสาบเสือจากไคคลอโรมีเทน มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อแบคทีเรีย จากจังหวัด อุบลราชธานี	22
4.2	แสดงค่าเฉลี่ยบริเวณที่สารสกัดหยาบของสาบเสือจากเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อแบคทีเรีย จากจังหวัด อุบลราชธานี	23
4.3	แสดงค่าเฉลี่ยบริเวณที่สารสกัดหยาบของสาบเสือจากไคคลอโรมีเทน มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อแบคทีเรีย จากจังหวัด ขอนแก่น	24
4.4	แสดงค่าเฉลี่ยบริเวณที่สารสกัดหยาบของสาบเสือจากเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อแบคทีเรีย จากจังหวัด ขอนแก่น	25
4.5	แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH reduction	29
4.6	ค่า $IC_{50}$ ของสารสกัดหยาบจากสาบเสือ	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะทั่วไปของต้นสาบเสือ	3
2.2 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคอิสระไปเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุภาคอิสระ	9
2.3 เครื่อง Rotary evaporator	11
2.4 ลักษณะการวางแผนทดสอบ (disc) ของยาปฏิชีวนะในการทำ disc diffusion	14
4.1 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากสาบเสือที่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	26
4.2 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากสาบเสือที่มีผลในการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> ใช้ยาปฏิชีวนะ streptomycin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	27
4.3 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากสาบเสือที่มีผลในการยับยั้งเชื้อ <i>B. Subtilis</i> ใช้ยาปฏิชีวนะ streptomycin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	27
4.4 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากสาบเสือที่มีผลในการยับยั้งเชื้อ <i>M. Luteus</i> ใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	27
4.5 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากสาบเสือที่มีผลในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	28
4.6 กราฟแสดงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาบเสือ	29
4.7 กราฟแสดงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี ( $\alpha$ -tocopherol) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระบริสุทธิ์ที่ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control)	30
4.8 กราฟแสดงมาตรฐานของ Gallic acid	31
4.9 กราฟแสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (MCF-7) โดยใช้สารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และไดคลอโรมีเทนมาทดสอบ	32
4.10 กราฟแสดงค่าความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7)	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันมนุษย์หันมาใส่ใจในเรื่องสุขภาพมากขึ้น สุขภาพที่แข็งแรงสมบูรณ์เป็นสิ่งที่คนเราต้องการให้เกิดขึ้นในชีวิต ในปัจจุบันสภาพแวดล้อมที่มีแต่มลภาวะ ก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพร่างกาย เช่น ควันบุหรี ควันพิษจากท่อ ไอเสีย ทำให้เกิดการสะสมของอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคหัวใจ โรคความจำเสื่อม โรคหลอดเลือดตีบ และโรคมะเร็ง และยังรวมถึงโรคมะเร็ง จึงมีการสนใจนำเอาสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ โดยเฉพาะสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ สามารถป้องกันร่างกายจากความเสียหายที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะ โรคมะเร็งและโรคหัวใจ ทั้งยังพบว่าไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อร่างกายมนุษย์ ลดความเสี่ยงโรคร้ายที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของคนไทยมากที่สุดในปัจจุบัน จึงเป็นที่สนใจต่อการนำเอาสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติมาใช้ประโยชน์มากขึ้น

สาบเสือมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Eupatorium odoratum* หรือ *Chromolaena odorata* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Asteraceae จัดเป็นวัชพืชที่เจริญเติบโตเร็ว และมีฤทธิ์ยับยั้งการงอกหรือการเติบโตของพืชผลทางการเกษตร ถึงแม้จะมีผลในทางลบแต่สาบเสือยังมีผลในทางการแพทย์พบว่าสามารถต่อต้านช่วยห้ามเลือด (astringent) ป้องกันการติดเชื้อ (hepatotropic) ช่วยขับปัสสาวะ (diuretic) ลดความดันเลือด (antihypertensive) และยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) ซึ่งเป็นคุณสมบัติพิเศษของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในพืช (Metwally และ Ekejuba, 1981)

จากคุณสมบัติของสาบเสื่อดังที่ได้กล่าวมาประกอบกับในประเทศไทยสามารถพบสาบเสือได้ทั่วไป จึงได้ให้ความสนใจศึกษาการสกัดสารจากสาบเสือเพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านการเกิดอนุมูลอิสระและความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อเป็นแนวทางในการนำสารสกัดจากสาบเสือไปประยุกต์ใช้ได้

### 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ของสารสกัดจากสาบเสือ
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) จากสารสกัดสาบเสือ
3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารสกัดจากสาบเสือ
4. เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดจากสาบเสือที่เก็บได้จาก 2 แหล่งที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสาบเสือในการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้สารสกัดจากสาบเสือมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย คือ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* และ *Pseudomonas aeruginosa* นอกจากนี้ยังศึกษาฤทธิ์ในการสร้างสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยวิธี MTT cytotoxicity

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบถึงฤทธิ์การต่อต้านการเกิดอนุมูลอิสระของสารสกัดสาบเสือ
- 1.4.2 สามารถทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสาบเสือ
- 1.4.3 สามารถทดสอบความเป็นพิษ และทราบถึงค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากสาบเสือ
- 1.4.4 ทราบถึงความแตกต่างของฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสาบเสือที่ได้จาก 2 แหล่ง

### 1.5 ขั้นตอนการทำงาน

นำใบของสาบเสือมาสกัดด้วยไคลคลอโรมีเทน และเอทานอล 95% เพื่อนำเอาสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเบื้องต้นกับเชื้อแบคทีเรีย คือ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* และ *Pseudomonas aeruginosa* นำเชื้อที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้โดยใช้วิธี agar disc diffusion จากนั้นทำการศึกษาถึงการต้านอนุมูลอิสระที่มีในสารสกัดจากใบสาบเสือโดยวิธี DPPH Scavenging และหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu's reagent โดยใช้เครื่อง Microplate Reader และทำการศึกษาถึงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของสารสกัดหยาบ โดยวิธี MTT cytotoxicity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและหลักการ

#### 2.1 สาบเสือ (*Eupatorium odoratum* Linn.)

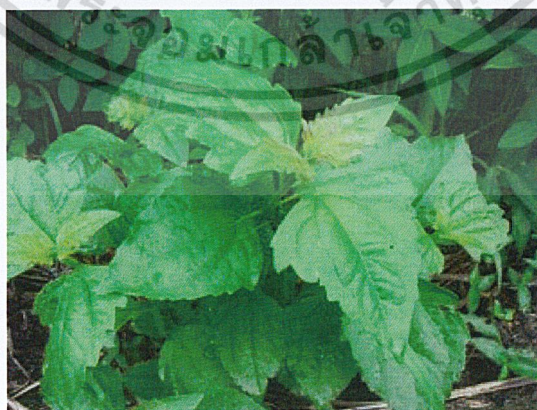
ชื่อทางวิทยาศาสตร์ : *Eupatorium odoratum* Linn. หรือ *Chromolaenaodorata*

วงศ์ : Asteraceae

ชื่อภาษาอังกฤษ : Siam weed

ถิ่นกำเนิด : อยู่ในอเมริกากลางมีเขตการแพร่กระจายตั้งแต่ทางตอนใต้ของฟลอริดาจนถึงพื้นที่ตอนเหนือของอาร์เจนตินาพบทั่วไปในเขตร้อนของโลกทุกทวีปขึ้นทั่วไปทั้งในสภาพดินชื้นหรือ แห้งแพร่กระจายในแหล่งปลูกพืชยืนต้นและที่รกร้าง ว่างเปล่าและตามที่มีแสงแดดมาก ๆ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : สาบเสือ เป็น ไม้ล้มลุก แตกกิ่งก้านสาขามากมายจนดูเป็นทรงพุ่ม ลำต้นและกิ่งก้านปกคลุม ด้วยขนอ่อนนุ่ม ก้านและใบเมื่อขยี้จะมีกลิ่นแรงคล้ายสาบเสือ สาบเสือชื่อสามัญว่า Siam weed มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Eupatorium odoratum* Linn. หรือ *Chromolaenaodorata* ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ลำต้น สูง 1-2 เมตร ใบเดี่ยวออกจากลำต้น ที่ข้อ แบบตรงกันข้ามรูปรีค่อนข้างเป็นสามเหลี่ยมขอบใบ หยัก ปลายใบแหลม ฐานใบกว้างเรียวสอบเข้าหากันมี สีเขียวอ่อน เส้นใบเห็นชัดเจน 3 เส้น มีขนปกคลุมผิวใบทั้งสองด้าน ดอกเป็นช่อสีขาวหรือฟ้าอมม่วง ดอกย่อย 10-35 ดอกดอกวงนอกบานก่อน กลีบดอกหลอมรวมกันเป็นหลอด ผลขนาดเล็ก รูปร่างเป็นห้าเหลี่ยมสีน้ำตาลหรือดำ มีหนามแข็งบนเส้นของผล ส่วนปลายผลมีขนสีขาวช่วยพวยงให้ผลและเมล็ดปลิวตามลม (ที่มา:<http://th.wikipedia.org/wiki/สาบเสือ>) / 8 กรกฎาคม 2553



รูปที่ 2.1 ลักษณะทั่วไปของต้นสาบเสือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
(ที่มา : <http://gotoknow.org/file/manowwan/view/343466>) / 8 กรกฎาคม 2553  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เก้าอี้ เฟอร์นิเจอร์ แล้วป้องกันเชื้อรามากေးได้ มีสารที่ออกฤทธิ์ที่ผนังเส้นเลือดทำให้เส้นเลือดหดตัวช่วยกระตุ้นสารที่ทำให้เลือดแข็งตัวได้เร็วขึ้น (ที่มา: <http://gotoknow.org/blog/herbland/115609>)

/ 8 กรกฎาคม 2553

## 2.2 ความหมายของอนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด (outer orbital) เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (unpaired electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุลทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อกันไปเรื่อยๆ (Halliwell, 1999) โดยที่อนุมูลอิสระก็มีสมบัติเหมือนสารต่างๆ ไป ตรงที่ความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง (pH) และความชื้น เป็นต้น

อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล R แทนอะตอมหรือโมเลกุลของอนุมูลอิสระที่ไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นประจุบวก ( $R^+$ ) เช่น อนุมูล pyridinyl ( $NAD^+$ ) และประจุลบ ( $R^-$ ) เช่น อนุมูล superoxide ( $O_2^-$ ) หรือเป็นกลางเช่น อนุมูล peroxy ( $ROO^{\cdot}$ ) หรืออนุมูล thyl ( $RS^{\cdot}$ ) เป็นต้น ซึ่งจากคำจำกัดความนี้ส่งผลให้อะตอมของธาตุและสารละลายหลายชนิดถูกจัดเป็นอนุมูลอิสระด้วย เช่น คลอรีนอะตอม ( $Cl^{\cdot}$ ) และซิลเวอร์อะตอม ( $Ag^{\cdot}$ ) เป็นต้น

อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ Hydroxyl radical ( $HO^{\cdot}$ ) Superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) เป็นต้น อนุมูลเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก

### 2.2.1 ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจัดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Free radical chain reaction)

ซึ่งมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

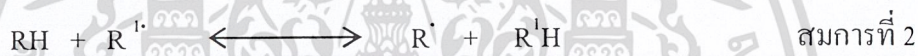
### 2.2.1.1 Initiation step

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ มักเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสลายพันธะด้วยน้ำ (Hydrolysis) แสง (Photolysis) รังสี (Radiolysis) หรือปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox reaction) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อื่นๆ อีกหลายชนิดที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์รวมถึงโมเลกุลที่มีความไวสูงในการทำปฏิกิริยาเช่น nitric oxide (NO) และ singlet oxygen ( $^1O_2$ ) ซึ่งหมายถึงออกซิเจนในสถานะที่ถูกกระตุ้น (Excited state) สิ่งเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดขึ้นตอนอินิทิเอชันของปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ ดังเช่นสมการที่ 1



### 2.2.1.2 Propagation step

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในขั้นตอนอินิทิเอชันจะดำเนินปฏิกิริยาต่อไปในขั้นตอนพวพาเกชัน โดยเกิดปฏิกิริยาขึ้น 2 ทาง คือ โดยการดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลข้างเคียงหรือโดยการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนที่อยู่ในสถานะ ground state ทำให้ได้อนุมูลอิสระตัวใหม่ ดังสมการที่ 2 ถึงสมการที่ 4



### 2.2.1.3 Termination step

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น 2 อนุมูลมารวมกันได้เป็นสารที่มีความเสถียร จึงเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 5 และ 6



อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องต่างๆ ในทางชีววิทยาที่สามารถเป็นตัวตั้งต้นที่ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระได้อีกหลายชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) สารบางชนิดสามารถจัดอยู่ได้ 2 กลุ่ม เช่น เปอร์ออกซีไนไตรท์ (Peroxyxynitrite) (โอภา, 2549)

## 2.2.2 อนุมูลอิสระกับการเกิดโรค

เนื่องจากอนุมูลอิสระมีอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่อยู่ในโมเลกุล จึงมีความไวสูง

ในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย ทำลายสมดุลของระบบต่างๆ ในร่างกาย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต โดยการทำลายองค์ประกอบหลักของเซลล์ เช่น ทำลายหน้าที่ของเซลล์เมมเบรนอันนำไปสู่

การตายของเซลล์ ทำลายดีเอ็นเอ โดยไปจับกับหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาลดีออกซีไรโบส อนุมูลอิสระยังสามารถแตกพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นสาเหตุของการเกิดการกลายพันธุ์และการเกิดมะเร็ง นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดสภาวะทางพยาธิสภาพในโรคสำคัญบางโรค ได้แก่ โรคหัวใจ ไขมันอุดตันในเส้นเลือด ไขข้ออักเสบ ต้อกระจก เป็นต้น อนุมูลอิสระมีที่มาจากทั้งแหล่งภายนอกในร่างกาย ได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ไนโตรสออกไซด์ ในโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น คาร์บอนหรือ อาหารที่มีกรดไขมันอิ่มตัวหรือธาตุเหล็กมากกว่าปกติ แสงแดด ความร้อนรังสีแกมมา ยาบางชนิด เป็นต้น และแหล่งภายในร่างกาย ได้แก่ ออกซิเจน เป็นต้น (Surveswan และCai, 2006)

### 2.2.3 การป้องกันอันตรายและความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

โดยธรรมชาติแล้วจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์และร่างกายหลายชนิด มีทั้งที่เป็นประโยชน์และให้โทษอันประกอบด้วย อนุมูลอิสระที่หลุดรอดออกมาจากการเผาผลาญ ออกซิเจนเป็นพลังงาน อนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณต่อเซลล์ และอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์หรืออวัยวะ ในกรณีหลังจะมีประโยชน์แต่ออกฤทธิ์ในปริมาณที่ต่ำมากไม่เกิดอันตรายต่อเซลล์ เซลล์และร่างกายจะเป็นอันตรายและเสียหาย หากมีอนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินไปเกินสมดุล ดังนั้นเซลล์และร่างกายจึงมีกลไกเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย กลไกสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระมีกลไกหลักอยู่สามกลไก ทำหน้าที่ลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของอนุมูลต่อเซลล์ ในสภาวะปกติกลไกเหล่านี้ถือว่าเป็นเพียงพอต่อการรักษาปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลได้ กล่าวคือสามารถควบคุมได้แม้ว่าจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามหากเกิดภาวะผิดปกติที่ทำให้กลไกการป้องกันเหล่านี้บกพร่องไม่สามารถที่จะควบคุมภาวะสมดุลได้ จะนำไปสู่การเกิดภาวะที่อนุมูล และสารออกซิแดนท์ที่มีมากเกินไปเกินสมดุล (Oxidative stress) และเกิดโรคต่างๆขึ้นในร่างกายได้ (Surveswan และ Cai, 2006)

## 2.3 ความหมายของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารที่มีหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในที่นี้รวมถึงสารที่สามารถยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติและได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ มีดังนี้

### 2.3.1 วิตามินอี (Tocopherol) เป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมันเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญ

โดยวิตามินอีทำงานร่วมกับสารต้านออกซิเดชันตัวอื่นๆ เช่น วิตามินซีและซัลโฟนิเอมเป็นต้น วิตามินอีช่วยปรับให้ร่างกายสามารถนำเอาวิตามินเอมาใช้ซึ่งจะช่วยในการป้องกันสารที่เป็นพิษที่มี

ผลมาจากโลหะเช่น ตะกั่ว ในธรรมชาติมีวิตามินอีอยู่หลายชนิดแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือโท โทฟีรอลและโทโทอินอลแต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อยๆ อีก 4 ชนิด ได้แก่ อัลฟา ( $\alpha$ -) เบต้า ( $\beta$ -) แกมมา ( $\gamma$ -) และเดลต้า ( $\delta$ -)

**2.3.2 วิตามินเอ** ในธรรมชาติวิตามินเอจะพบเฉพาะในสัตว์เท่านั้น แต่ในพืชจะมีสารประกอบแคโรทีนอยด์ที่สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ จัดเป็น Precursor ของวิตามินเอ เรียกว่าโปรวิตามินเอมักพบในพืชผักใบเขียว ผักและผลไม้ที่มีสีเหลือง หรือสีส้มแดง

**2.3.3 วิตามินซี** มีชื่อทางเคมีว่า กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เป็นวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ จะสลายตัวเมื่อถูกความร้อนหรือทิ้งไว้ในอากาศที่มีความชื้น วิตามินซีมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูล hydroxyl และอนุมูล peroxy

**2.3.4 ซิลิเนียม ทองแดง และสังกะสี** เป็นสารต้านออกซิเดชันทางอ้อม เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน มีการศึกษาวิจัยที่แสดงว่าการใช้ซิลิเนียม และวิตามินอีร่วมกันช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งบางชนิด ซึ่งพบได้ในอาหารตามธรรมชาติ เนื่องจากสารต้านออกซิเดชันมีหน้าที่หลายอย่าง เช่น ทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) เป็นตัวจับไล่ออนุมูลอิสระจับกับไอออนโลหะที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ด้วยหน้าที่ต่างๆเหล่านี้ จึงทำให้มีผลต่อการชะลอหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ และทำให้เป็นสารที่มีความเสถียรหรือเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกต่อไป หรือเป็นสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radical product)

## 2.4 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่มีลักษณะเป็นวงแหวนมีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น สามารถละลายน้ำได้ ที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycosides) และพบได้ในส่วนของช่องว่างภายในเซลล์ (cell vacuole) สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบพวก ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) นอกจากนั้นยังมีสารประกอบต่างๆ เช่น simple monocyclic phenol, phenyl propanoid, phenolic quinine และ polyphenolic ซึ่งได้แก่พวก lignin, tannin เป็นต้น รวมทั้งยังพบว่ามีการประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีนอัลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น (รัตนนา, 2547)

พบว่าสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และ แทนนิน เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นตัวจับไล่ออนุมูลอิสระที่สำคัญคืออนุมูล peroxy โดยมีกลไก 2 แบบคือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับ

สารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีนอลิกจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเกิดชั้นตอนพลอพาเกินได้ นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็นสารคีเลต ดักจับไอออนของโลหะเข้าไปในโมเลกุล เช่น เควอร์ซีทิน (quercetin)

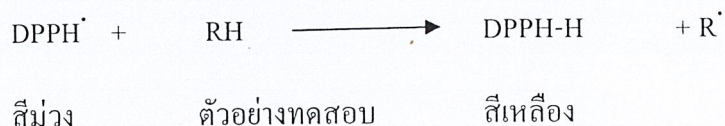
สารประกอบฟีนอลิกยังทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอกทีฟ ด้วยหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชัน ที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป (Rice-Evans และคณะ, 1997)

#### 2.4.1 ฟลาโวนอยด์ (ไบโอฟลาโวนอยด์)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากชนิดหนึ่งจะพบมากในพืชผักและผลไม้ที่มีหน้าสีสองอย่าง คือเป็นรงควัตถุทำหน้าที่กรองแสงที่มีความยาวคลื่นที่จำเพาะเจาะจง และทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยไปกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์พืชออกไป ความสามารถในการต้านออกซิเดชันขึ้นอยู่กับโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ และคุณสมบัติของฟลาโวนอยด์ยังสามารถช่วยลดการอักเสบช่วยให้หลอดเลือดแข็งตัวทำให้การไหลเวียนเลือดดีขึ้นต่อต้านแบคทีเรียและไวรัสลดโคเลสเตอรอล และช่วยเสริมการทำงานของวิตามินซีพบได้ในพืชหลายชนิด เช่น ส้ม พริกไทย และพวกเบอร์รี่ต่างๆ เป็นต้น (รัตนา, 2547)

#### 2.4.2 การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH (DPPH radical scavenging assay)

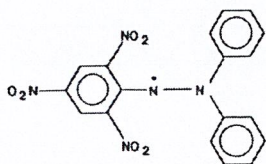
อนุมูล DPPH เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง อยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนกับกรณีอนุมูล ABTS การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม การวัดทำได้โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) วัดการลดลงของสี เมื่อเติมสารต้านออกซิเดชันลงไป โดยวัดการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร DPPH radical ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง (scavenging activity) สารละลายของ DPPH มีสีม่วงในเอทานอล และเมื่อได้รับ H จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลือง ตามสมการดังนี้ (Blois และ M.S., 1958)



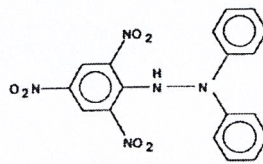
ค่าที่วัดได้จะแสดงความสามารถในการสารต้านออกซิเดชันออกมาในค่า %Inhibition ตามสมการดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\% \text{Inhibition} = [(A_{517} \text{ control} - A_{517} \text{ test sample}) / A_{517} \text{ control}] \times 100$$



1: Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)



2: Diphenylpicrylhydrazine (nonradical)

รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคอิสระไปเป็น โมเลกุลที่ไม่เป็นอนุภาคอิสระ

(ที่มา : <http://pirun.ku.ac.th/~b4755242/7.html>) /8 กรกฎาคม 2553

ข้อดีของวิธีนี้คือ ทำได้ง่าย นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสาร  
ต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

ข้อเสียของวิธีนี้คือ อนุมูล DPPH มีความคงตัวไม่ไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิด  
ในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้

## 2.5 การศึกษาการสกัดจากพืช

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปการสกัดสารสกัดเบื้องต้นไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีใดหรือใช้ตัวทำละลายใด จะได้องค์ประกอบเป็นของผสมหรือสารสกัดหยาบ (crude extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดออกมาจากสมุนไพร โดยใช้น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลาย (solvent) สารสกัดอย่างหยาบนี้เป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรซึ่งมีทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacologically active constituents) ซึ่งมักเรียกว่า สารสำคัญ (active constituents) และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacologically inactive constituents) ซึ่งเรียกว่า สารเฉื่อย (inert substances) ชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบในสารสกัดจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพสมุนไพรที่ใช้และที่ใช้ในการสกัด วัตถุประสงค์ของสารสกัดพืชสมุนไพร คือ

1. เพื่อสกัดแยกสารสำคัญออกจากสมุนไพร
2. เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นของสารสำคัญ
3. เพื่อลดขนาด (dose) ของการใช้สมุนไพรลงให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม

### 2.5.1 การเลือกใช้ตัวทำละลาย

การแยกสารพฤกษเคมีมักใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่างๆ กัน ไม่ว่าจะเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำจนถึงตัวทำละลายที่มีขั้วสูง หรือบางทีอาจสกัดเฉพาะสารพฤกษเคมีบางชนิดที่ต้องการ ดังนั้นการเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกพฤกษเคมีจึงควรทราบคุณสมบัติของขั้วที่คล้ายคลึงกันจึงจะมีแรง (force) ที่เกี่ยวข้องในการละลาย ซึ่งได้แสดง

เอกสาร ความสามารถของตัวทำละลายชนิดต่างๆ ในการละลายสารพฤกษเคมีในตารางที่ 2.1 ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงความสามารถในการละลายของสารพฤกษเคมีในตัวทำละลายชนิดต่างๆ

น้ำ	เอทานอล	เมทานอล	คลอโรฟอร์ม	ไดคลอโรเมทานอล	อีเทอร์	อะซิโตน
Anthocyanin	Polyphenols	Anthocyanins	Terpenoids	Terpenoids	Alkaloids	Flavonols
Starches	Polyphenols	Terpenoids	Flavonoids		Terpenoids	
Tanins	Polyacetylenes	Saponins			Coumarins	
Saponins	Flavonols	Tanins			Fatty acid	
Terpenoids	Terpenoids	Xanthoxyllines				
Polypeptides	Sterols	Totarol				
Lectins	Alkaloids	Quassinoids				
	Propolis	Lactones				
		Flavones				
		Phenones				
		Polyphenols				

#### 2.5.2 คุณสมบัติของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

1. มีความสามารถในการละลายสารสำคัญได้มากที่สุด และไม่ละลายองค์ประกอบอื่นๆ หรือละลายองค์ประกอบอื่นๆ ได้น้อย ในการเลือกตัวทำละลายนั้น มีกฎทั่วไปว่า สิ่งที่เหมาะสมย่อมละลายกันและกัน เช่น คุณสมบัติของสารสำคัญมีขี้ ก็ควรเลือกตัวทำละลายหรือน้ำยาสกัดที่มีขี้เช่นเดียวกันในการสกัด

2. มีความคงตัวดีและหาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย

3. ไม่ระเหยง่ายหรือระเหยได้ยากจนเกินไป

4. สภาพของสมุนไพรที่ทำการสกัด เช่น เมล็ด เป็นส่วนที่มีไขมันอยู่มาก ควรจัดไขมันพวกนี้ออกก่อนโดยการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ประเภทไม่มีขี้ เช่น ปีโตรเลียมอีเทอร์ เป็นต้น แล้วจึงนำกากพืชที่เหลือไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

#### 2.5.3 การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentration)

สารสกัดที่ได้จะมีปริมาณมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและมีประสิทธิภาพ จึงเหมาะที่ต้องนำมาทำให้เข้มข้นก่อนด้วยวิธีต่างๆดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.5.3.1 การระเหย (Free evaporatin)** เป็นการนำตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือแผ่นความร้อน (hot plate) วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสารสกัดสลายตัวได้เนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไป และหากใช้สารละลายอินทรีย์ในการสกัด การระเหยโดยให้ความร้อนโดยตรง บนแผ่นความร้อนอาจเกิดอันตรายได้ง่าย

**2.5.3.2 การกลั่นในสถานะสุญญากาศ (Distillation in vacuum)** จัดเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า rotary evaporator ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ 3 ส่วน คือภาชนะบรรจุสารสกัดหยามาที่กลั่น (distillation flask) ส่วนคอนเดนเซอร์หรือตัวควบแน่นไอสารละลาย (condenser) และภาชนะรองรับสารละลายหลังกลั่น (receiving flask) โดยสารสกัดหยาบซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะจะแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้และจะหมุนตลอดเวลาที่ทำงาน เพื่อให้มีการกระจายความร้อนอย่างทั่วถึง ภาชนะบรรจุสารสกัดหยาบนี้จะต่อเข้ากับส่วนควบแน่น ซึ่งมีระบบที่ทำความเย็นอยู่ตลอดเวลา ปลายของส่วนควบแน่นจะมีภาชนะรองรับ โดยทั้งระบบจะต่อเข้ากับระบบสุญญากาศ สารละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุจะควบแน่นที่บริเวณคอนเดนเซอร์และหยดลงมาในภาชนะรองรับ สารละลายหลังกลั่นซึ่งสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำมากลับมาใช้ใหม่ได้

ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 เครื่อง Rotary evaporator

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่มาจาก (ที่มา: <http://www.imlab.com/buchi/fr210215%20english.htm>) / 8 กรกฎาคม ค.ศ. 2553 นี้เป็นการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.5.3.3 การทำให้แห้ง (drying)** เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดจนแห้งได้สารสกัดออกมาในสภาพของแข็งหรือกึ่งของแข็ง มีหลายวิธี เช่นการใช้ความเย็น (lyophilizer หรือ freeze dryer) หรือการใช้ความร้อน (spray dryer)

**2.5.3.4 อุลตราฟิวเทรชัน (ultrafiltration)** เป็นการทำสารสกัดที่อยู่ในรูปของของเหลวให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้การกรองผ่านเมมเบรน (membrane) ที่มีรูขนาดเล็กมากๆ ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5000

## 2.6 กลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษเคมีต่อคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์

### (Mechanism of action or mode of action)

สารประกอบเคมีในพืชนอกเหนือจากคุณสมบัติในการเป็นยารักษาโรคยังสามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์และมีกลไกในการยับยั้งแตกต่างกันไป สารประกอบเคมีในพืชที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์แบ่งเป็นกลุ่มสำคัญๆ ได้แก่ ฟีนอลิก โพลีฟีนอลเทอร์ปีนอยด์ น้ำมันหอมระเหย อัลคาลอยด์ แลคติน และโพลีเปปไทด์ (ตารางที่ 2.2) นอกจากนี้การแบ่งประเภทตามวิธีการออกฤทธิ์ของสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในการทำลายจุลินทรีย์เป็น 2 แบบ ได้แก่ สารที่มีผลในการฆ่าทำลายเชื้อ และสารที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ซึ่งสารดังกล่าวจะมีสมบัติคล้ายสารปฏิชีวนะและมีกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม คือ

#### 1. สารออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (Cell wall synthesis inhibitors)

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยโครงสร้างร่างแหของสารประกอบ peptidoglycan ซึ่งสารดังกล่าวพบเฉพาะที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเท่านั้น โดยสารปฏิชีวนะจะมีผลต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่กำลังอยู่ในสภาวะการแบ่งเซลล์ สารดังกล่าวจะป้องกันการเกิดการเชื่อมต่อ (crosslink) ของ peptidoglycan และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ peptidoglycan synthetase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สร้างพันธะของ peptidoglycan ดังนั้นจึงทำให้โครงสร้างของผนังเซลล์อ่อนแอ และไม่สมบูรณ์ เซลล์จึงถูกย่อยสลายและแตกในที่สุด

#### 2. สารออกฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane inhibitors)

เยื่อหุ้มเซลล์เป็นชั้นที่อยู่ถัดจากชั้นของผนังเซลล์แบคทีเรีย สารปฏิชีวนะจะมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการนำสารเข้าออกของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย เช่น ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารออกจากเซลล์ หรือทำให้คุณสมบัติการป้องกันสารเข้าออกของเยื่อหุ้มเซลล์ (osmotic barrier) เสียไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. สารออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (Protein synthesis inhibitors)

สารปฏิชีวนะมีผลในการยับยั้งการสร้างพันธะเพปไทด์ (peptide bond) ของกรดอะมิโน ทำให้กรดอะมิโนไม่สามารถต่อกันเป็นโพลีเพปไทด์ในการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ได้ หรือทำให้รูปร่างของไรโบโซม (ribosome) เปลี่ยนแปลงทำให้การอ่านรหัสของยีนบน mRNA ไม่ถูกต้องมีผลทำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนที่ผิดปกติ

### 4. สารออกฤทธิ์ต่อกรดนิวคลีอิก (Effect on Nucleic Acids)

สารปฏิชีวนะมีผลในการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ DNA และ RNA หรือยับยั้งการทำงานของ DNA ทำให้ไม่สามารถอ่านข้อมูลทางพันธุกรรมที่ควบคุมการพัฒนาและกิจกรรมเมตาบอลิซึมของเซลล์

### 5. สารออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ (Competitive Inhibitors)

การออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ที่จำเป็นสำหรับจุลินทรีย์ต่อการเจริญและการมีชีวิตของเซลล์ซึ่งสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่มีกลไกการออกฤทธิ์แบบการแย่งจับ (competitive inhibitors) โดยอาศัยสูตร โครงสร้างที่คล้ายกันในการแทนที่สารเริ่มต้นที่ใช้สังเคราะห์สารเมตาบอไลต์

ตารางที่ 2.2 แสดงสารประกอบเคมีสำคัญที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

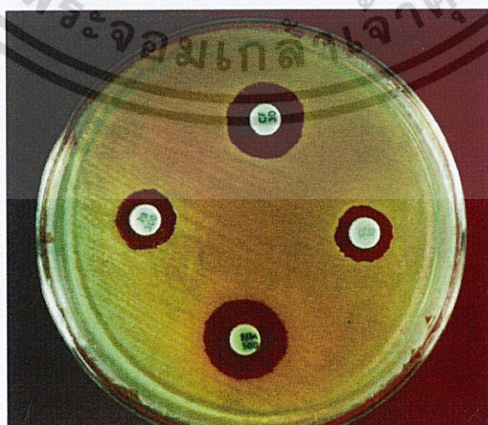
สารประกอบเคมี	ตัวอย่าง	กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์
Phenolic	Simple phenols Cathechol Phenolic acids	Substrate deprivation Membrane Dissuption
Quinones	Hypericin	Bind to adhesions , complex with cell wall , inactivate enzyme
Flavonoids	Chrysin	Bind to adhesions , Complex with cell wall
Tanins	Ellagitannin	Bind to proteins Bind to adhesions Enzyme inhibition Substrate deprivation Complex with cell wall Membrane disruption Metalation complex

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7 การศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยวิธี disc diffusion

วิธี Disc diffusion method เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการเนื่องจากเป็นวิธีซึ่งสามารถปฏิบัติได้ง่ายสะดวกและรวดเร็วรวมทั้งสามารถให้ผลที่แน่นอนและถูกต้องการทดสอบวิธีนี้ใช้หลักการแพร่โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เติมลงบนกระดาษกรอง (filter paper disc) ซึ่งวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการตรวจสอบไว้จะแพร่จากจุดเริ่มต้นไปในอาหารเลี้ยงเชื่อนั้น เมื่อระยะทางที่สารแพร่ออกไปเพิ่มขึ้นความเข้มข้นของสารนั้นจะลดลงทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสารณจุดต่างๆกันรอบแผ่นกระดาษกรองในขณะเดียวกันจุลินทรีย์บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารออกฤทธิ์ความเข้มข้นของสารที่จุดใดๆ (ไกลกระดาษกรอง) ก็จะเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นจนเห็นได้ชัด แต่บริเวณใกล้กระดาษกรองซึ่งมีความเข้มข้นของสารมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้จะไม่มีการเจริญของเชื้อให้เห็นจึงเกิดเป็นโซนใส (inhibition zone) ขึ้นอัตราการแพร่ของสารออกฤทธิ์ผ่านไป ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสซึ่งจะบอกถึงความสามารถของสารที่นำมาทดสอบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้มากน้อยเพียงใดผลการยับยั้งจุลินทรีย์วัดได้จากขนาดของโซนใสโดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสจะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ทดสอบ (Minimal Inhibitory Concentration หรือ MCC) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (ที่มา: [http://dusithost.dusit.ac.th/~research/menu/abstra/abstract/full/sci/Amonrat\\_nontabury/ch3.pdf](http://dusithost.dusit.ac.th/~research/menu/abstra/abstract/full/sci/Amonrat_nontabury/ch3.pdf)) / 8 กรกฎาคม 2553

นอกจากจะขึ้นอยู่กับความไวของเชื้อต่อสารแล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของยาปฏิชีวนะ ปริมาณอัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรดต่าง ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ที่มา: <http://www.oknation.net>) / 8 กรกฎาคม 2553



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

รูปที่ 2.4 ลักษณะการวางแผ่นทดสอบ (disc) ของยาปฏิชีวนะในการทำ disc diffusion  
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่โดยศูนย์บริการวิชาการเพื่อการศึกษาเพื่อให้นักศึกษาได้เรียนรู้เกี่ยวกับเรื่องนี้โดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่าย  
 (ที่มา: <http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/Lecture-syllabus.html>) / 8 กรกฎาคม 2553

## 2.8 ตรวจสอบเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.8.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในด้านการต้านเชื้อจุลินทรีย์

2.8.1.1 งานวิจัยเกี่ยวกับการทำแผ่นยาผสมสารสกัดใบสาบเสือที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ห้ามเลือดไหล และป้องกันการติดเชื้อของบาดแผลในคน โดยนำผงใบสาบเสือแห้งมาสกัดด้วยน้ำ หรือเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* พบว่า สารสกัดด้วยน้ำสามารถกระตุ้นการแข็งตัวของเลือดได้ทั้งทาง extrinsic และ intrinsic pathway และมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ สารสกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 100 และ 250 mg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ในลักษณะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดซึ่งสามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zones ได้ 10 และ 14 ตามลำดับ เมื่อนำแผ่นซับแผลและแผ่นไฮโดรเจลที่ผสมสารสกัดด้วยน้ำของใบสาบเสือที่ความเข้มข้น 20 และ 50 mg/ml ตามลำดับ พบว่า แผ่นยาทั้งสองชนิดนี้สามารถลดเวลาการแข็งตัวของเลือดในหลอดทดลองได้ ดังนั้นแผ่นซับแผลและแผ่นไฮโดรเจลที่มีสารสกัดในสาบเสืออาจนำไปพัฒนาในเชิงการค้าเพื่อใช้ในการห้ามเลือดและสมานแผลต่อไป

2.8.1.2 งานวิจัยศึกษาเกี่ยวกับการนำพืช 19 ชนิด ที่มีฤทธิ์ทางการแพทย์ โดยการนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* โดยวิธี disc diffusion และ broth dilution methods ผลที่ได้จากการทำ disc diffusion แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากพืช 13 ชนิดที่มีฤทธิ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. acnes* เช่น ชุมเห็ดเทศ, สาบเสือ, มังคุด และเสลดพังพอน ซึ่งเหล่านี้จะมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี ส่วนวิธีการ broth dilution methods สารสกัดที่ได้จากเปลือกมังคุดจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.039 mg/ml ของการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองชนิด และมีค่า MBC เท่ากับ 0.039 และ 0.156 mg/ml ในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* และ *S. epidermidis* ส่วนสารสกัดที่ได้จากสาบเสือก็พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* โดยใช้การทดลองด้วยวิธี disc diffusion assay โดยที่มีค่า MIC เท่ากับ 0.625 mg/ml และค่า MBC เท่ากับ 1.25 mg/ml (Mullika Traidej Chomnawang และคณะ, 2005)

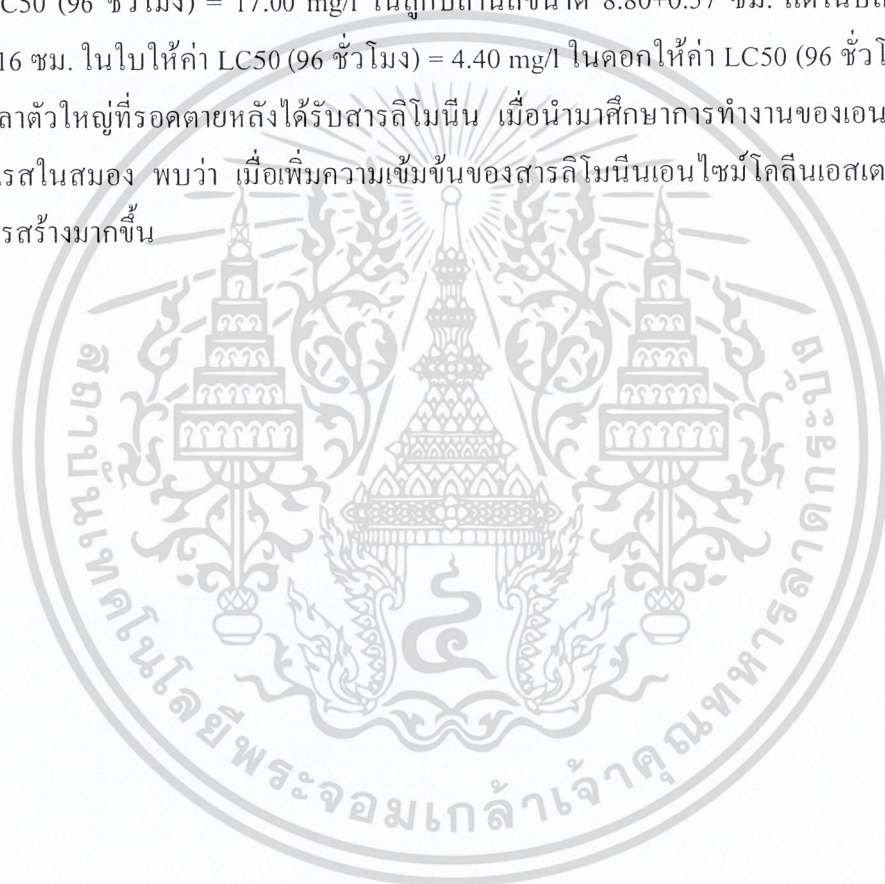
### 2.8.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในด้านการต้านอนุมูลอิสระ

งานวิจัยศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากใบสาบเสือ (ด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม) พบว่าสารสกัด (0.1-5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สัมพันธ์กับปริมาณสารในช่วงร้อยละ 23.48-91.6 เมื่อเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิก (ร้อยละ 3.9 - 94.01) ค่าความเข้มข้นของสารสกัดสาบเสือที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง ( $IC_{50}$ ) ในอนุมูลอิสระ DPPH อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล อนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ และอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 0.31 0.43 0.28 และ 1.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่ค่า  $IC_{50}$  ของกรดแอสคอร์บิกมีค่า

เท่ากับ 0.24 0.4 0.23 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ วัดปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจาก สารสกัดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่ามีค่าเท่ากับ 242.2 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด ซึ่งมีค่า มากกว่าที่พบในสารอ้างอิงมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) แสดงว่าสาบเสือมีศักยภาพมากพอที่จะใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (K.Srinivasa Rao และคณะ ในปี 2010)

### 2.8.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในด้านความเป็นพิษ

งานวิจัยศึกษาสารลิโมนีนในสารสกัดดอกและใบสาบเสือมีความเป็นพิษต่อลูก ปลานิล โดยในดอกให้ค่า LC50 (96 ชั่วโมง) = 7.20 mg/l ในลูกปลานิลขนาด 5.60+0.81 ซม. ในใบ ให้ค่า LC50 (96 ชั่วโมง) = 17.00 mg/l ในลูกปลานิลขนาด 8.80+0.57 ซม. แต่ในปลาขนาดเล็ก 2.32+0.16 ซม. ในใบให้ค่า LC50 (96 ชั่วโมง) = 4.40 mg/l ในดอกให้ค่า LC50 (96 ชั่วโมง) = 2.11 mg/l ปลาตัวใหญ่ที่รอดตายหลังได้รับสารลิโมนีน เมื่อนำมาศึกษาการทำงานของเอนไซม์โคลีน เอสเตอเรสในสมอง พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลิโมนีนเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจะถูก ยับยั้งการสร้างมากขึ้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานโครงการพิเศษ

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 <i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	สาขาชีววิทยา
3.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	สาขาชีววิทยา
3.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12228	สาขาชีววิทยา
3.1.4 <i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	สาขาชีววิทยา
3.1.5 <i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	สาขาชีววิทยา

3.2 พืชที่ใช้ในการทดสอบ

ส่วนใบของสาบเสือ (*Eupatorium odoratum* Linn.) โดยทำการเก็บรวบรวมจาก 2 แหล่ง คือ อำเภอศรีเมืองใหม่ จังหวัดอุบลราชธานี และอำเภอเวียงน้อย จังหวัดขอนแก่น เก็บในเดือน มิถุนายน ปีพ.ศ. 2553

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 ไดคลอโรโรมีเทน
- 3.3.2 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- 3.3.3 เอทานอล 70, 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์
- 3.3.4 Folin-Ciocalteu's reagent
- 3.3.5 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT)
- 3.3.6 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide; DMSO)
- 3.3.7 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride; NaCl)
- 3.3.8 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate; NaCO<sub>3</sub>)
- 3.3.9 NSS (normal salt saline 0.85%)

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.4.1 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (temperature incubator)
- 3.4.2 ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (laminar air flow hood)
- 3.4.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave)
- 3.4.4 เครื่องอบลมร้อน (hot air oven)

3.4.5 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.6 เครื่องระเหยระบบสุญญากาศ (rotary evaporator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของสำนักหอสมุดกลางพระจอมเกล้าลาดกระบัง ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใด

3.4.7 แผ่นทดสอบ (paper disc) Whatman เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

3.4.8 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.4.9 96-well plate

### 3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5.1 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิด Nutrient Broth

3.5.2 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิด Nutrient Agar

3.5.3 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิด Mueller Hinton Agar/ Mueller Hinton Broth

### 3.6 วิธีดำเนินการทดลอง

#### 3.6.1 กระบวนการสกัดสารจากสาบเสือ

นำสาบเสือ 10 กิโลกรัม (น้ำหนักสด) มาทำการแยกส่วนเอาเฉพาะใบ ตากให้แห้งในที่ร่ม แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เพื่อทำการลดความชื้น และหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นนำมาบดให้ละเอียด แล้วทำการชั่งน้ำหนัก 100 กรัม ใส่ลงในพลาสติกขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วเติมไคคลอโรมีเทน ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท หมักไว้ 7 วันในที่มืด นำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง what man เบอร์ 1 ด้วยชุดกรองสุญญากาศ จากนั้นนำสารสกัดส่วนใสที่ผ่านการกรองแล้วไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยนำไปประเหยเอาสารละลายไคคลอโรมีเทนออก โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบของสาบเสือ (ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง) หลังจากนั้นทำการหมักต่อด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท แล้วหมักทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน ในที่มืด นำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ด้วยชุดกรองสุญญากาศ จากนั้นนำสารสกัดส่วนใสที่ผ่านการกรองแล้วไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยนำไปประเหยเอาเอทานอลออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบของสาบเสือ (ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง) จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้เก็บไว้ในขวดแก้วขนาดเล็ก (vial) แล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง

#### 3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Agar disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Agar disc diffusion ในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์และไคคลอโรมีเทน โดยเชื้อที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 โดยมีวิธีการทดสอบ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar นำเชื้อที่ใช้มาผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ (normal salt saline 0.85%)

*Escherichia coli* ATCC 25922 โดยมีวิธีการทดสอบ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar นำเชื้อที่ใช้มาผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ (normal salt saline 0.85%) ปรับให้มีความขุ่นเท่ากับมาตรฐาน McFarland 0.5 ซึ่งมีจำนวนเซลล์ประมาณ  $1 \times 10^8$  CFU/ml โดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารแขวนลอยที่เจือจางไว้และทา (swab) ลงบนผิวหน้าของอาหารแข็งด้วยเทคนิคปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นนำสารสกัดหยาบของพืชที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นทดสอบ (disc) และทิ้งไว้ให้แห้ง แล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบ และนำแผ่นทดสอบควบคุม (control) โดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) โดยใช้ยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) และเจนต้าไมซิน (Gentamicin) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1–2 วัน แล้วทำการตรวจผลโดยดูจากเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญ (clear zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่นำมาทดสอบแต่ละชนิด หลังจากการทดสอบเบื้องต้นแล้ว

### 3.6.3 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH (DPPH reduction scavenging assay)

นำสารสกัดหยาบของสาบเสือโดยซึ่งสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์และไดคัลโครมีเทนมา 0.012 กรัม มาละลายในเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางด้วยเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ให้ได้ความเข้มข้น 7 ระดับ ได้แก่ 12, 6, 3, 2.25, 1.5, 1.125 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของวิตามินอี ( $\alpha$ -tocopherol) มีปริมาณสูงสุด 12 ไมโครโมลาร์ โดยทำการเจือจางด้วยเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ให้ได้ 9 ระดับความเข้มข้น (12, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.1875, 0.09375 และ 0.046875 ไมโครโมลาร์) แล้วนำสารตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงในจานไมโครเพลทขนาด 96 หลุม (96-well plate) และหยดสาร DPPH ปริมาตร 190 ไมโครลิตรตามลงไป โดยจะทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยใช้วิตามินอี ( $\alpha$ -tocopherol) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) และเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) นำผลที่ได้ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงต่อมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง มาเปรียบเทียบกับผลของตัวควบคุมเชิงบวก และนำไปคำนวณหาร้อยละของปฏิกิริยาคักจับอนุมูลอิสระ

การคำนวณร้อยละของปฏิกิริยาคักจับอนุมูลอิสระ (Free radical Scavenging)

สามารถคำนวณได้ตามสมการดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\% \text{ DPPH Reduction} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}} \times 100$$

โดยที่ Blank = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร  
หลังจากการบ่ม

Sample = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่นำมาทำปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 517  
นาโนเมตร หลังจากการบ่ม

สำหรับการพิจารณาค่า  $IC_{50}$  ของสารที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทำได้โดยเขียน  
กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ DPPH reduction ที่  
ได้จากการคำนวณ จากนั้นจะหาค่า  $IC_{50}$  ได้จากการวิเคราะห์กราฟ

### 3.6.4 การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยวิธี MTT

เตรียมเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดลองโดยนำมาดูแลเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และ  
เติม trypsin (GIBCO™) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประมาณ 1 นาที ลงไปเพื่อย่อยเซลล์ออกจากกัน  
หลังจากนั้นดูดเอา trypsin ออก และใส่อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ทำการนับ  
จำนวนเซลล์มีชีวิตโดยใช้ Heamacytometer ทำการย้อมสีเซลล์ด้วย trypan blue โดยจะทำการดูด  
เซลล์มา 0.2 มิลลิลิตร และดูด trypan blue เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ 0.2 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:1) ลง  
ไปในหลอดทดลองผสมให้เข้ากัน หยดเซลล์ที่ผสม trypan blue ลงใน Heamacytometer นับเซลล์  
และคำนวณจำนวนเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากนั้นทำการเจือจางเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยง  
เซลล์ให้ได้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ  $2 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเปิดเซลล์ใส่ลงในแต่ละหลุม  
ของไมโครเพลท ขนาด 96 หลุม (Costar®) 200 ไมโครลิตร เตรียมสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัด  
ด้วยไดคลอโรมีเทนและเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ทำการเจือจางด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO)  
ให้ได้ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 1,000, 100, 10, 1, 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเปิด 10  
ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครเพลทที่มีเซลล์อยู่ ทำการเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่มีการให้ก๊าซ  
คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส  
เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วดูดเอาตัวอย่างและอาหารออก เติมสาร  
3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 10 ไมโครลิตร  
และอาหาร 190 ไมโครลิตรลงไปแทนในแต่ละหลุม บ่มในที่มืด 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดเอาสาร  
MTT และอาหารออก จากนั้นเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เพื่อ  
ละลายผลึกของ Formazan เขย่าเป็นเวลา 5 นาที (ทำการทดลองซ้ำ 6 ครั้ง) นำมาวัดค่าการดูดกลืน  
แสงที่ 540-570 นาโนเมตร โดยใช้เซลล์ที่ไม่ได้ใส่สารสกัดหยาบเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative  
control) นำผลที่ได้ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสง มาเปรียบเทียบกับผลของตัวควบคุมเชิงลบ และนำไป  
หาค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์และค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบจากพืช

เตรียมสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์และไดคลอโรมีเทนให้มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย ใส่สารสกัดหยาบจากสาบเสือลงในหลุมของไมโครเพลทขนาด 96 หลุม (96 well-plate) หลังจากนั้นใส่สารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent 100  $\mu$ l และ 85 % สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 80  $\mu$ l จากนั้นทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ทำการคำนวณหาปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้งสองโดยทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

# ผลการวิจัยและอภิปรายผล

### 4.1 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพสารสกัดจากพืช

#### 4.1.1 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบจากพืช

โดยนำสารสกัดสาบเสื่อมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นกับเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* และ *Bacillus subtilis* ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 4 ชนิด คือ *E. coli*, *S. aureus*, *M. luteus* และ *B. subtilis* ดังแสดงตารางที่ 4.1-4.4

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยบริเวณที่สารสกัดหยาบของสาบเสื่อจากไคคโล โรมีเทน มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย จากจังหวัด อุบลราชธานี

ประเภทของสารสกัด	บริเวณที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)				
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
สารสกัดหยาบ					
Di-1 (6.25 มก./มล.)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Di-2 (12.5 มก./มล.)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Di-3 (25 มก./มล.)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Di-4 (50 มก./มล.)	1.13±0.25 <sup>b</sup>	2.38±0.48 <sup>b</sup>	2.38±0.25 <sup>b</sup>	1.00±0.71 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Di-5 (100 มก./มล.)	1.63±0.25 <sup>a</sup>	3.38±0.63 <sup>a</sup>	3.63±0.48 <sup>a</sup>	1.38±0.48 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
ชุดควบคุม					
ST (10 ไมโครกรัม/มล.)	1.875	3.5	0.00	0.00	0.00
GT (10 ไมโครกรัม/มล.)	0.00	0.00	3.5	3.125	0.00
GT (20 ไมโครกรัม/มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
EiOH 95%	0	0	0	0	0

ST = streptomycin GT= Gentamicin Di = สารสกัดจากไคคโลโรมีเทน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ยบริเวณที่สารสกัดหยาบของสาบเสื่อจากเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย จากจังหวัด อุบลราชธานี

ประเภทของสารสกัด	บริเวณที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)				
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>สารสกัดหยาบ</b>					
Et-1 (6.25 มก./มล.)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Et-2 (12.5 มก./มล.)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Et-3 (25 มก./มล.)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Et-4 (50 มก./มล.)	1.50±0.58 <sup>b</sup>	1.25±0.29 <sup>b</sup>	2.44±0.38 <sup>b</sup>	0.69±0.75 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Et-5 (100 มก./มล.)	1.75±0.29 <sup>a</sup>	1.63±0.25 <sup>a</sup>	3.00±0.00 <sup>a</sup>	1.38±0.32 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
<b>ชุดควบคุม</b>					
ST (10 ไมโครกรัม/มล.)	2.875	2.125	0.00	0.00	0.00
GT (10 ไมโครกรัม/มล.)	0.00	0.00	3.5	3.125	0.00
GT (20 ไมโครกรัม/มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
EtOH 95%	0	0	0	0	0

ST = streptomycin GT= Gentamicin Et = สารสกัดจากเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ยบริเวณที่สารสกัดหยาบของสาบเสื่อจากไคคลอ โรมีเทน มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย จากจังหวัด ขอนแก่น

ประเภทของสารสกัด	บริเวณที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)				
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>สารสกัดหยาบ</b>					
Di-1 (6.25 มก./มล.)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Di-2 (12.5 มก./มล.)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Di-3 (25 มก./มล.)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Di-4 (50 มก./มล.)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Di-5 (100 มก./มล.)	1.13±0.25 <sup>a</sup>	0.88±0.25 <sup>ab</sup>	0.5±0.41 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
<b>ชุดควบคุม</b>					
ST (10 ไมโครกรัม/มล.)	2.625	2.0	0.00	0.00	0.00
GT (10 ไมโครกรัม/มล.)	0.00	0.00	2.25	0.625	0.00
GT (20 ไมโครกรัม/มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
EtOH 95%	0	0	0	0	0

ST = streptomycin GT= Gentamicin Di = สารสกัดจากไคคลอโรมีเทน

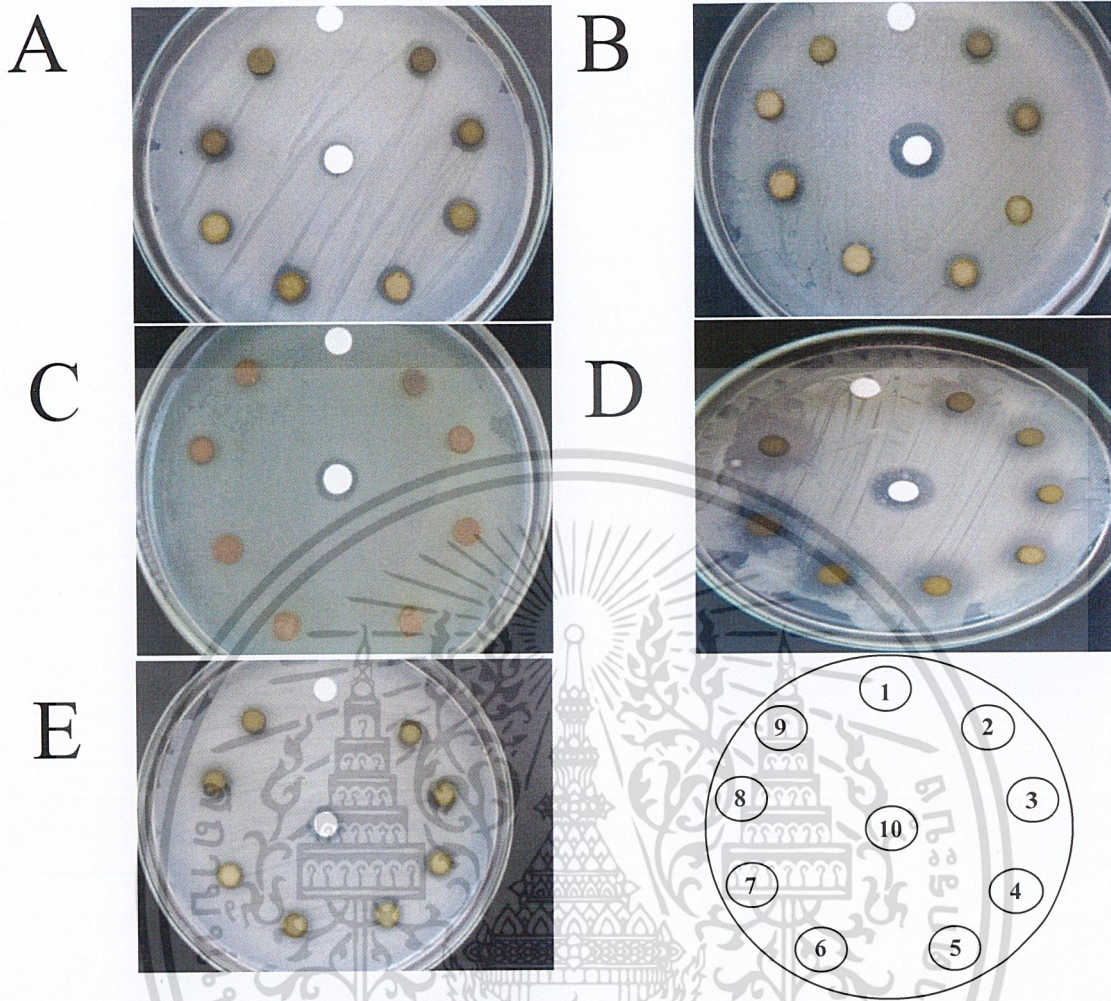
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยบริเวณที่สารสกัดหยาบของสาบเสื่อจากเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย จากจังหวัด ขอนแก่น

ประเภทของสารสกัด	บริเวณที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)				
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>สารสกัดหยาบ</b>					
Et-1 (6.25 มก./มล.)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Et-2 (12.5 มก./มล.)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Et-3 (25 มก./มล.)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Et-4 (50 มก./มล.)	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Et-5 (100 มก./มล.)	0.75±0.5 <sup>ab</sup>	1.13±0.48 <sup>a</sup>	0.38±4.8 <sup>bc</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
<b>ชุดควบคุม</b>					
ST (10 ไมโครกรัม/มล.)	2.87	2.00	0.00	0.00	0.00
GT (10 ไมโครกรัม/มล.)	0.00	0.00	3.00	1.25	0.00
GT (20 ไมโครกรัม/มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00
EtOH 95%	0	0	0	0	0

ST = streptomycin GT= Gentamicin Et = สารสกัดจากเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



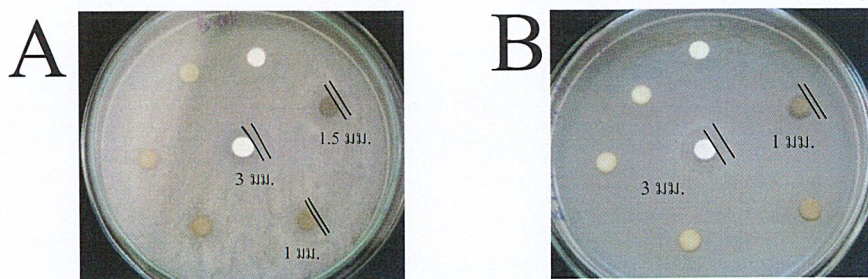
รูปที่ 4.1 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากสาบเสือที่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

หมายเหตุ A: *Staphylococcus aureus* B: *Escherichia coli* C: *Pseudomonas aeruginosa*  
 D: *Micrococcus luteus* E: *Bacillus subtilis*

- 1: เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์
- 2: สารสกัดหยาบจากสาบเสือที่มีความเข้มข้น 100 มก./มล. (ET100)
- 3: สารสกัดหยาบจากสาบเสือที่มีความเข้มข้น 100 มก./มล. (EM100)
- 4: สารสกัดหยาบจากสาบเสือที่มีความเข้มข้น 50 มก./มล. (ET50)
- 5: สารสกัดหยาบจากสาบเสือที่มีความเข้มข้น 50 มก./มล. (EM50)
- 6: สารสกัดหยาบจากสาบเสือที่มีความเข้มข้น 100 มก./มล. (DT100)
- 7: สารสกัดหยาบจากสาบเสือที่มีความเข้มข้น 100 มก./มล. (DM100)
- 8: สารสกัดหยาบจากสาบเสือที่มีความเข้มข้น 50 มก./มล. (DT50)
- 9: สารสกัดหยาบจากสาบเสือที่มีความเข้มข้น 50 มก./มล. (DM50)

10: A และ B ใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin 10 ไมโครกรัม/มิลลิตร และ D ใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin 20 ไมโครกรัม/มิลลิตร ส่วน C และ E ใช้ยาปฏิชีวนะ streptomycin 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในวงจำกัดเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรรมใดๆ ไม่โครกรัม/มิลลิตร ได้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากสาบเสือที่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ใช้ยาปฏิชีวนะ streptomycin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

หมายเหตุ A: สารสกัดสาบเสือจากจังหวัด อุบลราชธานี

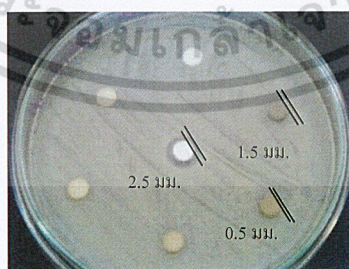
B: สารสกัดสาบเสือจากจังหวัด ชอนแก่น



รูปที่ 4.3 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากสาบเสือที่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *B. Subtilis* ใช้ยาปฏิชีวนะ streptomycin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

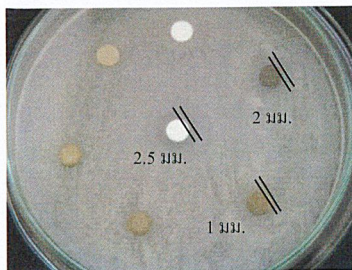
หมายเหตุ A: สารสกัดสาบเสือจาก จังหวัดอุบลราชธานี

B: สารสกัดสาบเสือจาก จังหวัดชอนแก่น



รูปที่ 4.4 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากสาบเสือที่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *M. Luteus* ใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.5** แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากสาบเสือที่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

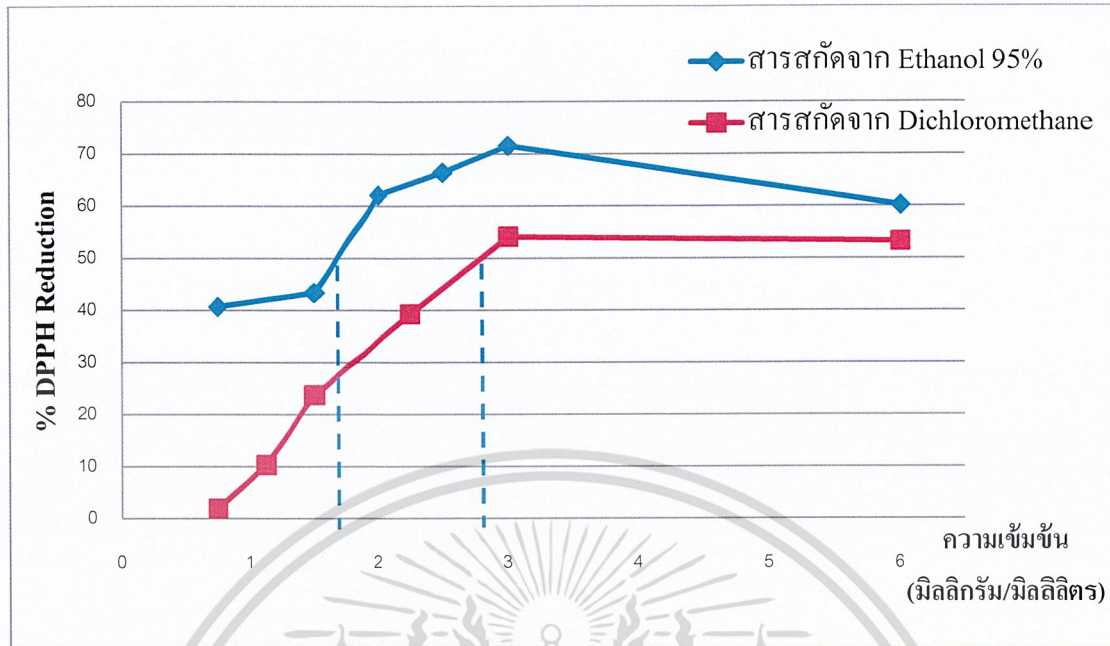
ผลจากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากสาบเสือ ให้ผลการทดลองคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Mendoza และคณะในปี 1997 ซึ่งศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* IAM1257, *Staphylococcus cereus* IAM1011 และ *Pseudomonas aeruginosa* IAM1257 ที่ความเข้มข้น 1,024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

#### 4.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ

##### 4.1.2.1 การตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากพืช โดยวิธี DPPH radical Scavenging

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มาทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการดักจับอนุมูลอิสระของ DPPH (DPPH radical scavenging method) เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครไทดอเตอร์เพลทรีดเดอร์ (Sunrise Tecan microtiter plate reader) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยทำการเจือจางสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 6, 3, 2.25, 1.5, 1.125 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 6, 3, 2.5, 2, 1.5 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์มีฤทธิ์รื้อยสะการดักจับอนุมูลอิสระสูงสุดที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 54.19 และ 71.55 ตามลำดับ แสดงในรูปที่ 4.6 โดยใช้วิตามินอี ( $\alpha$ -tocopherol) เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) ดังแสดงในรูปที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

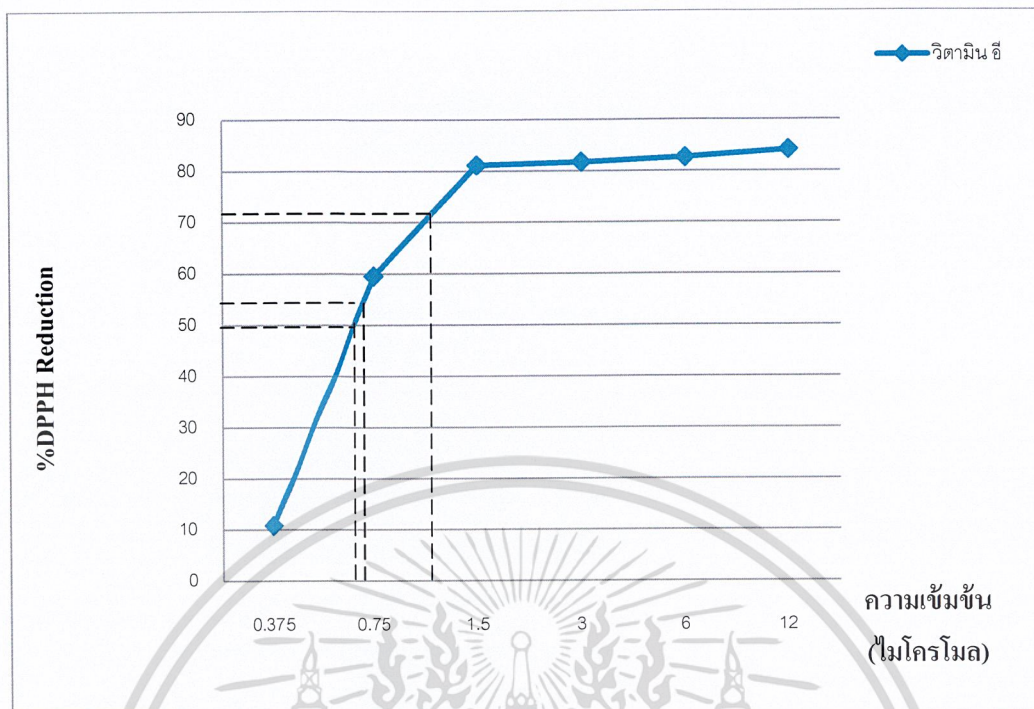


รูปที่ 4.6 กราฟแสดงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาบเสือ

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH reduction

ความเข้มข้นของสารสกัดจากไดคลอโรมีเทน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	%DPPH reduction	ความเข้มข้นของสารสกัดจากทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	%DPPH reduction
0.75	1.9185	0.75	40.719
1.125	10.312	1.5	43.405
1.5	23.741	2	62.110
2.25	39.329	2.5	66.427
3	54.192	3	71.557
6	53.293	6	60.180

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี ( $\alpha$ -tocopherol) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระบริสุทธิ์ที่ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control)

ตารางที่ 4.6 ค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดหยาบจากสาบเสือ

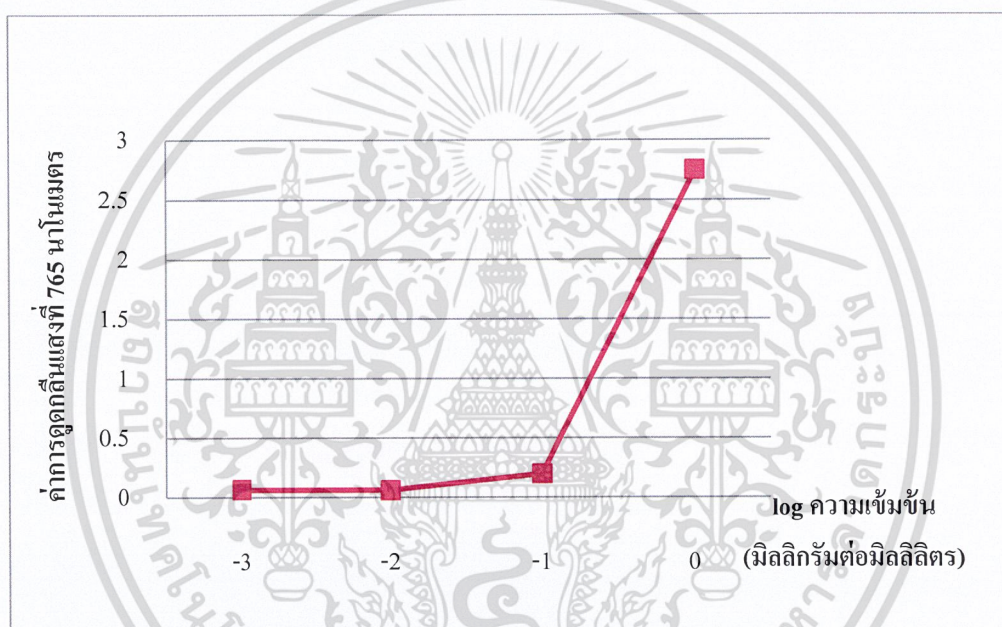
ชนิดของสารสกัดหยาบ	$IC_{50}$ (mg/ml)
สารสกัดหยาบที่หมักจากไคคลอโรมีเทน	2.89
สารสกัดหยาบที่หมักจากเอทานอล	1.88
วิตามิน อี	0.65 $\mu$ M

คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด แสดงให้เห็นในค่า  $IC_{50}$  (Inhibition Concentration 50%) หรือค่าความเข้มข้นของสารสกัดสาบเสือที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง เมื่อทำการพิจารณาค่า  $IC_{50}$  พบว่าสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยไคคลอโรมีเทนมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 2.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระนั้นพบว่าสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดจากเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถดักจับอนุมูลอิสระสูงสุดได้ 71.56 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นที่ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบเท่ากับวิตามินอีที่ 1.125 ไมโครโมล ส่วนสารสกัดจากสาบเสือที่สกัดจากไคคลอโรมีเทนสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงสุดได้ 54.19 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นที่ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบเท่ากับวิตามินอีที่ 0.70 ไมโครโมล วิตามินอีใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) ซึ่งมี

ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.65 ไมโครโมล สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 84.13 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 12 ไมโครโมล

#### 4.1.2.2 การวิเคราะห์หาสารฟีนอลิกทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบจากสาบเสือ

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากสาบเสือที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดสอบด้วยสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent และทำการเปรียบเทียบปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบจากสาบเสือกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงมาตรฐานของ Gallic acid

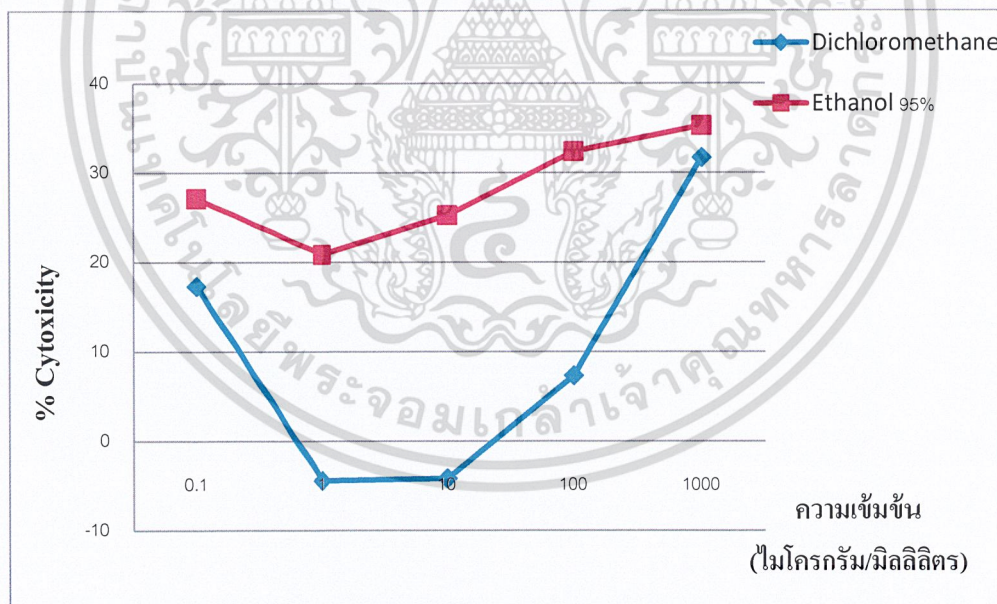
จากค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากสาบเสือที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแกลลิก พบว่าสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์และไดคลอโรมีเทนมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.0416 และ 0.0299 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ

เนื่องจากการหาเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเป็นการหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จากผลการทดสอบสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารสกัดที่ได้จากเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ให้ผลต่ำกว่าสารสกัดจากไดคลอโรมีเทนทั้งสองการทดลอง ดังนั้นถ้าต้องการเลือกใช้สารสกัดจากใบสาบเสือมาใช้ประโยชน์ก็ควรที่จะเลือกใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนในการสกัดใบสาบเสือ

เพราะจะทำให้ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่าสารสกัดใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

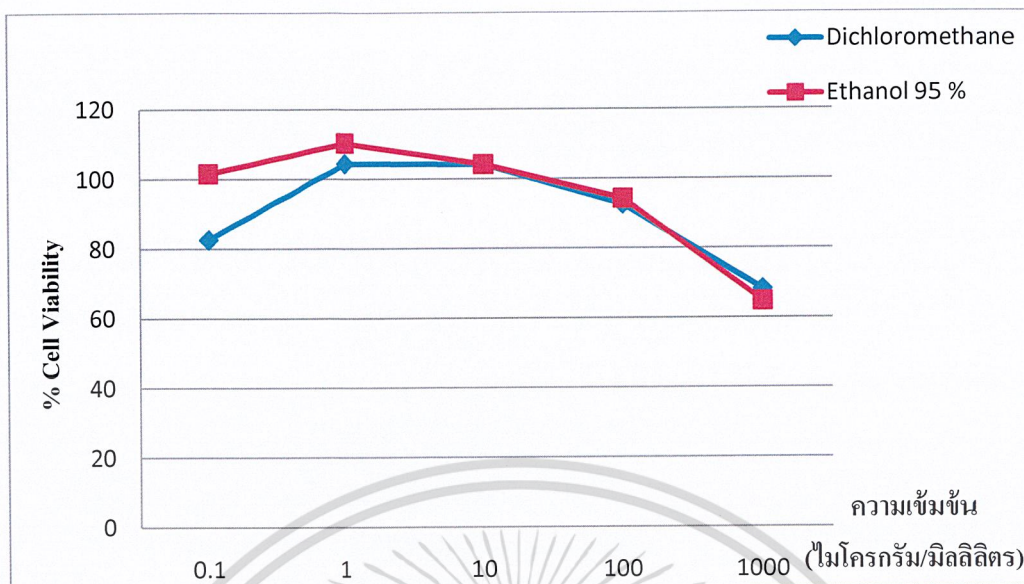
#### 4.1.2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ของสารสกัด หยาดจากสาบเสือโดยใช้วิธี MTT

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากสาบเสือโดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านม ( MCF-7 ) โดยทำการเจือจางความเข้มข้นของสารสกัดจากสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และไดคลอโรมีเทนให้มีความเข้มข้นที่ระดับ 1,000, 100, 10, 1 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ นำสารสกัดทั้งสองชนิดมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งทั้งหมด 6 ซ้ำ เพื่อหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมสูงสุด เมื่อทดสอบแต่ละระดับความเจือจางของสารสกัดจากสาบเสือ พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดหยาดทั้งสองชนิดนั้น มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง คือ 35.28 และ 31.71 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ได้ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ เท่ากับ 49.73 ซึ่งถือได้ว่าใกล้เคียงกับค่าที่วัดจากชุดควบคุมที่ได้ เมื่อระดับความเข้มข้นมากขึ้นจะทำให้ค่าร้อยละของความเป็นพิษต่อเซลล์ (%CC<sub>50</sub>) มีค่ามากขึ้น อัตราการมีชีวิตของเซลล์ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.9-4.10



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงค่าร้อยละของความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (MCF-7) โดยใช้สารสกัดหยาดจากสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และไดคลอโรมีเทนมาทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยใช้สารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และ ไดคลอโร โรมีเทนมาทดสอบ

การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ของสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยไดคลอโรโรมีเทนและเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งในสารสกัดจากไดคลอโรโรมีเทน และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์มีค่าร้อยละของการมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 104.39 และ 110.35 ตามลำดับ และการทดสอบร้อยละของความเป็นพิษสูงสุดของสารสกัดหยาบจากสาบเสือมีค่าเท่ากับ 31.71 และ 35.28 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่ได้จาก 2 แหล่ง คือ จังหวัดอุบลราชธานี และจังหวัดขอนแก่น แล้วนำมาทำการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ โดยนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น 5 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* และ *Bacillus subtilis* พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนั้น สารสกัดที่ได้จาก จ.อุบลราชธานี สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 4 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *M. luteus* และ *B. subtilis* แต่สารสกัดที่ได้จาก จ.ขอนแก่น ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ 3 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *M. luteus* และ *B. subtilis* แต่สำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* จากการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบสาบเสือจากตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าว ถึงแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วก็ตาม

จากการทดสอบทำให้เห็นว่า สาบเสือที่ได้จาก 2 แหล่งนั้น เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้นั้น พืชที่ได้จาก 2 แหล่งจะมีฤทธิ์ที่แตกต่างกันออกไป โดยสาบเสือที่ได้จากจังหวัดอุบลราชธานี เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสูงสุด คือ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ผลของสารสกัดจากสาบเสือที่ได้จากจังหวัดขอนแก่นนั้น สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงได้ทำการคัดเลือกใช้สารสกัดจากสาบเสือที่ได้จากจังหวัดอุบลราชธานี มาทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อให้เห็นผลที่ชัดเจน

เมื่อนำผลที่ได้จากการทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า สารสกัดหยาบจากสาบเสือที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 4 ชนิดคือ *E. coli*, *S. aureus*, *M. luteus* และ *B. Subtilis* โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะแตกต่างกับสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากสาบเสือมาทดสอบด้วยวิธี DPPH Scavenging assay พบว่าสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดจากไดคลอโรมีเทนและเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถต้านอนุมูลอิสระสูงสุดได้ 54.19 เปอร์เซ็นต์ เทียบเท่ากับวิตามินอีที่ 0.70 ไมโคร โมล และ 171.56 เปอร์เซ็นต์ เทียบเท่ากับวิตามินอีที่ 1.125 ไมโคร โมล ที่ความเข้มข้นที่ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

โดยสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 2.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากสาบเสือ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์นั้นมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ส่วนวิตามินอี ( $\alpha$ -tocopherol) ซึ่งมีประสิทธิภาพ ในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด 84.13 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 12 ไมโครโมล

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกโดยใช้สารละลาย Folin – Ciocalteu's reagent โดยการเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของ Gallic acid พบว่าสารสกัดหยาบสาบเสือที่สกัดจากไดคลอโรมีเทนมีปริมาณฟีนอลิกน้อยกว่าสารสกัดหยาบสาบเสือที่สกัดจากเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ คือมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเทียบเท่ากับ 0.0299 และ 0.0416 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ

ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ของสารสกัดหยาบจากสาบเสือโดยใช้วิธี MTT สารสกัดหยาบสาบเสือที่สกัดจากเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน พบว่าสารสกัดจากสาบเสือที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดคือ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดหยาบทั้งสองชนิดนั้น มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดเท่ากับ 35.28 และ 31.71 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ของสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์และไดคลอโรมีเทนมีค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์สูงสุดที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 110.35 และ 104.39 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์นั้นเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ซึ่งแปรผกผันกับค่าการมีชีวิตของเซลล์โดยจะมีค่าลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547. แบบที่เรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โนเบิล  
พรินท์ จำกัด

ภัทรดล สงเคราะห์, ญาดา ชพานนท์ และบัณฑิต จันทร์ศรี. 2551. การเพาะเลี้ยงรากหม่อนเพื่อผลิต  
สารต้านอนุมูลอิสระ. โครงการพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. สถาบัน  
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

รัตนา อินทรานุกฤษณ์. 2547. การตรวจสอบประสิทธิภาพสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพรร.  
กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โอภา วัชรคุปต์. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: พี.เอส.พรินท์

Afolabi, C.A., Ibukun, E.O., Dan-Ologe, I.A., 2007. Phytochemical constituents and antioxidant  
properties of extracts from the leaves of *Chromolaenaodorata*. Scientific Research and  
Essay 2 (6), 191–194.

Alisi, C.S., Onyeze, G.O.C., 2000. Nitric oxide scavenging ability of ethyl acetate fraction of  
methanolic leaf extracts of *Chromolaenaodorata*. African Journal of Biochemistry  
Research 2 (7), 1373–1379.

Anagnostopoulou, M.A., Kefalas, P., Papageorgiou, V.P., Assimepoulou, A.N., Boskou, D.,  
2006. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel  
(*Citrus sinensis*). Food Chemistry 94, 19–25.

Aneta, W., Jan, O., Renata, C., 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected  
herbs. Food Chemistry 105, 940–949.

Babu, B.H., Shylesh, B.S., Padikkala, J., 2001. Antioxidant and hepatoprotective effect of  
*Alanthusicifocus*. Fitoterapia 72, 272–277.

Bamidele, V.O., Stephen, O., Kemi, D.B., Alice, O., Elizabeth, A.A., Ayodele, O.S., 2008.  
Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities from flavonoid fractions of  
*Chromolaenaodorata*. Journal of Medicinal Plant Research 2 (9), 219–225.

Blios, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 26,  
1199–1200.

Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Boskou, D. (2002).

Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปเผยแพร่  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Boskou, D. (2002). Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage and summer savory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (19), 5294–5299.
- Feng, P.C., Haynes, L.J., Magnues, K.E., Plimmer, J.R., 1964. Further pharmacological screening of some West Indian medicinal plants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 16, 115–117.
- Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Bjork, L., Trajkovski, V., 2000. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1485–1490.
- Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1887–1892.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Amoma, O.L., 1987. The deoxyribose method: a simple test tube assay for the determination of rate constant for reaction of hydroxyl radical. *Analytical Biochemistry* 165, 215–219.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Hatano, T., Edamatsu, R., Mori, A., 1989. Effects of interaction of tannins with coexisting substances. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 37, 2016–2021.
- Hill, A.F., 1952. *Economic Botany, second ed..A Textbook of Useful Plants and Plant Products* McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.
- Hochstein, P., Atallah, A.S., 1988. The nature of oxidant and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. *Mutation Research* 202, 363–375.
- Javanraedi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J.M., 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry* 83, 547–550.
- K. Sriniasa Rao, Pradeep Kumar Chaudhury, Anuhumam Pradhan. 2010. Evaluation of anti-oxidant activities and total phenolic content of *Chromolaena odorata*
- Kim, D., Jeong, S., Lee, C.H., 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry* 81, 321–326.

- Marcocci, L., Maguire, J.J., Droy, M.T., 1994. The nitric oxide scavenging properties of *Gingobiloba* extract EGb 761. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 15, 748–755.
- Mendoza, L., Wilkens, M., Urzua, A. 1997. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and isolated from some Chilean *Pseudognaphalim* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 58:85-88.
- Metwally, A.M., Ekejuba, E.C., 1981. Methoxylated flavonols and flavones from *Eupatorium odoratum* L.. *Planta Medica* 42, 403.
- Mullik Traidej Chomnawang, Suvinol Surassmo, Veena S. Nukoolkarn, Wandee Gritsanapan., 2005. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria
- Ningappa, M.B., Dinesha, R., Srinivas, L., 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry leaf extract (*Murrayakoenigii* L.). *Food Chemistry* 106, 720–728.
- Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R., Akev, N., 2008. Antioxidant activity of *Smilax excelsa* leaf extracts. *Food Chemistry* 110, 571–583.
- Oludare, B.T., Olumayokun, A.O., Olufunmilola, O.S., Makinde, J.M., 2000. Antiinflammatory, antipyretic and antispasmodic properties of *Chromolaena odorata*. *Pharmaceutical Biology* 38 (5), 367–370.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2, 152–159.
- Sajise, P.E., Palis, R.K., Norcio, N.V., Lales, J.S., 1974. The biology of *C. odorata* L. King and Robinson, flowering behaviour, pattern of growth and nitrate metabolism. *Philippine Weed Science Bulletin* 1, 17–24.
- Silva, B.A., Ferreres, F., Malva, J.O., Dias, A.C.P., 2005. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry* 90, 157–167.
- Slinkard, K., Singleton, V.L., 1977. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28, 49–55.
- Soares, J.R., Dinis, T.C.P., Cunha, A.P., Almeida, L.M., 1997. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research* 26, 469–478.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Surveswan S., Cai Y. Systematic., 2006. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry* 102, 938 – 953.

Tanaka, M., Kuei, C.W., Nagashima, Y., 1998. Application of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakkaishi* 47, 1409–1414.

Yen, G.C., Hsieh, P.P., 1995. Antioxidative activity and scavenging effects on active oxygen of xylose–lysine Maillard reaction products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67, 415–420.

[Online]. Available : <http://gotoknow.org/file/manowwan/view/343466>

[Online]. Available : <http://th.wikipedia.org/wiki/สารเคียว>

[Online]. Available : <http://gotoknow.org/blog/herbland/115609>

[Online]. Available : <http://pirun.ku.ac.th/~b4755242/7.htm>

[Online]. Available : <http://www.imlab.com/buchi/fr210215%20english.htm>

[Online]. Available : [http://dusithost.dusit.ac.th/~research/menu/abstra/abstract/full/sci/Amonrat\\_nontabury/ch3.pdf](http://dusithost.dusit.ac.th/~research/menu/abstra/abstract/full/sci/Amonrat_nontabury/ch3.pdf)

[Online]. Available : <http://www.oknation.net>

[Online]. Available : <http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/Lecture-syllabus.html>

[Online]. Available : <http://www.marlerblog.com/legal-cases/e-coli-o157h7-mediated-post-infectious-irritable-bowel-syndrome-ibs/>

[Online]. Available : [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Staphylococcus\\_aureus\\_VISA\\_2.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Staphylococcus_aureus_VISA_2.jpg)

[Online]. Available : [http://www.fisheries.go.th/rgm-samutsa/download/Staphylococcus%20aureus\\_1.pdf](http://www.fisheries.go.th/rgm-samutsa/download/Staphylococcus%20aureus_1.pdf)

[Online]. Available : <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Micrococcus>,

[Online]. Available : <http://grupo3-12a.blogspot.com/2010/02/micrococcus-luteus.html>

[Online]. Available : <http://www.k-center.doae.go.th/getKnowledge.jsp?id=953>

[Online]. Available : <http://www.biomateinter.com/product.php?p=product&ps=pui>

[Online]. Available : [http://www.genomenewsnetwork.org/articles/10\\_03/defensins.php](http://www.genomenewsnetwork.org/articles/10_03/defensins.php)

[Online]. Available : <http://www.bloggang.com/viewblog.php?id=narusaru&group=5>

[Online]. Available : <http://jacquelyn88.blogspot.com/2009/12/love-them-hate-them.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### เชื้อจุลินทรีย์และเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีกระจายอยู่ทั่วไป มีทั้งชนิดที่เป็นโทษก่อให้เกิดโรคเจ็บป่วย และชนิดที่ไม่เป็นโทษต่อร่างกายหรือบางชนิดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในร่างกายของเราเพื่อช่วยสร้างความสมดุล และคอยป้องกันเชื้อโรคที่เป็นอันตรายในระดับหนึ่ง แต่ในบางครั้งเมื่อร่างกายอ่อนแอลง เชื้อประจำถิ่นอาจเพิ่มจำนวนมากเกินไปจนทำให้เสียสมดุล และเกิดความผิดปกติได้

##### 1.1 เชื้อ *Escherichia coli*

เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง (gram negative rod) ขนาด 1-2 ไมโครเมตร จัดเป็นพวก facultative anaerobic เคลื่อนที่โดย peritrichous flagella และยังมีโครงสร้างใช้ยึดเกาะ เรียกว่า fimbriae แต่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส และให้กรดแล้วยังสามารถใช้น้ำตาลตัวอื่นๆ ที่ 35 องศาเซลเซียส ย่อยสลายน้ำตาลชีรีบิทอล ได้กลูคาร์โรนเดส และเป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ ปกติจะไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะทำให้เกิดโรคได้ถ้าเชื้ออยู่นอกลำไส้ เช่น ในท่อปัสสาวะ ท่อน้ำดี ปอด เยื่อหุ้มปอด เยื่อหุ้มสมอง และไขสันหลังในเด็กแรกเกิด เชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคท้องร่วงในคน และสัตว์ ดังรูปภาคผนวก ก ที่ 1



รูปภาคผนวก ก ที่ 1 เชื้อ *Escherichia coli*

(ที่มา: <http://www.marlerblog.com/legal-cases/e-coli-o157h7-mediated-post-infectious-irritable-bowel-syndrome-ibs/>) / 11 กรกฎาคม 2553

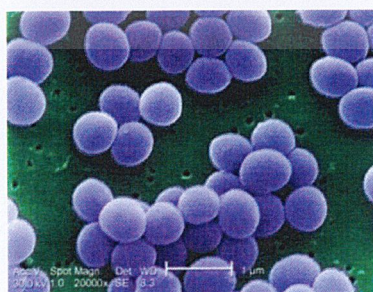
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ *E. coli* สายพันธุ์ทำให้เกิดโรค อาจทำให้เกิดโรคท้องร่วง (gastroenteritis) ท้องเดิน รำคาญ  
ไม่ว่าปัสสาวะอีกเสบ (urinary tract infections) โลหิตเป็นพิษ (septicemia) และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ

(neonatal meningitis) การรักษาและการป้องกันโรคที่อวัยวะในเด็กทารก นอกจากการกินยาอีโนไมซินหรือโคลิสติน ยังต้องรีบให้น้ำเกลือเพื่อทดแทนส่วนที่สูญเสียไป หลีกเลี่ยงการได้รับเชื้อจากอาหาร และน้ำดื่มที่ปนเปื้อน โดยเฉพาะที่ปรุงอาหารให้เด็กๆ ควรระวัง เลือกรับประทานอาหารที่ปรุงเสร็จใหม่ๆ และยังร้อนอยู่ ไม่รับประทานอาหารที่ไม่ผ่านการปรุงให้สุก หรือรับประทานอาหารสุกๆดิบๆ รวมทั้งดื่มนมที่ผ่านความร้อนแล้ว (นงลักษณ์, 2547)

## 1.2 เชื้อ *Staphylococcus aureus*

เป็นจุลินทรีย์ใน Family Micrococcaceae ซึ่งมีคุณสมบัติย้อมติดสีแกรมบวกเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม (0.5 – 1.0 ไมครอน) เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น แต่อาจจะพบเป็นเชลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ (โดยมากไม่เกิน 4 เชลล์) อยู่ปะปนด้วยกันเสมอเวลา ย้อมแกรม

*Staphylococcus aureus* ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ลักษณะโคโลนิกรวม นูน มีสีครีม เหลือง ส้ม (ขึ้นอยู่กับชนิดของคาร์โบไฮเดรตในเชลล์เมมเบรน รวมถึงอุณหภูมิ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะแวดล้อมที่ทำให้เชื้อเจริญ) *S. aureus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6-46 องศาเซลเซียส ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30-37 องศาเซลเซียส ทนความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ค่า pH ที่สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 4.0-10.0 pH โดยมีช่วงที่เหมาะสมคือ 7.0-7.5 ส่วนค่า  $A_w$  อยู่ในช่วง 0.85-0.999 ถ้าค่า  $A_w$  น้อยกว่า 0.94 จะเจริญได้อย่างช้าๆ สามารถทนเกลือที่ 18-20 เปอร์เซ็นต์ *S. aureus* ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Facultative anaerobe คือ สามารถเจริญได้ดีที่สภาพที่มีออกซิเจนมากกว่าในสภาพไม่มีออกซิเจน และสามารถสร้างสารพิษ enterotoxin แบ่งออกเป็น 8 ชนิด ได้แก่ A, B, C1, C2, C3, D, E และ H ชนิดที่พบบ่อยซึ่งเป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษคือ A กับ D สารพิษนี้มีคุณสมบัติพิเศษ ทนความร้อน ไม่ถูกทำลายแม้ต้มเดือดครึ่งชั่วโมง และทนความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที สารพิษนี้ละลายได้ดีในน้ำและสารละลายเกลือ *S. aureus* จะสร้างสารพิษดังกล่าวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าที่ 25 และ 10 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทั้งสามารถทนต่อรังสีแกมมาในปริมาณที่อนุญาตให้ใช้กับอาหารอีกด้วยดังรูปภาคผนวก ก ที่ 2



รูปภาคผนวก ก ที่ 2 *Staphylococcus aureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้เฉพาะในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
(ที่มา: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Staphylococcus\\_aureus\\_VISA\\_2.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Staphylococcus_aureus_VISA_2.jpg))  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ถือว่าผู้พิมพ์ให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้  
/ 11 กรกฎาคม 2553

1.2.1 แหล่งที่พบเชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ที่ผิวหนัง โพรงจมูก เชื้อบุทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร และบาดแผลที่เป็นฝี หนอง รวมถึงในดินฝุ่นละออง

1.2.2 อาหารที่มักพบเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อเนื้อสัตว์ ปีกและผลิตภัณฑ์จากไข่ อาหารประเภทสลัด ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ครีมพาย เอแคลร์ ช็อกโกแลต แชนวิช และผลิตภัณฑ์นม ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม และเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนรับประทาน

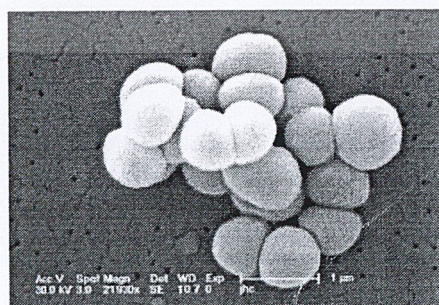
1.2.3 การทำให้เกิดโรค เชื้อ *S. aureus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษแม้ในปริมาณน้อยกว่า 1 ไมโครกรัม ก็สามารถทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยได้ สารพิษชนิดนี้จะทำให้เกิด Acute infection (ฝี หนอง แผลติดเชื้อ septicemial) และ Acute toxemias (heat stable enterotoxin)

(ที่มา: [http://www.fisheries.go.th/rgm-samutsa/download/Staphylococcus%20aureus\\_1.pdf](http://www.fisheries.go.th/rgm-samutsa/download/Staphylococcus%20aureus_1.pdf)) /11  
กรกฎาคม 2553

### 1.3 เชื้อ *Micrococcus luteus*

*Micrococcus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 – 3.5 ไมโครเมตร มักจัดกลุ่มอยู่ในรูป tetrads โดยเป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตโดยใช้ออกซิเจน ซึ่งจะไม่ผลิตกรดจากกลูโคสรวมทั้งไม่มีอาร์จินิน ไคไฮโดรเลส (arginine dihydrolase) หรือเบต้ากาแล็คโตซิเดส ( $\beta$ -galactosidase) ซึ่ง *Micrococcus sp.* บางชนิดจะสร้างเม็ดสี เช่น *M.s luteus* จะมีโคโลนีสีเหลือง และ *Micrococcus roseus* จะมีโคโลนีสีแดง

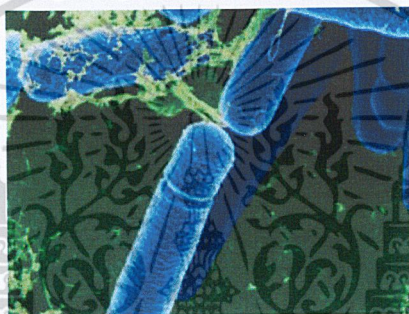
*Micrococcus luteus* พบที่ผิวของมนุษย์ สัตว์ และผลิตภัณฑ์จากนม โดย *M. luteus* จะอยู่ในสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ด้วย เช่น น้ำ และดิน *M. luteus* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำน้อยหรือความเข้มข้นเกลือสูง โดยจะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังสามารถพบ *M. luteus* ในทะเลบริเวณเขตแอนตาร์ติกอีกด้วย ดังแสดงในรูปภาคผนวก ก ที่ 3  
(ที่มา : <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Micrococcus>.) / 11 กรกฎาคม 2553



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เฉพาะในท้องถิ่น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ (ที่มา: <http://grup03-12a.blogspot.com/2010/02/micrococcus-luteus.html>) /15 กรกฎาคม 2553

#### 1.4 ชื่อ *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน ดังแสดงในรูปภาพผนวก ก ที่ 4 อยู่ในกลุ่ม obligate aerobe สามารถสร้างเอนโดสปอร์ ดังนั้นจึงทำให้มีการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิที่เหมาะสมการเจริญประมาณ 30 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสในนมได้ แต่สร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์เรนิน (renin) ย่อยสลายเคซีนให้ตกตะกอนเป็นอนุภาคที่ละเอียด เรียก sweetcurd สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ใช้อย่างแพร่หลายให้เป็นน้ำตาลแลคโตส (lactose) ไม่ทำอันตรายต่อมนุษย์โดยตรง แต่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยสปอร์สามารถอยู่รอดได้ในอาหารที่ให้ความร้อนสูงและยังทำให้เกิดเม็องในขนมปัง (ที่มา : [www.k-center.doae.go.th/getKnowledge.jsp?id=953](http://www.k-center.doae.go.th/getKnowledge.jsp?id=953)) / 11 กรกฎาคม 2553

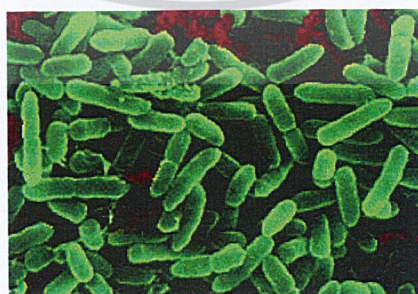


รูปภาพผนวก ก ที่ 4 *Bacillus subtilis*

(ที่มา : <http://www.biomateinter.com/product.php?p=product&ps=pui>) / 11 กรกฎาคม 2553

#### 1.5 ชื่อ *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* เป็น แบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง aerobic เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Pseudomonadaceae สามารถเคลื่อนที่ได้โดย flagellum 1 เส้นที่ติดอยู่ตรงหัว ปกติจะพบกระจายในดิน น้ำ ขยะ หรือในพืช และเป็น normal flora ในลำไส้คน *P. aeruginosa* สามารถทำให้เกิดโรคในคน ได้ รวมทั้งสัตว์ แมลงและต้นไม้ได้บ้าง ดังแสดงในรูปภาพผนวก ก ที่ 5



รูปภาพผนวก ก ที่ 5 *Pseudomonas aeruginosa*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับวารสารวิชาการซึ่งเผยแพร่โดยวารสารวิจัยทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (ที่มา : [http://www.genomenewsnetwork.org/articles/10\\_03/defensins.php](http://www.genomenewsnetwork.org/articles/10_03/defensins.php)) / 11 กรกฎาคม 2553  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*P. aeruginosa* เป็นเชื้อโรคฉวยโอกาสจะมีการติดเชื้อกับ ผู้ที่ภูมิคุ้มกันต่ำหรือป่วยมากๆ หรือผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาล บางทีจึงเรียกโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *P. aeruginosa* ว่าโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล จากผู้ป่วยโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล 2,000 คนต่อปี จะมีจำนวน 10 % ที่มีสาเหตุมาจาก *P. aeruginosa* ซึ่ง *P. aeruginosa* เป็นสาเหตุอันดับสองในการทำให้เกิดโรคปอดบวมในโรงพยาบาล และเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ในการก่อให้เกิดโรคปอดบวม ในห้อง ICU โรคติดเชื้อจาก *Pseudomonas* สามารถแพร่กระจายภายในโรงพยาบาลโดยบุคลากร อุปกรณ์การแพทย์ ผิวหนัง น้ำยาฆ่าเชื้อ และอาหาร โรคติดเชื้อนี้เป็นปัญหาที่รุนแรงมากในโรงพยาบาลมากเนื่องจากผู้ป่วยซึ่งมีอาการหนักอยู่แล้วจะเสียชีวิตเนื่องจากโรคติดเชื้อจาก *Pseudomonas* และ *Pseudomonas* คือต่อยาปฏิชีวนะมาก ทำให้ยากต่อการรักษา

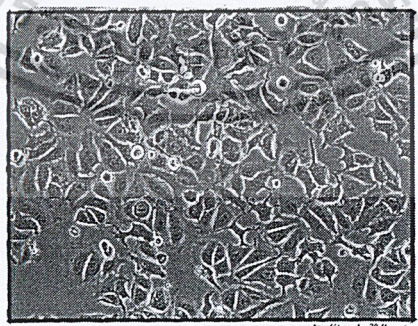
(ที่มา: <http://www.bloggang.com/viewblog.php?id=narusaru&group=5>) / 11 กรกฎาคม 2553

### เซลล์มะเร็ง MCF-7 (human breast adenocarcinoma cell line)

เซลล์มะเร็ง MCF-7 สามารถแยกได้ครั้งแรกในปี 1970 จากเนื้อเยื่อเต้านมของหญิงสาวผิวขาววัย 69 ปีจากการเข้ารับการรักษาผ่าตัดมะเร็งเต้านม ลักษณะของเซลล์มะเร็ง MCF-7 เซลล์ติดผิวแก้ว (monolayer cell) ดังรูปภาคผนวก ก ที่ 6 เซลล์ไลน์ของมะเร็งเป็นประโยชน์ในการศึกษาการเกิดมะเร็งเต้านมในหลอดทดลอง เซลล์มะเร็งจะถูกนำมาทดสอบกับสารที่มีคุณสมบัติในการต้านเซลล์มะเร็ง โดยการวัดค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) โดยดูที่ค่า  $ED_{50}$

$$ED_{50} = \text{Effective Dose}_{50}$$

วิธีการดูค่า  $ED_{50}$  จะดูว่าสารทดสอบเท่าใดจึงทำให้เซลล์ตายไป 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม และก่อนที่จะทดสอบสารที่มีคุณสมบัติต้านเซลล์มะเร็งจะต้องทราบลักษณะและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดเสียก่อน



รูปภาคผนวก ก ที่ 6 เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7

(ที่มา: <http://jacquelyn88.blogspot.com/2009/12/love-them-hate-them.html>) / 11 กรกฎาคม 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS

#### การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

1. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดจากเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ จังหวัดอุบลราชธานี โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ทางสถิติ

		Value Label	N
tractment	0	6.25	16
	1	12.5	16
	2	25	16
	3	50	16
	4	100	16
MO	1	E	20
	2	B	20
	3	M	20
	4	S	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Descriptive Statistics

Dependent Variable: Inhibition zone

traetment	MO	Mean	Std. Deviation	N
6.25	E	.0000	.00000	4
	B	.0000	.00000	4
	M	.0000	.00000	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.0000	.00000	16
12.5	E	.0000	.00000	4
	B	.0000	.00000	4
	M	.0000	.00000	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.0000	.00000	16
25	E	.0000	.00000	4
	B	.0000	.00000	4
	M	.0000	.00000	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.0000	.00000	16
50	E	1.5000	.57735	4
	B	1.2500	.28868	4
	M	2.4375	.37500	4
	S	.6875	.74652	4
	Total	1.4688	.80558	16
100	E	1.7500	.28868	4
	B	1.6250	.25000	4
	M	3.0000	.00000	4
	S	1.3750	.32275	4
	Total	1.9375	.68617	16
Total	E	.6500	.85993	20
	B	.5750	.74824	20
	M	1.0875	1.38667	20
	S	.4125	.65028	20
	Total	.6812	.96945	80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dependent Variable: clear zone

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	70.153 <sup>a</sup>	19	3.692	54.116	.000
Intercept	37.128	1	37.128	544.168	.000
traetment	57.450	4	14.363	210.504	.000
MO	4.991	3	1.664	24.382	.000
traetment * MO	7.712	12	.643	9.420	.000
Error	4.094	60	.068		
Total	111.375	80			
Corrected Total	74.247	79			

a. R Squared = .945 (Adjusted R Squared = .927)

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: clear zone

	(I) traetment	(J) traetment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	6.25	12.5	.0000	.09235	.000	-.1847	.1847
		25	-.0000	.09235	.000	-.1847	.1847
		50	-1.4688	.09235	.000	-1.6535	-1.2840
		100	-1.9375	.09235	.000	-2.1222	-1.7528
	12.5	6.25	.0000	.09235	.000	-.1847	.1847
		25	.0000	.09235	.000	-.1847	.1847
		50	-1.4688	.09235	.000	-1.6535	-1.2840
		100	-1.9375	.09235	.000	-2.1222	-1.7528
	25	6.25	.0000	.09235	.000	-.1847	.1847
		12.5	.0000	.09235	.000	-.1847	.1847
		50	-1.4688	.09235	.000	-1.6535	-1.2840
		100	-1.9375	.09235	.000	-2.1222	-1.7528
	50	6.25	1.4688	.09235	.000	1.2840	1.6535
		12.5	1.4688	.09235	.000	1.2840	1.6535
		25	1.4688	.09235	.000	1.2840	1.6535
		100	-.4688	.09235	.000	-.6535	-.2840
	100	6.25	1.9375	.09235	.000	1.7528	2.1222
		12.5	1.9375	.09235	.000	1.7528	2.1222
		25	1.9375	.09235	.000	1.7528	2.1222
		50	.4688	.09235	.000	.2840	.6535

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = .068.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Homogeneous Subsets

## Clear zone

	traement	N	Subset		
			1	2	3
Duncan <sup>a</sup>	6.25	16	.0000		
	12.5	16	.0000		
	25	16	.0000		
	50	16		1.4688	
	100	16			1.9375
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .068.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 16.000.

## 2. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดจากโคคลอโรมีเทน จังหวัดอุบลราชธานี

		Value Label	N
traement	0	6.25	16
	1	12.5	16
	2	25	16
	3	50	16
	4	100	16
MO	1	E	20
	2	B	20
	3	M	20
	4	S	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Descriptive Statistics

Dependent Variable: Inhibition zone

traetment	MO	Mean	Std. Deviation	N
6.25	E	.0000	.00000	4
	B	.0000	.00000	4
	M	.0000	.00000	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.0000	.00000	16
12.5	E	.0000	.00000	4
	B	.0000	.00000	4
	M	.0000	.00000	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.0000	.00000	16
25	E	.0000	.00000	4
	B	.0000	.00000	4
	M	.0000	.00000	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.0000	.00000	16
50	E	1.1250	.25000	4
	B	2.3750	.47871	4
	M	2.3750	.25000	4
	S	1.0000	.70711	4
	Total	1.7188	.79517	16
100	E	1.6250	.25000	4
	B	3.3750	.62915	4
	M	3.6250	.47871	4
	S	1.3750	.47871	4
	Total	2.5000	1.12546	16
Total	E	.5500	.72366	20
	B	1.1500	1.51397	20
	M	1.2000	1.57614	20
	S	.4750	.69727	20
	Total	.8437	1.22628	80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dependent Variable: clear zone

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	113.484 <sup>a</sup>	19	5.973	67.458	.000
Intercept	56.953	1	56.953	643.235	.000
traetment	90.312	4	22.578	255.000	.000
MO	8.859	3	2.953	33.353	.000
traetment * MO	14.312	12	1.193	13.471	.000
Error	5.312	60	.089		
Total	175.750	80			
Corrected Total	118.797	79			

a. R Squared = .955 (Adjusted R Squared = .941)

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: clear zone

	(I) traetment	(J) traetment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	6.25	12.5	.0000	.10520	1.000	-.2104	.2104
		25	.0000	.10520	1.000	-.2104	.2104
		50	-1.7188	.10520	.000	-1.9292	-1.5083
		100	-2.5000	.10520	.000	-2.7104	-2.2896
	12.5	6.25	.0000	.10520	1.000	-.2104	.2104
		25	.0000	.10520	1.000	-.2104	.2104
		50	-1.7188	.10520	.000	-1.9292	-1.5083
		100	-2.5000	.10520	.000	-2.7104	-2.2896
	25	6.25	.0000	.10520	1.000	-.2104	.2104
		12.5	.0000	.10520	1.000	-.2104	.2104
		50	-1.7188	.10520	.000	-1.9292	-1.5083
		100	-2.5000	.10520	.000	-2.7104	-2.2896
	50	6.25	1.7188	.10520	.000	1.5083	1.9292
		12.5	1.7188	.10520	.000	1.5083	1.9292
		25	1.7188	.10520	.000	1.5083	1.9292
		100	-.7812	.10520	.000	-.9917	-.5708
100	6.25	2.5000	.10520	.000	2.2896	2.7104	
	12.5	2.5000	.10520	.000	2.2896	2.7104	
	25	2.5000	.10520	.000	2.2896	2.7104	
	50	.7812	.10520	.000	.5708	.9917	

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .089.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 \* The mean difference is significant at the .05 level. ไม่ว่าจะตีความด้วยวิธีใดก็ตาม

## Homogeneous Subsets

Clear zone

	traement	N	Subset		
			1	2	3
Duncan <sup>a</sup>	6.25	16	.0000		
	12.5	16	.0000		
	25	16	.0000		
	50	16		1.7188	
	100	16			2.5000
	Sig.			1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .089.

### 3. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดจากเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ จังหวัดขอนแก่น

traement	Value Label	N
0	6.25	16
1	12.5	16
2	25	16
3	50	16
4	100	16
MO	E	20
	B	20
	M	20
	S	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Descriptive Statistics

Dependent Variable: Inhibition zone

tractment	MO	Mean	Std. Deviation	N
6.25	E	.0000	.00000	4
	B	.0000	.00000	4
	M	.0000	.00000	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.0000	.00000	16
12.5	E	.0000	.00000	4
	B	.0000	.00000	4
	M	.0000	.00000	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.0000	.00000	16
25	E	.0000	.00000	4
	B	.0000	.00000	4
	M	.0000	.00000	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.0000	.00000	16
50	E	.0000	.00000	4
	B	.0000	.00000	4
	M	.0000	.00000	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.0000	.00000	16
100	E	.7500	.50000	4
	B	1.1250	.47871	4
	M	.3750	.47871	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.5625	.57373	16
Total	E	.1500	.36635	20
	B	.2250	.49934	20
	M	.0750	.24468	20
	S	.0000	.00000	20
	Total	.1125	.33729	80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dependent Variable: clear zone

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6.862 <sup>a</sup>	19	.361	10.198	.000
Intercept	1.012	1	1.012	28.588	.000
traetment	4.050	4	1.013	28.588	.000
MO	.563	3	.188	5.294	.003
traetment * MO	2.250	12	.187	5.294	.000
Error	2.125	60	.035		
Total	10.000	80			
Corrected Total	8.987	79			

a. R Squared = .764 (Adjusted R Squared = .689)

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: clear zone

	(I) traetment	(J) traetment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	6.25	12.5	.0000	.06654	1.000	-.1331	.1331
		25	.0000	.06654	1.000	-.1331	.1331
		50	.0000	.06654	1.000	-.1331	.1331
		100	-.5625	.06654	.000	-.6956	-.4294
	12.5	6.25	.0000	.06654	1.000	-.1331	.1331
		25	.0000	.06654	1.000	-.1331	.1331
		50	.0000	.06654	1.000	-.1331	.1331
		100	-.5625	.06654	.000	-.6956	-.4294
	25	6.25	.0000	.06654	1.000	-.1331	.1331
		12.5	.0000	.06654	1.000	-.1331	.1331
		50	.0000	.06654	1.000	-.1331	.1331
		100	-.5625	.06654	.000	-.6956	-.4294
	50	6.25	.0000	.06654	1.000	-.1331	.1331
		12.5	.0000	.06654	1.000	-.1331	.1331
		25	.0000	.06654	1.000	-.1331	.1331
		100	-.5625	.06654	.000	-.6956	-.4294
100	6.25	.5625	.06654	.000	.4294	.6956	
	12.5	.5625	.06654	.000	.4294	.6956	
	25	.5625	.06654	.000	.4294	.6956	
	50	.5625	.06654	.000	.4294	.6956	

Based on observed means.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่ขึ้นสำหรับใช้ในการเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 \* The mean difference is significant at the .05 level.  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่มีเหตุใดเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Homogeneous Subsets

Clear zone

	traetment	N	Subset	
			1	2
Duncan <sup>a</sup>	6.25	16	.0000	
	12.5	16	.0000	
	25	16	.0000	
	50	16	.0000	
	100	16		.5625
	Sig.			1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .089.

#### 4. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของสารสกัดหยาบจากสาบเสือที่สกัดจากไคคลอโรมีเทน จังหวัดขอนแก่น

		Value Label	N
traetment	0	6.25	16
	1	12.5	16
	2	25	16
	3	50	16
	4	100	16
MO	1	E	20
	2	B	20
	3	M	20
	4	S	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Descriptive Statistics

Dependent Variable: Inhibition zone

traetment	MO	Mean	Std. Deviation	N
6.25	E	.0000	.00000	4
	B	.0000	.00000	4
	M	.0000	.00000	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.0000	.00000	16
12.5	E	.0000	.00000	4
	B	.0000	.00000	4
	M	.0000	.00000	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.0000	.00000	16
25	E	.0000	.00000	4
	B	.0000	.00000	4
	M	.0000	.00000	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.0000	.00000	16
50	E	.0000	.00000	4
	B	.0000	.00000	4
	M	.0000	.00000	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.0000	.00000	16
100	E	1.1250	.25000	4
	B	.8750	.25000	4
	M	.5000	.40825	4
	S	.0000	.00000	4
	Total	.6250	.50000	16
Total	E	.2250	.47226	20
	B	.1750	.37258	20
	M	.1000	.26157	20
	S	.0000	.00000	20
	Total	.1250	.33281	80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dependent Variable: clear zone

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7.875 <sup>a</sup>	19	.414	28.421	.000
Intercept	1.250	1	1.250	85.714	.000
traetment	5.000	4	1.250	85.714	.000
MO	.575	3	.192	13.143	.000
traetment * MO	2.300	12	.192	13.143	.000
Error	.875	60	.015		
Total	10.000	80			
Corrected Total	8.750	79			

a. R Squared = .900 (Adjusted R Squared = .868)

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: clear zone

	(I) traetment	(J) traetment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	6.25	12.5	.0000	.04270	1.000	-.0854	.0854
		25	.0000	.04270	1.000	-.0854	.0854
		50	.0000	.04270	1.000	-.0854	.0854
		100	-.6250	.04270	.000	-.7104	-.5396
	12.5	6.25	.0000	.04270	1.000	-.0854	.0854
		25	.0000	.04270	1.000	-.0854	.0854
		50	.0000	.04270	1.000	-.0854	.0854
		100	-.6250	.04270	.000	-.7104	-.5396
	25	6.25	.0000	.04270	1.000	-.0854	.0854
		12.5	.0000	.04270	1.000	-.0854	.0854
		50	.0000	.04270	1.000	-.0854	.0854
		100	-.6250	.04270	.000	-.7104	-.5396
	50	6.25	.0000	.04270	1.000	-.0854	.0854
		12.5	.0000	.04270	1.000	-.0854	.0854
		25	.0000	.04270	1.000	-.0854	.0854
		100	-.6250	.04270	.000	-.7104	-.5396
100	6.25	.6250	.04270	.000	.5396	.7104	
	12.5	.6250	.04270	.000	.5396	.7104	
	25	.6250	.04270	.000	.5396	.7104	
	50	.6250	.04270	.000	.5396	.7104	

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .015.

\* The mean difference is significant at the .05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูผู้ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### Homogeneous Subsets

#### Clear zone

	traetment	N	Subset	
			1	2
Duncan <sup>a</sup>	6.25	16	.0000	
	12.5	16	.0000	
	25	16	.0000	
	50	16	.0000	
	100	16		.6250
	Sig.			1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .015.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 16.000.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการทดลอง

ตารางภาคผนวก ก ที่ 1 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดหยาบของสาบเลื่อจากจังหวัดอุบลราชธานี ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis*

ประเภทของสารสกัด	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> (มิลลิเมตร)				
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย
<b>สารสกัดหยาบ</b>					
Dichlo (6.25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dichlo (12.5 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dichlo (25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dichlo (50 มก. /มล.)	2.5	3	2	2	2.375
Dichlo (100 มก. /มล.)	3.5	4	3.5	2.5	3.375
<b>ชุดควบคุม</b>					
ST (10ไมโครกรัม/มล.)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
EtOH 95 %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

**หมายเหตุ** ค่าที่ได้หาโดยนำค่าของเส้นผ่านศูนย์กลางทั้งหมด - เส้นผ่านศูนย์กลางของ Disc (6 มม.)

ตารางภาคผนวก ก ที่ 2 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดหยาบของสาบเลื่อจากจังหวัดอุบลราชธานี ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*

ประเภทของสารสกัด	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> (มิลลิเมตร)				
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย
<b>สารสกัดหยาบ</b>					
Dichlo (6.25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dichlo (12.5 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dichlo (25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dichlo (50 มก. /มล.)	1	1.5	1	1	1.125
Dichlo (100 มก. /มล.)	1.5	1.5	1.5	2	1.625
<b>ชุดควบคุม</b>					
ST (10ไมโครกรัม/มล.)	1.5	1.5	2.5	2	1.875
EtOH 95 %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ในการค้า  
**หมายเหตุ** ค่าที่ได้หาโดยนำค่าของเส้นผ่านศูนย์กลางทั้งหมด - เส้นผ่านศูนย์กลางของ Disc (6 มม.)

ตารางภาคผนวก ก ที่ 3 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดหยาบของสาบเสือจากจังหวัด อุบลราชธานี ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Micrococcus luteus*

ประเภทของสารสกัด	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Micrococcus luteus</i> (มิลลิเมตร)				
	ซ้ที่ 1	ซ้ที่ 2	ซ้ที่ 3	ซ้ที่ 4	เฉลี่ย
<b>สารสกัดหยาบ</b>					
Dichlo (6.25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dichlo (12.5 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dichlo (25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dichlo (50 มก. /มล.)	2	2.5	2.5	2.5	2.375
Dichlo (100 มก. /มล.)	3	3.5	4	4	3.625
<b>ชุดควบคุม</b>					
GT (10 ไมโครกรัม/มล.)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
EtOH 95 %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ ค่าที่ได้หาโดยนำค่าของเส้นผ่านศูนย์กลางทั้งหมด – เส้นผ่านศูนย์กลางของ Disc (6 มม.)

ตารางภาคผนวก ก ที่ 4 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดหยาบของสาบเสือจากจังหวัด อุบลราชธานี ที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*

ประเภทของสารสกัด	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> (มิลลิเมตร)				
	ซ้ที่ 1	ซ้ที่ 2	ซ้ที่ 3	ซ้ที่ 4	เฉลี่ย
<b>สารสกัดหยาบ</b>					
Dichlo (6.25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dichlo (12.5 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dichlo (25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dichlo (50 มก. /มล.)	1.5	0.00	1.5	1	1
Dichlo (100 มก. /มล.)	2	1.5	1	1	1.375
<b>ชุดควบคุม</b>					
GT (10 ไมโครกรัม/มล.)	3	2.5	3.5	3.5	3.125
EtOH 95 %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ ค่าที่ได้หาโดยนำค่าของเส้นผ่านศูนย์กลางทั้งหมด – เส้นผ่านศูนย์กลางของ Disc (6 มม.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค ที่ 5 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดหยาบของสาบเสือจากจังหวัดอุบลราชธานี ที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis*

ประเภทของสารสกัด	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> (มิลลิเมตร)				
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย
<b>สารสกัดหยาบ</b>					
EtOH (6.25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EtOH (12.5 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EtOH (25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EtOH (50 มก. /มล.)	1	1	1.5	1.5	1.25
EtOH (100 มก. /มล.)	1.5	1.5	1.5	2	1.625
<b>ชุดควบคุม</b>					
ST (10ไมโครกรัม/มล.)	2	2.5	2	2	2.125
EtOH 95 %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

**หมายเหตุ** ค่าที่ได้หาโดยนำค่าของเส้นผ่านศูนย์กลางทั้งหมด – เส้นผ่านศูนย์กลางของ Disc (6 มม.)

ตารางภาคผนวก ค ที่ 6 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดหยาบของสาบเสือจากจังหวัดอุบลราชธานี ที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*

ประเภทของสารสกัด	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> (มิลลิเมตร)				
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย
<b>สารสกัดหยาบ</b>					
EtOH (6.25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EtOH (12.5 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EtOH (25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EtOH (50 มก. /มล.)	1	2	1	2	1.5
EtOH (100 มก. /มล.)	1.5	1.5	2	2	1.75
<b>ชุดควบคุม</b>					
ST (10ไมโครกรัม/มล.)	3	3	2.5	3	2.875
EtOH %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

**หมายเหตุ** ค่าที่ได้หาโดยนำค่าของเส้นผ่านศูนย์กลางทั้งหมด – เส้นผ่านศูนย์กลางของ Disc (6 มม.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค ที่ 7 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดหายาบของสาบเสื่อจากจังหวัด อุบลราชธานี ที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Micrococcus luteus*

ประเภทของสารสกัด	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Micrococcus luteus</i> (มิลลิเมตร)				
	ซ้ที่ 1	ซ้ที่ 2	ซ้ที่ 3	ซ้ที่ 4	เฉลี่ย
สารสกัดหายาบ					
EtOH (6.25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EtOH (12.5 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EtOH (25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EtOH (50 มก. /มล.)	2.25	2.25	2.25	2.5	2.3125
EtOH (100 มก. /มล.)	3	3	3	3	3
ชุดควบคุม					
GT (10 ไมโครกรัม/มล.)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
EtOH 95 %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ ค่าที่ได้หาโดยนำค่าของเส้นผ่านศูนย์กลางทั้งหมด – เส้นผ่านศูนย์กลางของ Disc (6 มม.)

ตารางภาคผนวก ค ที่ 8 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดหายาบของสาบเสื่อจากจังหวัด อุบลราชธานี ที่สกัดด้วย เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*

ประเภทของสารสกัด	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> (มิลลิเมตร)				
	ซ้ที่ 1	ซ้ที่ 2	ซ้ที่ 3	ซ้ที่ 4	เฉลี่ย
สารสกัดหายาบ					
EtOH (6.25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EtOH (12.5 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EtOH (25 มก. /มล.)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EtOH (50 มก. /มล.)	0.5	0.00	0.5	1.75	0.8675
EtOH (100 มก. /มล.)	1.25	1.5	1	1.75	1.375
ชุดควบคุม					
GT (10 ไมโครกรัม/มล.)	3	2.5	3.5	3.5	3.125
EtOH 95 %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ ค่าที่ได้หาโดยนำค่าของเส้นผ่านศูนย์กลางทั้งหมด – เส้นผ่านศูนย์กลางของ Disc (6 มม.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค ที่ 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัด  
หยาบของสาบเสือที่สกัดโดยไดคลอโรมีเทน

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร					% DPPH reduction
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	
0.75	0.421	0.399	0.409	0.407	0.409	1.9185
1.125	0.381	0.383	0.369	0.361	0.374	10.312
1.5	0.334	0.304	0.324	0.308	0.318	23.741
2.25	0.254	0.245	0.248	0.263	0.253	39.329
3	0.152	0.157	0.153	0.151	0.153	54.192
6	0.158	0.148	0.157	0.162	0.156	53.293

ตารางภาคผนวก ค ที่ 10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัด  
หยาบของสาบเสือที่สกัดโดยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร					% DPPH reduction
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	
0.75	0.200	0.202	0.203	0.185	0.198	40.719
1.5	0.265	0.218	0.236	0.226	0.236	43.405
2	0.161	0.154	0.161	0.155	0.158	62.110
2.5	0.123	0.140	0.149	0.146	0.140	66.427
3	0.118	0.118	0.120	0.116	0.118	71.557
6	0.181	0.189	0.181	0.237	0.197	60.180

ตารางภาคผนวก ค ที่ 11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของวิตามินอี

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร					% DPPH reduction
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย	
0.375	3.886	3.167	3.043	3.454	3.3875	10.841
0.75	0.105	0.123	0.156	0.156	0.135	59.581
1.5	0.061	0.058	0.064	0.067	0.063	81.138
3	0.059	0.061	0.061	0.061	0.061	81.737
6	0.059	0.057	0.056	0.059	0.058	82.653
12	0.051	0.053	0.054	0.055	0.053	84.132

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ภายใต้เงื่อนไขการใช้งาน 10.053 ปี 2013 ใช้ประโยชน์ในการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ก ที่ 12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของ Gallic acid

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร				
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	เฉลี่ย
0.001	0.071	0.064	0.060	0.064	0.065
0.01	0.197	0.199	0.179	0.201	0.194
0.1	0.055	0.057	0.054	0.071	0.059
1	2.615	2.856	2.475	2.792	2.685

ตารางภาคผนวก ก ที่ 13 แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเมื่อนำมาทดสอบกับสารสกัดหยาดของพืช

ความเข้มข้น ของสารสกัด	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร							%CC <sub>50</sub>
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6	ค่าเฉลี่ย	
Dichlo[0.1]	0.112	0.132	0.109	0.114	0.113	0.155	0.1225	17.3414
Dichlo[1]	0.115	0.127	0.197	0.142	0.161	0.186	0.1547	-4.3860
Dichlo[10]	0.067	0.126	0.145	0.117	0.097	0.112	0.1107	-4.1392
Dichlo[100]	0.143	0.146	0.130	0.130	0.146	0.129	0.1373	7.3549
Diclo[1000]	0.098	0.096	0.118	0.094	0.098	0.103	0.1012	31.7139
EtOH[0.1]	0.069	0.102	0.124	0.114	0.115	0.124	0.1080	27.1255
EtOH [1]	0.067	0.184	0.116	0.134	0.110	0.093	0.1173	20.8502
EtOH [10]	0.109	0.116	0.100	0.124	0.109	0.107	0.1108	25.2362
EtOH [100]	0.105	0.101	0.105	0.107	0.099	0.084	0.1002	32.3887
EtOH [1000]	0.069	0.066	0.070	0.066	0.075	0.067	0.0688	35.2775
DMSO	0.076	0.075	0.078	0.071	0.079	0.068	0.0745	49.7301

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ก ที่ 14 แสดงค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านม เมื่อทดสอบกับสารสกัดหยาบจากพืช

ความเข้มข้น ของสารสกัด	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร							ค่าCell
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6	ค่าเฉลี่ย	Viability
Dichlo[0.1]	0.112	0.132	0.109	0.114	0.113	0.155	0.1225	82.6586
Dichlo[1]	0.115	0.127	0.197	0.142	0.161	0.186	0.1547	104.3860
Dichlo[10]	0.067	0.126	0.145	0.117	0.097	0.112	0.1107	104.1392
Dichlo[100]	0.143	0.146	0.130	0.130	0.146	0.129	0.1373	92.6451
Dichlo[1000]	0.098	0.096	0.118	0.094	0.098	0.103	0.1012	68.2861
EtOH [0.1]	0.069	0.102	0.124	0.114	0.115	0.124	0.1080	101.5992
EtOH [1]	0.067	0.184	0.116	0.134	0.110	0.093	0.1173	110.3481
EtOH [10]	0.109	0.116	0.100	0.124	0.109	0.107	0.1108	104.2333
EtOH [100]	0.105	0.101	0.105	0.107	0.099	0.084	0.1002	94.2615
EtOH [1000]	0.069	0.066	0.070	0.066	0.075	0.067	0.0688	64.7225
DMSO	0.076	0.075	0.078	0.071	0.079	0.068	0.0745	700.8467

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้