สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

อิทธิพลของสารสกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงในการทดสอบสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

THE EFFECT OF THE CULTURED MULBERRY ROOT EXTRACTS IN THE ASSAY OF ANTITYROSINASE ACTIVITY AND ANTIBACTERIAL AGAINST *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

T142796

ณัฐดนย์ มีรัตน์
วนิดา สุวรรณรินทร์
วรัญญา แก้วมาตย์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....142796
วัน,เดือน,ปี.....30 พ.ค. 2559
.b.....
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2557

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THE EFFECT OF THE CULTURED MULBERRY ROOT EXTRACTS IN THE ASSAY OF ANTITYROSINASE ACTIVITY AND ANTIBACTERIAL AGAINST *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Nattadon Meerat
Wanida Suwannarin
Waranya Keawmat

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2014

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	อิทธิพลของสารสกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงในการทดสอบสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 The Effect of The Cultured Mulberry Root Extracts in The Assay of Antityrosinase Activity and Antibacterial Against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
ชื่อนักศึกษา	นายณัฐดนย์ มีรัตน์ รหัสนักศึกษา 54051192 นางสาววนิดา สุวรรณรินทร์ รหัสนักศึกษา 54051275 นางสาววรัญญา แก้วมาตย์ รหัสนักศึกษา 54051278
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2557
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2557

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ กรรมการ	
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	อิทธิพลของสารสกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงในการทดสอบสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923			
ชื่อนักศึกษา	นายณัฐดนย์	มีรัตน์	รหัสนักศึกษา	54051192
	นางสาววนิดา	สุวรรณรินทร์	รหัสนักศึกษา	54051275
	นางสาววรัญญา	แก้วมาตย์	รหัสนักศึกษา	54051278
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)			
ภาควิชา	ชีววิทยา			
ปีการศึกษา	2557			
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี			

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหารเหลว MS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยศึกษาการเจริญเติบโตของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญ NAA ที่แตกต่างกัน คือ 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงโดยเปรียบเทียบระหว่างสภาวะให้แสงและไม่ให้แสง พบว่า น้ำหนักรากหม่อนแห้งต่อขวดเพาะเลี้ยงที่มีน้ำหนักรากแห้งมากที่สุด คือ รากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีสารควบคุมการเจริญ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะให้แสง นำสารสกัดหยาบจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงที่สภาวะต่างๆ ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยในการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method พบว่า สารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญ NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะให้แสง สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้มากที่สุด (81.44 ± 0.67%) สารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆ ได้ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วยวิธี thin layer chromatography โดยมีซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และมีสารผสมระหว่างเอทิลอะซิเตตกับเมทานอลในอัตราส่วน 4 : 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ จากการทดลอง ระหว่าง R_f เริ่มต้นจนถึง R_f ประมาณ 0.90 เมื่อส่องภายใต้หลอดรังสียูวีที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบว่า มีแถบเรืองแสงที่แยกได้ทั้งหมด 12 แถบ และพบว่า สารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่ค่า R_f ประมาณ 0.8 สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, การยับยั้งแบคทีเรีย, รากหม่อน

Title	The Effect of The Cultured Mulberry Root Extracts in The Assay of Antityrosinase Activity and Antibacterial Against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
Student Name	Mr. Nattadon Meerat Student ID 54051192
	Miss Wanida Suwannarin Student ID 54051275
	Miss Waranya Keawmat Student ID 54051278
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Academic Year	2014
Advisor	Assist.Prof. Dr.Pana Lohasupthawee

Abstract

Mulberry roots were cultured at 30 °C in liquid MS media. The growth of mulberry roots in liquid MS media with different concentrations of NAA 0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l cultured in the light were comparable to those of mulberry roots cultured under dark condition. The highest increase in dry weight was observed in roots cultured in the MS medium containing NAA 0.5 mg/l under light condition. The antityrosinase and antibacterial properties of methanolic extracts of mulberry roots cultured in different condition were examined. The antityrosinase activities of crude extracts were determined according to dopachrome method. The results showed that crude extracts of roots cultured in the MS medium containing NAA 2.0 mg/l under light condition showed the highest antityrosinase activity (81.44 ± 0.67%). The crude methanolic extracts of cultured mulberry roots in different conditions were partial purified by silica gel thin layer chromatography using ethyl acetate : methanol : : 4 : 1 as mobile phase. The result showed 12 fluorescence-quenching zones between the start and R_f ~ 0.90 in UV–365 nm. It was found the R_f ~ 0.8 showed antibacterial against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Keyword : antibacterial, antityrosinase, Mulberry roots

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษจะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงได้ หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้ ที่คอยให้คำแนะนำ ให้ความรู้เพิ่มเติม สอนเทคนิควิธีการต่างๆ และให้ประสบการณ์ที่ดีในการทำโครงงานพิเศษนี้แก่คณะผู้จัดทำด้วยความกรุณา ตลอดจนแนวทางในการแก้ปัญหาที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ประธานกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ และ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการในการสอบโครงงานพิเศษที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อมาเป็นกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมี รวมทั้งให้ใช้สถานที่เพื่อปฏิบัติงาน ทำให้โครงงานพิเศษจนสำเร็จลุล่วง

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาของผู้จัดทำที่เป็นกำลังใจและให้คำปรึกษาในการทำโครงงานพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณเพื่อนและพี่ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจที่ดีมาตลอด

โครงงานพิเศษฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจในในโครงงานพิเศษและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้ คณะผู้จัดทำขออุทิศโครงงานพิเศษนี้ไว้เป็นแหล่งค้นคว้า อ้างอิงความรู้ให้กับผู้ที่สนใจในอนาคตต่อไป หากมีข้อผิดพลาดประการใดทางคณะผู้จัดทำ ขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

นายณัฐดนย์ มีรัตน์
นางสาววนิดา สุวรรณรินทร์
นางสาววรัญญา แก้วมาตย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข

กิตติกรรมประกาศ..... ค

สารบัญ..... ง

สารบัญตาราง..... ฉ

สารบัญรูป..... ช

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย..... 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

2.1 หม่อน..... 3

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์..... 3

2.1.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของหม่อน..... 4

2.2 เม็ดสีผิว..... 4

2.2.1 กระบวนการสังเคราะห์เมลานิน..... 5

2.2.2 ผลของรังสียูวีต่อการเกิดผิวหมองคล้ำ..... 6

2.2.3 แนวทางการป้องกันผิวหมองคล้ำ..... 7

2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนส..... 9

2.4 สมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส..... 10

2.5 การต้านจุลชีพ..... 12

2.5.1 Dilution Susceptibility Test..... 12

2.5.2 Agar Diffusion Test..... 13

2.6 เชื้อ *Staphylococcus aureus*..... 14

2.6.1 ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ..... 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6.2 *Staphylococcus aureus* ในสิ่งแวดล้อม 15

2.6.3 ความเกี่ยวข้องระหว่าง *Staphylococcus aureus* กับมนุษย์ 15

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 18

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 24

4.1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรากหม่อน 24

4.2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส 26

4.3 การแยกสารประกอบต่างๆของสารสกัดหยาบจากรากหม่อนด้วยวิธี Chromatography 28

4.4 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากรากหม่อนโดย วิธี Disc Diffusion 31

4.5 วิจารณ์ผลการทดลอง 35

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 37

เอกสารอ้างอิง 39

ภาคผนวก 43

ภาคผนวก ก 44

ภาคผนวก ข 47

ภาคผนวก ค 49

ภาคผนวก ง 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ตัวอย่างรายชื่อพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส..... 11

4.1 แสดงค่าเฉลี่ยของน้ำหนักรากแห้งที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน ในอาหารสูตรต่างๆ ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส..... 24

4.2 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน ในอาหารสูตรต่างๆที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส..... 26

4.3 แสดงค่า R_f เฉลี่ยของสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35วัน ในอาหารสูตรต่างๆ ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศเซลเซียส..... 29

4.4 แสดงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เกิดการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของสารประกอบจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 35 วัน ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส..... 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

ภาพที่	หน้า
2.1 แสดงลักษณะต้นหม่อน ผลหม่อน และรากหม่อน	3
2.2 แสดงกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน	5
2.3 แสดงผลของรังสียูวีต่อการเกิดผิวหมองคล้ำ	6
2.4 แสดงโครงสร้างสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	9
2.5 ภาพแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*	14
4.1 แสดงแผนภูมิค่าเฉลี่ยของน้ำหนักรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 35 วัน ที่สภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสง ตลอด 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	25
4.2 แสดงแผนภูมิเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 วันในอาหารสูตรต่างๆ ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	27
4.3 แสดงโครมาโตแกรมของสารประกอบลำดับต่างๆ จากสารสกัดรากหม่อนโดยวิธี TLC ที่ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร	30
4.4 แสดงการเกิดบริเวณโซนใสรอบแผ่นดิสก์ที่มีการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของสารประกอบจากสารสกัดรากหม่อนที่มีค่า R_f ~ 0.8	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ประเทศไทยได้รับผลกระทำจากสภาวะโลกร้อนเป็นอย่างมาก จึงส่งผลกระทบโดยตรงต่อผิวหนังของมนุษย์ คือ ผิวหนังมีกลไกตามธรรมชาติในการป้องกันรังสี UV A ซึ่งจะผ่านเข้าถึงผิวหนังชั้นหนังแท้ด้วยการผลิตเมลานิน (melanin pigment) เพื่อให้ผิวหนังมีความสามารถในการปกป้องรังสี UV ได้ดีขึ้น โดยรังสี UV เป็นตัวการสำคัญที่ส่งผลทำให้ผิวหนังมีสีคล้ำลง เกิดริ้วรอยก่อนวัย มีความเสื่อมโทรม และเกิดโรคต่างๆได้ เช่น มะเร็งผิวหนัง เป็นต้น ทั้งยังในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ผิวขาวกำลังได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย โดยคนไทยส่วนใหญ่และวัยรุ่นมีค่านิยมที่ว่า ผิวสวย คือ ผิวที่ขาวใสและอมชมพู สารทำให้ผิวขาวที่ใช้ในเครื่องสำอางมีหลายกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibitor) กลุ่มที่ทำให้เซลล์ผิวชั้นนอกสุดหลุดออก (exfoliation) และกลุ่มอื่นๆ ซึ่งผลิตภัณฑ์เพื่อผิวขาวที่ขายตามท้องตลาดส่วนใหญ่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ หากมีการใช้ที่ไม่ถูกต้องหรือเหมาะสมอาจก่อให้เกิดการ ระคายเคืองและก่อให้เกิดอันตรายได้เมื่อใช้ไม่ถูกวิธีหรือใช้ในความเข้มข้นที่สูงเกินกว่าที่กำหนด

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีโดปาโครม (dopachrome method) ทดสอบได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ dopachrome ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส กับ L-3,4-diphenylphenylalannin (L-dopa) ปกติเอนไซม์ไทโรซิเนส จะเปลี่ยน L-dopa ไปเป็น o-diphenol และ o-quinone ตามลำดับ ทำให้เกิดกระบวนการสร้างสี ถ้ามีสารชนิดหนึ่งมายับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจะทำให้ L-dopa ไม่สามารถเปลี่ยนเป็น o-diphenol และ o-quinone ได้ จึงไม่เกิดการสร้างสีขึ้น

เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อาศัย และก่อให้เกิดโรคทางผิวหนังของมนุษย์ เช่น การอักเสบบริเวณเนื้อเยื่อ โรคฝี และโรคผิวหนังพุพอง อีกทั้งยังเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดสิว เพราะเหตุนี้จึงมีการใส่สารที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่างๆ ทำให้ผู้ที่ใช้ผลิตภัณฑ์ไม่เกิดอาการแพ้และระคายเคืองต่อผิวหนัง

การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของสารสกัดหยาบจากรากหม่อนด้วยวิธี Disc diffusion หากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จะเกิดบริเวณที่ยับยั้งขึ้นรอบแผ่นดิสก์ ดังนั้น โครงงานพิเศษนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในห้องปฏิบัติการด้วยสารสกัดหยาบจากรากหม่อนด้วยวิธีโดปาโครม และทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากรากหม่อน อีกทั้งยังหาแนวทางการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินโดยสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรากหม่อน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า

1.2.2 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดได้จากรากหม่อน ในสภาวะต่างๆ

1.2.3 ศึกษาวิธีการแยกสารประกอบของสารสกัดหยาบจากรากหม่อน เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1.2.4 ทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของสารประกอบต่างๆจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม่อนในอาหารแข็งสูตร MS ประมาณ 1 เดือน จากนั้นนำรากหม่อนที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 4 สูตร คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 35 วัน จำนวน 5 ซ้ำ จากนั้นนำรากหม่อนมาทำให้แห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำรากหม่อนแห้งมาบดให้ละเอียดเป็นผง และนำรากหม่อนผงแห้งมาสกัดด้วยวิธี soxhlet extraction แล้วนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี evaporation จากนั้นนำมาศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี dopachrome และศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากหม่อน

1.4.2 ทราบประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในแต่ละสูตรอาหาร

1.4.3 สามารถแยกสารประกอบต่างๆออกจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนได้

1.4.4 ทราบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หม่อน

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

หม่อน หรือ มัลเบอร์รี่ (*Morus rotunbiloba*) จัดอยู่ในวงศ์ Moraceae โดยทั่วไปหม่อนมีอยู่หลายพันธุ์ด้วยกันและนิยมปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ซึ่งมีลักษณะเป็นไม้พุ่มยืนต้นสูง 2-5 เมตร (ภาพที่ 2.1A) ใบเดี่ยวเรียงสลับ ขอบใบไม่มีหยักหรือมีหยักเล็กน้อย และปลายใบแหลม ขนาดใบกว้าง 8-14 เซนติเมตร ยาว 12-16 เซนติเมตร ผิวใบมีลักษณะเลื่อมมัน ไม่มีขน อ่อนนุ่ม (วันดี , 2549) ออกดอกเป็นช่อสีครีมอมเขียว อยู่บริเวณซอกใบ ดอกขนาดเล็ก แยกเพศแต่อยู่บนต้นเดียวกัน (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2554) เมื่อดอกตัวเมียได้รับการผสมจะเกิดเป็นผลซึ่งมีลักษณะเป็นทรงกระบอกป้อมๆ (ภาพที่ 2.1B) ขนาดกว้าง 0.5-1 เซนติเมตร ยาว 2-3 เซนติเมตร ผลนิ่มอวบน้ำ เมื่อสุกจะมีสีแดงอมม่วง (สวนพฤษศาสตร์คลองไผ่, 2554) รากประกอบด้วยรากแขนงซึ่งทำหน้าที่ยึดลำต้น และกิ่งให้ทรงตัวอยู่ได้ ส่วนรากฝอยมีหน้าที่ดูดซึมอาหารและน้ำจากดิน (อุไรวรรณ, 2554) (ภาพที่ 2.1C)

ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะต้นหม่อน (A), ผลหม่อน (B), รากหม่อน (C)
(ที่มา : http://www.oknation.net/blog/jaopad//09/03/2013entry-1)
(ที่มา : http://www.vcharkarn.com/varticle/41577)
(ที่มา : http://frynn.com/หม่อน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของหม่อน

2.1.2.1 ฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ หม่อน เป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยับยั้งกระบวนการอักเสบ (Park และคณะ, 1995) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อราได้อีกด้วย (Du และคณะ, 2003) จากการศึกษาของ Sohn และคณะ ในปี 2004 พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเปลือกรากหม่อนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ (MIC) *Streptococcus mutans* อยู่ในช่วงระหว่าง 5-30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้การศึกษาของ Du และคณะ ในปี 2003 พบว่า เปลือกรากหม่อนมีฤทธิ์ในการต้านการทำงานของเชื้อ Herpes Simplex type 1 virus (HSV-1) โดยมีค่า IC_{50} = 1.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีสารออกฤทธิ์ คือ leachianone G

2.1.2.2 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและช่วยให้ผิวขาว (Skin Whitening agent) จากการศึกษาของ Wang และคณะ ในปี 2006 ที่ได้คัดเลือกสมุนไพรที่นิยมนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ช่วยให้หน้าขาวใส โดยได้นำส่วนของใบหม่อนมาทำการศึกษา ซึ่งพบว่าสารสกัด 95% เอทานอลจากใบหม่อนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส 70.3 ± 0.2% และยับยั้งการสร้างเมลานิน 16.3 ± 4.8% และในปี 2002 Lee และคณะ ซึ่งทำการศึกษาหม่อนในส่วนของใบและเปลือกราก พบว่า สารสกัดด้วย 85% เมทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ DOPA oxidase และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

2.2 เม็ดสีผิว

การเกิดเม็ดสีผิวตามธรรมชาติ เม็ดสีผิว (melanin) จะถูกสร้างจากกลุ่มเซลล์ที่อยู่ในชั้นผิวหนังกำพร้าบริเวณ stratum basal ที่มีชื่อว่า เมลาโนไซต์ (melanocytes) จากนั้น เมลานินที่อยู่ในรูปของเมลาโนโซม (melanosome) จะถูกส่งทางเดนไดรต์ (dendrites) ของเมลาโนไซต์ไปยังเคราติโนไซต์ (keratinocyte) ทำให้มีการแสดงออกของสีผิว ซึ่งความเข้มของสีผิวจะขึ้นกับความหนาแน่นของเมลาโนไซต์ จำนวน ขนาด และการกระจายของเมลาโนโซม ที่อยู่ในเคราติโนไซต์ เมลานินมี 2 รูปแบบได้แก่ ฟีโอเมลานิน (pheomelanin) เป็นเมลานินที่ให้สีเหลืองถึงแดง และยูเมลานิน (eumelanin) เป็นเมลานินที่ให้สีน้ำตาลถึงดำ เมลานินจะทำหน้าที่ในการป้องกันรังสียูวี โดยจะดูดซับแสงยูวี และกำจัดสารอนุมูลอิสระในไซโทพลาสซึมของเซลล์ผิวหนัง (Slominski และคณะ, 2007)

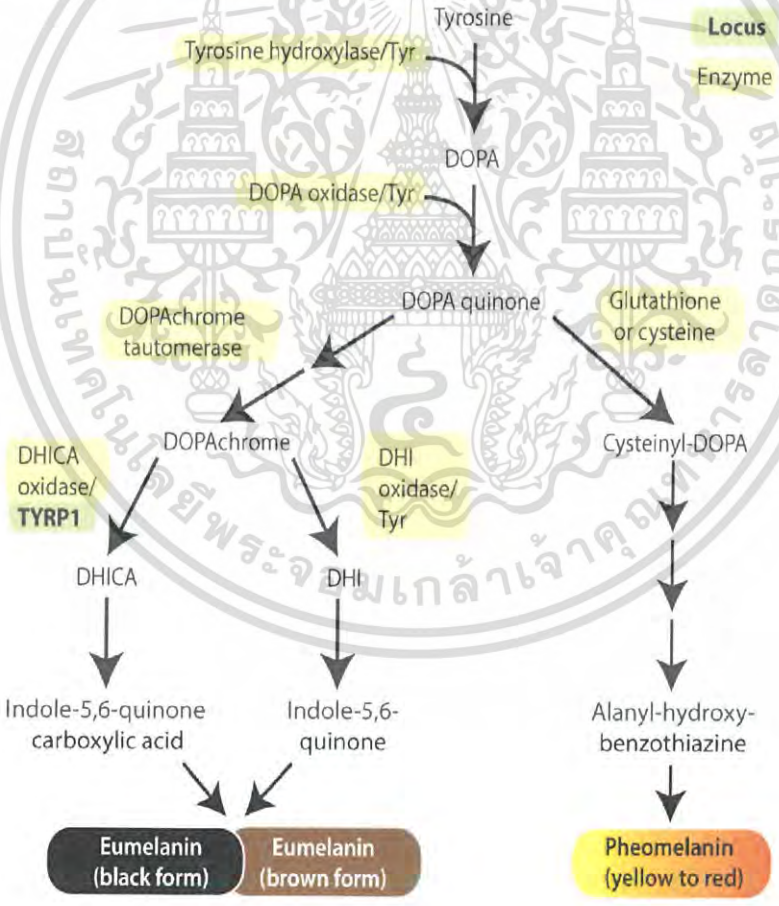
แสงแดดเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาผิวหมองคล้ำโดยเฉพาะรังสียูวีบี เนื่องจากรังสียูวีบีมีคลื่นความถี่อยู่ในช่วงระหว่าง 290-320 นาโนเมตร (มัณฑนา และคณะ, 2552) จึงก่อให้เกิดผลเสียต่อผิวหนังชั้นในบริเวณหนังกำพร้า โดยจะไปเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มการสังเคราะห์เมลานินหรือเม็ดสีผิว (จินดาพร, 2551) เนื่องจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมลานินมีหน้าที่ดูดซับรังสียูวีในแสงแดดเพื่อปกป้องผิวหนังไม่ให้เกิดการเผาไหม้หรือบวมแดง (พิมพร, 2544)

2.2.1 กระบวนการสังเคราะห์เมลานิน

การสังเคราะห์เมลานิน เกิดโดยการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มี copper เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไทโรซีน (Tyrosine) ซึ่งเป็นสาร monophenol ให้เป็น DOPA ซึ่งเป็นสาร diphenol และเปลี่ยน DOPA ไปเป็น dopaquinone และเกิดปฏิกิริยาต่อไปอีกหลายขั้นตอนจนกระทั่งได้เป็นเมลานิน โดยเมลานินมี 3 ชนิด คือ ฟีโอเมลานิน (pheomelanin) มีสีขาว-ชมพู ยูเมลานิน (eumelanin) มีสีน้ำตาล-ดำ และเมลานินผสม (mixed melanin) คือ มีเม็ดสีผิวทั้งสองผสมกัน (พิมพร, 2544) สามารถอธิบายตามกลไกที่แสดงในภาพที่ 2.2

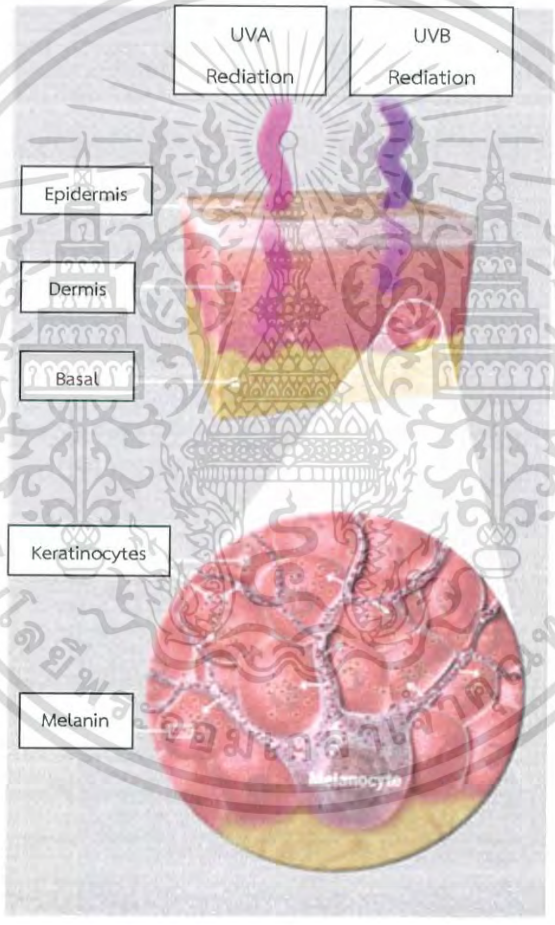


ภาพที่ 2.2 กระบวนการสังเคราะห์เมลานิน (Melanin Pathway)
(ที่มา : https://adapaproject.org/doggenetics/tiki-index.php)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ผลของรังสียูวีต่อการเกิดผิวหมองคล้ำ

กระบวนการสังเคราะห์เมลานินนี้ เกิดขึ้นที่บริเวณหนังกำพร้าชั้นล่างสุด (stratum basale) โดยเซลล์สร้างสีผิว (melanocytes) เมลานินจะถูกสร้างไว้รอบนิวเคลียสของเมลาโนไซด์ และถูกเก็บไว้ในถุงหุ้มที่เรียกว่าเมลาโนโซม (melanosome) ดังแสดงในภาพที่ 2.3 (มัณฑนา, 2552) เมื่อมีปัจจัยมากระตุ้น เช่น แสงแดด รังสียูวี ยาคุมกำเนิด ฮอร์โมน เป็นต้น ก็จะทำให้เมลาโนไซด์ผลิตเมลานินเพิ่มมากขึ้น (พลอยไพลิน, 2553) และส่งต่อเมลานินให้กับเซลล์เคราติโนไซด์ (keratinocytes) ที่อยู่ด้านบนของผิวชั้นหนังกำพร้าผ่านทางเดนไดรต์ส่งผลให้ผิวหนังมีสีคล้ำขึ้น (มัณฑนา, 2552)



ภาพที่ 2.3 แสดงผลของรังสียูวีต่อการเกิดผิวหมองคล้ำ
(ที่มา : http://ehp.niehs.nih.gov/-120a308)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 แนวทางการป้องกันผิวหมองคล้ำ

จากปัจจัยในการกระตุ้นให้เกิดผิวหมองคล้ำข้างต้น เพื่อการป้องกันการสร้างเมลานินจึงเป็นวิธีที่สำคัญในการป้องกันความหมองคล้ำของผิว ซึ่งสามารถทำได้ด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ การปกป้องผิวหนังจากแสงแดดโดยการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งจะช่วยควบคุมการสังเคราะห์เมลานินหรือการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ช่วยเร่งการผลัดเซลล์ผิว กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน และอีลาสตินในชั้นผิวหนัง (นรินทร์, 2554)

สารจากธรรมชาติที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เพื่อลดความหมองคล้ำของผิวหนัง

เป็นสารที่มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีโครงสร้างของสารที่แตกต่างกันออกไป ดังแสดงในภาพที่ 2.4 ได้แก่

1. อาร์บูติน (Arbutin) เป็นอนุพันธ์ของไฮโดรควิโนนที่สกัดจากใบของต้นแบร์เบอรี่ (bearberry) แต่มีความคงตัวมากกว่าไฮโดรควิโนน และไม่เกิดผลข้างเคียงในระยะยาว อาร์บูตินมีคุณสมบัติช่วยปรับสีผิวให้ขาวเนื่องจากมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ RNA และสามารถยับยั้งการสร้างเมลานินโดยไม่มีความเป็นพิษต่อเมลาโนไซต์ (มัณฑนา, 2552)

2. กรดโคจิก (Kojic acid) (ภาพที่ 2.4) เป็นสารที่สร้างขึ้นมาจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยจับกับ copper ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส (นรินทร์, 2554) สารนี้อาจทำให้ระคายเคืองได้ นิยมใช้ในความเข้มข้น 1-4% (พิมพร, 2544)

3. วิตามินซี (Ascobic acid) มีฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ โดยรีดิวซ์ diphenol ซึ่งกลไกนี้จะใช้เวลาประมาณ 4-12 สัปดาห์ โดยใช้ประมาณที่สูงแต่ไม่เกิน 20% แต่เพื่อให้ได้ผลดีจะใช้ร่วมกับสารอื่น โดยเฉพาะกรดลอกผิวในกลุ่ม AHA เนื่องจากใช้ในปริมาณที่สูง ดังนั้นผลข้างเคียงที่พบ คือ อาจทำให้ระคายเคืองได้ (มัณฑนา, 2552)

4. สารในกลุ่ม Hydroxycinnamic acid มีหลายตัว เช่น p-coumaric acid, ferulic acid, N-feruloyl serotonin และ N-(p-coumaroyl) serotonin เป็นต้น มีรายงานการศึกษา พบว่า p-coumaric acid ที่สกัดได้จากใบของต้นโสมมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (mushroom tyrosinase) สำหรับ ferulic acid มีฤทธิ์ยับยั้งการออกซิเดชันของ L-DOPA ซึ่งคะตะลิสต์ได้โดยเอนไซม์ไทโรซิเนส และ N-feruloylserotonin ส่วน N-(p-coumaroyl) serotonin จากเมล็ดดอกคำฝอยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน (Roh และคณะ, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

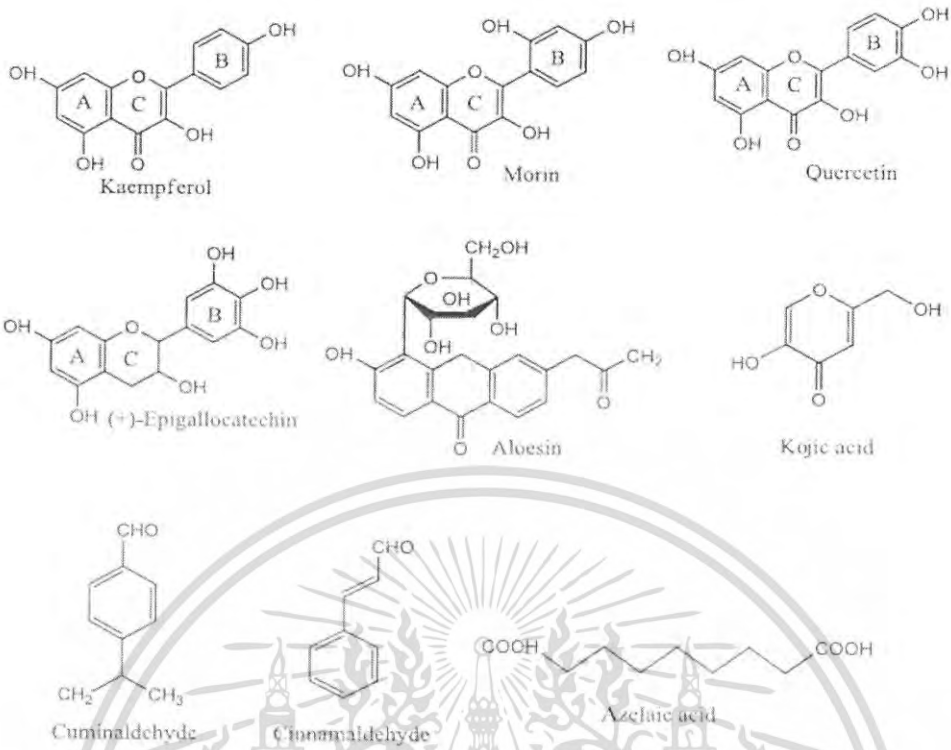
5. อโลซิน (Aloesin) หรือ (2-acetonyl-8-D-glucopyranosyl-7-hydroxy-5-methyl chromone) (ภาพที่ 2.4) เป็นสารสกัดจากว่านหางจระเข้ จัดเป็น glycosylated และ chromone มีโครงสร้างค่อนข้างใกล้เคียงฟลาโวนอยด์ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเมื่อใช้ร่วมกับอาร์บูตินจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีมากขึ้น (Piao และคณะ, 2002)

6. สารสกัดจากถั่วเหลือง (Soybean Extract) เป็นสารสกัดจากถั่วเหลือง ประกอบด้วย serine protease ขนาดเล็ก เช่น Bowman Birk inhibitor (BBI) และ soybean trypsin inhibitor (STI) ซึ่งยับยั้งกระบวนการ protease activity receptor-2(PAR-2) pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับการ express keratinocytes การรบกวน protease activity receptor-2(PAR-2) pathway จะส่งผลให้เกิดการทำลายเม็ดสีโดยไปลด phagocytosis ของเมลาโนโซมโดยเคราติโนไซต์ และลดการนำส่งเมลานิน (นภัทร, 2555)

7. โพลีฟีนอล (Polyphenols) เป็นสารเคมีที่พบมากในธรรมชาติ และรู้จักกันในรูป tannins เพราะเป็นสารที่ให้สีในดอกไม้ มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มฟีนอลิก (phenolic) หรืออนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เช่น artocarbene, chlorophorin และ norartocarpanone ซึ่งสามารถป้องกันการสร้างเม็ดสีที่เกิดจากกระบวนการ auto-oxidation processes (Nery และคณะ, 2004) กรดแกลลิค (gallic acid) และอนุพันธ์ที่มีโครงสร้างเป็นแบบโซ่สายยาวของหมู่ alkyl สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (Kim, 2007) ส่วน procyanidins เป็น polymer ของ catechins ที่พบได้ในชาและผลไม้ เช่น แอปเปิล และองุ่น ซึ่งมีการศึกษาพบว่าสาร procyanidins จากผลแอปเปิลมีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีผิวโดยไปลดการสร้าง DOPA ที่ เมลาโนไซต์ และ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine positive melanin ในเซลล์ผิวหน้า ซึ่งเป็นผลให้มีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และreactive oxygen species (ROS) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแบ่งตัวของเมลาโนไซต์ (Shoji และคณะ, 2005)

8. สารสกัดอื่นๆ (Other Compounds) เช่น isoimperatorin และ imperatorin ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จาก แปะจี หรือโกศสอ (*Angelica dahurica*) มีข้อมูลว่ามีความแรงในการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่า arbutin (Lin และคณะ, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 แสดงโครงสร้างสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Kima และ Uyama, 2005)

2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

เป็นวิธีการวัดความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ส่งผลให้ในปฏิกิริยาไม่ได้ผลิตภัณฑ์ การทดสอบฤทธิ์ทำโดยใช้สารตั้งต้น (substrate) ของปฏิกิริยา คือ L-DOPA ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ mushroom tyrosinase ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 6.8 จะได้สารจากการเกิดปฏิกิริยา คือ Dopachrome สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส คำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ Tyrosinase Inhibition} = \frac{\text{control} - \text{sample}}{\text{control}} \times 100$$

Control = ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของตัวควบคุม

Sample = ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (นภัทร, 2555)

สารสกัดจากสมุนไพรหลายชนิด มีรายงานถึงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยแสดงในตารางที่ 2.1

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของขู่เชิง (*Sophora Flavescens*) ซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่ว โดยใช้ส่วนของรากและใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด พบว่า สารสกัดจากขู่เชิง ซึ่งได้แก่ Sophraflavanone G และ kuraridin มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ดอย่างมีนัยสำคัญ และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.6 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Kojic Acid; IC_{50} = 20.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (Kim และคณะ, 2003)

การศึกษาสารสกัดจากเมล็ดลองกอง (Longan seeds) โดยใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัด พบว่า สารสกัดจากเมล็ดลองกองมีองค์ประกอบของ corilagin, gallic acid และ ellagic acid ซึ่งสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี (IC_{50} = 2.9-3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (Rangkadilok และคณะ, 2007)

การศึกษาและประเมินฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและการยับยั้งจุลชีพของพืชสกุล Macaranga ซึ่งเป็นพืชที่พบได้ในประเทศไทยจำนวน 4 ชนิด พบว่า *M. triloba* มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสูงโดยเฉพาะเชื้อแกรมบวกนอกจากนี้ยังพบว่า *M. pruinosa* มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด (Lim และคณะ, 2009)

การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดลิ้นจี่ (*Lichi sinesis* Sonn.) โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดแตกต่างกัน ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดลิ้นจี่ที่ใช้เอทานอล 50% เป็นตัวทำละลายมีคุณสมบัติในการยับยั้งออกซิเดชันและเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบสารกลุ่ม ฟีนอลิก เช่น gallic acid และ procyanidine B2 เป็นต้น (Prasad และคณะ, 2009)

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีจากสารสกัด chestnut flower พบว่า เมื่อใช้เอทานอล เป็นตัวทำละลายในการสกัด มีปริมาณสารฟีนอลิกรวม เท่ากับ 467.92 ± 60.45 mg./GAE นอกจากนี้ยังพบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีได้ดีเมื่อเทียบกับ albutin (Sapkota และคณะ, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างรายชื่อพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (นภัทร, 2555)

ชื่อสมุนไพร	ส่วนที่นำมาใช้	สารละลายที่ใช้สกัด	สารสำคัญ	ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส
Carthamus tinctorius	เมล็ด	เมทานอล	N-feruloyserotonin, p-coumarory	√
Cinamomum cassia	ลำต้น	เอทานอล	cinnamic acid	√
Dimocarpus longan	เมล็ด	เมทานอล	corilagin gallic acid ellagic acid	√
Litchi sinensis Sonn.	เมล็ด	เอทานอล 50%	galactic acid, procyanidin B2, gallacocatechin, epicatechin	√
Lentinus lepideus	เนื้อผล	น้ำ	beta-carotene linoleic acid	√
Morus alba Linn.	ราก	เอทานอล	maclurin rutin morin isoquercitrin resveratrol	√
Morinda citrifolia	เมล็ด	เอทานอล 50%	ursolic acid	√
Pleurotus ostreatus	เนื้อผล	เอทานอล	NA	√

2.5 การต้านจุลชีพ (Antimicrobial Activity)

จุลชีพเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อต่างๆหลายชนิด เช่น โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ โรคติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์ โรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร รวมทั้งโรคติดเชื้อทางผิวหนัง เป็นต้น ซึ่งก่อให้เกิดการเจ็บป่วยและเสียชีวิต นอกจากนี้ จุลชีพบางชนิดมีความไวต่อการดื้อยาที่ใช้ในการรักษาปัจจุบัน เช่น *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* (Tenover, 2006) มีรายงานพบว่า สารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ เช่น สารกลุ่มฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพมากขึ้น (Bylka และ Matlawska, 2004)

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Antibacterial Susceptibility Test) (Das และคณะ, 2010) สำหรับวิธีทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียสามารถทำได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth medium) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar medium) โดยมีวิธีหลักอยู่ 2 รูปแบบ ได้แก่

2.5.1 Dilution Susceptibility Test (Das และคณะ, 2010)

เป็นการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยการเจือจางสารที่ทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้จะเป็นการทดสอบในเชิงปริมาณเพราะสามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำลายเชื้อได้ นิยมใช้ทดสอบเชื้อที่เจริญได้ช้า ใช้ทดสอบยืนยันผลวิธี diffusion ที่ให้ความไวปานกลางหรือดื้อยาเพื่อว่าจะสามารถใช้สารที่ทดสอบนั้นในความเข้มข้นสูงๆ ได้และใช้ทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ (anaerobe) หลักการโดยทั่วไปของวิธีทดสอบแบบ broth และ agar dilution susceptibility test จะคล้ายคลึงกัน โดยเจือจางสารทดสอบใน medium ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นจึงใส่เชื้อลงในบน medium ภายหลังการบ่มเพาะให้ดูค่า MIC โดยสังเกตความขุ่นหรือใสของ broth และมีหรือไม่มีเชื้อเจริญขึ้นบน agar

1. Broth dilution test เป็นการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสารทดสอบที่ละเอียดวิธีหนึ่ง การทดสอบนี้จะทำให้ทราบทั้ง MIC และ MBC ของสารทดสอบนั้นๆกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้ คือ เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีสารทดสอบในปริมาณต่างๆกันผสมอยู่และสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ วิธีการนี้ยังสามารถแบ่งเป็น macrodilution test และ microdilution test

1.1 Broth Macrodilution test ทดสอบในหลอดทดลองโดยทำการเจือจางที่จะทดสอบ (stock solution) ด้วยตัวเจือจางหรือ broth ในลักษณะลดลงทุกๆ 2 เท่า (2-fold serial dilution) ไปเรื่อยๆ และต้องมีหลอดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดของตัวอย่างด้วยและเตรียมเชื้อที่ทดสอบให้ได้ขนาดโดยอาจใช้วิธีเทียบความขุ่นกับ McFarland เบอร์ 0.5 หรืออาจใช้การวัดความขุ่นด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

spectrophotometer แล้วเจือจางลงเพื่อให้ได้ขนาดเชื้อที่ต้องการและนำไปบ่มเพาะร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารทดสอบที่เจือจางแล้ว

1.2 Broth Microdilution test ทำใน microtiter plate 96-well โดยเจือจาง stock solution ด้วย broth แบบ 2-fold serial dilution มีหลุมควบคุมเป็น broth ที่ไม่มีสารที่ทดสอบในแต่ละหลุมจะมีปริมาตรเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เชื้อที่ปรับขนาดแล้ว (ใช้เชื้อประมาณ 105 CFU/มล.) 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วปิดฝาก่อนนำไปบ่มเพาะ อ่านค่า MIC โดยดูความขุ่นด้วยตาเปล่าหรืออาจใช้สารบางอย่างที่สามารถบ่งชี้ การเจริญของเชื้อได้เพื่อให้อ่านค่าได้ง่ายขึ้น ซึ่งวิธีการนี้สามารถทำได้รวดเร็ว แม่นยำ และเหมาะสมในการนำมาใช้ศึกษาสมุนไพร เนื่องจากสามารถลดการรบกวนการอ่านผลเนื่องจากสีและความขุ่นของตัวอย่างได้

2. Agar dilution test เป็นการทดสอบความไวของเชื้อแบบปริมาณวิเคราะห์โดยมีหลักการทดสอบคล้ายคลึงกับ Broth dilution method ต่างกันเพียงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น กล่าวคือ ทำการทดสอบโดยการเจือจางสารทดสอบในอาหารวุ้นและถ่ายเชื้อลงบนผิวของอาหารวุ้น ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานเดียวกันได้ วิธีนี้สามารถหาค่า MIC ได้โดยค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ วิธีการทำ agar dilution test ทำได้โดยนำ stock solution มาเจือจางด้วยน้ำหรือตัวเจือจางที่เหมาะสมจนได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ แล้วจึงใส่ใน agar medium ซึ่งหลอมไว้ (45-50 องศาเซลเซียส) การเตรียมขนาดเชื้อ ด้วยวิธีการเดียวกับที่ทำใน broth dilution test แต่เจือจางขนาดเชื้อลงให้ได้ขนาดเชื้อซึ่งเมื่อแตะลงบน agar แล้วให้ได้เชื้อประมาณ 1×10^4 ตัวต่อจุด เมื่อแตะเชื้อลงบน agar ทดสอบแล้ว ต้องทิ้งให้ซึมหมดก่อนคว่ำ plate นำไปบ่มอุณหภูมิที่เหมาะสม เช่น 35-37 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas maltophilia, Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* เป็นต้น นาน 16-20 ชั่วโมง (เชื้อที่เจริญช้าอาจบ่มมากกว่า 48 ชั่วโมง) แล้วอ่านค่า MIC ที่ความเข้มข้นจะต้องไม่มีเชื้อขึ้นเลย

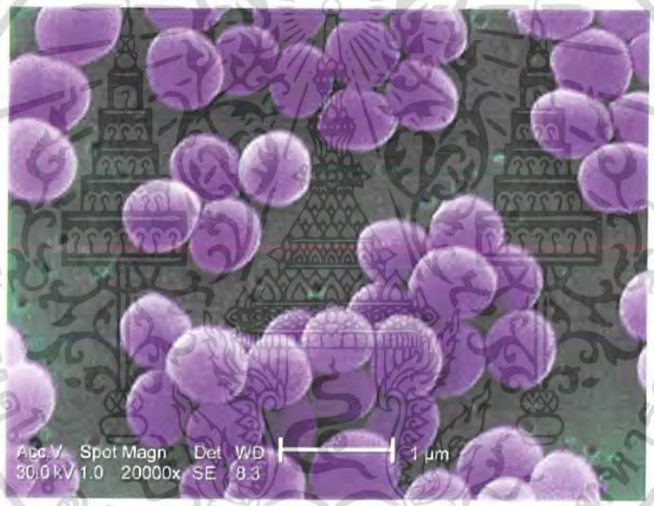
2.5.2 Agar diffusion Test (Das และคณะ, 2010)

วิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุดคือ Disc diffusion method (Kirby-Bauer) เนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่นๆ วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพสามารถบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ ซึ่งไม่อาจทราบค่า MIC หรือ MBC ได้ จึงไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญช้าและเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ หลักการทั่วไป คือการหยดสารทดสอบลงบนแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อ (spread) ในจำนวนที่เหมาะสม แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสไม่มีโคโลนีของเชื้อรอบๆแผ่นดิสก์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแปรตามขนาดของ inhibition zone วิธีการนี้ โดยทั่วไปมักทำการทดสอบตัวอย่างเพียงความเข้มข้นเดียวและเป็นการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อของตัวอย่างในเบื้องต้น นอกจากขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของสารที่ทดสอบแล้วยังอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพร ความสามารถในการละลาย หรือซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของสมุนไพร อัตราการเจริญของเชื้อภาวะความเป็นกรด-ด่างและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อ สำหรับแหล่งรองรับสารที่ศึกษา (drug reservoir) ที่ใช้มักใช้เป็นกระดาษซับวงกลม (filter paper dish) หรืออาจเรียกว่า dish sensitivity test หรือ อาจเป็นหลุมที่เจาะลงในเนื้ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Agar well diffusion)

2.6 เชื้อ *Staphylococcus aureus* (Kluytmans J และคณะ, 1997)



ภาพที่ 2.5 ภาพแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*
(ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus)

2.6.1 ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม มักพบเป็นคู่เกาะกันด้วยสายสั้นๆ เป็นกิ่งหรือเป็นลักษณะพวงองุ่น (ภาพที่ 2.5) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศและมีอากาศ (facultative anaerobes) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ 15-45 องศาเซลเซียส และเจริญได้ในระดับความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เช่น การติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อ และโรคอาหารเป็นพิษ (Todar, 2005) มีการสร้างเม็ดสี (pigment) เหลืองในโคโลนี (Rosenbach, 1884)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Staphylococcus aureus จัดอยู่ใน Family Micrococcaceae เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ใช้กลูโคสได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศ และ ไม่มีอากาศ เซลล์เรียงตัวเป็นกลุ่มทำให้ดูเหมือนพวงองุ่น บางครั้งอยู่เป็นคู่หรือเป็นสาย โคโลนีมีสีเหลืองทองแต่บางครั้งอาจพบเป็นสีครีมได้ และมีความสามารถในการทำให้พลาสมาแข็งตัวเนื่องจากการสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลส (coagulase) (Davis และคณะ, 1980)

2.6.2 *Staphylococcus aureus* ในสิ่งแวดล้อม

มักพบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในคนและสัตว์เลือดอุ่นชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะในคนที่มีผิวหนังผิดปกติ เช่น เป็นฝี แผลผ่าตัด และแผลอักเสบ เป็นต้น เชื้อนี้ยังแยกได้จากสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข เป็ด ไก่ โค และกระบือ เป็นต้น

Staphylococcus aureus มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอกได้ดีมากทำให้สามารถมีชีวิตอยู่ได้ภายนอกร่างกายสัตว์ได้ดี มักก่อให้เกิดน้ำเน่าเสียแบบระยะยาว (Borrego และคณะ, 1987) และสามารถพบเชื้อแพร่กระจายอยู่รอบสิ่งแวดล้อมในโรงงานผลิตอาหาร เช่น ในโรงงานบรรจุหีบห่อสัตว์ปีก (Mead และ Adam, 1986)

2.6.3 ความเกี่ยวข้องระหว่าง *Staphylococcus aureus* กับ มนุษย์

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคที่สำคัญที่ผิวหนัง เช่น ฝี การติดเชื้อของแผลผ่าตัด และแผลอักเสบ เป็นต้น พบได้ทั้งคนที่กำลังเป็นโรคและคนที่มีสุขภาพดี นอกจากนี้ *Staphylococcus aureus* ยังพบตามส่วนอื่นๆของร่างกายได้อีก เช่น ผิวหนัง ในจมูก คอ ผม และบางครั้งอาจพบในอุจจาระด้วย จมูกเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนในอาหารโดยพบในจมูกร้อยละ 10-40 และพบในโพรงจมูกมีปริมาณเชื้อมากกว่า 10^3 CFU/swab (Varnam และ Evan, 1991)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

N. Baurin และคณะ (2002) ทำการศึกษาขั้นต้นเกี่ยวกับพืชเขตร้อนบางชนิดที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อผิวขาว โดยได้ทำการศึกษาพืชเขตร้อน 67 ชนิด แบ่งเป็น 38 วงศ์ ผลของการทดสอบในหลอดทดลองด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด พบว่า มีสารสกัดจากพืช 5 ชนิด คือ *Strephnodendron barbatimao*, *Portulaca pilasa*, *Cariniana brasiliensis*, *Entada africana* และ *Prosopis africana* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (มีผลการยับยั้งมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของชุดควบคุมเชิงบวก คือใบหม่อน (*Morus alba*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nam-Ho Shin และคณะ (1998) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ดด้วย Oxyresveratrol โดย Oxyresveratrol (2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) เป็นสารสำคัญที่พบในหม่อน (*Morus alba* L.) พบว่า Oxyresveratrol สามารถยับยั้งไม่ให้เอนไซม์ไทโรซิเนสออกซิไดซ์ Dopa ซึ่งเป็นกระบวนการหลักในการสร้างเมลานินของร่างกาย ซึ่ง oxyresveratrol ความเข้มข้น 0.3 ถึง 0.5 ไมโครลิตร สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Arabshahi (2007) ศึกษาคุณสมบัติสารแอนติออกซิแดนต์ของสารละลายต่างๆที่สกัดได้จากใบหม่อนสายพันธุ์ *Morus indica* โดยทำการสกัดในตัวทำละลาย 3 ตัว คือ เมทานอล อะซีโตน และน้ำ พบว่าการสกัดในเมทานอลได้ผลดีที่สุด โดยที่การสกัดด้วยเมทานอลนั้นทำให้ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่มากและมีคุณภาพดีที่สุด ซึ่งการทดลองต้องมีการควบคุมอุณหภูมิ ค่าพีเอช และการเก็บรักษาด้วย

HeeLee และคณะ (2001) ทำการศึกษาสาร Mulberroside F ที่ถูกสกัดแยกจากใบของ *Morus alba* L. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยสกัดในเมทานอล 85% พบว่า mulberroside F ที่สกัดจากธรรมชาติมีฤทธิ์มากกว่ากรดโคจิกซึ่งนอกจากจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสแล้วยังยับยั้งเมลานินในเซลล์ที่ทำการทดลองอีกด้วย

WenChang และคณะ (2011) ทำการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากกิ่งหม่อนที่ใช้เอทานอลเป็นตัวสกัด พบว่า ที่ความเข้มข้น 0-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดจากกิ่งหม่อนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น ซึ่งนำมาวิเคราะห์โดยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าสารสกัดจากกิ่งหม่อนมีสารประกอบฟีนอลิคหลายชนิดไม่ว่าจะเป็น maclurin, rutin, isoquercitrin, resveratrol และ morin สารเหล่านี้ส่งผลให้สารสกัดจากกิ่งหม่อนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้

Kittisak (2008) ศึกษาพบว่าเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์โมโนออกซิจิเนส ที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะทำหน้าที่ในการสร้างเม็ดสีให้กับผิวหนัง ดวงตา เส้นผม ผัก และผลไม้ เอนไซม์ไทโรซิเนสจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่พึงประสงค์ โดยการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสนี้อาจนำไปสู่การพัฒนาสารทำให้ผิวขาวชนิดใหม่ๆ หรือใช้ในการควบคุมการเกิดสีน้ำตาลในแมลง จำนวนของสารกลุ่ม Stilbenes ในธรรมชาติพบว่ามีศักยภาพที่แข็งแกร่งในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ผลจากการศึกษาการสังเคราะห์สารจากธรรมชาติได้แสดงให้เห็นว่า หมู่ OH อิสระ และตำแหน่งของวงแหวนอะโรมาติกมีความสำคัญกับกิจกรรมซึ่งแสดงให้เห็นถึงภาพรวมของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากธรรมชาติ รวมถึงความสัมพันธ์ของกลไกในการทำงานของสารที่ทำการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Seong Hun Jeong และคณะ (2009) ศึกษา Polyphenol ที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งจะถูกแยกโดยใช้สารละลายเมทานอล 95% เพื่อทำการสกัดจาก *Morus lhou* สารประกอบที่แยกได้ประกอบด้วย Flavonones 4 สาร ,Flavones 4 สารและ Phenyl-bensofuranes 4 สาร ซึ่งอนุพันธ์ Moracin ทั้ง 12 สาร ถูกพิสูจน์ว่าเป็นสารประกอบชนิดใหม่ และจะทำการคัดแยกลักษณะทางโครงสร้างของ Monophenolase และ Diphenolase (ทั้งสองสารจะถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ไทโรซิเนส) เพื่อยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้มาจากเห็ด คณะผู้ทำการทดลองได้ทำการทดลองเปรียบเทียบสารประกอบทั้ง 3 ชนิด พบว่า มีประสิทธิภาพการยับยั้ง Monophenolase สูง (ค่า IC_{50} = 1.3, 1.2, และ 7.4 mg/ml ตามลำดับ) และมีศักยภาพในการยับยั้งหมู่ฟังก์ชัน alkyl บนวงแหวนอะโรมาติก อีเธอร์ หรือไฮดรอกซิล และสาร Flavones พบการยับยั้งการทำงาน ของ Monophenolase แต่สาร Flavonones และ Phenylbensofuranes จะยับยั้ง Diphenolase ได้ดีกว่า Monophenolase

จักรพันธ์ และคณะ (2013) ศึกษาสารสกัดจากหม่อนรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักที่พบในรากหม่อน ได้แก่ มัลเบอโรไซด์เอ สารชนิดนี้เป็นโครงสร้างไกลโคไซด์ของออกซีเรสเวอราทรอล ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านไวรัส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ปกป้องตับ และฤทธิ์ปกป้องประสาท จากการทดลองพบว่าเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงหม่อนเป็นแหล่งทางเลือกในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อราไตรโคเดอร์มา ซึ่งเป็น เอนโดไฟต์จากต้นหม่อนให้ผลบวกเมื่อทดสอบสารมัลเบอโรไซด์เอ (0.40 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักสารสกัด) รวมถึงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (IC_{50} = 3.72 ± 0.58 มิลลิกรัมของน้ำหนักสารสกัดต่อมิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
142796

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

หม่อน (*Morus rotunbiloba*)

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

Staphylococcus aureus ATCC 25923

3.3 เครื่องแก้ว สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ

อาหารผงสำเร็จรูปของ Murashige and Skooge medium (MS) ของ Sigma

อาหารผงสำเร็จรูป Mueller Hinton Agar (MHA)

α-Napthaleneacia acid (NAA) ของ Sigma

เมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

สารละลายเอทิลอะซิเตต

น้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์

ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 และ 8 ออนซ์

จานเพาะเลี้ยง

มีดผ่าตัด

ปากคีบ

ลูป

ปิเปตต์และออโตปิเปตต์

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1

ไมโครเวฟ

แท่งแก้วสำหรับคนสาร

พีเอชมิเตอร์

บีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร

กระบอกตวงขนาด 1000 มิลลิลิตร

ตะเกียงแอลกอฮอล์

ที่วางหลอดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลอดทดลอง

สำลี

ไม้พันสำลี

โกร่งบดสาร

หลอดแคปิลลารี่ (Capillary)

กระดาษ Thin Layer Chromatography (TLC)

Thin Layer Chromatography (TLC) Tank

ไม้บรรทัดและเครื่องเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (Vernier Calipers)

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)

เครื่องเขย่า (Shaker)

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

เครื่องสกัด (Soxhlet extractor)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเพิ่มปริมาณต้นหม่อนโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร MS

3.5.1.1 การเตรียมอาหารแข็ง MS

การเตรียมอาหารแข็ง MS ปริมาตร 1 ลิตร โดยนำบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วเติมอาหารผงสำเร็จรูป MS 4.43 กรัม เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส 30 กรัม ปรับปริมาตรสารละลายอาหาร MS ด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ให้ได้ค่าอยู่ในช่วง 5.6-5.8 เติมผงวุ้น 8 กรัม แล้วหลอมละลายวุ้นโดยใช้เตาไมโครเวฟจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายอาหาร MS เทอาหารลงขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 ออนซ์ ปิดฝาจากนั้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.5.1.2 การเตรียมอาหารเหลว MS

ทำการเตรียมคล้ายอาหารแข็ง MS แต่เมื่อปรับพีเอชแล้วไม่ต้องเติมผงวุ้น โดยทำการเตรียมอาหารสูตรละ 800 มิลลิลิตร เทอาหารลงขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 8 ออนซ์ เติมขวดละ 20 มิลลิลิตร จะได้อาหารสูตรละ 40 ขวด ปิดฝา นำอาหารที่บรรจุในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.5.1.3 ขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารใหม่

คัดเลือกต้นหม่อน (*Morus rotunbiloba*) จากห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอายุครบ 30 วัน ซึ่งเหมาะสมต่อการเปลี่ยนอาหารใหม่ ฆ่าเชื้อภายนอกขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เปิดฝาขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายในตู้ปลอดเชื้อ ใช้ปากคีบนำต้นหม่อนที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ออกมาวางในจานเพาะเลี้ยงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตัดชิ้นส่วนของต้นหม่อนโดยเลือกบริเวณตาข้างและส่วนของปลายยอดไว้ ตัดใบที่มีขนาดใหญ่ทิ้ง ใช้ปากคีบเคลื่อนย้ายชิ้นส่วนที่คัดเลือกลงอาหารใหม่ที่เตรียมไว้ นำขวดเพาะเลี้ยงที่ได้วางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรากหม่อน

ในการเพาะเลี้ยงรากหม่อนมีสูตรอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยง 4 สูตร คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสง

วิธีการเพาะเลี้ยงรากหม่อน โดยนำต้นหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลาประมาณ 30 วัน นำเฉพาะส่วนรากล้างด้วยน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วจนวุ้นที่ติดอยู่หลุดออกไปจนหมดแล้วทำการตัดรากหม่อนที่บริเวณปลายรากที่มีสีขาวให้มีความยาว 2 เซนติเมตร นำรากหม่อนที่ตัดแล้วใส่ในขวดเพาะเลี้ยงที่มีอาหารเหลวขวดละ 10 ราก ทำการทดลอง 5 ครั้ง โดยทำการเปรียบเทียบน้ำหนักของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 4 สูตรบนเครื่องเขย่า 128 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ให้แสงตลอดเวลาเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง

3.5.3 การสกัดสารจากรากหม่อนด้วยวิธี Soxhlet extraction

นำรากหม่อนที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน ไปทำให้แห้งโดยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำรากแห้งที่ได้มาบดด้วยโกร่งให้เป็นผงและชั่งน้ำหนักรากหม่อนในแต่ละสูตรอาหาร จากนั้นชั่งผงรากหม่อนให้ได้อัตราส่วนรากหม่อน 1 กรัมต่อเมทานอล 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่เครื่อง Soxhlet extraction ทำการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator จนแห้ง จากนั้นละลายสารที่ได้ด้วยเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

นำมาเตรียมสารสกัดที่ทราบความเข้มข้นโดยปิเปตต์สารสกัดที่ได้ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด eppendorf จำนวน 5 ซ้ำ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ววางทิ้งไว้ในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักสารสกัดแห้ง แล้วทำการเตรียมสารสกัดหยาบจากรากหม่อนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลายเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.5.4 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากรากหม่อนในหัวข้อ 3.5.3 มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้ Dopachrome method ซึ่งได้ดัดแปลงวิธีการจาก Shoji และคณะ ในปี 2005 โดยทำเป็น 2 ชุด คือ ชุดตัวอย่างกับชุดควบคุม โดยชุดแรก คือ ชุดควบคุมที่จะเติม L-Dopa ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 60 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง และเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (pH 6.8) ปริมาตร 880 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ไทโรซิเนส 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ส่วนในชุดที่สอง คือ ชุดตัวอย่าง เติมสารสกัดหยาบที่ได้จากรากหม่อน ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง เติม L-Dopa ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และเติมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (pH 6.8) ปริมาตร 780 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ไทโรซิเนส 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 60 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าให้สารละลายทั้งหมดผสมกันดี นำทั้งสองชุดไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พอครบเวลานำมาเขย่าให้เข้ากันและวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

การคำนวนหาค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

$$\% \text{ Tyrosinase inhibitor} = \left[\frac{\text{control - sample}}{\text{control}}\right] \times 100$$

เมื่อ control = ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของตัวควบคุม

sample = ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของตัวอย่าง

3.5.5 การแยกสารประกอบต่างๆของสารสกัดหยาบจากรากหม่อนด้วยวิธี Chromatography

นำสารสกัดแห้งที่ได้จากรากหม่อนในหัวข้อ 3.5.3 มาละลายโดยใช้เมทานอล และทำการแยกสารประกอบต่างๆในสารสกัดหยาบจากรากหม่อน โดยใช้หลอดแคปิลลารี่ (capillary) ดูดสารละลายตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร จุดลงบนแผ่น Thin layer chromatography (TLC) รอจนตัวทำละลายระเหยแห้ง จากนั้นนำมาวางลงใน TLC Tank โดยใช้ silica เป็นเฟสคงที่ และใช้ Ethyl acetate ผสมกับ Methanol ในอัตราส่วน 4 : 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ นำมาศึกษาโครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบจากรากหม่อนโดยนำมาส่องภายใต้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร โดยบนแผ่น TLC สารจะถูกแยกเป็นแถบ ทำการวัดความยาวของแต่ละแถบเพื่อหาค่า R_f และทำการแยกสารประกอบแต่ละลำดับ โดยการตัดกระดาษ TLC ตามแถบที่ได้ จากนั้นทำการขูดตัวดูดซับ (ซิลิกา) ของสารประกอบแต่ละลำดับออก นำไปละลายในเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ดูดออกมา 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอด eppendorf จำนวน 3 หลอด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ซิลิกาตกตะกอน

การคำนวณหาค่า R_f

$$R_f = \frac{\text{ระยะที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.6 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดโดยวิธี Disc Diffusion

3.5.6.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

Staphylococcus aureus ATCC 25923

3.5.6.2 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย โดยทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร MHA นำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อจำนวน 1 ลูป ละลายเชื้อโดยใส่ลงในน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.5.6.3 วิธีการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรีย

เตรียมอาหารแข็ง MHA สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียลงในจานเพาะเชื้อ ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อชุบสารแขวนลอยของแบคทีเรียมาป้ายให้ทั่วอาหารแข็ง วางแผ่นดิสก์ที่มีสารประกอบ จากหัวข้อ 3.5.5 และแผ่นดิสก์ชุดควบคุมจะใช้ Ethyl acetate ผสมกับ Methanol ในอัตราส่วน 4 : 1 เป็น Negative control ลงบนอาหารที่ป้ายเชื้อแล้ว (swab) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใสด้วยเครื่องเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นทดสอบที่เกิดจากความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบแต่ละลำดับจากรากหม่อน โดยการทดสอบจะทำ 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรากหม่อน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหารเหลวสูตรต่างๆ คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ต่างกัน คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้ตลอด 24 ชั่วโมง โดยเมื่อครบกำหนดเวลาบ่มเป็นเวลา 35 วัน นำรากที่ได้มาทำการอบให้แห้งที่ตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้น นำรากแห้งมาชั่งน้ำหนักรากแห้งต่อขวดเพาะเลี้ยง แสดงดังตารางผนวก ข1 ในภาคผนวก ข และคำนวณน้ำหนักรากแห้งเฉลี่ยต่อขวดเพาะเลี้ยง ดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1 แสดงค่าน้ำหนักรากแห้งต่อขวดเพาะเลี้ยงเฉลี่ยที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน ในสูตรอาหารต่างๆ ในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยของน้ำหนักรากแห้งต่อขวดเพาะเลี้ยง ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 วันในอาหารสูตรต่างๆ ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

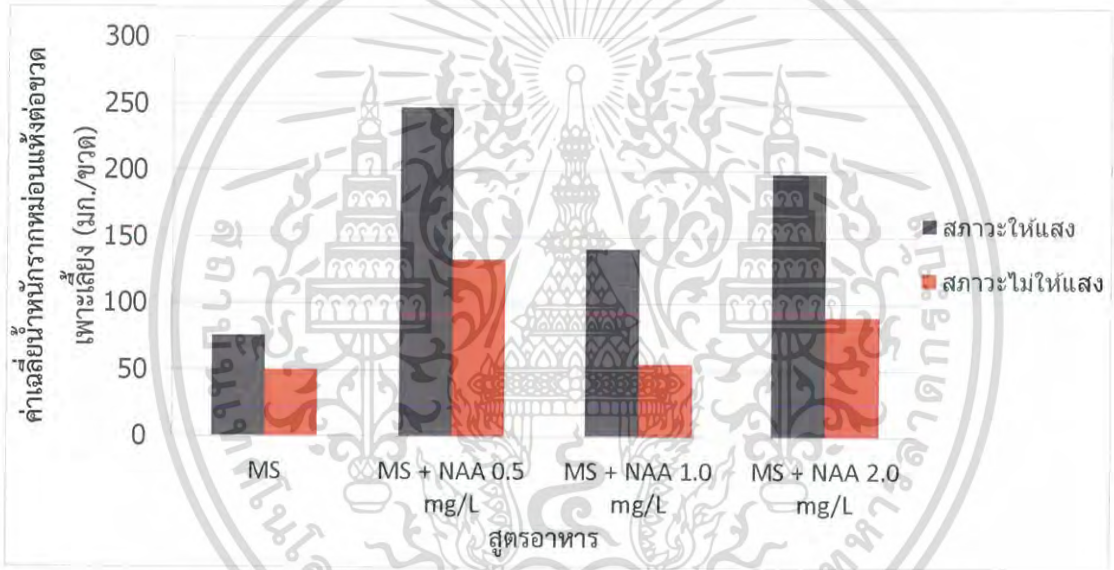
สูตรอาหาร	ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักรากแห้งต่อขวดเพาะเลี้ยง[n] (มก./ขวด)	
	เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง	เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่ให้แสง
MS	76.12 ± 1.4935[c]	50.44 ± 0.9579[a]
MS + NAA 0.5 mg/l	247.42 ± 1.8178[h]	132.98 ± 0.6240[e]
MS + NAA 1.0 mg/l	141.50 ± 0.9851[f]	54.94 ± 1.9551[b]
MS + NAA 2.0 mg/l	197.94 ± 2.0721[g]	89.98 ± 1.7095[d]

[n] : น้ำหนักรากแห้งเฉลี่ยต่อขวดเพาะเลี้ยง ± ค่า SE (standard error)

[a, b, c...] : ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างของดัชนีการเจริญเติบโตของรากหม่อนแห้งในแต่ละสูตรอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของรากหม่อน โดยทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักรากแห้งต่อขวดเพาะเลี้ยงของอาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ต่างกัน คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ดังภาพที่ 4.1 พบว่า รากหม่อนที่มีน้ำหนักรากแห้งมากที่สุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงรากหม่อนเป็นเวลา 35 วัน คือ รากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า มีน้ำหนักรากแห้งเฉลี่ยต่อขวดเพาะเลี้ยง คือ 247.42 ± 1.8178 มิลลิกรัมต่อขวด (ตารางที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 แสดงแผนภูมิค่าเฉลี่ยของน้ำหนักรากหม่อนแห้งต่อขวดเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 35 วัน ที่สภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสง ตลอด 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ พบว่า รากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และการเพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง มีอิทธิพลต่อการเจริญของรากหม่อน โดยรากหม่อนที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA จะมีค่าน้ำหนักรากแห้งเฉลี่ยต่อขวดเพาะเลี้ยงน้อยกว่ารากหม่อนที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และในสูตรอาหารเดียวกัน ส่วนรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง จะมีน้ำหนักรากแห้งต่อขวดเพาะเลี้ยงมากกว่ารากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากการทดลองเพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหารเหลวสูตรต่างๆ คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ต่างกัน คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง จากนั้นนำรากหม่อนไปทำให้แห้ง โดยการอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และบดให้เป็นผงละเอียดด้วยโกร่ง นำผงรากแห้งละเอียดมาทำการสกัดด้วยวิธีการ Soxhlet extraction โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ทำการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำสารสกัดที่ได้มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator นำสารสกัดหยาบเข้มข้นไปทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี Dopachrome แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ดังตารางผนวก ข2 ในภาคผนวก ข และนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน ในสูตรอาหารต่างๆ ในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน ในอาหารสูตรต่างๆ ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

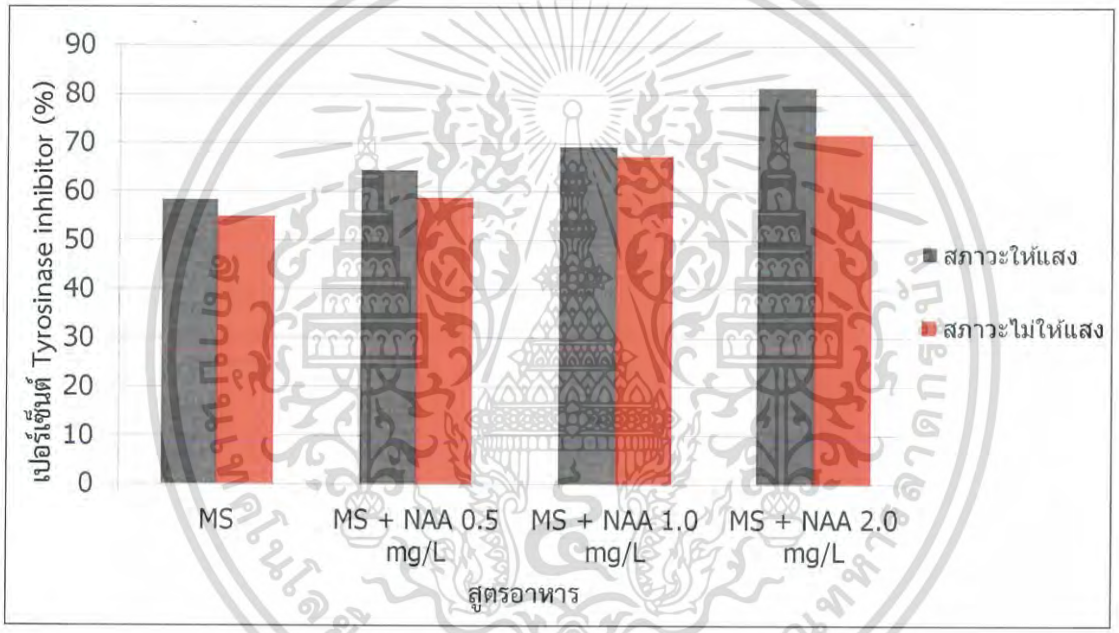
สูตรอาหาร	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส[n]	
	เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง	เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่ให้แสง
MS	58.3166 ± 2.3484[a]	54.8697 ± 0.9352[a]
MS + NAA 0.5 mg/l	64.4489 ± 1.5751[b]	58.7174 ± 0.8343[a]
MS + NAA 1.0 mg/l	69.2986 ± 0.7438[b]	67.2946 ± 0.7069[b]
MS + NAA 2.0 mg/l	81.4429 ± 0.6680[c]	71.8236 ± 0.3534[b]

[n] : เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ± ค่า SE (standard error)

[a, b, c] : ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ในแต่ละสูตรอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของอาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ต่างกัน คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ดังภาพที่ 4.2 พบว่า สารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงรากหม่อนเป็นเวลา 35 วัน คือ รากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า มีเปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 81.4429 ± 0.6680 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 แสดงแผนภูมิเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 วันในอาหารสูตรต่างๆ ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ พบว่ารากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และเพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง มีอิทธิพลต่อการสร้างสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยรากหม่อนมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA จะมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงขึ้นตามลำดับ และในสูตรอาหารเดียวกันนั้น แสงก็มีอิทธิพลในการสร้างสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การแยกสารประกอบต่างๆของสารสกัดหยาบจากรากหม่อนด้วยวิธี Chromatography

จากการนำสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ต่างกัน คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง มาละลายโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย แล้วนำมาจุดลงบนแผ่น Thin layer chromatography (TLC)

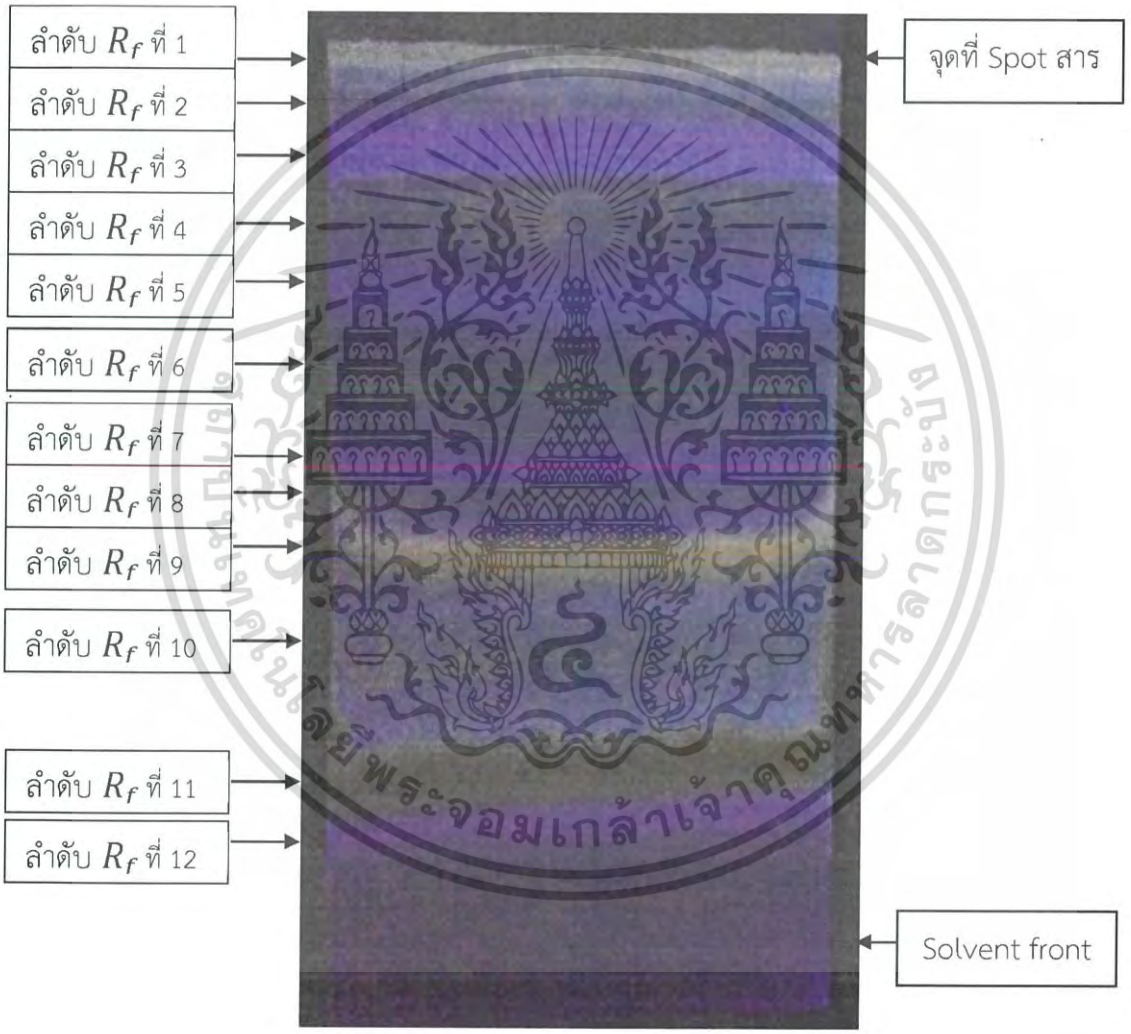
ทำการศึกษาโครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบจากรากหม่อนโดยนำมาส่องภายใต้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร โดยบนแผ่น TLC สารจะถูกแยกเป็นแถบ และทำการวัดความยาวของแต่ละแถบเพื่อหาค่า R_f ดังตารางที่ 4.3 แสดงค่า R_f ที่ได้จากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ต่างกัน คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า R_f ของสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน ในอาหารสูตรต่างๆ ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สูตรอาหาร	สภาวะ	ลำดับ R_f ที่											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MS	ให้แสง	0.0083	0.0361	0.1111	0.1556	0.2000	0.3000	0.4333	0.5750	0.6389	0.6944	0.7944	0.8500
MS+NAA 0.5 mg/l	ให้แสง	0.0083	0.0306	0.1028	0.2250	0.3389	0.4222	0.4917	0.5500	0.6056	0.6611	0.7667	0.8444
MS+NAA 1.0 mg/l	ให้แสง	0.0083	0.0306	0.0944	0.1250	0.1528	0.2250	0.3333	0.4722	0.5528	0.6444	0.7917	0.8306
MS+NAA 2.0 mg/l	ให้แสง	0.0055	0.0250	0.0889	0.1556	0.2333	0.3361	0.5472	0.6139	0.6583	0.7389	0.8306	0.9028
MS	ไม่ให้แสง	0.0083	0.0472	0.1111	0.2111	0.3194	0.3750	0.4833	0.5889	0.6056	0.6528	0.7694	0.8222
MS+NAA 0.5 mg/l	ไม่ให้แสง	0.0083	0.0750	0.1472	0.3056	0.4028	0.4694	0.4889	0.5167	0.5861	0.6472	0.7417	0.8500
MS+NAA 1.0 mg/l	ไม่ให้แสง	0.0083	0.0306	0.0528	0.1000	0.1306	0.1694	0.2750	0.4028	0.5189	0.5472	0.7722	0.8306
MS+NAA 2.0 mg/l	ไม่ให้แสง	0.0083	0.0306	0.0500	0.1056	0.1806	0.2639	0.3889	0.5000	0.5417	0.6528	0.7778	0.8278

จากการทดลอง สารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่ละลายในเมทานอล เมื่อนำมาจุดลงบนแผ่น Thin layer chromatography (TLC) แล้วทำการศึกษาโครมาโตแกรมด้วยการนำไปส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร โดยบนแผ่น TLC สารจะถูกแยกเป็นแถบ และทำการวัดความยาวของแต่ละแถบเพื่อหาค่า R_f พบว่า สารสกัดหยาบจากรากหม่อนสามารถแยกสารประกอบได้ทั้งหมด 12 สาร ดังภาพที่ 4.3 และตารางที่ 4.3 แสดงค่า R_f จากสารสกัดหยาบรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน ในอาหารสูตรต่างๆ ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



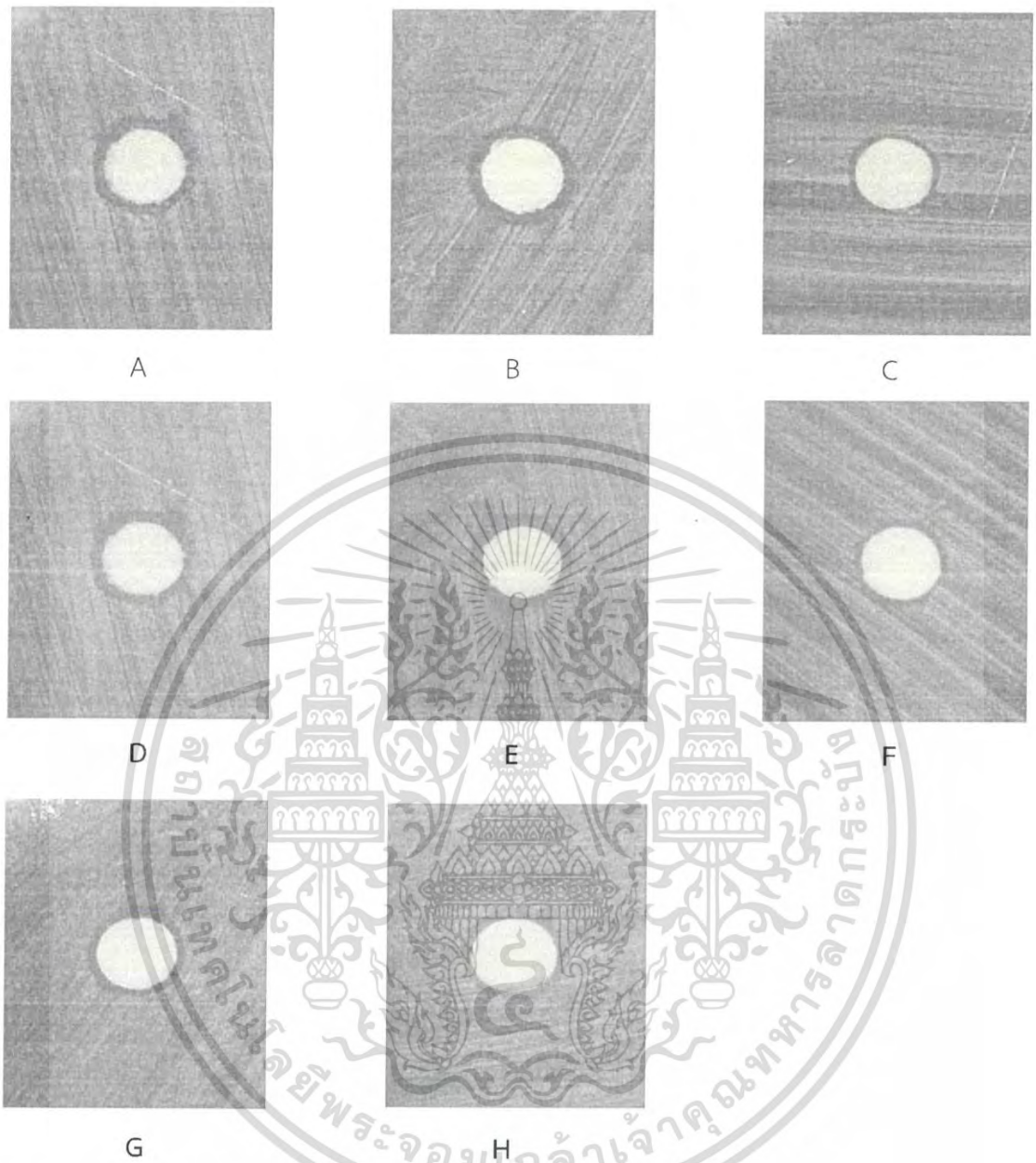
ภาพที่ 4.3 แสดงโครมาโตแกรมของสารประกอบลำดับต่างๆ จากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนโดยวิธี TLC ที่ส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากรากหม่อน โดยวิธี Disc Diffusion

จากการทดลอง นำสารประกอบทั้งหมด 12 สาร ในแต่ละสูตรอาหาร คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ต่างกัน คือการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่ได้มาจากการแยกสารประกอบต่างๆด้วยวิธี Chromatography นำมาทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรีย ทำโดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยวิธี Disc Diffusion สังเกตการเกิดโซนใสรอบแผ่นดิสก์ และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ดังภาพที่ 4.4 และตารางที่ 4.4 แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของสารประกอบจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อน ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 35 วัน ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 แสดงการเกิดบริเวณโซนใสรอบแผ่นดิสก์ที่มีการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของสารประกอบจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่มีค่า $R_f \sim 0.8$ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS สภาวะให้แสง (A), อาหารสูตร MS+NAA 0.5 mg/l สภาวะให้แสง (B), อาหารสูตร MS+NAA 1.0 mg/l สภาวะให้แสง (C) และอาหารสูตร MS+NAA 2.0 mg/l สภาวะให้แสง (D), อาหารสูตร MS สภาวะไม่ให้แสง (E), อาหารสูตร MS+NAA 0.5 mg/l สภาวะไม่ให้แสง (F), อาหารสูตร MS+NAA 1.0 mg/l สภาวะไม่ให้แสง (G) และอาหารสูตร MS +NAA 2.0 mg/l สภาวะไม่ให้แสง (H) เป็นเวลา 35 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลอง พบว่า สารสกัดหยาบจากรากหม่อนในแต่ละสูตรอาหาร คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ต่างกัน คือการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียโดยได้ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 พบว่า สารประกอบของสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่มีค่า $R_f \sim 0.8$ ของอาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทั้งในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้ โดยสังเกตจากบริเวณโซนใสที่เกิดขึ้นรอบแผ่นดิสก์ (ภาพที่ 4.4) และสามารถวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ดังตารางที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เกิดการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เกิดการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของสารประกอบจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 35 วัน ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สูตรอาหาร	สภาวะ	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง[ก] (มม.)											
		ลำดับ R_f ที่											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MS	ให้แสง	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.540	-
MS+NAA 0.5 mg/l	ให้แสง	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.443	-
MS+NAA 1.0 mg/l	ให้แสง	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.360	-
MS+NAA 2.0 mg/l	ให้แสง	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.626	-
MS	ไม่ให้แสง	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.523	-
MS+NAA 0.5 mg/l	ไม่ให้แสง	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.270	-
MS+NAA 1.0 mg/l	ไม่ให้แสง	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.338	-
MS+NAA 2.0 mg/l	ไม่ให้แสง	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.332	-

หมายเหตุ [ก] : ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เกิดการยับยั้ง ± ค่า SD (รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่น disc 5.315 มม.)

- : ไม่เกิดการยับยั้ง

จากตาราง 4.4 พบว่า สารประกอบจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนในแต่ละสูตรคือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยสารประกอบจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่มีค่า $R_f \sim 0.8$ ของอาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งเฉลี่ยอยู่ในช่วง 6.33–7.62 มิลลิเมตร

4.5 วิจารณ์ผลการทดลอง

อิทธิพลของสารสกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงในการทดสอบสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยจากการทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรากหม่อน พบว่า รากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง มีน้ำหนักของรากหม่อนแห้งต่อขวดการเพาะเลี้ยงมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ ภัทรดล และคณะ, 2551 พบว่า รากหม่อนที่มีการเจริญสูงสุดหรือรากหม่อนที่มีน้ำหนักมากที่สุดในวันที่ 35 ของการทดลอง คือ รากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง มีดัชนีการเจริญเติบโตของรากหม่อนมากที่สุดเท่ากับ 46.1109 ± 0.3303 ($p \leq 0.05$)

การศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี Dopachrome method ของสารสกัดหยาบจากรากหม่อน พบว่า อาหาร MS สูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะให้แสง มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุด สอดคล้องกับ งานวิจัยของจักรพันธ์ และคณะ, 2013 ได้ศึกษาการหาปริมาณสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของหม่อนเมื่อเปรียบเทียบกับหม่อนในธรรมชาติ จากการทดลองพบว่า รากหม่อนเพาะเลี้ยงมีความเข้มข้นของสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (IC_{50} = 0.76 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร) สูงกว่ารากหม่อนในธรรมชาติ (IC_{50} = 3.20 ± 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากงานวิจัยของจักรพันธ์ และคณะ, 2013 จึงได้สนับสนุนผลการทดลองว่า รากหม่อนเพาะเลี้ยงมีสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยนำสารสกัดหยาบจากรากหม่อนทั้ง 4 สูตร มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ด้วยวิธี Disc diffusion พบว่า สารประกอบจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่มีค่า R_f ~ 0.8 ของอาหารสูตร MS, อาหารสูตรMS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งในช่วง 6.33-7.62 มิลลิเมตร ดังตัวอย่างงานวิจัยของ ภัทรดล และคณะ, 2551 ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงรากหม่อนเพื่อการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ และสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากรากหม่อนโดยวิธี Disc diffusion พบว่าสารสกัดจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นของสารสกัดรากหม่อน 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ได้ โดยมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งอยู่ในช่วง 7.17–7.67 มิลลิเมตร โดยค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาอิทธิพลของสารสกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงในการทดสอบสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรากหม่อนมีอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง 4 สูตร คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อผ่านการบ่มเป็นเวลา 35 วัน นำมาชั่งน้ำหนักรากแห้ง พบว่า รากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง มีน้ำหนักของรากหม่อนแห้งต่อขวดเพาะเลี้ยงมากที่สุด เท่ากับ 247.42 ± 1.8178 มิลลิกรัม ($p \leq 0.05$) และการเพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA จะสามารถเจริญได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และการเพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะที่มีแสงตลอด 24 ชั่วโมง จะเจริญได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะที่ไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี Dopachrome method ของสารสกัดหยาบจากรากหม่อนทั้ง 4 สูตรอาหาร คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า อาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะให้แสง มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุดคือ 81.4429 ± 0.6680 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยนำสารสกัดหยาบจากรากหม่อนทั้ง 4 สูตรอาหาร คือ อาหารสูตร MS, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะ คือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) ที่มีซิลิกาเป็นเฟสคงที่ และเอทิลอะซิเตตกับเมทานอลในอัตราส่วน 4 : 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ พบว่ามีสารประกอบจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนจำนวน 12 สาร และนำสารประกอบที่แยกออกจากตัวดูดซับโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ด้วยวิธี Disc diffusion พบว่า สารประกอบจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่มีค่า R_f ~ 0.8 ของทุกสูตรอาหารและทุกสภาวะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เกิดการยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 6.33–7.62 มิลลิเมตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การคัดเลือกรากหม่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ต้องเลือกเอารากที่มีสีขาว ซึ่งจะสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ดีกว่ารากที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมเหลือง

5.2.2 การรักษาเอนไซม์ต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งหากเก็บรักษาไม่ดี อาจทำให้เอนไซม์มีการเสียสภาพการทำงานได้

5.2.3 ความเข้มข้นของสารสกัดจากรากหม่อนที่นำมาทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสควรมีความเข้มข้นที่ไม่มากเกินไป เนื่องจากสีของสารสกัดจากรากหม่อนจะส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงได้

5.2.4 ในการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ควรแบ่งสารที่ทำการทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากหากทำการบ่มทีละหลายตัวอย่าง เวลาที่ใช้รอขณะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง อาจทำให้ปฏิกิริยายังคงดำเนินอยู่ และส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงได้

5.2.5 ขั้นตอนในการแยกสารประกอบจากวิธี Thin layer chromatography (TLC) หากจุดสารลงบนแผ่น TLC มากจนเกินไป จะทำให้แถบโครมาโทแกรมที่ได้นั้น ไม่สามารถแยกความแตกต่างของชั้นสารได้

5.2.6 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดจากรากหม่อน เพื่อนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อผิวขาวหรือเชิงพาณิชย์อื่นๆได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จักรพันธ์ โคมัยกุล และคณะ. การประเมินการผลิตสารมัลเบอโรไซด์เอและฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อราเอนโดไฟต์และเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของหม่อน. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 5 : 141-145.

จินดาพร คงเดช. 2551. การผลิตสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชเพื่อใช้ในเครื่องสำอาง. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และคณะ. 2557. เอกสารประกอบการเรียน บทที่ 9 โครมาโตกราฟี. [ออนไลน์]. Available : http://www.chemistry.sc.chula.ac.th (18 พฤษภาคม 2558).

นภัทร ปราบมีชัย. 2555. ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสและต้านจุลชีพของสารสกัดจากต้นอดและการพัฒนาตำรับ. วิทยานิพนธ์ศึกษาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นรินทร์ จันทร์ศรี. 2554. การพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางต้นแบบจากงา. รวมบทคัดย่อผลงานวิจัยปี2554. ขอนแก่น, 164-165.

พลอยไพลิน ธาราวดี. 2553 การพัฒนาตำรับเจลเซริซินเพื่อลดความหมองคล้ำของผิว. รายงานการศึกษาอิสระปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พิทักษ์ และคณะ. 2558. ธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. [ออนไลน์]. Available : http://www.oknation.net/blog/jaopad/2013/03/09/entry-1 (18 พฤษภาคม 2558).

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ. 2544. เครื่องสำอางสำหรับผิวหนัง ฉบับปรับปรุง. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ภัทรดล และคณะ. 2551. การเพาะเลี้ยงรากหม่อนเพื่อผลิตสารต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

มัณฑนา ภานุมาภรณ์. 2552. เครื่องสำอางเพื่อความงามและสุขภาพ. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.

วันดี แสงสุวรรณ์. 2549. การศึกษากระบวนการผลิตใบหม่อนผสมผงสำเร็จรูป. รายงานการวิจัยและวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบัง.

วิโรจน์ แก้วเรือง. 2557. หม่อน สรรพคุณและประโยชน์ของต้นหม่อน. [ออนไลน์]. Available : http://frynn.com/หม่อน (18 พฤษภาคม 2558).

สถาบันวิจัยสมุนไพร. หม่อน. [ออนไลน์]. Available : http://www.dmsc.moph.go.th/webrooot/Plant/MPRI/Q_Morus.shtmหม่อน. (18 พฤษภาคม 2558).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สวนพฤษศาสตร์คลองไผ่. หม่อน. สถาบันแพทย์แผนไทย. [ออนไลน์]. Available : http://www.rspg.or.th/plants_data/kp_bot_garden/kpb_20-3.htm (18 พฤษภาคม 2558).

อรรถกฤติ และคณะ. 2553. หม่อนไหม เกี่ยวอะไรกับเบอร์รี่. [ออนไลน์]. Available : http://www.vcharkarn.com/varticle/41577 (18 พฤษภาคม 2558).

อุไรวรรณ นิลเพ็ชร์. หม่อน (Mulberry) : พืชมากประโยชน์. [ออนไลน์]. Available : http://www.rdi.ku.ac.th/kufair50/plant/67_plant/67_plant.htm (18 พฤษภาคม 2558).

Arabshahi-Delouee S, Urooj A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry. 102(4) : 1233-1240

Baurin N, Arnoult E, Scior T, Do QT, Bernard P. 2002. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. Journal Ethnopharmacol. 82(2-3) : 155-158

Bolton, K.J., C. E. R. Dodd and W.M. Waites. 1988. Chlorine resistance of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from poultry processing plants. 6 : 31–34.

Borrego, J.J., J.A. Florido, P.P Mrocek and P. Romero. 1987. Design and performance of a new medium for the quantitative recovery of *Staphylococcus aureus* from recreational waters. 63 : 85–93.

Bylka W and Matlawska I. 2004. Natural flavonoids as antimicrobial gents. 7 : 24-30.

Chang LW, Juang LJ, Wang BS, Wang MY, Tai HM, Hung WJ, Chen YJ, Huang MH. 2011 Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark. Food and Chemical Toxicology. 49(4) : 785-790

Das K, Tiwari KS and Shrivastava DK. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. Journal of Medicinal Plants. 4 : 104-111.

Davis, B. D., R. Dulbecco, H.N. Eisen and H.S. Ginsberg. 1980. Microbiology, 3rd ed. Harper & Row Publisher, Inc., United States of America.

Du J, He ZD, Jiang RW, Ye WC, Xu HX and But PPH. 2003. anticiral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. Phytochemistry. 62 : 1235-1238.

Easmon, C. S. F. and M. Goodfellow. 1990. Staphylococcus and Micrococcus.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kim SJ, Son KH, Chang HW, Kang SS and Kim HP. 2003. tyrosinase Inhibitory prenylated flavonids from *Sophora flavescens*. 26 : 1384-1450.

Kim YJ. 2007. antimelanogenic and antioxidant properties of gallic Aaid. 30 : 1052-1055.

Kima YJ and Uyama H. Tyrosinase. 2005. Inhibitors from natural and synthetic sources:structure, inhibition mechanism and perspective for the future. 62 : 1707–1723.

Kittisak Likhitwitayawuid. 2008. Staleness with tyrosinase inhibitor activity. Journal of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin. Microbiol. Rev. 10 (3): 505–20.

Lee SH, Choi SY, Kim H, Hwang JS, Lee BG, Gaoo JJ and Kim SY. 2002. Mulberroside F Isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis. Biological and Phamaceutical Bulletin. 25 : 1045-1048.

Lim TY, Lim YY and Yule CM. 2009. Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four Macaranga species. Food Chemistry. 114 : 594–599.

Lin J-W, Chiang H-M, Lin Y-C and Wen K-C. 2008. Natural products with skin–whitening effects. Journal of Food and Drug Analysis. 16 : 1-10.

Mead, G.C and B.W. Adam. 1986. Chlorine resistance of *Staphylococcus aureus* from turkeys and turkey products. 3 : 131–133.

Nery O, Musa R, Khatib S, Tamir S and Vaya J. 2004. Chalcones as Potent tyrosinase Inhibitors : The Effect of Hydroxyl Positions and Numbers. 65 : 1389-1395.

Park KM, You JS, Lee HY Baek NI and Hwang JK. 1995. An Antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. Journal of Ethnopharmacology. 84 : 181-185.

Parvez S, Kang M, Chung HS, Cho C, Hong MC, Shin MK and Bae H. 2006. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. 20 : 921-934.

Piao LZ, Park HR, Park YK, Lee SK, Park JH and Park MK. 2002. Mushroom tyrosinase inhibition activity of some chromones. 50 : 309-311.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Prasad KN, Yang B, Shi J, Yu C, Zhao M, Xue S and Jiang Y. 2009. Enhanced antioxidant and antityrosinase activities of longan fruit pericarp by ultra-high-pressure-assisted extraction. 51 : 471-477.

Rangkadilok N, Sitthimonchai S, Worasuttayangkurn L, Mahidol C, Ruchirawat M and Satayavivad J. 2007. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. 45 : 328-336.

Rosenbach, F. J. 1884. Type species: *S. aureus*. Microorganismen bei den Wund-Infections-Krankheiten des Menschen, J. F. Bergmann, Wiesbaden.

Roh JS, Han JY, Kim JH and Hwang JK. 2004. Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis. 27 : 1976-1978.

Sapkota K, Park SE, Kim JE, Kim S, Choi HS, Chun HS and Kim SJ. 2010. Antioxidant and antimelanogenic properties of chestnut flower extract. 74 : 1527-1533.

Seong Hun joeng, et al. 2009. Tyrosinase inhibitor Polyphenols from roots of *Morus lhou*, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57 : 1195-1203.

Shoji T, Masumoto S, Moriichi N, Kobori M, Kanda T, Shinmoto H and Tsushida T. 2005. Procyanidin trimers to pentamers fractionated from apple inhibit melanogenesis in B16 mouse melanoma cell. 53 : 6105-6111

Slominski A, J.Tobin D, Zmijewski MA, Wortsman J and Paus R. 2007. Melatonin in the skin: synthesis,metabolism and functions. 19 : 17-24.

Slominski A, Wortsman J, Tuckey RC, et al. 2007. Differential expression of HPA axis homolog in theskin. 265–266 : 143–149.

Tenover FC. 2006. mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. 119 : 3-10.

Todar, K. 2005. Staphylococcus Todar's online textbook of bacteriology. University of Wisconsin. Madison Department of Bacteriology. [อ อ น ไ ล น์] : http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html (16 พฤศจิกายน 2557).

Topley and Wilson's. Principle of Bacteriology. Virology and Immunity. 8th ed., Vol. 2. B.C. Decker Inc., Great Britain. 683p.

Varnam, A.H. and M.G. Evan. 1991. Foodborne pathogens an Ill state text. Wolfe Publishing Ltd., England. 557p.

Wang KH, Lin DR, Hsu LF, Huang HY, Chang CH and Huang YC et al. 2006. Cosmetic Applications of selevted traditional Chinese herbal medicines. Journal of Ethnopharmacology. 106 : 353-359.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Murashige and skoog medium (MS)

Ammonium nitrate(NH_4NO_3)	1,650	mg/l
Boric acid(H_3BO_3)	6.2	mg/l
Calcium chloride($CaCl_2$ $2H_2O$)	440	mg/l
Cobalt chloride($CoCl_2$ $6H_2O$)	0.025	mg/l
Manganese sulfate($MnSO_4$ $7H_2O$)	370	mg/l
Cupric sulfate($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.025	mg/l
Potassium phosphate(KH_2PO_4)	170	mg/l
Ferrous sulfate($FeSO_4$ $7H_2O$)	27.8	mg/l
Potassium nitrate(KNO_3)	1,900	mg/l
Manganese sulfate($MnSO_4$ $4H_2O$)	22.3	mg/l
Potassium iodide(KI)	0.83	mg/l
Sodium molybdate($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.25	mg/l
Zinc sulfate($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	8.6	mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37.2	mg/l
i-Inositol	100	mg/l
Niacin	0.5	mg/l
Pyridoxine·HCl	0.5	mg/l
Thiamine·HCl	0.1	mg/l
Glycine(recrystallized)	2.0	mg/l

1.2 Mueller Hinton Agar (MHA)

เป็นอาหารสำเร็จรูป ปริมาตรที่ใช้ 39 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Beef infusion	300	กรัม
Casamino Acid	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมสารละลาย

2.1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เราต้องการเตรียมบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ซึ่งประกอบด้วย NaH_2PO_4 และ Na_2HPO_4

$$NaH_2PO_4 = \frac{0.1 \times 100}{1000} = 0.01 \text{ โมลต่อ } 100 \text{ มิลลิลิตร}$$

$$Na_2HPO_4 = \frac{0.1 \times 100}{1000} = 0.01 \text{ โมลต่อ } 100 \text{ มิลลิลิตร}$$

หาน้ำหนักของ NaH_2PO_4 จากสูตร n = g / Mw

Mw ของ $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ = 137.99 ; 0.01 = g / 137.99

g = 137.99 × 0.01

g = 1.37

ดังนั้น ต้องชั่ง $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ เท่ากับ 1.37 กรัม

Mw ของ $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ = 246 ; 0.01 = g / 246

g = 246 × 0.01

g = 2.46

ดังนั้น ต้องชั่ง $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ เท่ากับ 2.46 กรัม

จะได้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยชั่ง $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ เท่ากับ 1.37 กรัม และ $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ เท่ากับ 2.46 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นค่อยๆหยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮโดรคลอริกเพื่อปรับ pH จนได้ 6.8 และปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (500 ยูนิต/มิลลิลิตร)

เอนไซม์ไทโรซิเนส 1,715 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

เอนไซม์ไทโรซิเนส 1,715 ยูนิต มีน้ำหนัก 1 มิลลิกรัม

เอนไซม์ไทโรซิเนส 500 ยูนิต จะมีน้ำหนัก $= \frac{500 \times 1}{1715}$ มิลลิกรัม

$= 0.2915$ มิลลิกรัม

ดังนั้น ต้องชั่งเอนไซม์ไทโรซิเนส 0.2915 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 500 ยูนิต

เอนไซม์ไทโรซิเนส 1 ขวด มี 14.58 มิลลิกรัม

เอนไซม์ไทโรซิเนส 0.2915 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

เอนไซม์ไทโรซิเนส 14.58 มิลลิกรัม จะละลายในน้ำกลั่น $= \frac{14.58 \times 1}{0.2915}$ มิลลิลิตร

$= 50$ มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้น ต้องชั่งเอนไซม์ไทโรซิเนส 14.58 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 500 ยูนิต

2.3 การเตรียมสารละลาย L-Dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)

สารละลาย L-Dopa มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ต้องการเตรียมสารละลาย 1 มิลลิลิตร ต้องชั่ง L-Dopa น้ำหนัก 1 มิลลิกรัม

ถ้าต้องการเตรียมสารละลาย 10 มิลลิลิตร ต้องชั่ง L-Dopa $= \frac{1 \times 10}{1}$ มิลลิกรัม

$= 10$ มิลลิกรัม

ดังนั้น ถ้าต้องการเตรียมสารละลาย 10 มิลลิลิตร ต้องชั่ง L-Dopa 10 มิลลิกรัม ละลายลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร

3. การเตรียมน้ำเกลือ (นอร์มอลซาไลน์) ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์

ชั่งสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และนำสารละลายไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางผนวก ข1 น้ำหนักรากหม่อนแห้งต่อขวดเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 35 วัน

สูตรอาหาร	สภาวะ	น้ำหนักรากหม่อนแห้งต่อขวดเพาะเลี้ยง (มก./ขวด)					น้ำหนักรากหม่อนแห้งเฉลี่ยต่อขวดเพาะเลี้ยง (มก./ขวด)
		ซ้ำที่					
		1	2	3	4	5	
MS	ให้แสง	71.9	76.1	80.5	74.1	78	76.12
MS+NAA 0.5 mg/l	ให้แสง	246.3	250.8	249.8	240.8	249.4	247.42
MS+NAA 1.0 mg/l	ให้แสง	137.9	142.7	140.9	143.3	142.7	141.50
MS+NAA 2.0 mg/l	ให้แสง	193.2	198.3	203.6	193.4	201.2	197.94
MS	ไม่ให้แสง	52.1	49.5	48.9	48.4	53.3	50.44
MS+NAA 0.5 mg/l	ไม่ให้แสง	132.4	135.1	133.3	132.8	131.3	132.98
MS+NAA 1.0 mg/l	ไม่ให้แสง	47.9	59.5	54.8	55.1	57.4	54.94
MS+NAA 2 mg/l	ไม่ให้แสง	87.3	89.3	91.9	95.5	85.9	89.98

ตารางผนวก ข2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สูตรอาหาร	สภาวะ	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส
		ซ้ำที่				
		1	2	3		
MS	ให้แสง	0.102	0.115	0.095	0.104	58.3166
MS+NAA 0.5 mg/l	ให้แสง	0.094	0.081	0.091	0.0887	64.4489
MS+NAA 1.0 mg/l	ให้แสง	0.073	0.079	0.078	0.0766	69.2986
MS+NAA 2.0 mg/l	ให้แสง	0.043	0.048	0.048	0.0463	81.4429
MS	ไม่ให้แสง	0.112	0.117	0.109	0.1126	58.3166
MS+NAA 0.5 mg/l	ไม่ให้แสง	0.102	0.107	0.100	0.103	58.7174
MS+NAA 1.0 mg/l	ไม่ให้แสง	0.079	0.081	0.085	0.0816	67.2946
MS+NAA 2.0 mg/l	ไม่ให้แสง	0.072	0.070	0.069	0.0703	71.8236

ภาคผนวก ค

1. การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักรากหม่อนแห้งต่อขวดเพาะเลี้ยง

ในการทดลองทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 22 มีผลดังนี้

ตารางผนวก ค1 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักรากหม่อนแห้งต่อขวดเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 วัน

Descriptives

Weight

สูตรอาหาร	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
NH-Light	5	76.120	3.3395	1.4935	71.974	80.266	71.9	80.5
0.5-Light	5	247.420	4.0647	1.8178	242.373	252.467	240.8	250.8
1.0-Light	5	141.500	2.2045	.9859	138.763	144.237	137.9	143.3
2.0-Light	5	197.940	4.6334	2.0721	192.187	203.693	193.2	203.6
NH-Nonlight	5	50.440	2.1420	.9579	47.780	53.100	48.4	53.3
0.5-Nonlight	5	132.980	1.3953	.6240	131.247	134.713	131.3	135.1
1.0-Nonlight	5	54.940	4.3718	1.9551	49.512	60.368	47.9	59.5
2.0-Nonlight	5	89.980	3.8226	1.7095	85.234	94.726	85.9	95.5
Total	40	123.915	66.7871	10.5600	102.555	145.275	47.9	250.8

ตารางผนวก ค2 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักรากหม่อนแห้งต่อขวดเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 วัน

ANOVA

Weight

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	173583.323	7	24797.618	2104.570	.000
Within Groups	377.048	32	11.783		
Total	173960.371	39			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ค3 แสดงผลการเปรียบเทียบภายหลังการวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักรากหม่อนแห้งต่อขวดเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 35 วัน

Weight

สูตรอาหาร		N	Subset for alpha = 0.05							
			a	b	c	d	e	f	g	h
Duncan[a]	NH-Nonlight	5	50.440							
	1.0-Nonlight	5		54.940						
	NH-Light	5			76.120					
	NH-Nonlight	5				89.980				
	0.5-Nonlight	5					132.980			
	1.0-Light	5						141.500		
	2.0-Light	5							197.940	
	0.5-Light	5								247.420
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตารางผนวก ค4 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในอาหารสูตรต่างๆที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 วัน

Descriptives

Percent

สูตรอาหาร	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
NH-Light	3	58.316600	4.0676757	2.3484737	48.211933	68.421267	53.9078	61.9238
0.5-Light	3	64.462267	2.7282284	1.5751434	57.684972	71.239562	62.3246	67.5351
1.0-Light	3	69.271900	1.2883917	.7438533	66.071357	72.472443	68.3367	70.7415
2.0-Light	3	81.429500	1.1570099	.6680000	78.555328	84.303672	80.7615	82.7655
NH-Nonlight	3	54.843000	1.6198139	.9352000	50.819159	58.866841	53.1062	56.3126
0.5-Nonlight	3	58.717400	1.4451050	.8343317	55.127560	62.307240	57.1142	59.9198
1.0-Nonlight	3	67.267900	1.2244642	.7069448	64.226162	70.309638	65.9319	68.3367
2.0-Nonlight	3	71.810300	.6122321	.3534724	70.289431	73.331169	71.1423	72.3447
Total	24	65.764858	8.4312813	1.7210281	62.204640	69.325076	53.1062	82.7655

ตารางผนวก ค5 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในอาหารสูตรต่างๆ ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 วัน

ANOVA

Percent

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1567.841	7	223.977	53.369	.000
Within Groups	67.148	16	4.197		
Total	1634.990	23			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ค6 แสดงผลการเปรียบเทียบภายหลังการวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในอาหารสูตรต่างๆ ที่สภาวะให้แสงและไม่ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 วัน

Percent

สูตรอาหาร		N	Subset for alpha = 0.05					
			a	b	c	d	e	f
Duncan[a]	NH-Nonlight	3	54.843000					
	NH-Light	3	58.316600	58.316600				
	0.5-Nonlight	3		58.717400				
	0.5-Light	3			64.462267			
	1.0-Nonlight	3			67.267900	67.267900		
	1.0-Light	3				69.271900	69.271900	
	2.0-Nonlight	3					71.810300	
	2.0-Light	3						81.429500
	Sig.		.054	.814	.113	.248	.149	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

1. การทดสอบทางชีวภาพ

1.1 วิธีการ swab

1.1.1 นำเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 1 ลูป ใส่ลงในสารละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร

1.1.2 นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เชื้อเข้ากัน

1.1.3 นำไม้พันสำลีไปจุ่มลงในหลอดเชื้อจุลินทรีย์ ระวังอย่าให้สำลีชุ่มมากเกินไป แล้วนำไม้พันสำลีนั้นมาทาลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่ว

1.2 วิธี Agar Disc Diffusion

การวิเคราะห์ผลผลิตโดยวิธีการทางชีววิทยา agar disc diffusion เป็นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตของสารชีวภาพโดยอาศัยหลักการแพร่ ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้อาหารวุ้นผสมเชื้อทดสอบลงในจานเพาะเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง จากนั้นจึงนำกระดาษกรองรูปวงกลม (paper disc) ดูดซับสารที่ต้องการวิเคราะห์วางลงบนไป สารที่ต้องการวิเคราะห์จะแพร่ออกไปตามแนวรัศมีรอบๆ เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (inhibition zone) ของเชื้อทดสอบจะแปรตามปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์

1.2.1 วิธีการทำ Agar Disc Diffusion Method

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ อาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA)
2. เตรียมสารละลายแขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ
3. ทำการทา (swab) เชื้อจุลินทรีย์แขวนลอยลงบนอาหารที่เตรียมไว้ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร
4. นำที่คีบคีบแผ่นดิสก์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มสารสกัดที่ต้องการทดสอบรอให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง และวางลงบนอาหารที่ผ่านการทาเชื้อแล้ว (swab)
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น (มิลลิเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้