การทดสอบทางประสาทสัมผัสของข้าวเหนียวแก้ว และกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากต้นเตยหอม

SENSORY TESTING OF KAO NIAO KEO AND BACTERIA GROWTH PROMOTING ACTIVITY FROM PANDAN (*PANDANUS AMARYLLIFOLIUS*)

ชนัญญา วิเชียร

ชลิตา ธรรมจารุวัฒน์

ปรีชญา วัชรินทร์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SENSORY TESTING OF KAO NIAO KEO AND BACTERIA GROWTH PROMOTING ACTIVITY FROM PANDAN (*PANDANUS AMARYLLIFOLIUS*)

CHANANYA WICHIEN

CHALITA THAMJARUWAT

PREECHAYA WATCHARIN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	กิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และการทดสอบทางประสาทสัมผัสของข้าวเหนียวแก้วจากต้นเตยหอม Sensory testing of kao niao keo and bacteria growth promoting activity from pandan (*Pandanus amaryllifolius*)
ชื่อนักศึกษา	ชนัญญา วิเชียร รหัสประจำตัว 58050733 ชลิตา ธรรมจารุวัฒน์ รหัสประจำตัว 58050736 ปรีชญา วัชรินทร์ รหัสประจำตัว 58050777
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ธนาวดี ก่ออานันต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2562

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ	**ลายมือชื่อ**
ผศ. ลินจง สุขลำภู ประธานกรรมการ	ลินจง สุขลำภู
ผศ.ดร. วิภาวี เดชติศักดิ์ กรรมการ	[signature]
อ. ธนาวดี ก่ออานันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ	ธนาวดี ก่ออานันต์

วัน/ เดือน/ ปี ที่สอบ 1 กรกฎาคม 62

สถานที่สอบ อาคารพระจอมเกล้า คณะวิทยาศาสตร์ ห้อง 303

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

( )

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่............. เดือน.............. พ.ศ. ....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การทดสอบทางประสาทสัมผัสของข้าวเหนียวแก้ว และกิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากต้นเตยหอม		
ชื่อนักศึกษา	ชนัญญา	วิเชียร	รหัสประจำตัว 58050733
	ชลิตา	ธรรมจารุวัฒน์	รหัสประจำตัว 58050736
	ปรีชญา	วัชรินทร์	รหัสประจำตัว 58050777
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2561		
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ธนาวดี ก่ออานันต์		

บทคัดย่อ

การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการทดสอบสารสกัดจากใบเตยหอมที่กลั่นด้วยน้ำและการสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล อะซิโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วย DPPH การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ โดยการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี Disc diffusion assay การทดสอบหาค่าความเป็นพิษของสารสกัดใบเตยหอมต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ด้วยวิธี MTT assay และการทดสอบทางประสาทสัมผัสของข้าวเหนียวแก้วใบเตย พบว่าสารสกัดจากปิโตรเลียมอีเทอร์สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้มากที่สุด คือ 131.35 ± 12.18 µg GAE/mg ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเอทานอลมีค่าสูงสุด 27.24 ± 4.73 % และมีค่า IC_{50} น้อยสุดประมาณ 12.07 µg/ml การสกัดใบเตยด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) สูงกว่าการใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นที่ทดสอบ มีค่าการเป็นพิษต่อเซลล์ประมาณ 88.925 % เมื่อใช้อัตราส่วนใบเตยต่อน้ำกรองประมาณ 40 g : 100 ml เป็นสารให้กลิ่นรสในการผลิตขนมไทย ข้าวเหนียวแก้วใบเตยได้รับการยอมรับมากที่สุด อย่างมีนัยสำคัญกับข้าวเหนียวแก้วควบคุมที่ไม่เติมใบเตย การเพิ่มอัตราส่วนใบเตยต่อน้ำกรองเป็น 80 : 100 จะทำให้การประเมินทางประสาทสัมผัสลดลงเป็นอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

คำสำคัญ : ต้นเตยหอม, สารให้กลิ่นรส และข้าวเหนียวแก้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Sensory testing of kao niao keo and bacteria growth promoting activity from pandan (*Pandanus amaryllifolius*)
Student	Chananya Wichien Chalita Thamjaruwat Preechaya Watcharin
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2018
Advisor	Thanavadee Korarnan

Abstract

The study of biological activity of pandan (*Pandanus amaryllifolius*) such as phenolic compounds, DPPH scavenging and antipathogenic bacteria of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* with disc diffusion and cytotoxicity against HepG2 cell including sensory testing of kao niao keo. Pandan leaves extraction with water distillation and solvent extraction with distilled water, ethanol, acetone and petroleum ether, respectively. It was found that, pandan leaves extracted with petroleum ether showed higher total phenolic content (TPC) at 131.35 ± 12.18 µg GAE/mg, DPPH scavenging of ethanol extract showed higher value of 27.24 ± 4.73% and have the lowest IC_{50} value at 12.07 µg/ml. Pandan leaves extraction with petroleum ether exhibited higher cytotoxicity to liver cancer cells (HepG2), approximately 88.925%. Finally, the sensory evaluation of kao niao keo composition with pandan leaf ratio to filtered water about 40 g : 100 ml has the most overall liking with significant difference to kao niao keo control without pandan. The composition with pandan leaves : filtered water increasing to 80 : 100 decreased the sensory evaluation with 9-hedonic scale with no significant difference at 95%.

Keywords: *Pandanus amaryllifolius,* pandan, flavour, kao niao keo

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การดำเนินการจัดทำโครงงานพิเศษเรื่อง “กิจกรรมการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและการทดสอบทางประสาทสัมผัสของข้าวเหนียวแก้วจากต้นเตยหอม” นี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่ได้วางแผนไว้ เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์และความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ อาจารย์ธนาวดี ก่ออานันต์ ผู้ซึ่งให้ทั้งคำปรึกษา คำแนะนำ รวมถึง แนวคิด ข้อมูลเทคนิค ตลอดจนให้ความรู้ในการจัดทำโครงงานพิเศษเล่มนี้จนสำเร็จบรรลุเป้าหมาย โดยทางเราหวังว่าโครงงานพิเศษเล่มนี้จะเป็นประโยชน์นำไปสู่การปรับใช้ในอนาคตได้ ทางคณะผู้จัดทำมีความตระหนักเห็นถึงความตั้งใจและความเอาใจใส่ของอาจารย์ที่ปรึกษาจึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

นอกจากนี้ต้องขอบคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์และบุคคลอื่นๆที่เกี่ยวข้องรวมทั้งเพื่อน ๆ ที่คอยช่วยเหลือ แนะนำและให้คำปรึกษาในการทำโครงงานพิเศษ ทางคณะผู้จัดทำ รู้สึกซาบซึ้งใจในความช่วยเหลือ ความปรารถนาดีของทุกท่านเป็นอย่างยิ่ง จึงขอขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการจัดทำโครงงานพิเศษครั้งนี้ไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ชนัญญา วิเชียร
ชลิตา ธรรมจารุวัฒน์
ปรีชญา วัชรินทร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อ ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ข
กิตติกรรมประกาศ ค
สารบัญ ง
สารบัญตาราง ช
สารบัญรูป ญ
คำย่อ/สัญลักษณ์ ฏ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 เตยหอม (Pandanus amaryllifolius) 3
2.2 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ 6
2.3 กลไกการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ของจุลชีพ 7
2.4 กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ 7
2.5 อนุมูลอิสระ (Free radical) 8
2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) 8
2.7 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH 10
2.8 สารประกอบฟีนอลิก 11
2.9 มะเร็ง (Cancer) 12
2.10 ความเป็นพิษต่อเซลล์ 12
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 15
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ 15
3.1.1 แบคทีเรีย 15
3.2 เซลล์สัตว์ 15
3.3 ตัวอย่างพืช 15
3.4 วัสดุและอุปกรณ์ 15
3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 15
3.4.2 สารเคมี 15
3.4.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ 16
3.5 วิธีการทดลอง 18
3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 18
3.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ 19
3.5.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบเตยหอมต่อเซลล์ 20
3.5.5 การทดสอบด้านประสาทสัมผัส 21
3.5.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis) 22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 23
4.1 การสกัดสารสกัดจากใบเตยหอม 23
4.2 การวิเคราะห์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากใบเตยหอม 23
4.2.1 การวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 23
4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เป็น DPPH 25
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ 27
4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (HepG2) 29
4.6 ผลการทดสอบประสาทสัมผัส 34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 37
5.1 สรุปผลการวิจัย 37
5.2 ข้อเสนอแนะ 37
เอกสารอ้างอิง 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก 43

ภาคผนวก ข 47

ภาคผนวก ค 53

ภาคผนวก ง 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 ปริมาณและเปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดจากใบเตยที่กลั่นและสกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล อะซิโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์........23

4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดของใบเตยหอมจากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 100, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร........24

4.3 แสดงร้อยละของปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% DPPH) ของสารสกัดใบเตยหอมจากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ........26

4.4 ค่า IC_{50} ในการดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเตยหอมที่ความเข้มข้น 100, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร........26

4.5 ค่าการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบเตยหอมต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)........29

4.6 ผลการประเมินประสาทสัมผัสของข้าวเหนียวแก้วใบเตยโดยใช้อัตราส่วนใบเตยต่อน้ำ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 40 : 100 และ 80 : 100........35

ผ-1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร........61

ผ-2 แสดงผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวม........62

ผ-3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เป็น DPPH ของสารสกัดใบเตยด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน........65

ผ-4 แสดงผลคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-Hedonic scale ของข้าวเหนียวแก้วใบเตยแบบไม่ใส่ใบเตย (ควบคุม)........68

ผ-5 แสดงผลคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-Hedonic scale ของข้าวเหนียวแก้วใบเตยอัตราส่วน 40 : 100........70

ผ-6 แสดงผลคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-Hedonic scale ของข้าวเหนียวแก้ใบเตยอัตราส่วน 80 : 100........72

ผ-7 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร........74

ผ-8 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร........77

ผ-9 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร........80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ผ-10 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร....83
ผ-11 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร....86
ผ-12 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร....89
ผ-13 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ค่าค่า IC_{50} ในการดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเตยหอมที่ความเข้มข้น 100, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร....92
ผ-14 ผลทางสถิติในการทดสอบประสาทสัมผัสด้านลักษณะที่ปรากฏ....95
ผ-15 ผลทางสถิติในการทดสอบประสาทสัมผัสด้านสี....97
ผ-16 ผลทางสถิติในการทดสอบประสาทสัมผัสด้านกลิ่น....99
ผ-17 ผลทางสถิติในการทดสอบประสาทสัมผัสด้านรสชาติ....101
ผ-18 ผลทางสถิติในการทดสอบประสาทสัมผัสด้านเนื้อสัมผัส....103
ผ-19 ผลทางสถิติในการทดสอบประสาทสัมผัสด้านความชอบโดยรวม....105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 เตยหอม..3

2.2 ลักษณะส่วนต่าง ๆของเตยหอม...5

2.3 แสดงโครงสร้างของ MTT และปฏิกิริยาของ MTT colorimetric assay..................................13

4.1 ตัวอย่างการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus*..27

4.2 ตัวอย่างการประเมินค่า MIC ของเชื้อ *Staphylococcus aureus*...27

4.3 ตัวอย่างการประเมินค่า MBC ของเชื้อ *Staphylococcus aureus*...28

4.4 ภาพถ่ายเฟสคอนทราสต์ของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ปกติ (A) และภาพแสดงการเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของใบเตยแห้ง (ควบคุม) (B)...30

4.5 ภาพถ่ายเฟสคอนทราสต์ของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ทดสอบด้วย ใบเตยกลั่นด้วยน้ำ (C) และทดสอบด้วยใบเตยที่สกัดด้วยน้ำ (D)..31

4.6 ภาพถ่ายเฟสคอนทราสต์ของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ทดสอบด้วยสารจากการสกัดด้วยเอทานอล (E) ทดสอบด้วยสารจากการสกัดด้วยอะซิโตน (F)..32

4.7 ภาพถ่ายเฟสคอนทราสต์ของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ทดสอบด้วยสารจากการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (G) ทดสอบด้วย DMSO เข้มข้น 1% (H)..33

4.8 ข้าวเหนียวแก้วใบเตย...34

ภาคผนวก ข ที่ 1 *Escherichia coli*...47

ภาคผนวก ข ที่ 2 *Pseudomonas aeruginosa*..49

ภาคผนวก ข ที่ 3 *Staphylococcus aureus*..50

ภาคผนวก ข ที่ 4 เซลล์ HepG2...51

ภาคผนวก ค ที่ 1 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และการประเมินค่าบนอาหารCAMHA ของ *S.aureus* TISTR 25923..53

ภาคผนวก ค ที่ 2 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และการประเมินค่าบนอาหารCAMHA ของ *E.coli* ATCC 25922...55

ภาคผนวก ค ที่ 3 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และการประเมินค่าบนอาหาร CAMHA ของ *Pseudomonas* sp. ATCC 27853...............................57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ภาคผนวก ค ที่ 4 แสดงลักษณะการประเมินฤทธิ์ของสิ่งสกัดในการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* TISTR 25923 บนอาหาร CAMHA....59

ภาคผนวก ค ที่ 5 แสดงลักษณะการประเมินฤทธิ์ของสิ่งสกัดในการยับยั้งเชื้อ *E.coli* ATCC 25922 บนอาหาร CAMHA....59

ภาคผนวก ค ที่ 6 แสดงลักษณะการประเมินฤทธิ์ของสิ่งสกัดในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* sp. ATCC 27853 บนอาหาร CAMHA....60

ภาคผนวก ง ที่ 1 กราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร....61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
ANOVA	การความแปรปรวน (Analysis of Variance)
DMSO	Dimethylformamide
DPPH	สารเคมี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
HepG-2	เซลล์มะเร็งตับ
MBC	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้
McFarland No 0.5	ความขุ่นมาตรฐานแมกซ์ฟาร์แลนด์ ที่มีจำนวนเซลล์ 1.5×10^8 CFU/ml
MIC	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (minimum inhibitory concentration)
MTS	สารเคมี (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, $C_{20}H_{17}N_5O_6S_2$)
MTT	สารเคมี (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
XTT	สารเคมี (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ต้นเตยหอม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pandanus amaryllifolius* Roxb เป็นพืชในท้องถิ่นที่คนไทยรู้จักตั้งแต่สมัยโบราณ มีการนำใบเตยมาใช้ประโยชน์มาก เนื่องจากหาได้ง่ายในประเทศไทย ราคาถูก เป็นพืชที่ให้สีและมีกลิ่นหอม โดยสีเขียวของใบเตยเป็นสีของคลอโรฟิลล์ สามารถนำมาใช้แต่งสีขนมหรือใช้แต่งกลิ่นอาหารได้อย่างหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นของหวานต่าง ๆ อย่างเช่น ขนมลอดช่อง ขนมชั้น รวมไปถึงเค้กและสลัด เป็นต้น ซึ่งไม่เป็นพิษในการนำมาประกอบอาหารและทำขนม สาระสำคัญที่พบในใบเตยประกอบไปด้วย น้ำมันหอมระเหย (essential oil) คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) สารต้านอนุมูลอิสระ และสารประกอบฟีนอล เป็นต้น ซึ่งในน้ำมันหอมระเหยประกอบไปด้วยสารหลายชนิด โดยสารหอมที่เป็นองค์ประกอบหลักของกลิ่นหอมในใบเตยคือ 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) การสกัดสารหอมระเหยของใบเตยหอมสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย เช่น เอทานอล ไดคลอโรมีเทน น้ำ เป็นต้น หรือใช้การกลั่นด้วยไอน้ำเพื่อให้ได้น้ำมันหอมระเหย

ปัจจุบันได้มีการนำใบเตยมาใช้เป็นสารให้กลิ่นในรถยนต์หรือในห้องน้ำ โดยจะนำมาใช้แบบใบสด จะให้กลิ่นหอมอ่อน ๆ ทำให้รู้สึกสบายคลายความเหนื่อยล้าได้ หรือนำใบเตยมาสกัดสารหอมเพื่อนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ ใช้ในรูปของน้ำมันหอมระเหย จะเป็นการเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรของใบเตย หรือนำมาแยกองค์ประกอบที่สำคัญออกมาและนำไปใช้ในการปรุงแต่งน้ำหอมหรือเครื่องหอมอื่น ๆ ได้ ใบเตยยังมีสรรพคุณช่วยลดการกระหายน้ำ เมื่อรับประทานน้ำใบเตยจะรู้สึกชื่นใจและชุ่มคอ รักษาโรคหืด บำรุงหัวใจ ช่วยรักษาโรคเบาหวาน ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด และรักษาระดับความดันให้เป็นปกติ นอกจากนั้น เตยหอมยังมีสารอาหารต่าง ๆ เช่น บีตา-แคโรทีน วิตามินซี และแคลเซียม เตยหอมจึงจัดเป็นวัตถุดิบสมุนไพรที่มีความน่าสนใจในแง่ของการเป็นพืชที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถนำไปต่อยอดแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ได้ เช่น ยา เครื่องสำอาง และอาหารสัตว์ เป็นต้น

งานวิจัยนี้เห็นความสำคัญของใบเตย จึงเป็นที่มาของการวิจัยเพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบเตยหอมและการทดสอบทางประสาทสัมผัสจากใบเตยหอม เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต่าง ๆ ที่มีอยู่ในสารสกัดใบเตยหอม รวมถึงการทดสอบสอบทางประสาทสัมผัสของใบเตยหอม ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่จะเป็นประโยชน์ต่อการนำใบเตยหอมมาใช้บริโภคหรือแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ด้านสุขภาพ อาหาร ความงาม หรือด้านอื่น ๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากใบเตยหอม

1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบเตยหอม ได้แก่ การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบการต้านทานเชื้อโรคและเซลล์มะเร็ง

1.2.3 เพื่อทดสอบทางประสาทสัมผัสการใช้ใบเตยเป็นส่วนผสมในการทำข้าวเหนียว

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบเตยหอม โดยใบเตยจะถูกนำตากแดดจนแห้ง จากนั้นนำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการกลั่นด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด ซึ่งถูกควบคุมด้วยอุณหภูมิและเวลาที่ต่างกันตามที่กำหนด และนำสารสกัดที่ได้จากทั้ง 2 วิธีไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป รวมถึงการนำใบเตยหอมมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ข้าวเหนียวแก้วเพื่อใช้ในการทดสอบประสาทสัมผัสต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากใบเตย

1.4.2 ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบเตยหอม เพื่อให้ใช้ประโยชน์ได้อย่างเหมาะสม

1.4.3 ทราบความชอบรวมทางประสาทสัมผัสของใบเตยหอมที่ใช้เป็นส่วนผสมในขนมไทย เช่น เหนียวแก้วใบเตย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เตยหอม (*Pandanus amaryllifolius*)

รูปที่ 2.1 ต้นเตยหอม (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.)
ที่มา : Wakte และคณะ (2009)

เตย (Pandom wangi) หรือบางครั้งเรียก เตยหอม เป็นพืชที่นิยมใบมาใช้ประโยชน์ทางด้านอาหารมาก เนื่องจากใบมีกลิ่นหอมอ่อนคล้ายข้าวหอมมะลิ ซึ่งช่วยปรับแต่งกลิ่นของอาหารให้น่ารับประทานขึ้น รวมถึงน้ำมันหอมระเหยจากใบยังใช้ประโยชน์ในทางยา และความสวยความงามได้ด้วย

วงศ์ : Pandanaceae

ชนิด : *P. amaryllifolius* Roxb.

ถิ่นกำเนิด : ประเทศไทย และแถบประเทศมาลายู

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Pandanus amaryllifolius* Roxb.

ชื่อพ้องวิทยาศาสตร์ : *Pandanus ordorus* Ridl.

ชื่อสามัญ : Pandom wangi, pandan หรือ Pandanus

ชื่อท้องถิ่น : ภาคกลาง และทั่วไป – เตย/ต้นเตย/ใบเตย เตยหอม เตยหอมใหญ่ เตยหอมเล็ก
ภาคเหนือ – หวานข้าวใหม้
ภาคใต้ และแถบมลายู – ปาแนะวองิง ปาแง๊ะออริง ปาแป๊ะออริง
จีน – พังลั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 ชนิดและการแพร่กระจาย

1. เตยมีหนาม หรือมักเข้าใจว่า เป็นเตยต้นตัวผู้ หรือที่เรียกว่า ต้นลำเจียก หรือ เตยทะเลลำต้นออก ดอก และดอกมีกลิ่นหอม ไม่นิยมนำใบมาทำอาหาร แต่นิยมใช้ดอกมาประกอบอาหาร รวมถึงนำใบใช้ ในการจักสาน

2. เตยไม่มีหนาม หรือมักเข้าใจว่า เป็นเตยต้นตัวเมีย หรือที่เรียกว่า เตย หรือ เตยหอม มีลำต้นเล็กกว่าเตยหนาม ไม่มีดอก นิยมนำมาคั้นเอาน้ำสำหรับใช้ประกอบอาหารหรือทำขนมหวาน

เตย หรือ เตยหอม เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศอินเดีย รวมถึงทวีป อื่น เช่น แอฟริกา และออสเตรเลีย ชอบขึ้นตามพื้นที่ชุ่ม ริมลำน้ำหรือบริเวณชื้นแฉะที่มีน้ำขังเล็กน้อย

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ใบเตยหอม (Bai-Toei-hom) หรือเรียกว่า เตยหอม เป็นสมุนไพรไทยที่มาแต่โบราณ เป็นไม้ยืนต้น มีทรงพุ่มขนาดเล็กขึ้นเป็นกอ ลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดิน มีข้อสั้นๆโผล่จากดินเล็กน้อย จะถูกห่อหุ้มไปด้วยกาบใบโดยรอบๆ มีสีเขียว ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับเวียนจนถึงปลายยอด มีลักษณะยาวรี ใบเป็นทางยาว มีเส้นกลางชัด ขอบใบเรียบ ใบแข็งเรียบเป็นมัน มีสีเขียว มีกลิ่นหอม ใช้ทำเครื่องดื่มต่างๆ และนำมาใช้ผสมอาหาร แต่งกลิ่น เพิ่มสีอาหารเมนูต่างๆ ได้หลายเมนู ในประเทศไทยมีปลูกหลายสายพันธุ์

ลำต้น เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก มีทรงพุ่มขนาดเล็กขึ้นเป็นกอ มีลักษณะกลมๆ ลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดิน มีข้อสั้นๆโผล่จากดินเล็กน้อย จะถูกห่อหุ้มไปด้วยกาบใบโดยรอบๆ มีสีเขียว

ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับเวียนจนถึงปลายยอด มีลักษณะยาวรี ใบเป็นทางยาว มีเส้นกลางชัด ขอบใบเรียบ ใบแข็งเรียบเป็นมัน มีสีเขียว มีกลิ่นหอม

ราก มีระบบรากแก้ว แทงลึกลงดิน มีลักษณะกลมๆ มีรากแขนง รากฝอยเล็กๆ มีรากออกตามลำข้อของต้น มีสีน้ำตาล

ดอก ออกเป็นช่อ มีดอกย่อยเล็กๆ ไม่มีกลีบดอก

ผล เป็นฝักเล็กๆ เตยหอมส่วนมากเป็นเตยตัวผู้ ไม่มีดอกและผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.2 ลักษณะส่วนต่าง ๆของเตยหอม

หมายเหตุ (A) ลำต้นของเตยหอม (B) ใบของเตยหอม (C) รากของเตยหอม (D) ดอกของเตยหอม

ที่มา : https://www.kasetorganic.com/ A1.html (สืบค้นวันที่ 05/06/62)

2.1.3 สารสำคัญในใบเตยหอม

1. **กลุ่มสาร**

Anthocyanin, carotenoids, tocopherols, tocotrienols, quercetin, alkaloids, fatty acids, esters, และessential oils

2. **สารสำคัญ**

3-methyl-2(5H)-furanone เป็นสารที่ให้กลิ่นหอมขณะที่เป็นใบสด

2-acetyl-1-pyrroline (C_6H_9NO) เรียกย่อๆว่า ACPY หรือ 2AP เป็นสารที่ให้กลิ่นหอม คล้ายกับ กลิ่นหอมของข้าวหอมมะลิหรือกลิ่นหอมของข้าวใหม่ ซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกัน และจะมีกลิ่นหอมเมื่อได้รับความร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 ฤทธิ์สำคัญทางยาที่พบ

- ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัส
- ต้านอนุมูลอิสระ
- ต้านการอักเสบ
- กระตุ้นกระบวนการซ่อมแซมเซลล์

2.1.5 สรรพคุณและประโยชน์ของใบเตยหอม

มีวิตามินซี มีวิตามินอี มีโฟเลต มีแมกนีเซียม มีสังกะสี มีทองแดง มีวิตามินบี1 มีวิตามินบี2 มีวิตามินบี3 มีโพแทสเซียม มีแมงกานีส มีวิตามินเอ มีแคลเซียม มีฟอสฟอรัส มีเหล็ก มี เบตาแคโรทีน มีพลังงาน มีคาร์โบไฮเดรต

ช่วยบำรุงหัวใจ ช่วยบำรุงประสาท แก้ไข้ ช่วยดับพิษไข้ ช่วยคลายร้อน ช่วยดับร้อนใน แก้อ่อนเพลีย ช่วยเพิ่มพลัง ช่วยบำรุงธาตุ ช่วยรักษาโรคเบาหวาน ช่วยควบคุมน้ำตาลในเลือด ช่วยลดความดันโลหิตสูง ช่วยป้องกันเลือดแข็งตัว ช่วยรักษาหืด ช่วยรักษาโรคหัด แก้กระษัย ช่วยขับปัสสาวะ ช่วยรักษาโรคผิวหนัง ช่วยรักษาโรคข้อ ช่วยรักษาโรครูมาตอยด์ ช่วยบรรเทาอาการปวด ช่วยรักษาอาการอักเสบ ช่วยบำรุงผิวพรรณ

2.1.6 คุณค่าทางอาหารของเตยหอม

ส่วนประกอบของใบเตยหอม มีสารอาหารสำคัญที่ดีต่อสุขภาพ ประกอบด้วยวิตามินและเกลือแร่หลากหลายชนิด หากเทียบใน 100 กรัม ในเตยหอมจะประกอบไปด้วย วิตามินซี 8 กรัม, เบต้าแคโรทีน 3 ไมโครกรัม, วิตามินบีสอง 0.1 มิลลิกรัม, วิตามินบีสามประมาณ 1-2 มิลลิกรัม, ฟอสฟอรัส 27 มิลลิกรัม, แคลเซียม 123 มิลลิกรัม, เหล็ก, 0.1 มิลลิกรัม นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบด้านโภชนาการ เทียบใน 100 กรัม จะมีคาร์โบไฮเดรต 45 กรัม และโปรตีนอยู่ที่ประมาณ 2 กรัม พลังงานให้สูงถึง 35 กิโลแคลอรี

2.2 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพร ทดสอบได้ 2 วิธี คือ

2.2.1 Dilution Method เป็นการเจือจางยาให้มีความเข้มข้นที่ต่างๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนาอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาที่มีความเข้มข้นที่ระดับต่างๆมาทดสอบกับเชื้อวิธีนี้สามารถหาความเข้มข้นต่าสุดในการยับยั้งเชื้อได้ (Minimal Inhibition Concentration, MIC) ซึ่งสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 วิธี คือการเจือจางยาในอาหารเหลว (Broth dilution method) และการเจือจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหารแข็ง (Agar dilution method) ซึ่งจะต้องใช้เวลา เครื่องมือและแรงงานมาก แต่ผลการทดลองที่ได้แน่นอนกว่า

2.2.2 Diffusion Method เป็นการทดสอบโดยทาให้ตัวยาจากที่หนึ่งซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้ อออาจใช้แผ่นยาเป็นกระดาษกรอง หรือเป็นเม็ดยา หรือเจาะหลุมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วใส่ยาลงไป เพื่อให้ยาซึมจากบริเวณหนึ่งที่มีความเข้มข้นสูงไปสู่ที่ที่มีความเข้มข้นต่า อ่านผลการทดสอบโดยดูบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญ (clear zone หรือ inhibition zone) วิธีนี้ไม่สามารถอ่านผลเป็นค่าความเข้มข้นของยาโดยตรงได้ แต่ก็เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากทาได้ง่าย ใช้เวลาน้อยและวิธีที่นิยมทดสอบมากที่สุดคือแบบที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (disc diffusion method)

2.3 กลไกการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ของจุลชีพ

1. ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ได้แก่กลุ่ม penicillins, กลุ่ม cephalosporins, vancomycin, bacitracin และ cycloserine เป็นต้น

2. ออกฤทธิ์ต่อเซลล์เมมเบรน ได้แก่ polymyxins, gramicidin, amphotericin B และ nystatin เป็นต้น

3. ขัดขวางการสร้าง nucleic acid ได้แก่ rifamycins, quinolones และ metronidazole

4. ยับยั้งการสร้างโปรตีน ได้แก่ tetracyclines, aminoglycosides, chloramphenicol, erythromycin และlincomycin

5. รบกวน metabolite ที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของแบคทีเรีย ได้แก่ sulfonamides, trimethoprim, isoniazid

2.4 กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ

1. การออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกแบ่งเป็น 2 ชั้น คือชั้นในติดกับเซลล์เมมเบรน ประกอบด้วยสารพวก peptidoglycan ยากลุ่ม penicillins ออกฤทธิ์โดยขัดขวางการสร้าง peptidoglycan ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

2. การออกฤทธิ์ต่อเซลล์เมมเบรน แบ่งได้เป็น 3 แบบ คือ

   1) ทำให้ส่วนประกอบของเมมเบรน ผิดปกติ

   2) ทำให้การดูดซึมของ ions ผิดปกติ

   3) ผลต่อเอ็นไซม์ที่เมมเบรน

3. การออกฤทธิ์ต่อการสร้าง nucleic acid

   1) ขัดขวางการทำงานของ DNA

   2) ขัดขวางเอ็นไซม์ของการสังเคราะห์ nucleic

4. การออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน เช่น tetracyclines จับกับ ribosome ส่วน 30S ขัดขวางไม่ให้ amino acyl tRNA ไปรวมกับ mRNA – ribosome complek ทำให้สาย peptide ที่กำลังสร้างดำเนินต่อไปไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การออกฤทธิ์รบกวน metabolite ของเซลล์

2.5 อนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระ (อังกฤษ: radical หรือมักใช้ว่า free radical) คือ อะตอม โมเลกุลหรือไอออนซึ่งมีอิเล็กตรอนเดี่ยวในวงนอกสุด (unpaired valence electron) หรือการมีจัดเรียงอิเล็กตรอนเป็นแบบเชลล์เปิด (open-shell electronic configuration) อนุมูลอิสระอาจมีประจุเป็นบวก ลบหรือเป็นศูนย์ก็ได้ ด้วยข้อยกเว้นบางประการ อิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเหล่านี้ทำให้อนุมูลอิสระว่องไวต่อปฏิกิริยาสูง อนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในการสันดาป เคมีบรรยากาศ พอลิเมอไรเซชัน เคมีพลาสมาชีวเคมีและกระบวนการทางเคมีอีกมากมายในสิ่งมีชีวิต

อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวหรืออิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ ซึ่งไม่เสถียร มีพลังงานและมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูง โดยอนุมูลอิสระนี้ มักจะหาทางจับคู่กับอะตอมหรือโมเลกุลใกล้ ๆ เพื่อดึงอิเลคตรอนจากโมเลกุลเหล่านั้น ทำให้โมเลกุลนั้นๆ สูญเสียอิเลคตรอนของมันเองกลายเป็น free radical ตัวใหม่ เกิดปฏิกิริยาต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ อาจเกิดปฏิกิริยากับส่วนที่สำคัญของร่างกายเรา เช่น DNA หรือ เยื่อหุ้มเซลล์และส่งผลส่งผลเสียต่อเซลล์ของเรา ทำให้เซลล์ทำงานแย่ลงหรือตายได้

อนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อไขมัน (โดยเฉพาะไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ) โปรตีน หน่วยพันธุกรรม และคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะไม่กล่าวถึงรายละเอียดในที่นี้ ทำให้เพิ่มอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด โรคที่สำคัญและมีการศึกษากันมาก ได้แก่ โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคมะเร็งบางชนิด โรคอัลไซเมอร์ โรคไขข้ออักเสบ โรคความแก่ เป็นต้น

2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือโมเลกุลของสารที่สามารถจับกับตัวรับและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลสารอื่น ๆ ได้ ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวเนื่องกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังตัวออกซิไดซ์ ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารอนุมูลอิสระ ซึ่งสารอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่และทำลายเซลล์ของร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้ายุติปฏิกิริยาลูกโซ่เหล่านี้ด้วยการเข้าจับกับสารอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงถือเป็นตัวรีดิวซ์ อาทิ ไธออล กรดแอสคอร์บิก และโพลีฟีนอล

ในทางเคมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชั่น โดยกระบวนการออกซิเดชั่นมีได้หลายรูปแบบ เช่น

1) กระบวนการออกซิเดชั่นที่ทำให้เหล็กกลายเป็นสนิม ทำให้แอปเปิ้ลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) ทำให้น้ำมันพืชเหม็นหืน

กระบวนการออกซิเดชั่นที่เกิดในร่างกาย เช่น การย่อยสลายโปรตีนและไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจ ควันบุหรี่ รังสียูวี ล้วนทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายของเราซึ่งสร้างความเสียหายต่อร่างกายได้ ในความเป็นจริงไม่มีสารประกอบสารใดสารหนึ่งสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นได้ทั้งหมด แต่ละกลไกอาจต้องใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันในการหยุดกระบวนการออกซิเดชั่น

บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันหรือกำจัดอนุมูลอิสระได้จึงมีความสำคัญ มีงานวิจัยมากมายบ่งชี้ว่า สารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดความเสี่ยงต่อโรคหลายโรคโดยเฉพาะโรคเรื้อรังที่สัมพันธ์กับอาหาร เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น

รวมทั้งช่วยชะลอกระบวนการบางขั้นตอนที่ทำให้เกิดความแก่โดยปกติร่างกายสามารถกำจัดอนุมูลอิสระก่อนที่มันจะทำอันตราย แต่ถ้ามีการสร้างอนุมูลอิสระเร็วหรือมากเกินกว่าร่างกายจะกำจัดทัน อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะสร้างความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อได้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพ สารต้านอนุมูลอิสระลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ 2 ทาง คือ

1) ลดการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกาย
2) ลดอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

แม้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระไม่สามารถแก้ไขความเสียหายที่เกิดขึ้นแล้ว แต่สามารถชะลอให้ความเสียหาย เกิดช้าลงได้ โดยเฉพาะโรคเรื้อรังซึ่งเป็นผลลัพธ์สะสมที่เกิดจากเซลล์และเนื้อเยื่อในร่างกายถูกทำอันตรายและเสียหายเป็นปีๆ (โดยมากเป็นเวลาหลายสิบปี) เห็นได้จากการรวบรวมความชุกของโรคว่าโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง เป็นมากในผู้ใหญ่วัยกลางคนหรือผู้สูงอายุ ดังนั้นบุคคลทุกเพศทุกวัยจึงควรได้รับสารต้านอนุมูลอิสระให้พอเพียงต่อความต้องการในแต่ละวัน เพื่อให้เกิดความสมดุลในร่างกายระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระ และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น

สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารแอนติออกซิแดนซ์ (antioxidants) ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี ซีลีเนียม บีตาแคโรทีน วิตามินเอ พฤกษาเคมีต่างๆ (phytochemicals) เช่น สารประกอบฟีโนลิก (polyphenol) จากชาและสมุนไพรบางชนิด ไอโซฟลาโวน (isoflavones) จากถั่วเหลือง เป็นต้น เพื่อให้ร่างกายได้รับสารต้านอนุมูลอิสระพอเพียงกับความต้องการ เราควรกินผักผลไม้สีเข้มเป็นประจำโดยล้างให้สะอาดทุกครั้ง นอกจากจะได้รับสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังจะได้รับใยอาหารด้วย ร่างกายของเราจำเป็นต้องได้รับใยอาหารเช่นกัน เนื่องจากใยอาหาร ช่วยในการขับถ่าย ช่วยเพิ่มปริมาณอุจจาระ ช่วยป้องกัน อาการท้องผูก ช่วยนำโคเลสเตอรอลออกจากร่างกาย เร่งการนำสารพิษที่อาจทำให้เป็นมะเร็งบางชนิดออกจากร่างกายเร็วขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazylเ ป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้องและแม่นยำสูง

หลักการ

DPPH เป็น stable radical ในตัวทำละลายเมทานอล (methanol) สารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร (nm)

โดย DPPH· จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species (R·)

DPPH· + AH------------DPPH-H + A·

DPPH· + R·-------------- DPPH-R

วิธีการ

เมื่อ DPPH· ทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูอิสระที่ใช้เป็นมาตรฐานคือ BHTถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงจะลดลง ซึ่งจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า

เตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT

เป็นสารมาตรฐานที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ใช้ความเข้มข้น 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.562 μg/ml ใน absolute ethanol วัดค่าการดูดกลืนแสงยูวี ที่ความยาวคลื่น 515 nm ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การแสดงผล

การศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ในสารตัวอย่างนิยมรายงานเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH□ ลดลง 50%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสง แล้วหาค่า EC_{50} จากกราฟแสดงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ แล้วใช้ค่า EC_{50} ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างตัวอย่างที่ทดสอบกับสารมาตรฐาน BHT คำนวณ % Radical Scavenging (เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ)

% Radical Scavenging = [(AB - AA) / AB] x100

เมื่อ

AA = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

AB = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

2.8 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิค (Phenolic compound) เป็นสารที่พบได้ในพืช มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น ละลายน้ำ ได้ มักพบอยู่ทั่วไปรวมกับโมเลกุลของน้ำ ตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ ในธรรมชาติพบสารประกอบฟีนอลิคได้หลายชนิด ที่พบมากสุดจะเป็นกลุ่มฟลาโวนอยด์ และโพลิฟีนอลิค เช่น ลิกนิน และ แทนนิน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคในอาหารและเครื่องดื่มที่มาจากพืชผักและผลไม้จะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของพืช วิธีการปลูก ระดับความสุก กระบวนการแปรรูปและการเก็บรักษา การใช้ความร้อนในกระบวนการแปรรูปมีส่วนทา ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคลดลง สารประกอบฟีนอลิกประเภทโพลิฟีนอลมีประโยชน์หลายประการ เช่น มีส่วนช่วยป้องกันมะเร็ง ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือดสมอง เนื่องจากช่วยลดโคเลสเตอรอลชนิดแอลดีแอลและไตรกลีเซอไรด์ และช่วยเพิ่มระดับโคเลสเตอรอลชนิดเอชดีแอล ลดความดันโลหิตและระดับน้า ตาลในเลือด

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของโมลิบโดทังสเตตไอออน (Molybdotungstate ion) รีเอเจนท์ประกอบด้วย โซเดียมทังสเตต โซเดียมโมลิบเดต กรดฟอสฟอริก และ โซเดียมคาร์บอเนต สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของไอออน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นอยู่ในช่วงประมาณ 760-765 นาโนเมตร และรายงานผลในหน่วยของมิลลิกรัมของกรดแกลลิค (Gallic acid equivalent, mg/g GAE)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 มะเร็ง (Cancer)

มะเร็งเป็นโรคที่มีความผิดปกติในการแบ่งตัวของเซลล์ โดยเซลล์จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและไม่สามารถควบคุมได้ ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาที่สลับซับซ้อนของปัจจัยการก่อโรคหลายๆ ชนิด ไม่ว่าจะเป็นปัจจัยทางพันธุกรรม สิ่งแวดล้อม หรือสารก่อมะเร็งต่างๆ เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เกิดจากการเผาไหม้ หรือ การสูบบุหรี่ สารพิษในอาหาร และรังสี เป็นต้น

การเกิดโรคมะเร็งมี 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเรียกว่า initiation เป็นขั้นตอนที่มีการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นมะเร็ง ได้แก่ ยีนมะเร็ง (oncogenes) หรือยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes) ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญในการควบคุมความสมดุลของการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ ส่งผลทำให้เซลล์มี DNA ที่ผิดปกติเกิดขึ้น ขั้นตอนต่อไปเรียกว่า promotion ในขั้นตอนนี้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น ดังนั้น เซลล์ที่มีความผิดปกติของ DNA จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น เซลล์ที่มีความผิดปกติของ DNA นั้นเมื่อผ่าน ขั้นตอน promotion แล้วเซลล์นั้นจะเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็งระยะลุกลาม (progression) ผลลัพธ์สุดท้ายของการลุกลามของโรคมะเร็งคือการแพร่กระจาย ของเซลล์ผิดปกติ (metastatic phenotype) ไปยังอวัยวะต่างๆ ผ่านทางกระแสโลหิต เมื่อเซลล์มะเร็งลุกลามเข้าสู่กระแสเลือดแล้วจะเกาะรวมตัวกันเอง หรือเกาะกับเซลล์อื่น ซึ่งการเกาะรวมตัวกันเองหรือเกาะกับเซลล์อื่นนั้น ทำให้เซลล์มะเร็งมีโอกาสรอดชีวิตได้มากขึ้นในระหว่างที่ ลอยอยู่ในกระแสเลือด เมื่อเซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปถึง ตำแหน่งใหม่ในร่างกายแล้ว เซลล์มะเร็ง จะกระตุ้นให้เกิดเส้นเลือดมาเลี้ยงเซลล์มะเร็งแล้วเริ่มแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นก้อนมะเร็งใหม่ขึ้นมา

2.10 ความเป็นพิษต่อเซลล์

การวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell Proliferation) ได้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาผลการตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อสารทดสอบ ซึ่งส่วนใหญ่จะดูความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ (Cell Cytotoxicity) ปัจจุบันมีหลากหลายวิธีที่ใช้วัด Cell Proliferation เช่น การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต วัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น (Click iT® EdU cell proliferation assay) รวมถึงการดูจาก metabolic activity ของเซลล์ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย และเป็นที่นิยมมากที่สุด

การวัด Metabolic activity ภายในเซลล์นั้น สามารถบ่งบอกว่าเซลล์นี้ยังมีพลังงานที่จะใช้ในการเพิ่มจำนวนอยู่หรือไม่ กลุ่มเซลล์ใดที่แสดงให้เห็นว่ามี metabolic activity มาก นั้นก็หมายถึงว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ในการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยการวัด metabolism มีอยู่หลายวิธี assay เช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น MTT MTS หรือ XTT (colorimetric assay) ซึ่งหลักการและวิธีของการวัดดังกล่าวนี้คือ การวัดสภาวะ reduction environment (mitochondrial reductase) ของ mitochondria ในเซลล์ โดยเมื่อ MTT หรือ XTT ถูก reduced ด้วย mitochondrial reductase จะทำให้สีของ MTT เปลี่ยนเป็นสีม่วงของสี formazan โดยสี จะถูกวัด absorption ที่ 570 nm ปริมาณของสีม่วงที่เพิ่มขึ้นจะหมายถึงปริมาณของเซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้นด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามข้อจำกัดในการใช้ MTT นั้นคือการวัดปริมาณเซลล์ที่ end point เนื่องจาก MTT เมื่อถูก reduced เป็นสี formazan ต้องทำการละลายด้วย DMSO ทำให้เซลล์ที่ถูกวัดด้วย MTT ไม่สามารถนำไปใช้ต่อได้ ด้วยข้อจำจัดของ MTT นี้ จึงได้มีการพัฒนา assay ขึ้นมาใหม่คือ AlarmaBlue® assay ซึ่งมีหลักการเหมือนกับ MTT คือวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการดู reduction environment ของเซลล์ แต่สิ่งที่ AlarmaBlue® assay แตกต่างจะ MTT คือ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ จึงสามารถวัดแบบ kinetic assay ได้ นอกจากนี้ยังสามารถวัดด้วย spectrofluorometer ในกรณีที่ต้องการความไว (sensitivity) ในการทดสอบ ที่สูงขึ้น

รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของ MTT และปฏิกิริยาของ MTT colorimetric assay

ที่มา : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/figure/mttassays.F1/

(สืบค้นวันที่ 05/06/62)

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอนก และ บุณยกฤต (2017) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจากพืชผักสมุนไพรพื้นบ้าน 15 ชนิด พบว่า การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบรวมฟีนอลด้วย Folin-Ciocalteu reagent มีการเตรียม Folin-Ciocalteu reagent และ sodium carbonate ความเข้มข้น 20 % และเตรียมสารสกัด ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1 mg/ml นำสารสกัดตัวอย่าง 20 µl ผสมกับ Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 µl และ sodium carbonate ความเข้มข้น 20 % ปริมาตร 80 µl ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ด้วย microplate reader ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณปริมาณ total phenolic component (µg/ml) จากกราฟมาตรฐานของ gallic acid พบว่าสมุนไพรแต่ละชนิดมี ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) พบว่ากระเจี๊ยบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด รองลงมา คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มะตูม กระเพรา สะระแหน่ โหระพา ขมิ้น ข่า แมงลัก อัญชัน ใบเตย ขิง มะขาม มะรุม ตะไคร้ และมะนาว ตามลำดับ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในช่วง 0.42-4.83 mgGAEg กระเจี๊ยบและมะตูมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูงใกล้เคียงกัน ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกในธรรมชาติจะมีปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่ชนิดของพืช พื้นที่การปลูก รวมถึงสภาพภูมิประเทศ นอกจากนี้มะตูมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณสูงโดยเฉพาะกลุ่มแทนนินและกระเจี๊ยบ มีสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูงเช่นกันโดยเฉพาะกลุ่มแอนโทไซยานิน ส่งผลให้ดอกกระเจี๊ยบและผลมะตูมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงว่าสมุนไพรชนิดอื่น

Ali และคณะ (2013) ได้ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกและกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็งของใบเตย จากสถานที่ต่าง ๆ ของประเทศมาเลเซีย พบว่าสารสกัดใบเตยจาก 3 สถานที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม (MCF-7) สูง โดยมีอัตราการยับยั้ง 78.3%, 70.5% และ 67.4% ตามลำดับ สารสกัดจากใบเตยมีปริมาณฟลาโวนอยด์ สูงถึง 1.87 mg/g และมีปริมาณสารฟีนอลิกประมาณ 6.72 mg/g ประกอบด้วยสาร Rutin ประมาณ 0.082 mg/g สาร epicatechin ประมาณ 0.035 mg/g สาร naringin ประมาณ 0.325 mg/g สาร catechin ประมาณ 0.613 mg/g สาร kaempferol ประมาณ 0.278 mg/g มีกรดแกลลิก gallic acid ประมาณ 0.423 mg/g มีสาร cinnamic acid ประมาณ 0.084 mg/g มีสาร Ferrulic acid ประมาณ 0.281 mg/g มีค่า DPPH 64.27% และมีค่า FRAP ประมาณ 517.2 μm Fe (II)/g

Faras และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากใบของ*ใบเตย P. amoxllifolius* จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้โดยทดสอบสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำด้วยซอกห์เลต (soxhlet) พบว่า สารสกัดใบเตยที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอลจะส่งเสริมการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้มากกว่าที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้อย่างมีนัยสำคัญ

Natisri และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาการทดสอบทางประสาทสัมผัสไอศกรีมจากสารสกัดใบเตย ในช่วงความเข้มข้นของสารกัดใบเตยต่อน้ำ 10:100, 15:100 และ 20:100 w/w พบว่าการผสมน้ำใบเตยในไอศกรีมด้วยอัตราส่วน 10:100 ได้การยอมรับกลิ่นรสมากที่สุด รองลงมา คือการใช้อัตราส่วน 15:100 การทดสอบความชอบสำหรับสารสกัดสด การทดสอบความชอบด้วยการวัดจากการให้คะแนนทั้งหมด 9 ระดับ (1 = ไม่ชอบมาก 2 = ไม่ชอบมาก 3 = ชอบปานกลาง 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 5 = เฉยๆ, 6 = ชอบเล็กน้อย 7 = ชอบปานกลาง, 8 = ชอบมากและ 9 = ชอบมาก) การประเมิน โดยผู้ทดสอบ 30 คน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 แบคทีเรีย

1. *Escherichia coli* ATCC 25922
2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
3. *Staphylococcus aureus* TISTR 25923

3.2 เซลล์สัตว์

1. เซลล์มะเร็งตับ (HepG-2)

3.3 ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชคือ ใบเตยหอม (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) ได้จาก ตำบลสวนดอกไม้ อำเภอเสาไห้ จังหวัดสระบุรี

3.4 วัสดุและอุปกรณ์

3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Mueller Hinton (SRL, India)
2. Nutrient Agar (HiMedia, India)

3.4.2 สารเคมี

1. 2. Ethyl Alcohol 95 % v/v (องค์การสุรา, ประเทศไทย)
2. น้ำเกลือ (Sodium chloride) เข้มข้นร้อยละ 0.85 (Ajax Finechem, Australia)
3. เมทานอล (ReAgent, UK)
4. อะซิโตน (RCI, Thailand)
5. เอทานอล (RCI, Thailand)
6. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Panreac, Spain)
7. เรซาซูริน (SRL, India)
8. DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma,USA)
9. กรดแอสคอร์บิก (Fisher,UK)
10. สารละลาย Folin-Ciocalteu (Sigma, USA)
11. สารละลายกรดแกลลิก (SRL, India)
12. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (Ajax Finechem, Australia)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
2. กระบอกสแตนเลสใส่จานเพาะเชื้อ (Petri dish Box)
3. บีกเกอร์ (Beaker)
4. แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
5. แท่งแก้วรูปตัวแอล (Spreader)
6. ช้อนตักสาร (Spatula)
7. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Lamp)
9. หลอดทดลอง (Test Tube)
10. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test Tube Rack)
11. ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 มิลลิลิตร
12. ปิเปต (Pipette) ขนาด 5 มิลลิลิตร
13. ปิเปต (Pipette) ขนาด 10 มิลลิลิตร
14. ลูกยาง (Rubber bulb)
15. จุกสำลี (Cork cotton)
16. ขวดใส่สารเคมี (Reagent Bottle) ขนาด 250 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร
17. ขวดใส่สารเคมีฝาเกลียวสีใส (Media Storage Bottle) ขนาด 500 มิลลิลิตร
18. กระบอกตวง (Cylinder)
19. ปากคีบ (Forceps)
20. หลอดหยด (Dropper)
21. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20 ไมโครลิตร, ขนาด 100 ไมโครลิตรและขนาด 1,000 ไมโครลิตร (Pipettman, FRANCE)
22. ทิป (Tips)
23. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
24. เครื่องชั่ง (Analytical Balance) 4 ตำแหน่ง (Satorious, Thailand)
25. เครื่องผสมสาร (Vortex)
26. ไฟแช็ค (Lighter)
27. ถุงมือ (Medical Gloves)
28. ถาดไมโครเพลท 96 หลุม (96-Well Plate) (waller chemical, Thailand)
29. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)
30. ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส
31. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

32. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) 70 องศาเซลเซียส (ConthermThermotec 2000,Germany)
33. ตู้อบลมร้อน (Binder, Thailand)
34. หม้อนึ่งแรงดันความดันไอ (Autoclave) (TOMY รุ่น ES-315, Japan)
35. เครื่องระเหยสุญญากาศ รุ่น Basic Hel-Vap (Heidolph, Germany)
36. ชุดเครื่องกรองสุญญากาศ
37. เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ รุ่น EZ Read 2000 (Biochrom, UK)
38. เครื่องอัลตราโซนิก รุ่น ELMA รุ่น S300H (GT Sonic, Germany)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 วิธีการสกัดสารสกัดจากใบเตยหอมด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ คือ น้ำกลั่น เอทานอล (Ethanol) อะซิโตน (Acetone) และปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether)

นำใบเตยหอมมาล้างทำความสะอาดแล้วหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด กว้างxยาว ประมาณ 1 นิ้ว x 1 นิ้ว จากนั้นนำมาแผ่วางไว้บนถาด อบให้แห้งโดยใช้เครื่องอบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 วัน (พลิกใบวันละครั้ง) นำใบเตยที่อบให้แห้งแล้ว มาปั่นให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักกากใบเตยที่บด สกัดใบเตยด้วยน้ำกลั่นโดยเติมน้ำกลั่นให้ท่วมใบเตย โดยใช้ตัวทำละลายตัวแรกเป็น น้ำกลั่น สกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก ที่อุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบระยะเวลา กรองแยกกากด้วยการกรองโดยใช้สูญญากาศ (Vacuum Filtration) กรองซ้ำ 3 รอบ นำสารที่แยกได้ไประเหยตัวทำละลายออกต่อด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่สภาวะอุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ความดัน 72 มิลลิบาร์ ส่วนของกากที่ได้ นำใส่บีกเกอร์แล้วเติมตัวทำละลายสกัด ดังนี้ เอทานอล อะซิโตน และปิโตเลียมอีเทอร์ ตามลำดับ ความดันในขั้นตอนการสกัดสารด้วยเครื่องระเหยจะแตกต่างกันไปในแต่ละตัวทำละลายคือ 175, 556 และ 335 มิลลิบาร์ ตามลำดับ ชะสารที่สกัดออกมาด้วยตัวทำละลายเอทานอลหรืออะซิโตน เก็บใส่ขวดสีชา ปิดฝาขวดด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยด์แล้วเจาะรูปากขวด ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกมาจนหมด นำไปใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.5.2.1 การหาปริมาณกรดฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Content, TPC)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

เตรียมสารละลายกรดแกลลิก ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ชั่งกรดแกลลิก 0.001 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำมาเจือจางเพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมตัวอย่างสารสกัด ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งตัวอย่าง 0.01 กรัม ละลายในเมทานอล 1 มิลลิลิตร นำมาเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 100, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารตัวอย่างสารสกัดปริมาตรละ 20 ไมโครลิตร หยอดลงหลุมไมโครเพลท เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 10% (โดยปริมาตรต่อปริมาตร) Folin-Ciocalteu Reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Na_2CO_3 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น 7.5% ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ชุดควบคุมทดสอบทำโดยเปลี่ยนจากตัวอย่างสารสกัด เป็นตัวทำละลายแทนของแต่ละสารสกัด เมื่อหยอดทุกสารลงหลุมไมโครเพลทแล้วให้ตั้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (A_{765}) ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ทดลอง 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซ้ำ จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากกราฟมาตรฐานปริมาณ กรดแกลลิกในช่วง 20-100 ไมโครกรัม

3.5.2.2 การทดสอบด้วยวิธี DPPH Scavenging วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธีการของ Shimada et al. (1992) และ ประภาพรรณ (2551)

เตรียมสารละลาย DPPH (น้ำหนักโมเลกุล 394.32 กรัมต่อโมล) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ โดยการชั่งน้ำหนัก DPPH ปริมาณ 0.8 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ชั่งกรดแอสคอบิก 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำมาเจือจางเพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิกความเข้มข้น 100, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมตัวอย่างสารสกัด ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งตัวอย่าง 0.01 กรัม ละลายในเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 100, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำตัวอย่างสารสกัดมาอย่างละ 10 ไมโครลิตร หยอดลงหลุมไมโครเพลท แล้วเติม DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 190 ไมโครลิตร เมื่อหยอดทุกสารลงหลุมไมโครเพลทแล้วให้ตั้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (A_{515}) ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด จากกราฟมาตรฐานปริมาณกรดแอสคอร์บิกในช่วง 100-1,000 ไมโครกรัม

คำนวณ % DPPH Scavenging ได้จากสมการ

$$\%\ \text{DPPH Scavenging} = \left[\frac{A - B}{A}\right] \times 100$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

B = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

3.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพตามวิธีการของ CLSI M07-A09 (2012) และ CLSI M100-S 22 (2012)

3.5.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร Nutrient Agar (NA) โดยวิธี cross streak จนได้โคโลนีเดี่ยว โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงน้ำเกลือ เข้มข้นร้อยละ 0.85 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-6 ชั่วโมง แล้วนำมาเปรียบเทียบให้เซลล์แขวนลอยมีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.3.2 ความเข้มข้นต่ำสุดที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC)

เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 5,120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยชั่งน้ำหนักสารสกัด 5.12 มิลลิกรัม ละลายในอาหาร cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) 1 มิลลิลิตร หรือ อาหาร cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) + NaCl 2% สำหรับทดสอบเชื้อ *S. aureus* นำมาเจือจางเพื่อเตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.125 - 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบจะเติมเซลล์แขวนลอยที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารสกัดใบเตยความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เช่นเดียวกันกับตัวควบคุม (control) จะเติมเพียงอาหารที่ไม่มีสารสกัดและตัวควบคุมเชิงบวก(positive control) โดยเติมยาปฏิชีวนะ Ampicillin แทนสารสกัดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังการบ่ม จะประเมินค่า MBC โดยขีดเชื้อลงบนอาหาร Mueller Hinton Agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไมโครเพลทที่ทำการประเมินค่า MBC แล้ว เติมสารละลาย resazurin เข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ซึ่ง resazurin เป็น redox indicator ที่ใช้ทดสอบการมีชีวิตของแบคทีเรียในแต่ละหลุม นำไมโครเพลทไปบ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.5.3.3 การวัดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Disk Diffusion

นำเชื้อแบคทีเรียที่ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ไว้มาปรับความขุ่นที่ McFarland standard nephelometer No. 0.5 จากนั้นปิเปตเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) แล้วใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้วิธี Swab ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นใช้คีมคีบที่ปราศจากเชื้อ คีบแผ่นสารต้านจุลินทรีย์มาวางบนผิวหน้าอาหาร 3 แผ่น หลังจากนั้นดูดสารสกัดเตรียมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้น 500 และ1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (stock ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบน AA disc ที่ปราศจากเชื้อ ทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.5.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบเตยหอมต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG-2 (Geran และคณะ, 1972) และ Srisawat และคณะ (2012)

เซลล์ที่ใช้ทดสอบ คือ HepG-2 ในการหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ จะทำการทดสอบขั้นต้น (Primary screening) ด้วยวิธี MTT Assay เริ่มจากการละลายสารสกัด โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 0.01 กรัม ใส่ในขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อเพื่อเตรียมเป็น Stock จากนั้นทำการละลายตัวอย่างเพื่อเตรียมเป็น Stock ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สาร DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นเติมสารละลาย PBS (Phosphate buffer saline, pH 7.4) ให้มีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของ DMSO ใน Stock เท่ากับร้อยละ 1 หลังจากนั้นกรองสารละลายตัวอย่างด้วยแผ่นกรองสารขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บเป็น Stock เพื่อเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับใช้ทดสอบต่อไป

การทดสอบจะเพาะเลี้ยงเซลล์ HepG-2 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มเซลล์ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณ CO_2 ร้อยละ 5 นาน 24 ชั่วโมง หลังการบ่มดูดอาหารออกจากแต่ละหลุม จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เมื่อบ่มเซลล์ในสารละลายตัวอย่างครบตามเวลาที่กำหนดคือเวลา 24 ชั่วโมง เติมสาร MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณ CO_2 ร้อยละ 5 นาน 4 ชั่วโมง เมื่อบ่มเซลล์ใน MTT ครบ 4 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT ทิ้ง และเติมสารที่ละลายผลึก Formazan ในที่นี้ใช้ DMSO ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 100 : SDS ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 ในอัตราส่วน 9:1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ตั้งโปรแกรมเขย่า 5 นาทีก่อนวัดค่าดูดกลืนแสง ค่า A และ B จะต้องนำค่าการดูดกลืนแสงของ Blank คือหลุมที่เติมสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 100 และสารละลาย SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 มาหักลบออก นำไปคำนวณร้อยละ Cytotoxicity โดยใช้สมการ

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \left[\frac{A - B}{A}\right] \times 100$$

A= ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม (เซลล์ + อาหาร)

B= ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (เซลล์ + ตัวอย่าง)

3.5.5 การทดสอบด้านประสาทสัมผัส

3.5.5.1 การเตรียมข้าวเหนียวแก้วใบเตย

เตรียมข้าวเหนียวแก้วใบเตยดัดแปลงสูตรจาก dailydelicious (http://dailydeliciousthai.blogspot.com/2017/11/pandan-flavored-gelatinous-rice-khao.html สืบค้นวันที่ 10 ก.ค. 62) ดังนี้ นำข้าวเหนียวเขี้ยวงูน้ำหนัก 300 กรัม ล้างให้สะอาดแล้วแช่ในน้ำเปล่าทิ้งไว้ 1 คืน แล้วทำการนึ่งให้สุกด้วยหม้อซึ้งนึ่ง ประมาณ 30 นาที เมื่อครบเวลาให้นำไปใส่หม้อที่เตรียมไว้ เทกะทิลงไปคลุกให้เข้ากัน ปิดฝาหม้อแล้วพักไว้ให้เย็น เตรียมคั้นน้ำใบเตยสด โดยใช้อัตราส่วนที่แตกต่างกัน 2 ระดับ ได้แก่ ความเข้มข้นของใบเตย 40 และ 80 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร และตัวควบคุม (control) จะไม่เติมน้ำใบเตย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้น ตั้งหม้อด้วยไฟอ่อน เทน้ำใบเตยที่เตรียมไว้แล้วใส่น้ำตาลทรายปริมาณ 200 กรัม เกลือป่น ¼ ช้อนชา ต้มจนน้ำตาลละลายและข้นขึ้นจึงใส่ข้าวเหนียวตามลงไป กวนข้าวด้วยไฟอ่อน ๆ เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นพักไว้ให้เย็นโรยหน้าด้วยงาขาวคั่วปริมาณ 4.6 กรัม และนำไปทดสอบประสาทสัมผัส

3.5.5.2 ทดสอบความชอบของสารสกัดใบเตยที่มีความเข้มข้นต่างกันในข้าวเหนียวแก้วใบเตย โดยใช้วิธี 9 Hedonic scale โดยจำนวนผู้ทดสอบ 30 คน

3.5.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

ผลการทดลองวิเคราะห์โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one-way ANOVA) จะได้ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระดับความเชื่อมั่น 95% ในการทดลองทั้งหมดทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 25.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การสกัดสารสกัดจากใบเตยหอม

สารสกัดที่ใช้ในการทดลองได้จากการนำใบเตยหอมมาอบแห้ง บดละเอียด แล้วจึงนำมากลั่นด้วยน้ำและสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล อะซิโตนและปิโตรเลียมอีเทอร์ นำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้วมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารสกัดจากใบเตยหอม ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารสกัดและผลได้ของสารสกัดจากใบเตยที่กลั่นด้วยน้ำและสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล อะซิโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์

ปริมาณ	กลั่นด้วยน้ำ	สกัดด้วยตัวทำละลาย			
		น้ำกลั่น	เอทานอล	อะซิโตน	ปิโตรเลียมอีเทอร์
น้ำหนักแห้งใบเตย (กรัม)	20	20	20	20	20
ปริมาณสารสกัด (กรัม)	1.12	3.78	6.41	7.26	4.23
ผลได้ (%)	5.60	18.90	32.05	36.30	21.15

ใบเตยหอมเมื่อนำมากลั่นด้วยน้ำและสกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันดังตารางที่ 4.1 ซึ่งสารสกัดใบเตยด้วยอะซิโตนมีผลผลิตสูงสุด (%Yield) คือร้อยละ 36.30

4.2 การวิเคราะห์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากใบเตยหอม

4.2.1 การวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดของใบเตยหอม ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยในการวิเคราะห์ใช้สารมาตรฐานคือกรดแกลลิก และใช้เมทานอลเป็น blank วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (ภาคผนวก ผ-2) พบว่าสารสกัดใบเตยหอมความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ ตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำละลายอื่นซึ่งมีปริมาณเทียบเท่ากับ 131.35 ± 12.18 mgGAE/g ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าปริมาณสารฟีนอลิกเมื่อสกัดด้วยเอทานอล ที่มีค่าประมาณ 118.85 ± 2.00 และการกลั่นใบเตยด้วยน้ำจะได้สารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุด คือ 88.40 ± 8.13 mgGAE/g ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดของใบเตยหอมจากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 100, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดจากใบเตย	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (µgGAE / mg สารสกัด)		
	ความเข้มข้นสารสกัด 100 µg/mL	ความเข้มข้นสารสกัด 500 µg/mL	ความเข้มข้นสารสกัด 1,000 µg/mL
ใบเตยแห้ง (ตัวควบคุม)	93.21 ± 3.35^{b}	23.77 ± 1.74^{c}	18.01 ± 1.58^{bcd}
กลั่นด้วยน้ำ	88.40 ± 8.13^{b}	23.58 ± 1.06^{c}	15.70 ± 0.92^{cd}
สกัดด้วยน้ำ	92.88 ± 4.54^{b}	47.15 ± 2.12^{a}	14.64 ± 0.78^{d}
สกัดด้วยเอทานอล	118.85 ± 2.00^{a}	32.55 ± 1.01^{b}	23.17 ± 1.76^{ab}
สกัดด้วยอะซิโตน	93.21 ± 6.40^{b}	24.35 ± 2.04^{c}	20.28 ± 1.77^{abc}
สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์	131.35 ± 12.18^{a}	37.74 ± 5.03^{b}	25.70 ± 2.66^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสารสกัดใบเตยหอมความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอื่นซึ่งมีปริมาณเทียบเท่ากับ 131.35 ± 12.18 mgGAE/g ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าปริมาณสารฟีนอลิกเมื่อสกัดด้วยเอทานอล ที่มีค่าประมาณ 118.85 ± 2.00 ($p < 0.05$) และการกลั่นใบเตยด้วยน้ำจะได้สารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุด คือ 88.40 ± 8.13 mgGAE/g ซึ่งพบว่าปริมาณสารสกัดที่ได้จากการศึกษานี้ มีปริมาณมากกว่าที่ Ali และคณะ (2013) ที่พบสารฟีนอลิกประมาณ 6.72 µgGAE/mg เมื่อสกัดสารจากใบเตยน้ำหนัก 0.25 กรัม ด้วยสารละลายกรด ฟอสฟอริก (ประกอบด้วยกรดฟอสฟอริก 1.2 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 998.8 มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลากรองตัวอย่างที่ได้ด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 µm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบเตยหอมด้วยวิธี DPPH scavenging activity

นำสารสกัดของใบเตยหอม มาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging method) แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร สารต้านอนุมูลอิสระ DPPH เป็นสารที่มีความเสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้ ซึ่งสารสกัดที่ใช้ในการทดลองจะกำจัดสารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าว โดยการให้ไฮโดรเจนทำให้สารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

จากผลการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH ของสารสกัดใบเตยหอมที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA)และเปรียบเทียบความแตกต่างแบบ DMRT (Duncan's new Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่า สารสกัดใบเตยด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีค่าเท่ากับ 22.34 ± 0.51 % ซึ่งมีความแตกต่างกับตัวทำละลายชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และสารสกัดใบเตยปิโตรเลียมอีเทอร์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 15.13 ± 0.14 %

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดใบเตยหอมที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยทำพบว่า สารสกัดใบเตยด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีค่าเท่ากับ 26.93 ± 0.71 % ซึ่งมีความแตกต่างกับตัวทำละลายชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ สารสกัดใบเตยด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 16.44 ± 0.99 %

ความเข้มข้นของสารสกัดใบเตยหอมสูงสุดที่ทดสอบ คือ ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดใบเตยด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีค่าเท่ากับ 27.20 ± 4.73 % ซึ่งมีความแตกต่างกับตัวทำละลายชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ สารสกัดใบเตยด้วยอะซิโตนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 19.59 ± 0.43 % แสดงได้ในตารางที่ 4.3

พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงร้อยละของปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% DPPH) ของสารสกัดใบเตยหอมจากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

สารสกัด	% DPPH Reduction 100 μg/mL	% DPPH Reduction 500 μg/mL	% DPPH Reduction 1,000 μg/mL
ใบเตยแห้ง (ตัวควบคุม)	20.95 ± 0.00^{b}	22.43 ± 0.20^{b}	24.36 ± 1.46^{ab}
กลั่นด้วยน้ำ	20.18 ± 0.74^{b}	22.75 ± 0.59^{b}	25.27 ± 0.95^{ab}
สกัดด้วยน้ำ	18.06 ± 0.07^{c}	18.37 ± 0.34^{c}	19.73 ± 0.72^{b}
สกัดด้วยเอทานอล	22.34 ± 0.51^{a}	26.93 ± 0.71^{a}	27.20 ± 4.73^{a}
สกัดด้วยอะซิโตน	15.82 ± 1.20^{d}	16.98 ± 0.30^{cd}	19.55 ± 0.43^{b}
สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์	15.13 ± 0.14^{d}	16.44 ± 0.99^{d}	20.00 ± 0.82^{b}

การคำนวณค่าการต้านอนุมูลอิสระที่เป็น DPPH ของสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50}) พบว่าสารสกัดใบเตยที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า IC_{50} ดีที่สุด มีค่าประมาณ 11.48 ± 4.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ค่า IC_{50} ในการดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเตยหอมที่ความเข้มข้น 100, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดจากใบเตย	**ค่า IC_{50} (μg/mL)**
ใบเตยแห้ง (ตัวควบคุม)	33.33 ± 0.93^{bc}
กลั่นด้วยน้ำ	13.78 ± 2.81^{ab}
สกัดด้วยน้ำ	46.44 ± 13.75^{c}
สกัดด้วยเอทานอล	11.48 ± 4.25^{a}
สกัดด้วยอะซิโตน	22.10 ± 4.65^{bc}
สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์	15.14 ± 1.74^{ab}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในตารางแสดงถึงร้อยละของปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

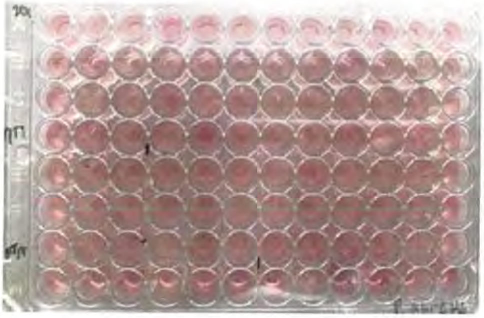
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดใบเตยหอมที่กลั่นและสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล อะซิโตนและปิโตรเลียมอีเทอร์ ผลการทดสอบด้วย Disc diffusion ดังรูปที่ 4.1 พบว่า ไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อทั้ง 3 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Faras และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากใบของ*ใบเตย P. amoxllifolius* จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้โดยทดสอบสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำด้วยซอกห์เลต (soxhlet) พบว่า สารสกัดใบเตยที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอลจะส่งเสริมการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้มากกว่าที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้

รูปที่ 4.1 ตัวอย่างการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus*

นอกจากนี้ สารสกัดใบเตยหอมที่กลั่นและสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล อะซิโตนและปิโตรเลียมอีเทอร์ เมื่อนำมาทดสอบหาค่า MIC (Minimum inhibitory concentration) พบว่าไม่มีผลต่อเชื้อทั้ง 3 ชนิดเช่นกันดังรูปที่ 4.2 และ 4.3



รูปที่ 4.2 ตัวอย่างการประเมินค่า MIC ของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.3 ตัวอย่างการประเมินค่า MBC ของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

การไม่พบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ในการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Faras และคณะ (2014) ที่พบว่าสารสกัดจากใบของใบ*เตย P. amoxllifolius* จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ ได้โดยทดสอบสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำด้วยซอกห์เลต (soxhlet) พบว่า สารสกัดใบเตยที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอลจะส่งเสริมการเจริญของ *Escherichia coli* NCIM 2832 และ *Micrococcus aureus* NCIM 2654 ได้มากกว่าที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Agar well dilution (Faras และคณะ, 2014) ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบเตยต้องมีค่าสูงประมาณ 20-40% ขึ้นไปจึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยพบว่าไม่พบการเจริญของแบคทีเรียนี้เมื่อทดสอบที่ค่า pH 2.0 และ 4.0 เมื่อเพิ่มค่า pH เป็น 6.0 และ 8.0 แบคทีเรียจะเจริญขึ้นได้ การเพิ่มอุณหภูมิการทดสอบสูงกว่าอุณหภูมิห้องให้มีค่าประมาณ 40 องศาเซลเซียส ถึง 100 องศาเซลเซียส (Dumaoal และคณะ, 2010)

การแยกสารบริสุทธิ์ Pandanin ที่เป็นสารประกอบ lectin เมื่อสกัดด้วย NaCl เข้มข้น 0.2 M การแยกสารบริสุทธิ์ด้วย ammonium sulfate precipitation, affinity chromatography โดยใช้ mannose–agarose และ gel filtration พบว่า Pandanin มีฤทธิ์ต้านไวรัส herpes simplex virus type-1 (HSV-1) และ influenza virus (H1N1) เมื่อทดสอบ 3 วัน มีค่า EC_{50} ประมาณ 2.94 และ 15.63 M ตามลำดับ (Ooi และคณะ, 2004) เลคตินเป็นสารประกอบไกลโคโปรตีนหรือน้ำตาลที่เชื่อมพันธะกับโปรตีน ที่ไม่เกิดมาจากระบบภูมิคุ้มกัน เลคตินสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่ม(agglutination) หรือตกตะกอนสารที่มีไกลโคโปรตีนเป็นส่วนประกอบได้ (glycoconjugates) ซึ่งพบว่า น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือโอลิโกแซคคาไรด์สามารถช่วยป้องกันการทำให้เซลล์เกาะกลุ่มของ เลคตินได้ (Goldstein และคณะ, 1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (HepG2)

ตารางที่ 4.5 ค่าการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบเตยหอมต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)

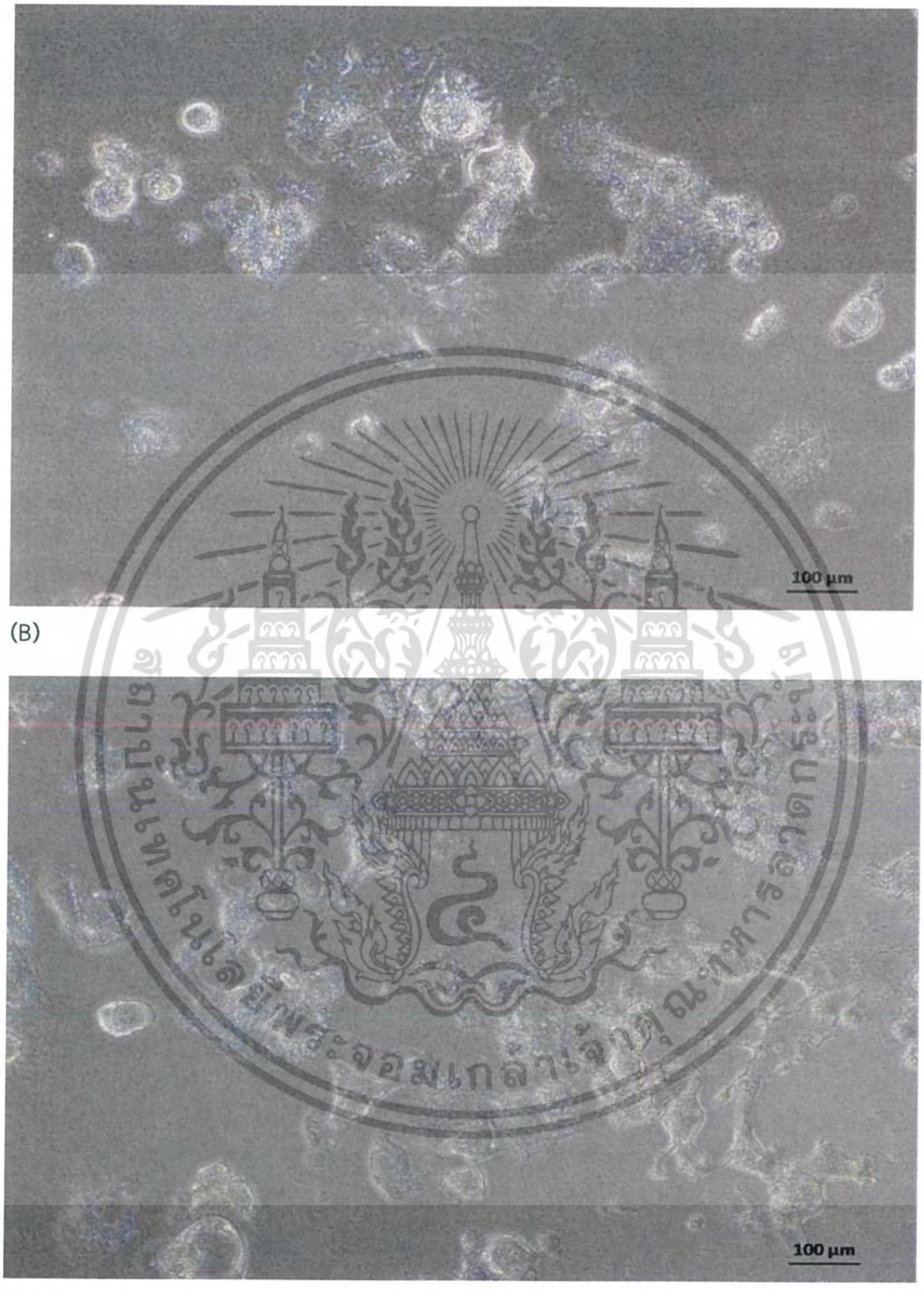
สารสกัดจากใบเตย	ความเข้มข้น (µg/ml)	% cytotoxicity
ใบเตยแห้ง (ตัวควบคุม)	1,000	-16.287
กลั่นด้วยน้ำ		-11.661
สกัดด้วยน้ำ		-15.244
สกัดด้วยเอทานอล		83.648
สกัดด้วยอะซิโตน		77.980
สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์		88.925
DMSO	1%	0.782

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) พบว่า สารสกัดในชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับสูงสุด มีค่าประมาณ 88.925 % รองลงมาเป็นชั้นของเอทานอล และอะซิโตนมีค่าเท่ากับ 83.648 และ 77.980% ตามลำดับ ส่วนใบเตยแห้ง สารสกัดจากการกลั่นด้วยน้ำและสกัดด้วยน้ำนั้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (ตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.4-4.7) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hueh Zan และคณะ (2011) ที่ได้สกัดใบเตยด้วยเอทานอล ระเหยตัวทำละลายออกแล้วทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดความ 0-100 mg/ml โดยใช้สาร MTT ทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 (non-hormone-dependent breast cancer), มะเร็งเต้านม MCF-7 (hormone-dependent breast cancer), เซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa (cervical cancer cell lines), เซลล์มะเร็งลำไส้ HT-29 (colon carcinoma tissue), เซลล์มะเร็งตับ HepG2 (hepatocellular carcinoma tissue) พบว่า สารสกัดจากใบเตยที่สกัดด้วยเอทานอลเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 สูงกว่าการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HepG2 และเซลล์มะเร็งอื่น ๆ ที่ทดสอบ โดยมีค่า IC_{50} เป็นพิษต่อเซลล์ MDA-MB-231 ประมาณ 86.5 µg/mL มีค่า IC_{50} ของการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HepG2 และเซลล์มะเร็งอื่น ๆ ที่ทดสอบมากกว่า 100 µg/mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(A)

(B)

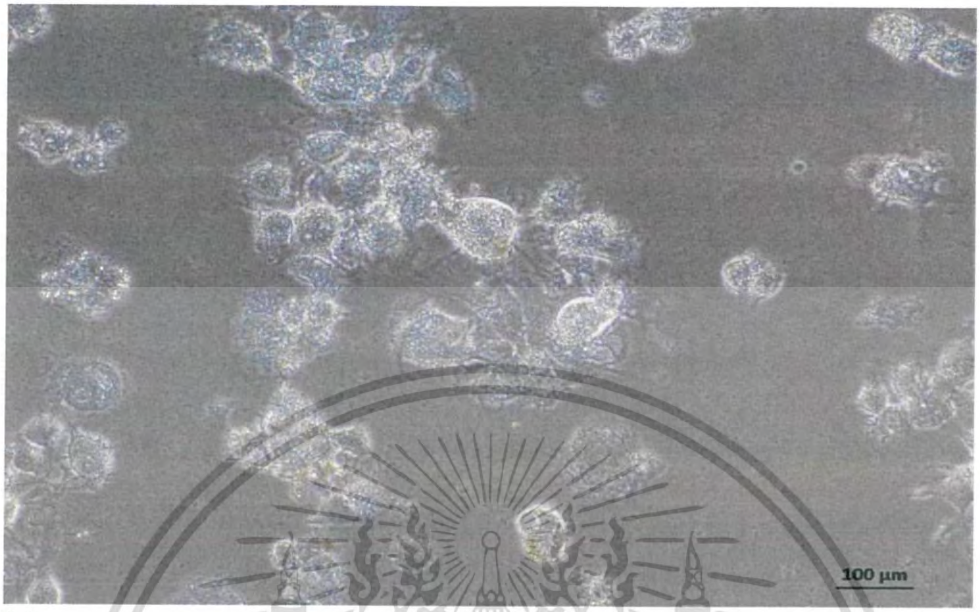


รูปที่ 4.4 ภาพถ่ายเฟสคอนทราสต์ของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ปกติ (A) และภาพแสดงการเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของใบเตยแห้ง (ควบคุม) (B)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(C)



(D)

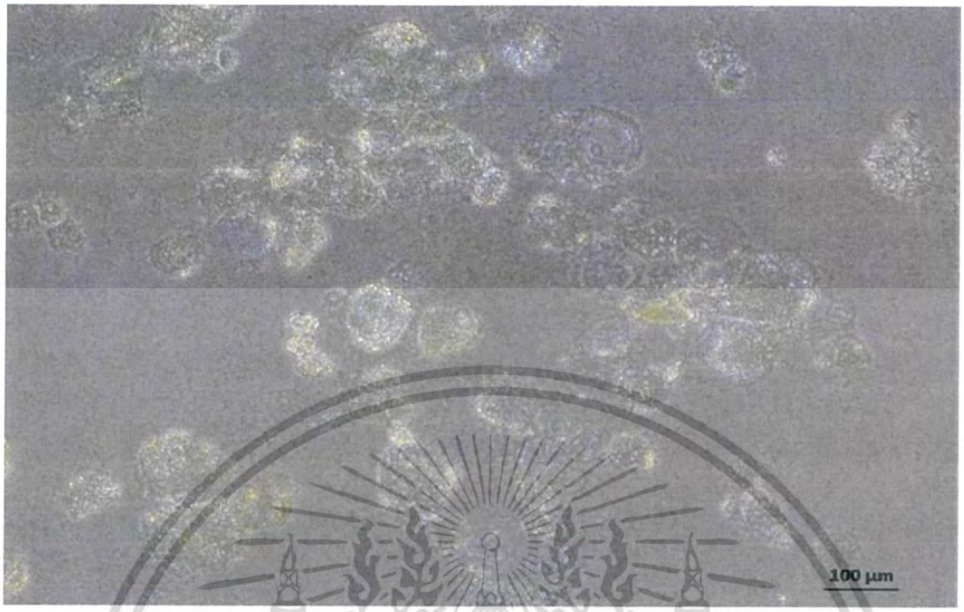
รูปที่ 4.5 ภาพถ่ายเฟสคอนทราสต์ของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ทดสอบด้วย

ใบเตยกลั่นด้วยน้ำ (C) และทดสอบด้วยใบเตยที่สกัดด้วยน้ำ (D)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(E)

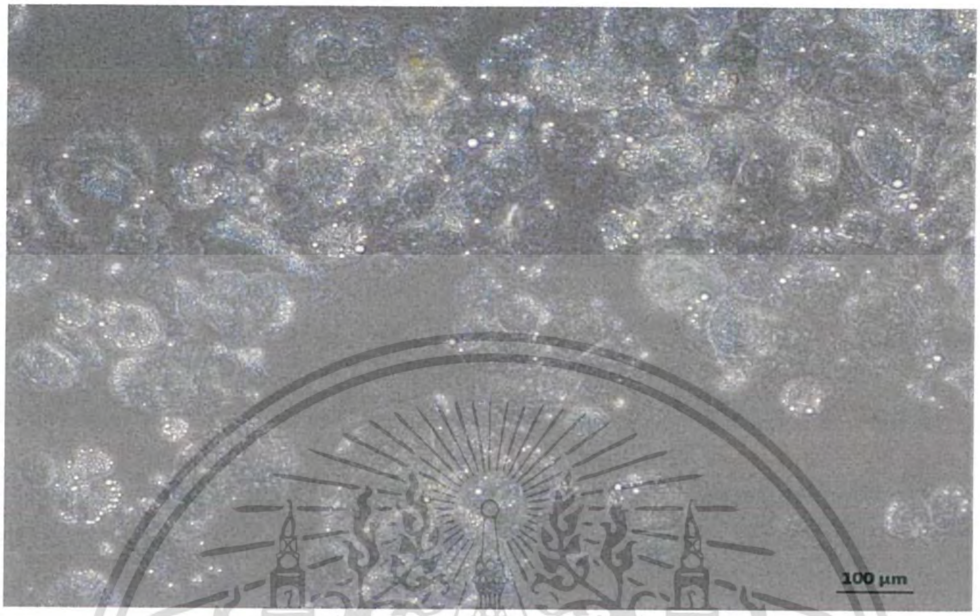


(F)

รูปที่ 4.6 ภาพถ่ายเฟสคอนทราสต์ของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ทดสอบด้วยสารจากการสกัดด้วยเอทานอล (E) ทดสอบด้วยสารจากการสกัดด้วยอะซิโตน (F)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(G)



(H)

รูปที่ 4.7 ภาพถ่ายเฟสคอนทราสต์ของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ทดสอบด้วยสารจากการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (G) ทดสอบด้วย DMSO เข้มข้น 1% (H)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการทดสอบประสาทสัมผัส

ข้าวเหนียวแก้วใบเตย

- ข้าวเหนียวแก้วใบเตยไม่ใส่ใบเตย (ควบคุม)
- ข้าวเหนียวแก้วใบเตยใส่ใบเตย 40 กรัม ต่อน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร
- ข้าวเหนียวแก้วใบเตยใส่ใบเตย 80 กรัม ต่อน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร

รหัสที่ใช้ทดสอบทางประสาทสัมผัส

503	412	785	624	917	306	978	539	012	326
734	316	849	756	258	403	675	035	807	512
932	061	281	418	504	749	842	174	296	378

คะแนนความชอบ

1 = ไม่ชอบมากที่สุด	2 = ไม่ชอบมาก	3 = ไม่ชอบปานกลาง
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย	5 = เฉยๆ	6 = ชอบเล็กน้อย
7 = ชอบปานกลาง	8 = ชอบมาก	9 = ชอบมากที่สุด

(A) (B) (C)

รูปที่ 4.8 ข้าวเหนียวแก้วใบเตย ; A ข้าวเหนียวแก้วไม่ใส่ใบเตย (ควบคุม), B ข้าวเหนียวแก้วใบเตย 40:100 และ C ข้าวเหนียวแก้วใบเตย 80:100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ผลการประเมินประสาทสัมผัสของข้าวเหนียวแก้วใบเตยโดยใช้อัตราส่วนใบเตยต่อน้ำ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 40 : 100 และ 80 : 100

อัตราส่วน ใบเตยต่อน้ำ (w/v)	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบรวม
ข้าวเหนียวแก้วควบคุม (0 : 100)	6.73 ± 0.21[b]	6.67 ± 0.16[b]	6.67 ± 0.16[b]	6.70 ± 0.23[b]	6.70 ± 0.17[b]	6.67 ± 0.19[b]
ข้าวเหนียวแก้วใบเตย 40 : 100	7.60 ± 0.21[a]	7.67 ± 0.19[a]	7.77 ± 0.20[a]	7.67 ± 0.13[a]	7.53 ± 0.10[a]	7.57 ± 0.12[a]
ข้าวเหนียวแก้วใบเตย 80 : 100	7.27 ± 0.17[ab]	7.37 ± 0.18[a]	7.43 ± 0.14[a]	7.30 ± 0.15[a]	7.37 ± 0.13[a]	7.30 ± 0.15[a]

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส (ตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.8) พบว่า เมื่อเพิ่มน้ำใบเตยสดอัตราส่วนที่แตกต่างกันพบว่า อัตราส่วน 40:100 ได้รับการยอมรับมากที่สุดในทุกด้านของการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส ได้แก่ ลักษณะที่ปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม คือ 7.60 ± 0.21, 7.67 ± 0.19, 7.77 ± 0.20, 7.67 ± 0.13, 7.53 ± 0.10, และ 7.57 ± 0.12 ตามลำดับ ค่าความชอบรวมเมื่อใช้ใบเตยต่อน้ำอัตราส่วน 40 : 100 และ 80 : 100 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีความแตกต่างกับตัวควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กรดอะมิโนกลูตามิกในอาหาร จะช่วยในการกระตุ้นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ของระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system, CNS) และระบบประสาทรอบส่วนกลาง (peripheral nervous system, PNS) กรดกลูตามิกจะกระตุ้นหน่วยรับรู้รสชาติ (taste receptor) ที่เป็น TAS1R1 และ TAS1R3 และกลูตามิกรีเซปเตอร์ที่ตอบสนองจำเพาะต่อกรดอะมิโนกลูตามิก เช่น mGluR1 และ mGluR4 ทำให้เกิดการรับรู้รสชาติอุมามิ (umami) ซึ่งเป็นรสชาติลำดับที่ 5 ที่ช่วยเพิ่มรสชาติ รสเปรี้ยว หวาน เค็มและขม (Nelson และคณะ, 2000, Alder และคณะ 2001) กรดกลูตามิกจะเกิดการเสริมฤทธิ์กับไรโบนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1.7 เท่า (Yoshii และคณะ, 1986) สารให้กลิ่นรสในใบเตยที่พบมากที่สุดคือ 2-acetyl-1-pyrroline (ACPY) ใบเตยสดประกอบไปด้วยน้ำตาลฟรุกโตสประมาณ 2.38 mg/g น้ำตาลกลูโคสประมาณ 1.77 mg/g และมีกรดอะมิโน glutamic acid ประมาณ 0.41 mg/g มีกรดอะมิโนโปรลีนซึ่งเป็น precursor ของ 0.12 mg/g (Cheetangdee & Chaiseri, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นการเติมใบเตยหรือเติมส่วนประกอบในใบเตยในอาหารทำให้การเกิดกลิ่นรสในอาหารดีขึ้นได้ เช่น จากการศึกษาของ Nor และคณะ (2008) พบว่าการใช้สารสกัดจากใบเตย *Pandanus amaryllifolius* เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ มีปริมาณโพลีฟีนอลสูงถึง 102 มิลลิกรัมต่อกรัม ได้รับการประเมินในน้ำมันปาล์มโอเลอีนที่ผ่านการกลั่นฟอกขาวและดับกลิ่น (RBD) สารสกัดจากใบเตยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด 0.2% จะช่วยชะลอการเกิดออกซิเดชันและการเสื่อมสภาพของน้ำมันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบกับการใช้สารต้านออกซิเดชันที่เป็น butylated hydroxytoluene (BHT) เข้มข้น 0.02% (1 mM) ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าค่าความชอบรวมของเฟรนช์ฟรายเมื่อทอดที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เมื่อใช้น้ำมันเดียวทอดเป็นเวลา 40 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างการเติมสารสกัดจากใบเตยเข้มข้น 0.2% มีค่าสูงกว่าค่าความชอบความชอบรวมการทอดเฟรนช์ฟรายเมื่อใช้ BHT เข้มข้น 0.02% เป็นสารต้านออกซิเดชัน ค่าความชอบความชอบรวมการทอดเฟรนช์ฟรายเมื่อใช้ใบเตยเป็นส่วนผสมมีค่า 5.67 ค่าความชอบรวมเมื่อทอดโดยใช้ BHT เข้มข้น 0.02% เป็นส่วนผสม มีค่า 4.67 และ Sirinat และคณะ (2014) ได้ทดสอบทางประสาทสัมผัสไอศกรีมจากสารสกัดใบเตยที่ความเข้มข้นของสารกัดใบเตยต่อน้ำ 10:100, 15:100 และ 20:100 *w/w* พบว่าการเติมใบเตยด้วยอัตราส่วน 10:100 ได้รับการยอมรับของการบริโภคมากกว่า การเพิ่มอัตราส่วนของใบเตยมากขึ้นกลับทำให้การยอมของผู้บริโภคลดลง (Natisri และคณะ, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การสกัดสารใบเตยที่กลั่นและสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล อะซิโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์ พบว่าเมื่อสกัดด้วยอะซิโตนจะได้สารสกัดมากที่สุด สารสกัดที่ใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์สกัดความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดคือ 131.35 ± 12.18 ไมโครกรัมกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด การทดสอบความสามารถ ในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสูงสุด 27.24 ± 4.73 % สารสกัดจากใบเตยเมื่อที่กลั่นและสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล อะซิโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion สารสกัดจากใบเตยเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล อะซิโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ได้ มีค่าการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งประมาณ 83.648, 77.980 และ 88.925 ตามลำดับ และสารสกัดจากการกลั่นด้วยน้ำ สารสกัดน้ำกลั่น ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

นอกจากนี้การทดสอบทางประสาทสัมผัสของการเป็นสารให้กลิ่นรสในการเป็นส่วนผสมในขนมไทย เช่น ข้าวเหนียวแก้วใบเตย เมื่อใช้น้ำใบเตยต่อน้ำกรอง อัตราส่วน 40:100 น้ำหนักต่อปริมาตร ได้รับการยอมรับมากที่สุดในทุกด้านของการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส ได้แก่ ลักษณะที่ปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม คือ 7.60 ± 0.21 7.67 ± 0.19 7.77 ± 0.20 7.67 ± 0.13 7.53 ± 0.10 และ7.57 ± 0.12 ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบเตย ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบเตยที่หลากหลายขึ้นและใช้วิธีการทดลองที่หลากหลายเพิ่มมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการนำสารสกัดใบเตยไปตรวจสอบโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หรือ เครื่อง Gas Chromatograph (GC) เพื่อที่จะแยกสารประกอบที่สนใจในสารสกัดใบเตยมาพัฒนาเป็นอย่างอื่นและเพื่อศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดจากใบเตย เพื่อนำไปเป็นความรู้และปรับใช้ในอนาคต รวมถึงการวิเคราะห์สารต่างๆในสารสกัดใบเตย

การนำสารสกัดใบเตยไปตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งหลายชนิดมากขึ้น ซึ่งผลที่ได้ยังไม่มีความหลากหลายและยังไม่มีตัวเปรียบเทียบ ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์ที่ใช้เซลล์หลากหลายเพิ่มมากขึ้น เพื่อที่จะได้นำมาเป็นความรู้และมีตัวเปรียบเทียบเพื่อหาข้อแตกต่างในเซลล์แต่ละเซลล์ และนำไปศึกษาและพัฒนาปรับใช้ในอนาคตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้มีการทดสอบทางประสาทสัมผัสของใบเตย ซึ่งทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้ข้าวเหนียวแก้วใบเตย มีผู้ทดสอบชิมทั้งหมด 30 คน ซึ่งผลที่ได้ก็แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความชอบของแต่ละคน แต่ในปัจจุบันใบเตยสามารถนำมาใช้เป็นสารให้กลิ่นรสในขนมไทย เครื่องสำอางและยาสมุนไทยได้ ดังนั้นการทดสอบทางประสาทสัมผัสก็ไม่จำเป็นที่จะต้องทำแต่ขนมแต่สามารถทำอย่างอื่นได้ ไม่ว่าจะเป็นการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการดม กิน หรือ ทดลองใช้ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพื่อเป็นการศึกษาและเป็นแนวทางในการปรับใช้ในอนาคตต่อไป

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นพวัฒน์ เพ็งคำศรี และคณะ. 2554. **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้าข่าลิง**. วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ. 6 (3) : 195-201.

วัชราภรณ์ ประภาสะโนบล และ สุนันทา แก้วสระแสน. 2556. **ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากใบสิบสองราศี**. วารสารวิทยาศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี. 12 (3) : 12-19.

เอนก หาลี และ บุณยกฤต รัตนพันธุ์. **การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจากพืชผักสมุนไพรพื้นบ้าน 15 ชนิด.** วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ 2560; 40 (2): 283-293.

Ali Ghasemzadeh and Hawa ZE Jaafar. 2013. **Profiling of phenolic compounds and their antioxidant and anticancer activities in pandan (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) extracts from different locations of Malaysia.** Biomedcentral, 13, 341-350.

Blois, M. S. 1958. **Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical.** Nature, 181 (4617): 1199-1200.

Cheetangdee, V., and Chaiseri, S. 2006. **Free amino acid and reducing sugar composition of pandan (Pandanus amaryllifolius) leaves.** Kasetsart J Nat Sci, 40, 67-74.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition M07-A9**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

Dailydelicious. 2017. **ขนมไทยง่ายๆ: ข้าวเหนียวแก้ว.** [Online]. Available: http://dailydeliciousthai.blogspot.com/2017/11/pandan-flavored-gelatinous-rice-khao.html. เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 ก.ค. 62.

Dumaoal, O. S. R., Alaras, L. B., Dahilan, K. G., Depadua, S. A., and Pulmones, C. J. 2010. **In vitro activity of pandan (Pandanus amaryllifolius) leaves crude extract against selected bacterial isolates.** Journal of Philippine Association of Institutions for Research, 4(1), 101-124.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Faras, A. F., Wadkar, S. S. and Ghosh, J. S. 2014. **Effect of leaf extract of *Pandanus amaryllifolius* (*Roxb.*) on growth of *Escherichia coli* and *Micrococcus* *(Staphylococcus) aureus*.** International Food Research Journal, 21, 421-423.

Foodscience. 2017. **ลักษณะของต้นเตย.** [Online]. Available: https://www.kasetorganic.com/A1.html. เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 มิ.ย. 62.

Geran R.I. GNH and Mac donald M.M. . 1972. **Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems.** Cancer chemotherapy reports 3:1-103.

Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T., and Sharon, N. 1980. **What should be called a lectin**. Nature, 285(5760): 66-66.

Hueh Zan, C., Rahmat, A., Abdah, Akim, M., Banu Mohd. Alitheen, N., Othman, F., and Ee Cheng Lian, G. (2011). **Anti-proliferative effects of pandan leaves (*Pandanus amarylfolius*), kantan flower (*Etlingera elatior*) and turmeric leaves (*Curcuma longa*).** Nutrition & Food Science, 41(4), 238-241.

Natisri, S., Mahattanatawee, K., and Thaiudom, S. 2014. **Improving the Flavor of Soy Ice Cream by Adding Lemongrass or Pandan Leaf Extracts.** Issue on Food and Applied Bioscience, 13, 469-482.

Nor, F. M., Mohamed, S., Idris, N. A., and Ismail, R. 2008. **Antioxidative properties of *Pandanus amaryllifolius* leaf extracts in accelerated oxidation and deep frying studies**. Food chemistry, 110(2), 319-327.

Ooi, L. S., Sun, S. S., and Ooi, V. E. 2004. **Purification and characterization of a new antiviral protein from the leaves of *Pandanus amaryllifolius* (Pandanaceae).** The international journal of biochemistry & cell biology, 36(8), 1440-1446.

Priyanut Inrod. 2014. ***Escherichia coli***. [Online]. Available: http://www.ssajm.org/viewimage.asp?img=SubSaharanAfrJMed_2014_1_4_168_144725_f3.jpg. เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 มิ.ย. 62.

Rajini P.S. 2015. ***Staphylococcus aureus*.** [Online]. Available: https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xsa/xsa01.html.
เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 มิ.ย.62.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Singh N. 2016. ***Pseudomonas aeruginosa***. [Online]. Available: http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html. เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 มิ.ย. 62.

Srisawat, T, Chumkaew, P, Heed-Chim, W, Sukpondma, Y and Kanokwiroon, K. 2013. **Phytochemical screening and cytotoxicity of crude extracts of *Vatica diospyroides* symington type LS**. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 12:71-6.

Wakte, K., Nadaf, A., J. Thengane, R., & Jawali, N. 2009. ***Pandanus amaryllifolius Roxb.* cultivated as a spice in coastal regions of India**.. Genet Resour Crop Evol (2009) 56:735–740

Wong S.K. 2013. **เซลล์มะเร็งตับ (HepG2)**. Online]. Available: https://www.atcc.org/~/media/Attachments/Micrographs/Cell/HB-8065%20Low%20High.ashx. เข้าถึงเมื่อวันที่ 10 มิ.ย. 62.

Yoshii, Kiyonori, Chizuko Yokouchi and Kenzo Kurihara. 2014. **Synergistic effects of 5'-nucleotides on rat taste responses to various amino acids.** Brain research 367.1-2 (1986): 45-51.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3.0 กรัม
Bacto peptone	5.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
Water	1,000 มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดไปต้มจนวนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ ครบ 1 ลิตรแบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ เครื่องนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

2. Cation-Adjusted Mueller Hinton Agar (CAMHA)

Beef extract powder	2.0 กรัม
Acid Digest of casein	17.5 กรัม
Soluble starch	1.5 กรัม
Agar	15.0 กรัม
pH	7.3±1 กรัม
Ca^{++}	25.0 มิลลิกรัม
Mg^{++}	12.5 มิลลิกรัม
Distilled water	1 ลิตร

3. Cation-Adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB)

Beef extract powder	2.0 กรัม
Acid Digest of casein	17.5 กรัม
Soluble starch	1.5 กรัม
pH	7.3±1
Ca^{++}	25.0 มิลลิกรัม
Mg^{++}	12.5 มิลลิกรัม
Distilled water	1 ลิตร

ชั่ง MHB 38 กรัมลงในน้ำ 1 ลิตร ต้มให้ละลายแล้วใส่ขวดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมไอออนลงไป โดยเติมMg^{++}ก่อนแล้วค่อยเติมCa^{++}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. **Cation-Adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB) + 2%NaCl**

Beef extract powder	2.0 กรัม
Acid Digest of casein	17.5 กรัม
Soluble starch	1.5 กรัม
pH	7.3±1
Ca^{++}	25.0 มิลลิกรัม
Mg^{++}	12.5 มิลลิกรัม
NaCl	20.0 กรัม
Distilled water	1 ลิตร

ชั่ง MHB 38 และเติมเกลือ NaCl 20.0 กรัม ลงในน้ำ 1 ลิตร ต้มให้ละลายแล้วใส่ขวดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยด้วยเครื่องนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมไอออนลงไป โดยเติมMg^{++}ก่อนจากนั้นจึงเติม Ca^{++}

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. **การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Mc Farland No.0.5**

เตรียมจากการผสมของสารละลาย $BaCl_2$ 0.048 M (1.75 % w/v $BaCl_2 \cdot 2H_2O$) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรกับสารละลาย H_2SO_4 0.36 N (1 % v/v) ปริมาณ 99.5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตรด้วยเครื่องSpectrophotometer ค่าที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 0.08-0.13 จึงเรียกว่าสารละลายมาตรฐาน Mc Farland No.0.5

2. **การเก็บรักษาเชื้อ**

เชื้อทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองจะอยู่ในหลอดทดลองแบบ Slant ต้องนำมา sub culture โดยทำการ sub culture ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถเจริญได้คือ Nutrient Agar (NA)

3. **การเตรียม Cation Stock Solution**

3.1 เตรียมสารละลาย Stock Magnesium ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมของแมกนีเซียมไอออนต่อมิลลิลิตร

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	8.36 กรัม
Deionized water (DI water)	100 มิลลิลิตร

ชั่ง $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 8.36 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์เติมน้ำ DI ลงไป ค่อยๆคนจนสารละลายใสแล้วเทใส่ขวดปรับปริมาตร จากนั้นเติมน้ำที่เหลือให้ครบจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เทสารละลายที่ได้ใส่ขวดสีชาจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียสนาน 15 นาที แล้วเก็บแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส

3.2 เตรียมสารละลาย Stock Calcium ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมของแคลเซียมไอออนต่อมิลลิลิตร

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3.68 กรัม
Deionized water (DI water)	100 มิลลิลิตร

ชั่ง $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 8.36 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์เติมน้ำ DI ลงไป ค่อยๆคนจนสารละลายใสแล้วเทใส่ขวดปรับปริมาตร จากนั้นเติมน้ำที่เหลือให้ครบจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เทสารละลายที่ได้ใส่ขวดสีชาจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยด้วยเครื่องนึ่งอัดไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียสนาน 15 นาที แล้วเก็บแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส

4. **การเตรียมสารละลายเรซาซูริน**

เตรียมน้ำกลั่นขนาด 50 มิลลิลิตรใส่ในขวดสีชา ปิดฝาให้แน่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอัดไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นใส่เรซาซูรินจำนวน 1 เม็ดลงในขวดน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อขณะที่น้ำยังอุ่นอยู่ปิดฝาให้แน่นและทำการเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ควรเก็บสารที่เตรียมไว้ให้พ้นแสงและควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการใช้งาน

5. **การเตรียมสารละลาย normal saline 0.85%**

NaCl	0.85 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ชั่ง NaCl 0.85 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันจากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายใส่หลอดทดลอง จำนวน 10 หลอด ๆ ละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย เครื่องนึ่งอัดไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6. **การเตรียมสารละลายDPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์**

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)	0.8 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	20 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. **การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 7.5% โดยมวลต่อปริมาตร**

Na_2CO_3	1.125 กรัม
น้ำกลั่น	15 มิลลิลิตร

8. **การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก**

เตรียมสารละลายกรดแกลลิก ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ชั่งกรดแกลลิก 0.001 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำมาเจือจางเพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

9. **การเตรียมสารละลายกรดแอสคอร์บิก (Vitamin C)**

เตรียมสารละลายกรดแอสคอร์บิก (Vitamin C) ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ชั่งกรดแอสคอร์บิก 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำมา เจือจางเพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 100,500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1.เชื้อแบคทีเรีย

1.1 *Escherichia coli*

1.1.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom: Eubacteria
Phylum: Proteobacteria
Class: Gamma Proteobacteria
Order: Enterobacteriales
Family: Enterobacteriaceae
Genus: Escherichia
Species: *Escherichia coli*

1.1.2 ลักษณะทั่วไป

แบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) รูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) ไม่สร้างสปอร์ เป็น facultative anaerobe เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae และเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) ประเภท fecal coliform ซึ่งเป็นโคลิฟอร์มที่พบในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น จึงใช้เป็นดัชนีบ่งชี้สุขลักษณะของอาหารและน้ำ

รูปภาคผนวก ข ที่ 1 *Escherichia coli*

ที่มา : http://www.ssajm.org/viewimage.asp?img=SubSaharanAfrJMed_2014_1_4_168_144725_f3.jpg (สืบค้นวันที่ 10/06/62)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1.3 แหล่งที่พบ

เชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น โดยปกติจะไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรง เมื่ออยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยอาหารที่เรารับประทานเข้าไป แต่หากเชื้อ *E. coli* ลุกล้ำ เข้าสู่ระบบต่างๆ ของร่างกายก็จะทำให้เกิดโรคติดเชื้อรุนแรง เช่น โรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นต้น และมีเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้ โดยการปนเปื้อนของเชื้อ ในอาหารหรือน้ำดื่ม ทั้งนี้เชื้อ *E. coli* ที่สามารถก่อโรคอุจจาระร่วง (Diarrheagenic *E. coli*) จะมีกลไกการก่อโรคและสามารถ สร้างสารพิษได้แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์

1.1.4 ความสำคัญในอุตสาหกรรม

มีแหล่งที่อยู่ตามลำไส้ของวัวและสัตว์อื่น มีอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมในระดับอาหารที่พบเชื้อนี้ ได้แก่ แฮมเบอเกอร์และอาหารฟาสต์ฟู้ด และเนยแข็งที่ทำจากนมที่ ไม่ได้รับการพาสเจอไรส์

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Pseudomonadales

Family: Pseudomonadaceae

Genus: Pseudomonas

Species: *P. aeruginosa*

1.2.2 ลักษณะทั่วไป

แบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Pseudomonadaceae สามารถเคลื่อนที่ได้โดย flagellum 1 เส้นที่ติดอยู่ตรง หัว ปกติจะพบกระจายในดิน น้ำ ขยะ หรือในพืช และเป็น normal flora ในลำไส้คน *Pseudomonas aeruginosa* สามารถทำให้เกิดโรคในคนได้ รวมทั้งสัตว์ แมลงและต้นไม้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปภาคผนวก ข ที่ 2 *Pseudomonas aeruginosa*

ที่มา : http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html (สืบค้นวันที่ 10/06/62)

1.2.3 แหล่งที่พบ

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ และปนเปื้อนไปยังอาหาร หลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ (meat) น้ำนม (milk) ไข่ (egg)

1.2.4 ความสำคัญในอุตสาหกรรม

Pseudomonas aeruginosa มีบทบาทสำคัญกับการเสื่อมเสียของอาหาร (food spoilage) การเสื่อมเสียของผักและผลไม้ ทำให้เกิดโรคจุดสีน้ำตาล (brown spot) ในผักผลไม้ Pseudomonas สร้างเอนไซม์เพกทิเนส (pectinase) ที่ย่อยเพกทิน (pectin) ได้ ทำให้เกิดโรคของผักและผลไม้ที่เรียกว่า โรคเน่าเละ (soft rot) การเสื่อมเสียของไข่

1.3 *Staphylococcus aureus*

1.3.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom: Eubacteria

Phylum: Firm cutes

Class: Bacilli

Order: Bacillales

Family: Staphylococcaceae

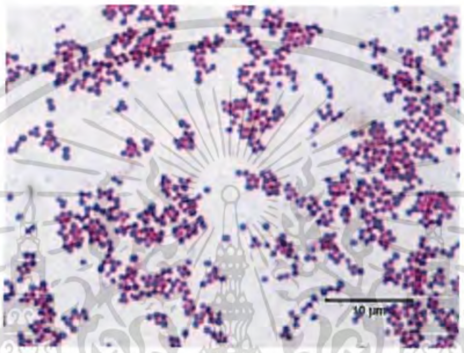
Genus: Staphylococcus

Species: *S. Aureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.2 ลักษณะทั่วไป

แบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม มักพบเป็นคู่เกาะกันด้วยสายสั้นๆ เป็นกิ่งหรือเปนลักษณะพวงองุ่น (spherical shape) สามารถเจริญได้ในสภาวะทที่ไม่มีอากาศและมีอากาศ (facultative anaerobes) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ 15 – 45 องศาเซลเซียส และเจริญได้ในระดับความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เช่นการติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อและโรคอาหารเป็นพิษ (Todar, 2005) มีการสร้างเม็ดสี (pigment) เหลืองในโคโลนี (Rosenbach, 1884)



รูปภาคผนวก ข ที่ 3 *Staphylococcus aureus*

ที่มา:https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xsa/xsa01.html (สืบค้นวันที่ 10/06/62)

1.1.3 แหล่งที่พบ

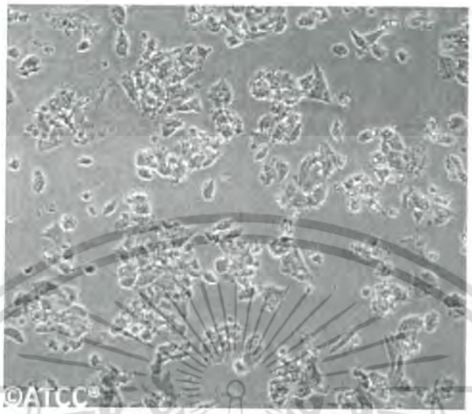
มักพบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในคนและสัตว์เลือดอุ่นชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะในคนที่มีผิวหนัง ผิดปกติเช่น เป็นฝีแผลผ่าตัด แผลอักเสบ เป็นต้น เชื้อนี้ยังแยกได้จากสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข เป็ด ไก่ โค กระบือ สุกร ห่าน และในอาหารสัตว์ *S. aureus* ก่อให้ เกิดโรค mastitis ในสัตว์โดยเฉพาะโค กระบือ แพะและแกะ *S. aureus* (Alberton et al. 2001) สายพันธุ์ที่สร้างเอ็นเตอโรท็อกซินที่พบใน สัตว์จะมีน้อยกว่าสายพันธุ์ ที่พบในคน

1.1.4 ความสำคัญในอุตสาหกรรม

S. aureus มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอกได้ดีมาก ทำให้ สามารถมีชีวิตอยู่ภายนอกร่างกายสัตว์ได้ดีมักก่อให้เกิดน้ำเน่าเสียแบบระยะยาว (Borrego et al. 1987) และสามารถพบเชื้อแพร่กระจายอยู่รอบสิ่งแวดล้อมในโรงงานผลิตอาหาร เช่น ในโรงงานบรรจุหีบห่อสัตว์ปีก (poultry packing plants) โดยเชื้อสามารถเกาะติดอยู่กับเครื่องมือดึงขนและปนเปื้อนลงในสัตว์ปีกขณะบรรจุหีบห่อได้ (Mead and Adam, 1986; Bolton et al. 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เซลล์มะเร็งตับ (HepG2)



รูปภาคผนวก ข ที่ 4 เซลล์ HepG2

ที่มา: https://www.atcc.org/~/media/Attachments/Micrographs/Cell/HB-8065%20Low%20High.ashx (สืบค้นวันที่ 10/06/62)

มะเร็งตับเป็นโรคที่เกิดจากเซลล์ของตับกลายเป็นเซลล์มะเร็งที่ มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น เป็น สาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 3 จากการเสียชีวิตจากมะเร็งทุกชนิดทั่วโลก และเป็นโรคที่พบได้บ่อยในคนไทย โดยพบใน ผู้ชายสูงกว่าในผู้หญิงประมาณ 3-4 เท่า

2.1 สาเหตุของมะเร็งตับ

ภาวะตับแข็งจากสาเหตุต่าง ๆ ได้แก่ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบซี การดื่มแอลกอฮอล์ ไขมันเกาะตับ โรคเบาหวาน โรคอ้วน รับประทานอาหารปนเปื้อน โดยเฉพาะ อะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) ที่พบมากในถั่วลิสง พริกป่นแห้ง

2.2 อาการของผู้ป่วยมะเร็งตับ

ปวด แน่น เจ็บบริเวณท้องบนด้านขวาและลิ้นปี่ คล้ายกับโรคกระเพาะอาหาร คลำเจอก้อนขนาดใหญ่ใต้ชายโครงด้านขวา เบื่ออาหาร น้ำหนักลดแบบไม่ทราบสาเหตุ ตัวเหลือง ตาเหลือง ท้องโต คลื่นไส้ อาเจียน

2.3 วิธีการรักษามะเร็งตับ

การรักษามะเร็งตับมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับระยะของโรค โดยแพทย์เฉพาะทางจะทำการพิจารณาวิธีที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่

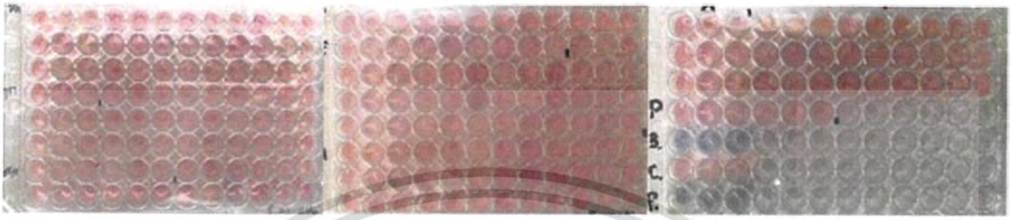
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การผ่าตัดก้อนมะเร็งตับ เนื่องจากการผ่าตัดรักษามะเร็งตับไม่สามารถผ่าเฉพาะก้อนเนื้อที่เป็นมะเร็งตับออกไปได้ อาจส่งผลกระทบถึงเนื้อเยื่อข้างเคียง ส่งผลให้อาจเกิดอันตรายถึงตับวายได้ ดังนั้นผู้ป่วยที่จะรักษาด้วยวิธีนี้มีเพียง 10-20% ที่สามารถรักษาโดยการผ่าตัดเนื้อตับออกไปได้
2. การจี้ด้วยคลื่นความถี่วิทยุ (Radio Frequency Ablation - RF) มักใช้ในกรณีที่ก้อนเนื้องอกมีขนาดไม่เกิน 3-4 เซนติเมตร โดยใช้เข็มเข้าไปทำลายก้อนเนื้อด้วยความร้อน โดยใช้การอัลตราซาวนด์หรือเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระบุตำแหน่ง ข้อดีคือเนื้อตับถูกทำลายน้อยมาก ทำลายเซลล์มะเร็งตับแบบถาวร ผู้ป่วยฟื้นตัวได้เร็ว
3. การให้เคมีบำบัดผ่านทางหลอดเลือดแดง (Transarterial Chemoembolisation - TACE) เป็นการรักษาผู้ป่วยมะเร็งตับที่ไม่สามารถทำการผ่าตัดได้และก้อนเนื้อบริเวณตับมีขนาดใหญ่ประมาณ 7 – 10 เซนติเมตร โดยสอดกล้องหรือสอดท่อเข้าไปทางหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงก้อนเนื้องอกที่ตับ จากนั้นทำการให้ยาฆ่าเซลล์มะเร็งและให้สารอุดกั้นหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงก้อนเนื้องอก ทำให้ก้อนเนื้องอกถูกทำลายด้วยเคมีบำบัดและขาดเลือดไปเลี้ยง วิธีนี้ช่วยป้องกันภาวะแทรกซ้อน แต่อาจต้องกลับมาทำซ้ำหากเซลล์มะเร็งยังมีอยู่ หรือรักษาก้อนเนื้องอกจนเล็กลง
4. การจี้ทำลายก้อนมะเร็งตับด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave Ablation) คล้ายกับวิธี RF โดยใช้เข็มที่ผลิตความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟผ่านรูเล็ก ๆ ที่มีขนาดเพียง 2 - 3 มิลลิเมตร เข้าไปทำลายก้อนเนื้อในตับที่มีขนาดไม่เกิน 5 เซนติเมตร โดยใช้การอัลตราซาวนด์หรือเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ระบุตำแหน่ง วิธีนี้ช่วยลดภาวะแทรกซ้อน ผู้ป่วยฟื้นตัวได้เร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

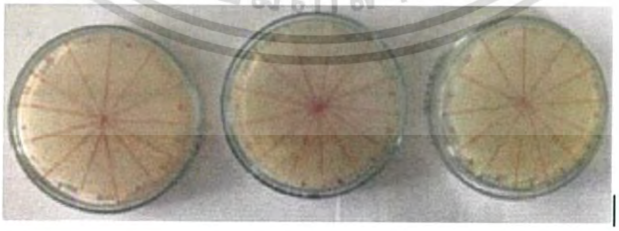
1. ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในไมโครเพลทและอาหาร Cation-Adjusted Mueller Hinton Agar



(A)

(B)

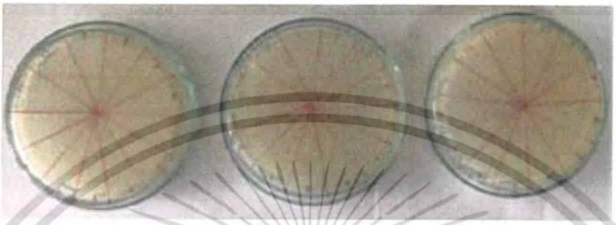
(C)



(D)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(E)

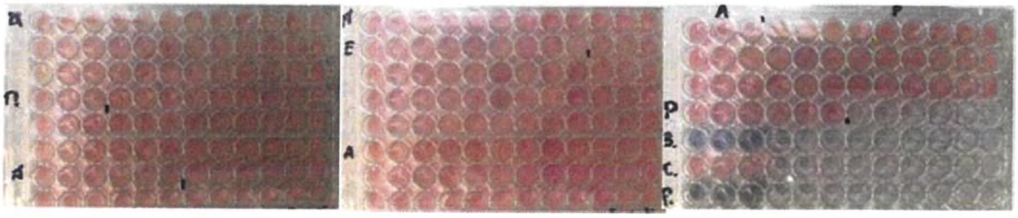


(F)

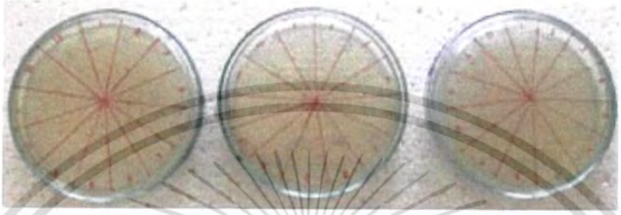
(G)

รูปภาคผนวก ค ที่ 1 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และการประเมินค่าบนอาหาร CAMHA ของ *S. aureus* TISTR 25923 : (A) การประเมินค่า MIC บนไมโครเพลท (B) ผล MBC ของใบเตยแห้ง (C) ผลMBC ของสิ่งสกัดจากการกลั่นด้วยน้ำ (D) ผล MBC ของสิ่งสกัดน้ำกลั่น (E) ผล MBC ของสิ่งสกัดเอทานอล (F) ผล MBC ของสิ่งสกัดอะซิโตน (G) ผล MBC ของสิ่งสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(A)



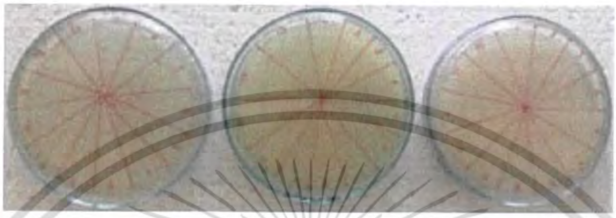
(B)

(C)

(D)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(E)

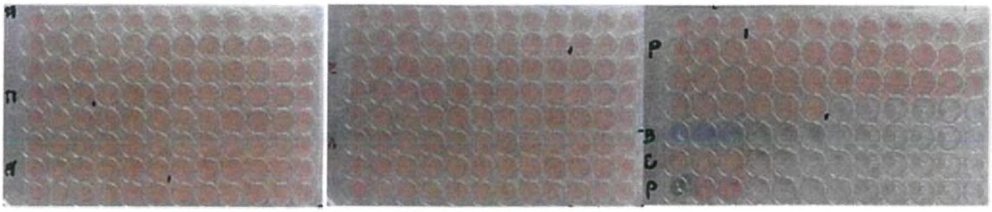


(F)

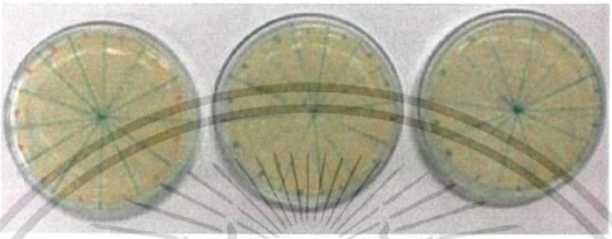
(G)

รูปภาคผนวก ค ที่ 2 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และการประเมินค่าบนอาหาร CAMHA ของ *E. coli* ATCC 25922 : (A) การประเมินค่า MIC บนไมโครเพลท (B) ผล MBC ของใบเตยแห้ง (C) ผล MBC ของสิ่งสกัดจากการกลั่นด้วยน้ำ (D) ผล MBC ของสิ่งสกัดน้ำกลั่น (E) ผล MBC ของสิ่งสกัดเอทานอล (F) ผล MBC ของสิ่งสกัดอะซิโตน (G) ผล MBC ของสิ่งสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(A)

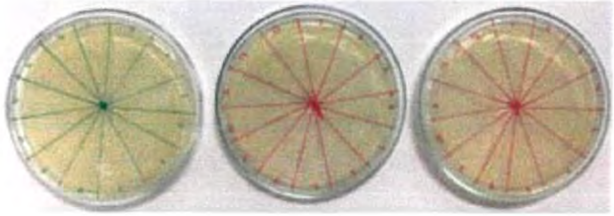


(B)

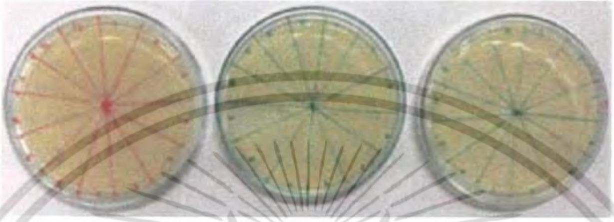
(C)

(D)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(E)



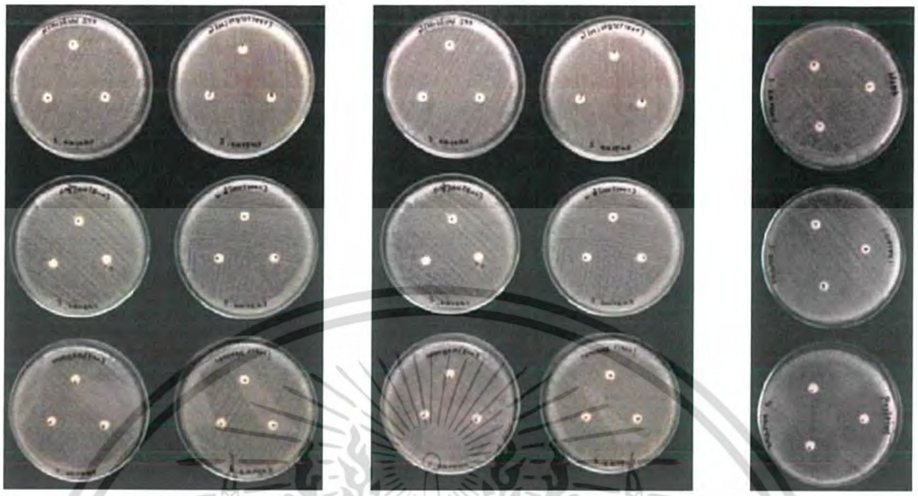
(F)

(G)

รูปภาคผนวก ค ที่ 3 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และการประเมินค่าบนอาหาร CAMHA ของ *Pseudomonas* sp. ATCC 27853 : (A) การประเมินค่า MIC บนไมโครเพลท (B) ผล MBC ของใบเตยแห้ง (C) ผล MBC ของสิ่งสกัดจากการกลั่นด้วยน้ำ (D) ผล MBC ของสิ่งสกัดน้ำกลั่น (E) ผล MBC ของสิ่งสกัดเอทานอล (F) ผล MBC ของสิ่งสกัดอะซิโตน (G) ผล MBC ของสิ่งสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์

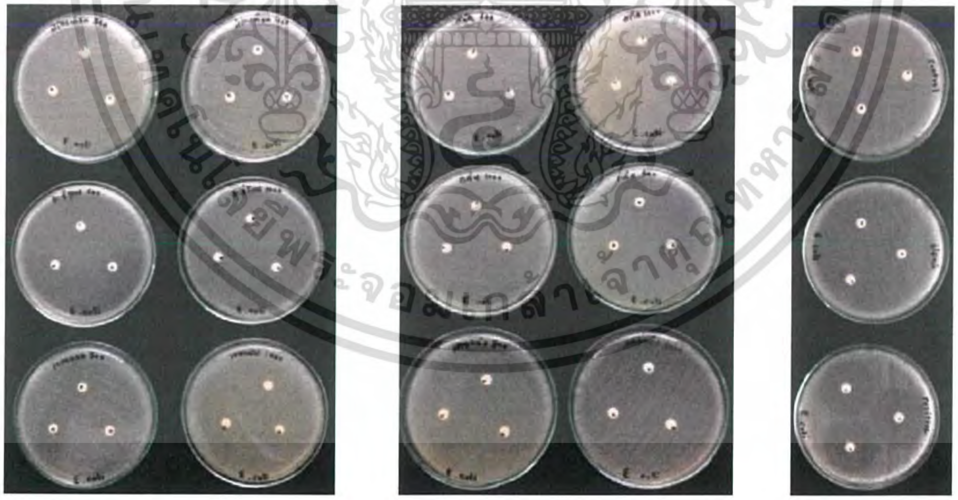
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ลักษณะการเกิดบริเวณยับยั้ง (clear zone) การเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหาร เลี้ยงเชื้อ



(A) (B) (C)

รูปภาคผนวก ค ที่ 4 แสดงลักษณะการประเมินฤทธิ์ของสิ่งสกัดในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 25923 บนอาหาร CAMHA : (A) สิ่งสกัดความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (B) สิ่งสกัดความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (C)ตัวควบคุมและตัวควบคุมเชิงบวก



(A) (B) (C)

รูปภาคผนวก ค ที่ 5 แสดงลักษณะการประเมินฤทธิ์ของสิ่งสกัดในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 บนอาหาร CAMHA : (A) สิ่งสกัดความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (B) สิ่งสกัดความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (C) ตัวควบคุมและตัวควบคุมเชิงบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(A) (B) (C)

รูปภาคผนวก ค ที่ 6 แสดงลักษณะการประเมินฤทธิ์ของสิ่งสกัดในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas sp.* ATCC 27853 บนอาหาร CAMHA

หมายเหตุ: (A) สิ่งสกัดความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (B) สิ่งสกัดความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (C) ตัวควบคุมและตัวควบคุมเชิงบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

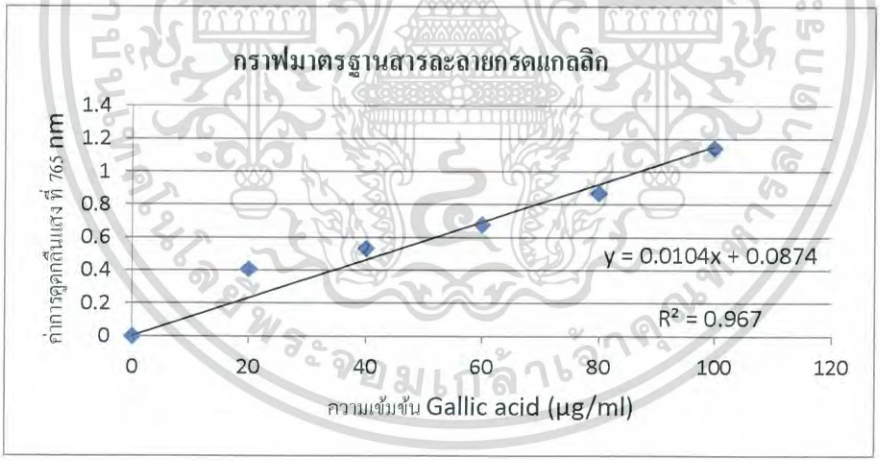
ภาคผนวก ง

ตารางแสดงผลการวิจัยและคำนวณทางสถิติ

1. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

ตารางที่ ผ-1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
0	0
20	0.408
40	0.533
60	0.677
80	0.871
100	1.144



รูปภาคผนวก ง ที่ 1 กราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ผ-2 แสดงผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวม

ตัวอย่างสารสกัด	จำนวนซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสง ความเข้มข้นต่าง ๆ (μg/mL)		
		100	500	1,000
ใบเตยแห้ง	1	0.178	0.225	0.3
	2	0.185	0.214	0.244
	3	0.19	0.194	0.28
	เฉลี่ย	0.184	0.206	0.275
กลั่นด้วยน้ำ	1	0.177	0.219	0.266
	2	0.195	0.211	0.253
	3	0.166	0.2	0.233
	เฉลี่ย	0.179	0.21	0.251
สกัดด้วยน้ำ	1	0..175	0.197	0.241
	2	0.186	0.199	0.253
	3	0.191	0.214	0.225
	เฉลี่ย	0.184	0.203	0.239
เอทานอล	1	0.207	0.258	0.311
	2	0.214	0.247	0.365
	3	0.212	0.265	0.309
	เฉลี่ย	0.211	0.256	0.328
อะซิโตน	1	0.177	0.198	0.335
	2	0.186	0.21	0.282
	3	0.19	0.234	0.278
	เฉลี่ย	0.184	0.214	0.298
ปิโตรเลียมอีเทอร์	1	0.199	0.336	0.347
	2	0.233	0.259	0.259
	3	0.24	0.256	0.256

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างวิธีการคำนวณ

หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบเตยด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ การกลั่นด้วยน้ำกลั่น การสกัดด้วยน้ำกลั่น การหมักใบเตยผงด้วยเอทานอล การสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดคือ เอทานอล อะซิโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์ ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การกลั่นด้วยน้ำกลั่น

ซ้ำที่ 1

ค่าการดูดกลืนแสง (y) = 0.300

จากสมการเส้นตรง y = 0.0104x + 0.0874

แทนค่า y = ลงในสมการ

0.300 = 0.0104x + 0.0874

จะได้ x = 20.44 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ทดสอบมีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ตัวอย่างจะมีปริมาณแกลลิก = (20.44μg/ml)/(1,000 μg/ml) = 20.44 μmgGAE/μg

= 20.44 mgGAE/g = 20.44 ugGAE/mg

ซ้ำที่ 2

ค่าการดูดกลืนแสง (y) = 0.244

จากสมการเส้นตรง y = 0.0104x + 0.0874

แทนค่า y = ลงในสมการ

0.244 = 0.0104x + 0.0874

จะได้ x = 15.06 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ทดสอบมีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ตัวอย่างจะมีปริมาณแกลลิก = (15.06 μg/ml)/(1,000 μg/ml) = 15.06 ugGAE/mg

= 15.06 mgGAE/g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซ้ำที่ 3

ค่าการดูดกลืนแสง (y) = 0.280

จากสมการเส้นตรง y = 0.0104x + 0.0874

แทนค่า y = ลงในสมการ

0.280 = 0.0104x + 0.0874

จะได้ x = 18.52 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ทดสอบมีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ตัวอย่างจะมีปริมาณแกลลิก = (18.52μg/ml)/(1,000 μg/ml) = 18.52 μgGAE/mg

= 18.52 mgGAE/g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระจากสิ่งสกัดด้วยวิธี DPPH Scavenging

ตารางที่ ผ-3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเตยด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน

ตัวอย่าง สารสกัด	จำนวนซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสง ความเข้มข้น (μg/mL)		
		100	500	1000
ใบเตยแห้ง (ตัวควบคุม)	1	0.585	0.572	0.538
	2	0.585	0.573	0.57
	3	0.585	0.577	0.571
กลั่นด้วยน้ำ	1	0.585	0.563	0.545
	2	0.591	0.576	0.567
	3	0.596	0.576	0.547
สกัดด้วยน้ำ	1	0.607	0.602	0.584
	2	0.606	0.609	0.602
	3	0.606	0.601	0.596
เอทานอล	1	0.579	0.534	0.47
	2	0.573	0.551	0.561
	3	0.572	0.537	0.585
อะซิโตน	1	0.62	0.61	0.599
	2	0.616	0.617	0.598
	3	0.633	0.616	0.589
ปิโตรเลียมอีเทอร์	1	0.628	0.628	0.602
	2	0.627	0.623	0.593
	3	0.629	0.604	0.581
Ascorbic acid	1	0.581	0.604	0.433
	2	0.604	0.554	0.455
	3	0.653	0.523	0.450

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ผ-3 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเตยด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน (ต่อ)

ตัวอย่างสารสกัด	**จำนวนซ้ำ**	**ค่าการดูดกลืนแสง ความเข้มข้น (µg/mL)**		
		100	500	1000
DPPH	1	0.724		
	2	0.746		
	3	0.751		

ตัวอย่างการคำนวณหาค่า % DPPH Scavenging

สมการเส้นตรงค่า % DPPH Scavenging ใบเตยควบคุม

y = 1.7117x + 19.159

R^2 = 0.9943

แทนค่า y = 50 จะได้ค่า x= 18.02 µg/mL

สมการเส้นตรงค่า % DPPH Scavenging สารสกัดใบเตยจากการกลั่นด้วยน้ำ

y = 2.545x + 17.643

R^2 = 1

แทนค่า y = 50 จะได้ค่า x= 12.71 µg/mL

สมการเส้นตรงค่า % DPPH Scavenging สารสกัดใบเตยด้วยน้ำ

y = 0.8333x + 17.057

R^2 = 0.8859

แทนค่า y = 50 จะได้ค่า x= 39.53 µg/mL

สมการเส้นตรงค่า % DPPH Scavenging สารสกัดใบเตยเอทานอล

y = 2.4324x + 20.631

R^2 = 0.7915

แทนค่า y = 50 จะได้ค่า x= 12.07 µg/mL

สมการเส้นตรงค่า % DPPH Scavenging สารสกัดใบเตยอะซิโตน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$y = 1.8694x + 13.709$

$R^2 = 0.9556$

แทนค่า y = 50 จะได้ค่า x= 19.41 μg/mL

สมการเส้นตรงค่า % DPPH Scavenging สารสกัดใบเตยปิโตรเลียมอีเทอร์

$y = 2.4324x + 12.327$

$R^2 = 0.9333$

แทนค่า y = 50 จะได้ค่า x= 15.49 μg/mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ตารางที่ ผ-4 แสดงผลคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-Hedonic scale ของข้าวเหนียวแก้วใบเตยแบบไม่ใส่ใบเตย(ควบคุม)

ผู้ทดสอบ	ข้าวเหนียวแก้วใบเตยไม่ใส่ใบเตย					
	ลักษณะที่ปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบโดยรวม
1	7	7	6	7	6	7
2	7	7	7	8	7	8
3	8	6	7	9	9	8
4	7	7	6	7	6	6
5	8	6	5	9	7	8
6	6	7	7	7	6	7
7	8	8	7	8	7	7
8	6	7	7	7	6	6
9	5	7	6	7	6	6
10	7	7	6	6	6	5
11	5	5	6	5	6	5
12	5	7	7	8	7	6
13	7	6	6	5	6	7
14	7	7	7	6	7	6
15	5	6	6	5	6	5
16	5	5	7	5	5	5
17	8	8	7	5	7	7
18	7	7	6	6	5	6
19	5	6	5	7	8	6
20	5	6	6	6	6	6
21	8	8	8	7	7	8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ผ-4 (ต่อ) แสดงผลคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-Hedonic scale ของข้าวเหนียวแก้วใบเตยแบบไม่ใส่ใบเตย(ควบคุม)

ผู้ทดสอบ	ข้าวเหนียวแก้วไม่ใส่ใบเตย					
	ลักษณะที่ปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบโดยรวม
22	7	7	8	7	7	8
23	8	5	8	5	7	5
24	7	7	6	7	7	7
25	9	8	8	7	8	8
26	8	8	8	9	8	8
27	7	7	6	5	6	7
28	7	6	6	7	8	7
29	6	6	7	7	7	7
30	7	6	8	7	7	8
รวม	202	200	200	201	201	200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ผ-5 แสดงผลคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-Hedonic scale ของข้าวเหนียวแก้วใบเตยอัตราส่วน 40:100

ผู้ทดสอบ	ข้าวเหนียวแก้วใบเตย 40:100					
	ลักษณะที่ปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบโดยรวม
1	9	9	9	9	8	9
2	9	9	9	8	7	8
3	7	8	9	7	7	7
4	7	8	8	8	8	7
5	9	8	9	9	7	8
6	8	7	7	7	8	7
7	8	9	9	8	7	8
8	9	9	7	7	7	8
9	6	6	7	7	8	7
10	7	8	8	7	7	7
11	7	6	7	8	7	7
12	7	7	9	7	8	8
13	9	8	8	7	7	8
14	8	9	7	8	8	8
15	7	6	7	7	7	7
16	8	8	5	8	8	7
17	9	8	7	7	8	8
18	9	8	7	7	7	7
19	5	6	8	8	8	8
20	5	9	6	9	9	8
21	8	8	8	7	7	8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ผ-5 (ต่อ) แสดงผลคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-Hedonic scale ของข้าวเหนียวแก้วใบเตยอัตราส่วน 40:100

ผู้ทดสอบ	ข้าวเหนียวแก้วใบเตย 40:100					
	ลักษณะที่ปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบโดยรวม
22	7	7	8	8	8	8
23	6	6	6	7	7	6
24	7	7	9	8	7	7
25	9	8	9	9	8	9
26	8	8	8	8	7	8
27	7	6	8	7	8	7
28	7	8	8	7	7	7
29	8	8	9	8	8	8
30	8	8	7	8	8	7
รวม	228	230	233	230	226	227

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ผ-6 แสดงผลคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-Hedonic scale ของข้าวเหนียวแก้ใบเตยอัตราส่วน 80:100

ผู้ทดสอบ	ข้าวเหนียวแก้วใบเตย 80:100					
	ลักษณะที่ปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบโดยรวม
1	8	8	8	8	7	8
2	9	9	8	8	7	7
3	8	8	9	8	7	7
4	7	7	8	8	7	6
5	8	8	9	9	7	7
6	6	6	7	6	7	6
7	8	8	7	7	7	7
8	9	9	7	7	8	7
9	6	6	7	7	8	7
10	7	8	8	7	7	8
11	7	7	8	6	8	7
12	7	6	7	6	7	7
13	6	6	7	6	7	6
14	7	7	6	7	6	7
15	6	6	7	7	7	7
16	6	6	8	8	7	7
17	7	6	6	7	7	7
18	7	8	7	7	7	7
19	6	7	8	7	6	7
20	6	7	6	7	7	6
21	8	8	8	9	8	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ผ-6 (ต่อ) แสดงผลคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-Hedonic scale ของข้าวเหนียวแก้ใบเตยอัตราส่วน 80:100

ผู้ทดสอบ	ข้าวเหนียวแก้วใบเตย 80:100					
	ลักษณะที่ปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบโดยรวม
22	8	8	8	8	9	9
23	7	7	7	6	7	7
24	7	7	7	8	8	8
25	8	8	8	8	8	8
26	8	9	8	8	9	8
27	9	9	7	7	8	9
28	7	7	8	7	8	8
29	8	8	7	8	8	8
30	7	7	7	7	7	7
รวม	218	221	223	219	221	219

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ผ-7 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Descriptives								
Total Phenolic								
สารสกัด	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ควบคุม	3	93.2051	5.79588	3.34625	78.8074	107.6029	87.12	98.65
กลั่นด้วยน้ำ	3	88.3974	14.07705	8.12739	53.4281	123.3668	75.58	103.46
สกัดด้วยน้ำ	3	92.8846	7.87053	4.54405	73.3331	112.4361	84.23	99.62
เอทานอล	3	118.8462	3.46688	2.00160	110.2340	127.4584	115.00	121.73
อะซิโตน	3	93.2051	6.40224	3.69633	77.3011	109.1092	86.15	98.65
ปิโตรเลียมอีเทอร์	3	131.3462	21.08818	12.17527	78.9602	183.7321	107.31	146.73
Total	18	102.9808	19.20318	4.52623	93.4313	112.5303	75.58	146.73

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร

ANOVA					
Total Phenolic					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4686.113	5	937.223	7.105	0.003
Within Groups	1582.840	12	131.903		
Total	6268.953	17			

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Total Phenolic			
Duncan[a]			
สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
กลั่นด้วยน้ำ	3	88.3974	
สกัดด้วยน้ำ	3	92.8846	
อะซิโตน	3	93.2051	
ควบคุม	3	93.2051	
เอทานอล	3		118.8462
ปิโตรเลียมอีเทอร์	3		131.3462
Sig.		0.643	0.207

ตารางที่ ผ-8 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Descriptives								
Total Phenolic								
สารสกัด	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ควบคุม	3	23.7692	3.02235	1.74496	16.2613	31.2772	20.50	26.46
กลั่นด้วยน้ำ	3	23.5769	1.83450	1.05915	19.0198	28.1341	21.65	25.31
สกัดด้วยน้ำ	3	47.1538	3.66900	2.11830	38.0396	56.2681	43.31	50.62
เอทานอล	3	32.5513	1.74496	1.00745	28.2166	36.8860	30.69	34.15
อะซิโตน	3	24.3462	3.52506	2.03519	15.5894	33.1029	21.27	28.19
ปิโตรเลียมอีเทอร์	3	37.7436	8.72054	5.03481	16.0806	59.4066	32.42	47.81
Total	18	31.5235	9.73621	2.29485	26.6818	36.3652	20.50	50.62

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA					
Total phenolic					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1376.534	5	275.307	14.061	0.000
Within Groups	234.961	12	19.580		
Total	1611.494	17			

phenolic				
Duncan[a]				
สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
กลั่นด้วยน้ำ	3	23.5769		
ควบคุม	3	23.7692		
อะซิโตน	3	24.3462		
เอทานอล	3		32.5513	
ปิโตรเลียมอีเทอร์	3		37.7436	
สกัดด้วยน้ำ	3			47.1538
Sig.		0.843	0.176	1.000

ตารางที่ ผ-9 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Descriptives								
Total Phenolic								
สารสกัด	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ควบคุม	3	18.0064	2.72869	1.57541	11.2280	24.7849	15.06	20.44
กลั่นด้วยน้ำ	3	15.6987	1.59839	0.92283	11.7281	19.6693	14.00	17.17
สกัดด้วยน้ำ	3	14.6410	1.35072	0.77984	11.2856	17.9964	13.23	15.92
เอทานอล	3	23.1667	3.05481	1.76369	15.5781	30.7552	21.31	26.69
อะซิโตน	3	20.2821	3.05934	1.76631	12.6822	27.8819	18.33	23.81
ปิโตรเลียมอีเทอร์	3	25.6987	4.61171	2.66257	14.2426	37.1548	21.50	30.63
Total	18	19.5823	4.73881	1.11695	17.2257	21.9388	13.23	30.63

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ANOVA					
Total phenolic					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	278.189	5	55.638	6.446	0.004
Within Groups	103.569	12	8.631		
Total	381.758	17			

Total phenolic					
Duncan[a]					
สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
สกัดด้วยน้ำ	3	14.6410			
กลั่นด้วยน้ำ	3	15.6987	15.6987		
ควบคุม	3	18.0064	18.0064	18.0064	
อะซิโตน	3		20.2821	20.2821	20.2821
เอทานอล	3			23.1667	23.1667
ปิโตรเลียมอีเทอร์	3				25.6987
Sig.		0.206	0.093	0.062	0.052

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ ผ-10 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Descriptives								
DPPH100								
สารสกัด	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ควบคุม	3	20.9459	0.00000	0.00000	20.9459	20.9459	20.95	20.95
กลั่นด้วยน้ำ	3	20.1802	0.74427	0.42970	18.3313	22.0290	19.46	20.95
สกัดด้วยน้ำ	3	18.0631	0.07802	0.04505	17.8692	18.2569	17.97	18.11
เอทานอล	3	22.3423	0.51161	0.29538	21.0714	23.6133	21.76	22.70
อะซิโตน	3	15.8108	1.20111	0.69346	12.8271	18.7945	14.46	16.76
ปิโตรเลียมอีเทอร์	3	15.1351	0.13514	0.07802	14.7994	15.4708	15.00	15.27
Total	18	18.7462	2.76976	0.65284	17.3689	20.1236	14.46	22.70

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ANOVA					
DPPH100					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	125.851	5	25.170	66.159	0.000
Within Groups	4.565	12	0.380		
Total	130.417	17			

DPPH100					
Duncan[a]					
สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
ปิโตรเลียมอีเทอร์	3	15.1351			
อะซิโตน	3	15.8108			
สกัดด้วยน้ำ	3		18.0631		
กลั่นด้วยน้ำ	3			20.1802	
ควบคุม	3			20.9459	
เอทานอล	3				22.3423
Sig.		0.205	1.000	0.154	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					

พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ ผ-11 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Descriptives								
DPPH500								
สารสกัด	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ควบคุม	3	22.4324	0.35753	0.20642	21.5443	23.3206	22.03	22.70
กลั่นด้วยน้ำ	3	22.7477	1.01426	0.58559	20.2282	25.2673	22.16	23.92
สกัดด้วยน้ำ	3	18.3784	0.58904	0.34008	16.9151	19.8416	17.70	18.78
เอทานอล	3	26.9369	1.22619	0.70794	23.8909	29.9830	25.54	27.84
อะซิโตน	3	16.9820	0.51161	0.29538	15.7111	18.2529	16.62	17.57
ปิโตรเลียมอีเทอร์	3	16.4414	1.71112	0.98791	12.1908	20.6921	15.14	18.38
Total	18	20.6532	3.93089	0.92652	18.6984	22.6079	15.14	27.84

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA					
DPPH500					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	250.289	5	50.058	48.469	0.000
Within Groups	12.393	12	1.033		
Total	262.683	17			

DPPH500					
Duncan[a]					
สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
ปิโตรเลียมอีเทอร์	3	16.4414			
อะซิโตน	3	16.9820	16.9820		
สกัดด้วยน้ำ	3		18.3784		
ควบคุม	3			22.4324	
กลั่นด้วยน้ำ	3			22.7477	
เอทานอล	3				26.9369
Sig.		0.527	0.118	0.711	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ ผ-12 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Descriptives								
DPPH1000								
สารสกัด	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ควบคุม	3	24.3694	2.53656	1.46448	18.0682	30.6705	22.84	27.30
กลั่นด้วยน้ำ	3	25.2703	1.64399	0.94916	21.1864	29.3542	23.38	26.35
สกัดด้วยน้ำ	3	19.7297	1.23853	0.71507	16.6530	22.8064	18.65	21.08
เอทานอล	3	27.2072	8.19807	4.73316	6.8421	47.5724	20.95	36.49
อะซิโตน	3	19.5495	0.74427	0.42970	17.7007	21.3984	19.05	20.41
ปิโตรเลียมอีเทอร์	3	20.0000	1.42374	0.82199	16.4632	23.5368	18.65	21.49
Total	18	22.6877	4.39355	1.03557	20.5028	24.8725	18.65	36.49

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA					
DPPH1000					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	167.235	5	33.447	2.494	0.090
Within Groups	160.920	12	13.410		
Total	328.155	17			

DPPH1000			
Duncan[a]			
สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
อะซิโตน	3	19.5495	
สกัดด้วยน้ำ	3	19.7297	
ปิโตรเลียมอีเทอร์	3	20.0000	
ควบคุม	3	24.3694	24.3694
กลั่นด้วยน้ำ	3	25.2703	25.2703
เอทานอล	3		27.2072
Sig.		0.106	0.384
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.			

ตารางที่ ผ-13 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ค่า IC_{50} ในการดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเตยหอมที่ความเข้มข้น 100, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Descriptives								
IC_{50}								
สารสกัด	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
เตยแห้ง	3	33.3316	1.60873	0.92880	29.3353	37.3279	31.67	34.88
กลั่นด้วยน้ำ	3	13.7786	4.86347	2.80793	1.6971	25.8602	10.29	19.33
สกัดด้วยน้ำ	3	46.4418	23.81530	13.74977	-12.7187	105.6022	21.80	69.33
เอทานอล	3	11.4761	7.36112	4.24994	-6.8099	29.7622	4.89	19.42
อะซิโตน	3	22.0954	8.05488	4.65048	2.0860	42.1048	13.03	28.43
ปิโตรเลียมอีเทอร์	3	15.1447	3.00967	1.73763	7.6683	22.6212	11.78	17.57
Total	18	23.7114	15.79986	3.72406	15.8543	31.5685	4.89	69.33

ANOVA					
IC_{50}					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2800.736	5	560.147	4.658	0.014
Within Groups	1443.070	12	120.256		
Total	4243.806	17			

IC$_{50}$				
Duncan[a]				
สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
เอทานอล	3	11.4761		
กลั่นด้วยน้ำ	3	13.7786	13.7786	
ปิโตรเลียมอีเทอร์	3	15.1447	15.1447	
อะซิโตน	3	22.0954	22.0954	
เตยแห้ง	3		33.3316	33.3316
สกัดด้วยน้ำ	3			46.4418
Sig.		0.293	0.065	0.169
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ ผ-14 ผลทางสถิติในการทดสอบประสาทสัมผัสด้านลักษณะที่ปรากฏ

Descriptives								
ตัวอย่าง	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ควบคุม	30	6.73	1.172	0.214	6.30	7.17	5	9
ใบเตย 40 กรัม	30	7.60	1.163	0.212	7.17	8.03	5	9
ใบเตย 80 กรัม	30	7.27	0.944	0.172	6.91	7.62	6	9
Total	90	7.20	1.144	0.121	6.96	7.44	5	9

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.467	2	5.733	4.753	0.011
Within Groups	104.933	87	1.206		
Total	116.400	89			

Duncan[a]			
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ควบคุม	30	6.73	
ใบเตย 80 กรัม	30	7.27	7.27
ใบเตย 40 กรัม	30		7.60
Sig.		0.063	0.243

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ตารางที่ ผ-15 ผลทางสถิติในการทดสอบประสาทสัมผัสด้านสี

Descriptives								
ตัวอย่าง	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ควบคุม	30	6.67	0.884	0.161	6.34	7.00	5	8
ใบเตย 40 กรัม	30	7.67	1.028	0.188	7.28	8.05	6	9
ใบเตย 80 กรัม	30	7.37	0.999	0.182	6.99	7.74	6	9
Total	90	7.23	1.050	0.111	7.01	7.45	5	9

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15.800	2	7.900	8.351	0.000
Within Groups	82.300	87	0.946		
Total	98.100	89			

Duncan[a]			
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ควบคุม	30	6.67	
ใบเตย 80 กรัม	30		7.37
ใบเตย 40 กรัม	30		7.67
Sig.		1.000	0.235
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.			

ตารางที่ ผ-16 ผลทางสถิติในการทดสอบประสาทสัมผัสด้านกลิ่น

Descriptives								
ตัวอย่าง	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ควบคุม	30	6.67	0.884	0.161	6.34	7.00	5	8
ใบเตย 40 กรัม	30	7.77	1.073	0.196	7.37	8.17	5	9
ใบเตย 80 กรัม	30	7.43	0.774	0.141	7.14	7.72	6	9
Total	90	7.29	1.019	0.107	7.08	7.50	5	9

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19.089	2	9.544	11.313	0.000
Within Groups	73.400	87	0.844		
Total	92.489	89			

Duncan[a]			
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ควบคุม	30	6.67	
ใบเตย 80 กรัม	30		7.43
ใบเตย 40 กรัม	30		7.77
Sig.		1.000	0.163
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.			

ตารางที่ ผ-17 ผลทางสถิติในการทดสอบประสาทสัมผัสด้านรสชาติ

Descriptives								
ตัวอย่าง	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ควบคุม	30	6.70	1.236	0.226	6.24	7.16	5	9
ใบเตย 40 กรัม	30	7.67	0.711	0.130	7.40	7.93	7	9
ใบเตย 80 กรัม	30	7.30	0.837	0.153	6.99	7.61	6	9
Total	90	7.22	1.025	0.108	7.01	7.44	5	9

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14.289	2	7.144	7.841	0.001
Within Groups	79.267	87	0.911		
Total	93.556	89			

Duncan[a]			
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ควบคุม	30	6.70	
ใบเตย 80 กรัม	30		7.30
ใบเตย 40 กรัม	30		7.67
Sig.		1.000	0.140

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ตารางที่ ผ-18 ผลทางสถิติในการทดสอบประสาทสัมผัสด้านเนื้อสัมผัส

Descriptives								
ตัวอย่าง	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ควบคุม	30	6.70	0.915	0.167	6.36	7.04	5	9
ใบเตย 40 กรัม	30	7.53	0.571	0.104	7.32	7.75	7	9
ใบเตย 80 กรัม	30	7.37	0.718	0.131	7.10	7.63	6	9
Total	90	7.20	0.824	0.087	7.03	7.37	5	9

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.667	2	5.833	10.414	0.000
Within Groups	48.733	87	0.560		
Total	60.400	89			

Duncan[a]			
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ควบคุม	30	6.70	
ใบเตย 80 กรัม	30		7.37
ใบเตย 40 กรัม	30		7.53
Sig.		1.000	0.391

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ตารางที่ ผ-19 ผลทางสถิติในการทดสอบประสาทสัมผัสด้านความชอบโดยรวม

Descriptives								
ตัวอย่าง	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ควบคุม	30	6.67	1.061	0.194	6.27	7.06	5	8
ใบเตย 40 กรัม	30	7.57	0.679	0.124	7.31	7.82	6	9
ใบเตย 80 กรัม	30	7.30	0.837	0.153	6.99	7.61	6	9
Total	90	7.18	0.943	0.099	6.98	7.38	5	9

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12.822	2	6.411	8.409	0.000
Within Groups	66.333	87	0.762		
Total	79.156	89			

Duncan[a]			
ตัวอย่าง	N	**Subset for alpha = 0.05**	
		1	**2**
ควบคุม	30	6.67	
ใบเตย 80 กรัม	30		7.30
ใบเตย 40 กรัม	30		7.57
Sig.		1.000	0.240
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.			