

ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียและเอนไซม์ไทโรซิเนส
ของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุล

ANTIBACTERIAL AND ANTITYROSINASE ACTIVITIES OF
Mimusops elengi SEPALS EXTRACT



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ปีการศึกษา 2561
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANTIBACTERIAL AND ANTITYROSINASE ACTIVITIES OF
Mimusops elengi SEPALS EXTRACT



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ดูแลเนื้อหาไปเผยแพร่หรือใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแบบลงเผยแพร่โดยเด็ดขาดของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ACADEMIC YEAR 2018

หัวข้อโครงการพิเศษ

ฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย และเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจาก
กลีบเลี้ยงของพิกุล
Antibacterial and Antityrosinase Activities of *Mimusops
elengi* Sepals Extract

ชื่อนักศึกษา

นายจตุรภัทร เรืองพินิจ รหัสนักศึกษา 58050718
นายวิษยุตม์ ศิลป์ไชย รหัสนักศึกษา 58050814
นายศิวกร สถิตวิทยา รหัสนักศึกษา 58050821

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา

ชีววิทยา

ปีการศึกษา

2561

อาจารย์ที่ปรึกษา

รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
(เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ กรรมการ	
รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการ และอาจารย์ที่ปรึกษา	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานที่การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามทำซ้ำโดยไม่ขออนุญาตจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	ฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย และเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุล		
ชื่อนักศึกษา	นายจตุรภัทร	เรื่องพินิจ	รหัสนักศึกษา 58050718
	นายวิษณุธรรม	ศิลป์ไชย	รหัสนักศึกษา 58050814
	นายศิวกร	สถิตวิทยา	รหัสนักศึกษา 58050821
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2561		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม		

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากกลีบเลี้ยงของพิกุล (*Mimusops elengi*) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทิลแอลกอฮอล์ โดยทดสอบฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี DOPA chrome และทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion พบว่าสารสกัดชั้นเมทิลแอลกอฮอล์ที่มีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 19.03 หรือเทียบเท่ากับ 66.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของกรดแอสคอร์บิก และมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* และ *Propionibacterium acnes* จึงได้ศึกษาเพิ่มเติมโดยนำสารสกัดหยาบชั้นเมทิลแอลกอฮอล์มาสกัดด้วยตัวทำละลายอีก 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ พบว่าสารสกัดจากชั้นเฮกเซนมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Pr. acnes* และสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Pr. acnes* ซึ่งจากผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในงานวิจัย และพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้

คำสำคัญ : พิกุล การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส การต้านแบคทีเรีย Disc diffusion, DOPA chrome

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Antibacterial and Antityrosinase Activities of <i>Mimusops elengi</i> Sepals Extract		
Students	Jaturapat	Ruangpinit	Student ID 58050718
	Vitchayut	Sillapachai	Student ID 58050814
	Siwakorn	Satitwitaya	Student ID 58050821
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2018		
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Supattra Poeaim		

Abstract

The point of this research is to study about crude extract from sepals of *Mimusops elengi* that extracted with methanol. The crude extract used to examine tyrosinase inhibition assay by DOPA chrome method and antibacterial assay by disc diffusion method. We found that the extract from methanol layer showed the greatest antityrosinase activity at 1,000 µg per mL (%inhibition = 19.03 or 66.09 µg per mL of ascorbic acid) and inhibition of *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* and *Propionibacterium acnes*. Therefore, study this extract more by partition with hexane, ethyl acetate, butanol and water. Found that the extract from hexane layer has antibacterial effect with *Pr. acnes* and the extract from ethyl acetate layer has antibacterial effect with *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Pr. acnes*. Finally all results from this study can use to produce varies products in future.

Keywords : *Mimusops elengi*, antityrosinase, antibacterial, Disc diffusion, DOPA chrome

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบคุณ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ได้อำนวยความสะดวกในเรื่องมือ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในการทำโครงการพิเศษในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการการสอบหัวข้อโครงการพิเศษ ที่ช่วยให้คำแนะนำต่าง ๆ ในการแก้ไขปัญหาโครงการพิเศษจนลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ กรรมการการสอบหัวข้อโครงการพิเศษ ที่ช่วยให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่ผู้วิจัยยังไม่ทราบให้เข้าใจมากขึ้น ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาหัวข้อโครงการพิเศษ ที่คอยให้ความรู้เกี่ยวกับเรื่องต่าง ๆ ที่ผู้วิจัยยังไม่เข้าใจ ช่วยแนะนำการแก้ปัญหาต่าง ๆ รวมทั้งช่วยตรวจสอบโครงการพิเศษเล่มนี้ให้ถูกต้อง และสมบูรณ์ยิ่งขึ้นในครั้งนี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณนายกฤษฎานาทุ่งนุ้ย ในการอนุเคราะห์สารสกัดของพืชในชั้นเอกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ ขอขอบคุณนางสาวจุฑาภรณ์ ผลมะขาม ที่คอยช่วยเหลือ และให้คำแนะนำในการทดลอง

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลที่เป็นเครือญาติ ที่คอยสนับสนุนสิ่งต่าง ๆ รวมถึงคอยเป็นกำลังใจในการทำโครงการพิเศษเล่มนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ เพื่อน พี่ และน้อง ๆ ทุกท่าน ที่คอยให้คำแนะนำ และช่วยเหลือตลอดจนทำโครงการพิเศษเล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ คณะผู้จัดทำหวังอย่างยิ่งว่า โครงการพิเศษเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ในงานวิจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับโครงการพิเศษนี้รวมถึงผู้ที่สนใจในการศึกษาไม่มากนักน้อย

ถ้าหาโครงการพิเศษเล่มนี้มีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้จัดทำต้องขออภัย ณ ที่นี้

จตุรภัทร	เรื่องพินิจ
วิษยุตม์	ศิลป์ไชย
ศิวกร	สถิตวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพิกุล.....	3
2.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย.....	5
2.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	6
2.3.1 กระบวนการสร้างและควบคุมเม็ดสีเมลานิน.....	6
2.3.2 เอนไซม์ไทโรซิเนส.....	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	10
3.1 ตัวอย่างพืช.....	10
3.2 ตัวอย่างสารสกัด.....	10
3.3 อุปกรณ์.....	10
3.4 สารเคมี.....	11
3.5 แบคทีเรีย.....	12
3.6 วิธีการทดลอง.....	12
3.6.1 สารสกัดหยาบเมทิลแอลกอฮอล์.....	12
3.6.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย.....	12
3.6.2.1 การเตรียมแบคทีเรียที่จะทำการทดสอบ.....	12
3.6.2.2 การเตรียมดิสก์ของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	13
3.6.2.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย.....	13
3.6.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	14
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	15
4.1 ผลการสกัดหยาบจากกลีบเลี้ยงของพิกุล.....	15
4.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย.....	15
4.2.1 ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมทิลแอลกอฮอล์จากกลีบเลี้ยง	
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามแก้ไขตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้	
ของพิกุล.....	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับควรใช้งานเพื่อการศึกษายานาน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.2 ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ จากกลีบเลี้ยงพิกุล.....	17
4.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุล.....	20
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	22
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	22
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	22
เอกสารอ้างอิง.....	23
ภาคผนวก.....	25
ภาคผนวก ก.....	26
ภาคผนวก ข.....	29
ภาคผนวก ค.....	36



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ปริมาณสารที่ใส่ในไมโครเทอร์เพลทในการทดสอบการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	14
4.1 ลักษณะของสารสกัด และผลได้ของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุล	15
4.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณด้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมทิลแอลกอฮอล์ จากกลีบเลี้ยงของพิกุล.....	16
4.3 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณด้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุลในชั้น เฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์	18
4.4 ร้อยละการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบเมทิลแอลกอฮอล์จากกลีบเลี้ยง ของพิกุล	20
4.5 ร้อยละการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของกรดแอสคอร์บิก	20
ข-1 ค่าการดูดกลืนแสง และร้อยละการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทิลแอลกอฮอล์ จากกลีบเลี้ยงของพิกุล.....	29
ข-2 ค่าการดูดกลืนแสงของกรดแอสคอร์บิก	30
ค-1 ข้อมูลผล 3 ซ้ำของขนาดบริเวณการต้านแบคทีเรียของสารสกัดเมทิลแอลกอฮอล์ จากกลีบเลี้ยงของพิกุล.....	36
ค-2 ข้อมูลผล 3 ซ้ำของขนาดบริเวณการต้านแบคทีเรียของสารสกัดเฮกเซน จากกลีบเลี้ยงของพิกุล.....	37
ค-3 ข้อมูลผล 3 ซ้ำของขนาดบริเวณการต้านแบคทีเรียของสารสกัดเอทิลอะซิเตท จากกลีบเลี้ยงของพิกุล.....	38
ค-4 ข้อมูลผล 3 ซ้ำของขนาดบริเวณการต้านแบคทีเรียของสารสกัดบิวทานอล จากกลีบเลี้ยงของพิกุล.....	39
ค-5 ข้อมูลผล 3 ซ้ำของขนาดบริเวณการต้านแบคทีเรียของสารสกัดน้ำ จากกลีบเลี้ยงของพิกุล.....	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ลักษณะส่วนต่าง ๆ ของต้นพิกุล (A) ต้น (B) ใบ (C) ดอก (D) เมล็ด (E) ผล..... 4
2.2	ลักษณะโครงสร้างโมโนเมอร์ของเม็ดสีดำ เม็ดสีแดงหรือสีเหลือง และเม็ดสีน้ำตาล..... 6
2.3	กลไกการสร้างเม็ดสี..... 7
2.4	กลไกการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในการย่อยสลาย L-DOPA ให้กลายเป็นเมลานิน 8
3.1	วิธีการวางดิสก์ลงในจานเพาะเชื้อเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion.... 13
4.1	บริเวณต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุลด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ที่ ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ต่อเชื้อแบคทีเรีย (A) <i>Bacillus subtilis</i> (B) <i>Propionibacterium acnes</i> 16
4.2	บริเวณต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุลด้วยเฮกเซนที่ ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ต่อเชื้อแบคทีเรีย <i>Propionibacterium acnes</i> 19
4.3	บริเวณต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุลด้วยเอทิลอะซิเตทที่ ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ต่อเชื้อแบคทีเรีย (A) <i>Bacillus subtilis</i> (B) <i>Propionibacterium acnes</i> 19
4.4	ร้อยละการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของกรดแอสคอร์บิก..... 21
ข-1	บริเวณต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุลด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ที่ ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ต่อเชื้อแบคทีเรีย (A) <i>Bacillus subtilis</i> (B) <i>Escherichia coli</i> (C) <i>Micrococcus luteus</i> (D) <i>Propionibacterium acnes</i> (E) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (F) <i>Staphylococcus aureus</i> (G) <i>Staphylococcus epidermidis</i> P : เจนต้าไมซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ N : เมทิลแอลกอฮอล์..... 31
ข-2	บริเวณต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุลด้วยเฮกเซนที่ ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ต่อเชื้อแบคทีเรีย (A) <i>Bacillus subtilis</i> (B) <i>Escherichia coli</i> (C) <i>Micrococcus luteus</i> (D) <i>Propionibacterium acnes</i> (E) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (F) <i>Staphylococcus aureus</i> (G) <i>Staphylococcus epidermidis</i> P : เจนต้าไมซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ N : เฮกเซน 32
ข-3	บริเวณต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุลด้วยเอทิลอะซิเตทที่ ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ต่อเชื้อแบคทีเรีย (A) <i>Bacillus subtilis</i> (B) <i>Escherichia coli</i> (C) <i>Micrococcus luteus</i> (D) <i>Propionibacterium acnes</i> (E) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (F) <i>Staphylococcus aureus</i> (G) <i>Staphylococcus epidermidis</i> P : เจนต้าไมซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ N : เอทิลอะซิเตท..... 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
ข-4 บริเวณด้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุลด้วยบิวทานอลที่ ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ต่อเชื้อแบคทีเรีย (A) <i>Bacillus subtilis</i> (B) <i>Escherichia coli</i> (C) <i>Micrococcus luteus</i> (D) <i>Propionibacterium acnes</i> (E) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (F) <i>Staphylococcus aureus</i> (G) <i>Staphylococcus epidermidis</i> P : เจนต้าไมซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ N : บิวทานอล.....	34
ข-5 บริเวณด้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุลด้วยน้ำที่ ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ต่อเชื้อแบคทีเรีย (A) <i>Bacillus subtilis</i> (B) <i>Escherichia coli</i> (C) <i>Micrococcus luteus</i> (D) <i>Propionibacterium acnes</i> (E) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (F) <i>Staphylococcus aureus</i> (G) <i>Staphylococcus epidermidis</i> P : เจนต้าไมซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ N : น้ำ.....	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบันมนุษย์เรานั้นให้ความสำคัญกับผิวพรรณเป็นอย่างมาก เพราะเรามนุษย์เราเชื่อว่าการมีผิวพรรณที่ดีนั้น จะทำให้ดูดีทั้งภายนอก และภายในในสายตาคนทั่วไป และยังเชื่อว่าการมีผิวพรรณที่ดีนั้นจะส่งผลต่อความสำเร็จในด้านต่าง ๆ มากกว่าผู้ที่มีผิวพรรณเป็นกระหรือเป็นจุดต่างดำอีกด้วย คนเราจึงศึกษาสิ่งต่าง ๆ มากมายเพื่อป้องกันไม่ให้ผิวพรรณเกิดจุดต่างดำ โดยศึกษาสาเหตุของการเกิดจุดต่างดำ โดยการเกิดจุดต่างดำเกิดจากเมลานินซึ่งเอนไซม์ไทโรซิเนสเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เมลานินในเมลาโนไซต์ เกิดการสะสมของจุดต่างดำของผิวหนังที่มากไปนำไปสู่การเป็นโรคผิวหนัง การติดเชื้อจำพวกแบคทีเรียบางชนิดเป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญสาเหตุหนึ่งในปัจจุบัน เนื่องจากปริมาณเชื้อโรคที่ต่อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น และมีผลทำให้โอกาสที่จะรักษาโรคติดเชื้อเหล่านี้ให้หายเป็นไปได้อย่างยิ่งขึ้น จึงได้หันมาสนใจยาสมุนไพรที่สามารถผลิตได้จากพืชที่มีส่วนประกอบของฟลาโวนอยด์ที่สำคัญ อีกทั้งราคาที่ไม่แพง และผลข้างเคียงน้อย ซึ่งมีโอกาสที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่าน้อยกว่าการใช้ยาเคมีสังเคราะห์ (Chanda และคณะ, 2010) โดยมีพืชชนิดหนึ่งที่นำสนใจคือ Spanish cherry (*Mimusops elengi*) เป็นพืชในวงศ์ Sapotaceae มีชื่อสามัญในประเทศไทยคือพิกุล ซึ่งเป็นสมุนไพรโบราณที่มีสรรพคุณได้แก่ ผาตสมาน ชูกำลัง แก้ไข้ และจากงานวิจัยของ Natungnuy และ Poaaim (2018) เรื่องฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบเมทิลแอลกอฮอล์จากพิกุล โดยทำการศึกษาที่กลีบดอก และกลีบเลี้ยง มีการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระแบบต่าง ๆ และการทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งผลที่ได้คือการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระกลีบเลี้ยงมีค่าสูงกว่ากลีบดอก ผู้วิจัยจึงสนใจนำกลีบเลี้ยงมาศึกษาต่อยอดในงานวิจัยนี้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบชั้นเมทิลแอลกอฮอล์
- 2) เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำจากสารสกัดหยาบชั้นเมทิลแอลกอฮอล์จากกลีบเลี้ยงของพิกุล
- 3) เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบชั้นเมทิลแอลกอฮอล์จากกลีบเลี้ยงของพิกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) ทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมทิลแอลกอฮอล์ และสารสกัดจากชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ จากกลีบเลี้ยงของพิภูลด้วยเทคนิค Disc diffusion กับแบคทีเรียต่าง ๆ ดังนี้ *Bacillus subtilis* (ATCC6633), *Staphylococcus aureus* (TISTR1466), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Micrococcus luteus* (ATCC9341), *Propionibacterium acnes* (DMST14916), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) และ *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228)
- 2) ทดสอบฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยเทคนิค DOPA chrome

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิภูลมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย และเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สามารถนำไปใช้ในงานวิจัย และพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมความงาม ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรค เป็นต้น
- 2) สามารถนำเทคนิคหรือความรู้ที่ได้จากการสกัดสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิภูล ไปประยุกต์ใช้กับสารสกัดชนิดอื่น ๆ ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพิกุล

จากงานวิจัยของ Mariyam และคณะ (2015) พิกุล (Spanish cherry) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Mimusops elengi* จัดอยู่ในอันดับ (Order) Ebenales วงศ์ (Family) Sapotaceae มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย พม่า ศรีลังกา ต่อมามีการนำเอาพิกุลมาเพาะปลูกกันทั่วไป รวมถึงประเทศไทยซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในป่าดิบทางภาคใต้ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พิกุลเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูง 8 - 15 เมตร ไม้ผลัดใบ ถ้าต้นยังเล็กหรือมีอายุน้อย เรือนยอดรูปทรงเจดีย์ (รูปที่ 2.1 A) เมื่อต้นมีอายุมากขึ้นจะมีเรือนยอดทรงกลมหรือรูปไข่ ทรงพุ่มหนาทึบ มีน้ำยางสีขาวขุ่นแตกกิ่งก้านในระยะต่ำ โดยพิกุลมีลักษณะทั่วไป (Naresch, 2013) ดังต่อไปนี้

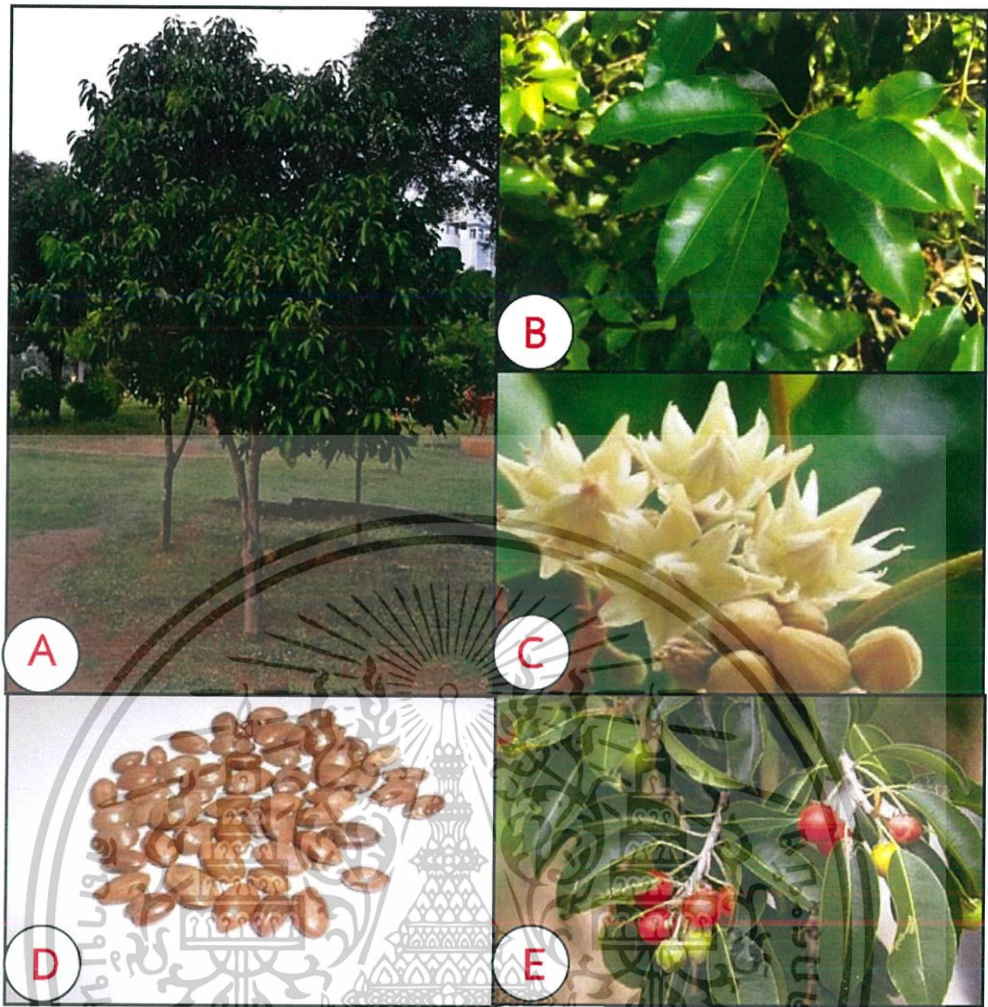
เปลือก เปลือกต้นพิกุลมีสีน้ำตาลอมเทา มีรอยแตกเป็นร่องตามทางยาว และแตกเป็นสะเก็ด ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกเรียงเวียนสลับห่าง ๆ รูปขอบขนานหรือรูปไข่ ปลายใบมนแหลม โคนใบมน ขอบใบเรียบปิดเป็นคลื่น แผ่นใบสีเขียวเข้มเรียบเป็นมัน กว้าง 5 - 8 เซนติเมตร ยาว 8 - 12 เซนติเมตร ก้านใบยาว 1.5 - 2.0 เซนติเมตร (รูปที่ 2.1 B)

ดอก สีขาวนวล ดอกเดี่ยว มีกลีบห่อดอกเดี่ยวหรือรวมเป็นช่อแบบกระจุกตามซอกใบ โคนปลายกิ่งหรือปลายกิ่ง กลีบเลี้ยง 8 กลีบ เรียงซ้อนกัน 2 ชั้น ๆ ละ 4 กลีบ กลีบเลี้ยงชั้นนอกสีเหลืองอมเทา กว้าง 0.3 - 0.4 เซนติเมตร ยาว 0.5 - 0.6 เซนติเมตร รูปขอบขนาน ปลายเรียวแหลม กลีบเลี้ยงชั้นในมีขนาดเล็กกว่า สีขาวนวล กลีบดอก 24 กลีบ เรียงซ้อนกัน 2 ชั้น ๆ นอก 8 กลีบ ชั้นใน 16 กลีบ ขนาดเล็กกว่า กว้าง 0.2 - 0.3 เซนติเมตร ยาว 0.3 - 0.5 เซนติเมตร ในขณะที่บานยังไม่เต็มที่ กลีบดอกชั้นในจะห่อตัวหุ้มกันเป็นรูปกรวยอยู่กลางดอกมีเกสรเพศผู้ 16 อัน ล้อมรอบเกสรเพศเมีย เมื่อดอกบานจะกว้าง 1.0 - 1.3 เซนติเมตร (รูปที่ 2.1 C)

เมล็ด รูปรีหรือรูปไข่ค่อนข้างแบน เปลือกแข็งเป็นมัน สีน้ำตาลเข้มเกือบดำ กว้าง 1.0 - 1.5 เซนติเมตร ยาว 1.5 - 2.0 เซนติเมตร (รูปที่ 2.1 D)

ผล เป็นผลสดแบบมีเนื้อ ผลเดี่ยว รูปทรงกลมหรือรูปไข่ โคนมนปลายแหลม กว้าง 1.0 - 1.5 เซนติเมตร ยาว 2.5 - 3.0 เซนติเมตร ผลอ่อนสีเขียวเข้มผลสุกสีแดงสดหรือสีส้ม เนื้อผลรับประทานได้มีรสฝาดอมหวาน หนึ่งผลมีเมล็ด 1 เมล็ด (รูปที่ 2.1 E)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ลักษณะส่วนต่าง ๆ ของต้นพิทูล (A) ต้น (B) ใบ (C) ดอก (D) เมล็ด (E) ผล
ที่มา: https://www.khaosod.co.th/lifestyle/news_675983

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

เทคนิค Dilution Susceptibility Test หรือการทดสอบ Minimal Inhibitory Concentration (MIC) การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Dilution test จะเป็นการทดสอบในเชิงปริมาณเพราะสามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ทำลายเชื้อได้ นิยมใช้ทดสอบเชื้อเจริญได้ช้า ใช้ทดสอบยืนยันผลวิธี Diffusion ที่ให้ความไวปานกลางหรือดีอย่า เพื่อว่าจะสามารถใช้สารสกัดสมุนไพรนั้นในจำนวนสูง ๆ ได้ และใช้ทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ (Anaerobe) หลักการโดยทั่วไปของวิธีทดสอบแบบ Broth และ Agar dilution susceptibility test จะคล้ายคลึงกัน คือจะเจือจางสารสกัดสมุนไพรในอาหารให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นจึงใส่เชื้อลงในหรือบนอาหารที่มีสมุนไพร ภายหลังจากบ่มให้ดูค่า MIC โดยสังเกตความขุ่นหรือใสของอาหาร และไม่มีเชื้อเจริญ

เทคนิค Disc diffusion method (Kirby-Bauer) เป็นวิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียที่สะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธี Dilution Susceptibility Test วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่า เชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ แต่ไม่อาจทราบค่า MIC หรือ Minimal Lethal Concentration (MLC) ได้ หลักการทั่วไปคือ การทำให้สารสกัดสมุนไพรที่มีในแผ่นกระดาษกรองที่เตรียมไว้ก่อน จุ่มไปในอาหาร เลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อ (Spread) ในจำนวนที่เหมาะสมไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสไม่มีเชื้อรอบ ๆ แผ่นดิสก์ความสามารถในการต้านเชื้อแปรตามขนาดของ Inhibition zone วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบสมุนไพรเพียงความเข้มข้นเดียว (ประสาทร และคณะ, 2551)

Durre และ Muhammad (2009) พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเปลือกของพิกุล มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Micrococcus luteus* มากกว่าสารสกัดเมทิลแอลกอฮอล์ และไดคลอโรมีเทน สารสกัดเอทิลอะซิเตทมีค่า MIC ที่ 0.6 ± 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Milimita และ Sujata (2013) พบว่าสารสกัดเมทิลแอลกอฮอล์จากใบของพิกุลมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีโซนวงใส 28.33 ± 1.52 , 18.66 ± 1.52 , 24.66 ± 1.15 , 14.33 ± 1.52 มิลลิเมตร ตามลำดับ ไกล่เคียงยาปฏิชีวนะเตตระไซคลิน ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม ที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *Ps. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* มีโซนวงใส 31.66 ± 0.57 , 24.66 ± 0.57 , 26.66 ± 1.52 , 23.00 ± 1.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ

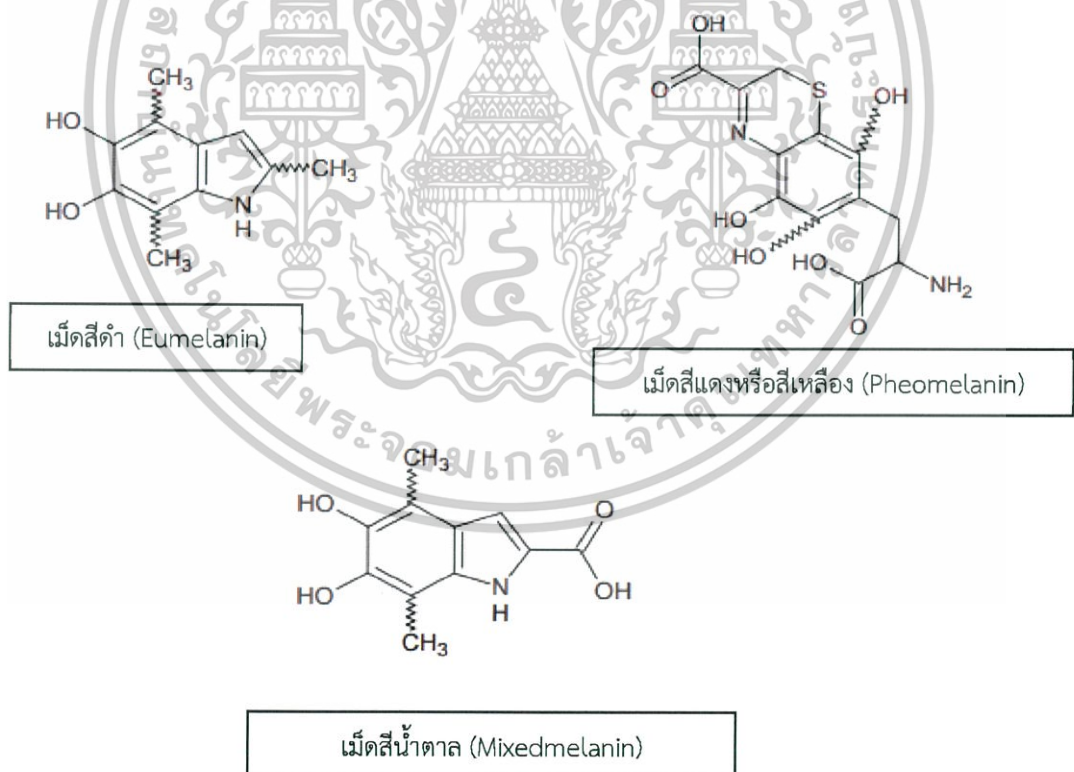
Sircar และ Mandel (2016) พบว่าสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากใบ เมล็ด และเปลือกของพิกุลมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *Ps. aeruginosa* โดยที่สารสกัดจากใบความเข้มข้น 16.25 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีโซนวงใส 13 และ 14 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดจากเมล็ดความเข้มข้น 16.25 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีโซนวงใส 14 และ 17 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดจากเปลือกความเข้มข้น 13 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีโซนวงใส 14 และ 18 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ใกล้เคียงยาปฏิชีวนะเจนต้าไมซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ มีโซนวงใส 18 และ 28 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

2.3.1 กระบวนการสร้างและควบคุมเม็ดสีเมลานิน (Melanogenesis and its regulation)

กระบวนการสร้างเมลานิน (เม็ดสี) ที่เกิดขึ้นที่ผิวหนัง นอกจากจะขึ้นกับจำนวน และขนาดของเซลล์เมลานोไซต์ แล้วยังขึ้นกับองค์ประกอบของเม็ดสีภายในเซลล์ และการกระจายของเซลล์เมลานोไซต์ ซึ่งเมลานोไซต์นี้จะทำหน้าที่สร้างเม็ดสีเมลานินเก็บไว้ในเมลานโซมแล้วส่งต่อไปยังเคราติโนไซต์ที่ชั้นล่างสุดของเอพิเดอร์มิส หรือชั้นหนังกำพวด กระบวนการสร้างเมลานิน เกิดจากแสงแดด หรือรังสียูวีเป็นตัวกระตุ้น ทำให้ไฟโบรบลาสต์หลั่งสารต่าง ๆ ออกมา ได้แก่ ไซโตไคน์ (Cytokines) สารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (Inflammatory factors) โกรทแฟกเตอร์ (Growth factors) รวมถึงการกระตุ้นให้เซลล์เมลานोไซต์สร้างไนตริกออกไซด์มากขึ้น ก่อให้เกิดการสร้างเม็ดสีเมลานินโดยการส่งสัญญาณภายในเซลล์ต่อกันเป็นทอด ๆ ผ่านเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิเดสที่มีคอปเปอร์ (Cu) เป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้างของโปรตีนที่บริเวณเร่ง และทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ดังกล่าว เอนไซม์ไทโรซิเนสสังเคราะห์มาจากไรโบโซมที่พบบนเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดหยาบ เมื่อสังเคราะห์ได้เมลานินจะส่งไปกักเก็บไว้ในเมลานโซม เม็ดสีจากกระบวนการสร้างเม็ดสีมี 3 ชนิด ได้แก่ เม็ดสีดำ (Eumelanin) พบมากในคนเอเชีย และคนที่ผิวคล้ำ เม็ดสีแดงหรือสีเหลือง (Pheomelanin) พบในคนที่ผิวขาว เม็ดสีน้ำตาล (Mixedmelanin) พบในคนที่ผิวคล้ำปานกลางถึงผิวขาว ดังรูปที่ 2.2 (ประไพพิศ, 2561)



รูปที่ 2.2 ลักษณะโครงสร้างโมโนเมอร์ของเม็ดสีดำ เม็ดสีแดงหรือสีเหลือง และเม็ดสีน้ำตาล

ที่มา: http://www.lib.kps.ku.ac.th/SpecialProject/General_Science/Sawitri Ta/chapter2.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเมลานิน ได้แก่ รังสียูวี และพันธุกรรม สำหรับรังสียูวีมีผลต่อการสร้างเมลานิน 2 วิธีคือ 1. รังสียูวีจะกระตุ้นเซลล์เมลานโนไซต์โดยตรงมีผลให้เอนไซม์ไทโรซิเนสถูกกระตุ้นให้ทำงานมากขึ้น และสร้างเม็ดสีเมลานิน ยิ่งมีจำนวนเม็ดสีเมลานินมากยิ่งทำให้มีสีผิวเข้มขึ้น 2. รังสียูวีจะไปกระตุ้นเซลล์เคราติโนไซต์ก่อให้เกิดการควบคุมการส่งสัญญาณแบบพาราไครน์ (Paracrine regulation process) ทำให้เซลล์เคราติโนไซต์หลั่งสารหลายชนิดออกมา ได้แก่ โพรสตาแกลนดินอี 2 (Prostaglandin E2) ฮอร์โมนเมลานโนไซต์สติมูเลติง (α -melanocyte stimulating hormone) หรือ α -MSH ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่หลั่งมาจากต่อมใต้สมองส่วนกลางสร้างมาจากเซลล์เมลานโนไซต์ ฮอร์โมนชนิดนี้จะไปกระตุ้นการสร้างเมลานินผ่าน cyclic AMP (cAMP) ซึ่งไปกระตุ้นให้โปรตีนไคเนส เอ (Protein kinase A) เร่งปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชัน มีผลทำให้ยีน Microphthalmia associated transcription factor (mitf gene) ซึ่งเป็นหน่วยพันธุกรรมที่ควบคุมเซลล์เมลานโนไซต์ให้ทำงาน ทำให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ สร้างเมลานิน และควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์ รวมถึงควบคุมการจำลองแบบดีเอ็นเอของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเมลานิน ได้แก่ ไทโรซิเนส, TRP-1 และ TRP-2 เป็นต้น ในอีกทางหนึ่งเซลล์เมลานโนไซต์จัดเป็น Phagocytic cell ซึ่งจะตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบที่ผิวหนัง กระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ Interleukin-1 มีผลกระตุ้น MSH receptor ทำให้มีการสร้างเมลานินมากขึ้น เช่นเดียวกับ ACTH ยังมีผลไปกระตุ้นไนตริกออกไซด์ ซึ่งจะไปเร่งการทำงานของ α -MSH ดังรูปที่ 2.3 (ประไพพิศ, 2561)



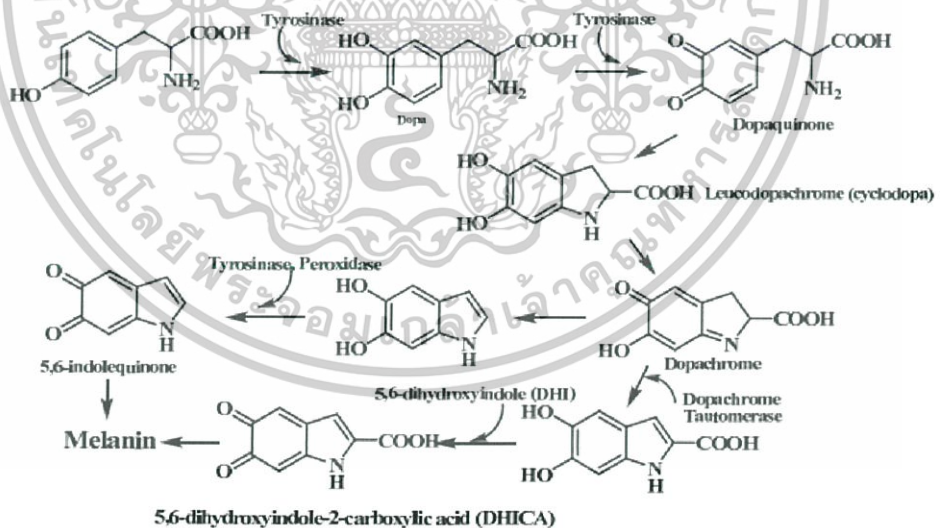
รูปที่ 2.3 กลไกการสร้างเม็ดสี

ที่มา: http://www.lib.kps.ku.ac.th/SpecialProject/General_Science/2550/Bs/SawitriTa/chapter2.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 เอนไซม์ไทโรซิเนส

ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ของสารประกอบฟีนอล (Phenolic compound) โดยทั่วไปเอนไซม์ไทโรซิเนสจะพบในเนื้อเยื่อสัตว์ และพืช ถูกสังเคราะห์ขึ้นใน Rough Endoplasmic Reticulum ภายในโครงสร้างของเอนไซม์มีทองแดง (Cu) ซึ่งมีหน้าที่ในการทำงานร่วมกับออกซิเจนเพื่อเร่งให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น โดยเอนไซม์ไทโรซิเนสจะทำหน้าที่ในการย่อยสลาย 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)-L-alanine หรือ L-DOPA (รูปที่ 2.4) ให้กลายเป็นเมลานิน ซึ่งเป็นเม็ดสีที่สร้างจากเซลล์ผิวหนังซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดการหมองคล้ำ กลไกการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในการย่อยสลาย L-DOPA ให้กลายเป็นเมลานิน (สุชาติ, 2554) สารที่มีฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสส่วนมากมักเป็นสารประเภทฟีนอลิกซึ่งมีความสามารถเป็น chelating agent โดยจะเข้าไปจับกับทองแดงซึ่งทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ในโมเลกุลของเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ตามปกติ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด วิธี DOPA chrome โดยใช้ L-DOPA เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์ไทโรซิเนสจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็นสารประกอบโดปาควิโนน (Dopaquinone) และถูกเปลี่ยนเป็นโดปาโครม (DOPA chrome) ซึ่งมีสีส้มแดง สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ดังนั้นเมื่อมีสารในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส จะส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์สารโดปาโครมในปริมาณที่ลดลง แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติในการต้านการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารที่ใช้ในการทดสอบ (Ribeiro และคณะ, 2015)



รูปที่ 2.4 กลไกการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในการย่อยสลาย L-DOPA ให้กลายเป็นเมลานิน

ที่มา: http://www.lib.kps.ku.ac.th/SpecialProject/General_Science/2550/Bs/SawitriTa/chapter2.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Narayanaswamy และคณะ (2011) ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพร (เปลือกไม้ ดอก ผล และใบ) ในตัวทำละลายชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์ เมทิลแอลกอฮอล์ และน้ำ จากส่วนทั้งหมดที่สกัดโดยเมทิลแอลกอฮอล์ พบว่าส่วนดอกของพืชสมุนไพรต้านอนุมูลอิสระที่ 89.85 เปอร์เซ็นต์ ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระที่ 50 เป็น 401 ไมโครกรัม ซึ่งมีค่ามากกว่าสารสกัดจากเปลือกไม้ ดอก ผล และใบที่สกัดโดยปิโตรเลียมอีเทอร์ที่แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 23 ถึง 33 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดชั้นน้ำจากใบที่แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 70.46



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างดอกของพิกุลจากจังหวัดราชบุรี ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม นำมาอบแห้ง และเก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำในห้องภายในถุงซิปล็อกป้องกันความชื้น นำมาแยกกลีบเลี้ยงออกจากกลีบดอก และอบแห้งก่อนนำไปสกัดสารสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเมทิลแอลกอฮอล์

3.2 ตัวอย่างสารสกัด

ตัวอย่างสารสกัดจากตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ จากการสกัดสารสกัดหยาบชั้นเมทิลแอลกอฮอล์ ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย

3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 ปากคีบ (Forceps)
- 3.3.2 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
- 3.3.3 ช้อนตักสาร (Spatula)
- 3.3.4 บีกเกอร์ (Beaker)
- 3.3.5 ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes)
- 3.3.6 หลอดทดลอง (Eppendorf tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.3.7 ที่ใส่หลอดทดลอง (Rack) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.3.8 ตู้ดูดควัน (Fume hood)
- 3.3.9 ตู้บ่ม (Incubator)
- 3.3.10 เครื่องทำความร้อน (Heat block)
- 3.3.11 ตู้เย็น (Refrigerator)
- 3.3.12 กระดาษทิชชู (Tissue)
- 3.3.13 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
- 3.3.14 คิวเวตควอตซ์ (Quartz Semi-Cuvette)
- 3.3.15 เครื่องชั่งสาร (Balance) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง และกระดาษชั่งสาร
- 3.3.16 ฟลาสก์ (Flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร
- 3.3.17 ไมโครเวฟ (Microwave Oven)
- 3.3.18 คอมพิวเตอร์ (Computer)
- 3.3.19 เครื่องผสมสาร (Vortex)
- 3.3.20 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (Spin down centrifuge)
- 3.3.21 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือนำไปใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.22 ขวดดูแรน (Duran)
- 3.3.23 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave)
- 3.3.24 ไมโครโทเทอร์เพลท (96-Well plate)
- 3.3.25 เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate Reader) รุ่น FLUOstar omega
- 3.3.26 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)
- 3.3.27 ผ้าขาวบาง
- 3.3.28 ขวดกาแฟ และขวดสีชา
- 3.3.29 Rotary flask
- 3.3.30 Receiving flask
- 3.3.31 ขวดยาหม่อง
- 3.3.32 อลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil)
- 3.3.33 โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 3.3.34 ซิลิกาเจล (Silica gel)
- 3.3.35 เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum pump)
- 3.3.36 กรวยกรองบุชเนอร์ (Buchner funnel)
- 3.3.37 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
- 3.3.38 กระบอกตวงขนาดต่าง ๆ
- 3.3.39 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
- 3.3.40 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- 3.3.41 เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลม (Loop)
- 3.3.42 ทิป (Micropipette tips) ขนาดต่าง ๆ

3.4 สารเคมี

- 3.4.1 เมทิลแอลกอฮอล์
- 3.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย
 - 3.4.2.1 Nutrient broth (NB)
 - 3.4.2.2 Brain Heart Infusion (BHI)
 - 3.4.2.3 Mueller Hinton broth (MHB)
 - 3.4.2.4 วัุ้น (Agar)
 - 3.4.2.5 น้ำเกลือร้อยละ 0.85
- 3.4.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส
 - 3.4.3.1 กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)
 - 3.4.3.2 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer)
 - 3.4.3.3 เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase enzyme)
 - 3.4.3.4 L-DOPA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 7 สายพันธุ์ แบ่งเป็นแกรมบวก 5 สายพันธุ์ และแกรมลบ มี 2 สายพันธุ์ดังนี้

แบคทีเรียแกรมบวก

Bacillus subtilis (ATCC6633)

Micrococcus luteus (ATCC9341)

Staphylococcus aureus (TISTR1466)

Staphylococcus epidermidis (ATCC12228)

Propionibacterium acnes (DMST14916)

แบคทีเรียแกรมลบ

Escherichia coli (ATCC25922)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC27853)

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 สารสกัดหยาบเมทิลแอลกอฮอล์

สกัดด้วยเทคนิค maceration ดัดแปลงจาก Hossain และคณะ (2014) โดยนำกลีบเลี้ยงของพิกุลที่อบเสร็จแล้ว มาบดให้ละเอียด ซึ่งน้ำหนักแบ่งใส่ผ้าขาวบาง มัดใส่ในขวดกาแพที่เติมเมทิลแอลกอฮอล์ เขย่าทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 วัน เก็บสารสกัดทั้งหมด 3 ครั้ง นำไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศโดยใช้ที่กรองบุชเนอร์ที่มีกระดาษกรอง whatman No.1 นำสารละลายเมทิลแอลกอฮอล์ที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนเหลือเมทิลแอลกอฮอล์น้อยที่สุดแล้ว นำมาใส่ขวดยาหม่องที่มีการฆ่าเชื้อ ซึ่งน้ำหนักขวดแล้วห่ออลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสง และเก็บไว้ในโถดูดความชื้นเพื่อให้สารสกัดเมทิลแอลกอฮอล์แห้ง

3.6.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

3.6.2.1 การเตรียมแบคทีเรียที่จะทำการทดสอบ

เตรียมอาหารในปริมาณที่ต้องการโดยเตรียม Nutrient Agar และ Brain Heart Infusion (ดัดแปลงจาก Gilchrist, 1900) เพื่อมากระตุ้นเชื้อแบคทีเรียให้พร้อมทำงานจากการเก็บไว้ในสต็อก จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *Bacillus subtilis* (ATCC6633), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Micrococcus luteus* (ATCC9341), *Staphylococcus aureus* (TISTR1466), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228) และ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) จากสต็อกมาลงในอาหารด้วยวิธีเขี่ยเชื้อแบบ streak plate ลงบนอาหาร NA นำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วน *Propionibacterium acnes* (DMST14916) จะเขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร BHI broth บ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องสุญญากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงไป BHI agar และนำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องสุญญากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้เป็นเชื้อแบคทีเรียแบบโคโลนีเดี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ซึ่งงานเพื่อการศึกษาด้านนี้ เมื่อผู้ใดเห็นนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2.2 การเตรียมดิสก์ของสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

เตรียมสารสกัดแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้น 500, 250, 125 และ 62.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายของสารสกัดนั้น ๆ (เฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล เมทิลแอลกอฮอล์ และน้ำ) เตรียมตัวควบคุมเชิงลบเป็นตัวทำละลายของสารสกัดนั้น ๆ (ดัดแปลงจาก Arya, 2011) และตัวควบคุมเชิงบวกเป็นยาปฏิชีวนะเจนต้าไมซินที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยหยดในแต่ละดิสก์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อดิสก์ วางทิ้งไว้จนกว่าดิสก์จะแห้งเพื่อให้สารสกัด ตัวทำละลาย และยาปฏิชีวนะซึมเข้าไปในดิสก์ จากนั้นเก็บไว้ในงานเพาะเชื้อเพื่อเตรียมใช้ทดสอบ

3.6.2.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

ทดสอบด้วยเทคนิค Disc diffusion ที่ดัดแปลงจาก CLSI2011 (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement) โดยทำการนำเชื้อแบคทีเรียมาทำเซลล์แขวนลอย โดยใช้ลูปเปียโคโลนีเดียวมาเจือจางในน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้ได้ค่าอยู่ที่ 0.08 – 0.13 จากนั้นนำไม้ปั่นสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำมาชุบสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เจือจางไว้ นำมา swab plate ลงบนอาหาร MHA ให้ทั่วผิวน้ำอาหาร จากนั้นนำดิสก์ที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้ว มาวางลงในงานเพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบดังรูปที่ 3.1 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทั้งการทดลองทำ 3 ชุด ตรวจสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียด้วยการวัดบริเวณการต้านแบคทีเรียในหน่วยมิลลิเมตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับอาจารย์และบุคลากรในหน่วยงานที่สังกัดเท่านั้น ไม่สามารถเผยแพร่สู่สาธารณะได้
รูปที่ 3.1 วิธีการวางดิสก์ลงในงานเพาะเชื้อเพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

ทดสอบด้วยเทคนิค DOPA chrome ที่ดัดแปลงมาจาก Toshiya และคณะ (2005) โดยกำหนดในแต่ละหลุมของไมโครไทเทอร์เพลทจะเติมสารสกัดในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบสที่ 6.8 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมจากการเจือจางเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 2,687 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงใส่ L-DOPA ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยตัวควบคุมจะไม่ได้สารสกัด Blank จะไม่ได้สารสกัด และเอนไซม์ไทโรซิเนส Blank ของตัวอย่างจะไม่ได้เอนไซม์ไทโรซิเนส ตามตารางที่ 3.1 และกราฟมาตรฐานสร้างจากกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 300, 250, 200, 150, 100 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการคำนวณหาค่าร้อยละการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสูตรดังนี้

ร้อยละการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

$$\% \text{การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส} = \frac{(\text{Control} - \text{Blank control}) - (\text{Sample} - \text{Blank sample})}{(\text{Control} - \text{Blank control})} \times 100$$

เมื่อ Control = ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ของตัวควบคุม

Sample = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ของตัวอย่าง

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารที่ใส่ในไมโครไทเทอร์เพลทในการทดสอบการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (ดัดแปลงมาจาก Toshiya และคณะ, 2005)

ชุดทดสอบ	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ไมโครลิตร)	สารสกัด หรือสารมาตรฐาน (ไมโครลิตร)	เอนไซม์ไทโรซิเนส (ไมโครลิตร)
1 Control	140	-	20
2 Blank control	160	-	-
3 Sample	80	60	20
4 Blank sample	100	60	-

หมายเหตุ : (-) คือส่วนที่ไม่ได้ใส่สารต่าง ๆ ลงไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการสกัดสารหยาบจากกลีบเลี้ยงของพิกล

จากการนำกลีบเลี้ยงที่แยกจากกลีบดอกของพิกลมาบดละเอียดมาสกัดด้วยตัวทำละลาย เมทิลแอลกอฮอล์โดยมีอัตราส่วน 20 กรัมต่อตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรทั้งหมด 1,350 มิลลิลิตร และทำให้เข้มข้นโดยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาบชั้น เมทิลแอลกอฮอล์จากกลีบเลี้ยงของพิกลพิกลเป็นจำนวน 91.89 กรัม โดยผลที่ได้คิดเป็นร้อยละ 6.8 ซึ่งสามารถคำนวณได้จากการนำปริมาณสุดท้ายหารด้วยปริมาตรตั้งต้นคูณหนึ่งร้อย $(91.89/1350) \times 100$ และยังได้รับการอนุเคราะห์สารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และ น้ำ เป็นจำนวน 2.44, 1.89, 2.13 และ 5.39 กรัม ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดตัวทำละลายแต่ละชั้นมี ลักษณะสีแตกต่างกัน โดยสารสกัดหยาบเมทิลแอลกอฮอล์จะมีสีเหลืองเข้ม และหนืด สารสกัด เฮกเซนมีสีน้ำตาลอ่อน และหนืด สารสกัดเอทิลอะซิเตทมีสีน้ำตาลเข้ม และหนืด สารสกัดบิวทานอลมี สีน้ำตาล และสารสกัดชั้นน้ำมีสีน้ำตาลอ่อน แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะของสารสกัด และผลได้ของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกล

ตัวทำละลาย	ลักษณะของสารสกัด	สารสกัดที่ได้ (กรัม)	ร้อยละผลได้
เมทิลแอลกอฮอล์	สีเหลืองเข้ม และหนืด	91.89	6.8
เฮกเซน	สีน้ำตาลอ่อน และหนืด	2.44	
เอทิลอะซิเตท	สีน้ำตาลเข้ม และหนืด	1.89	ได้รับการอนุเคราะห์จาก
บิวทานอล	สีน้ำตาล	2.13	รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
น้ำ	สีน้ำตาลอ่อน	5.39	

4.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

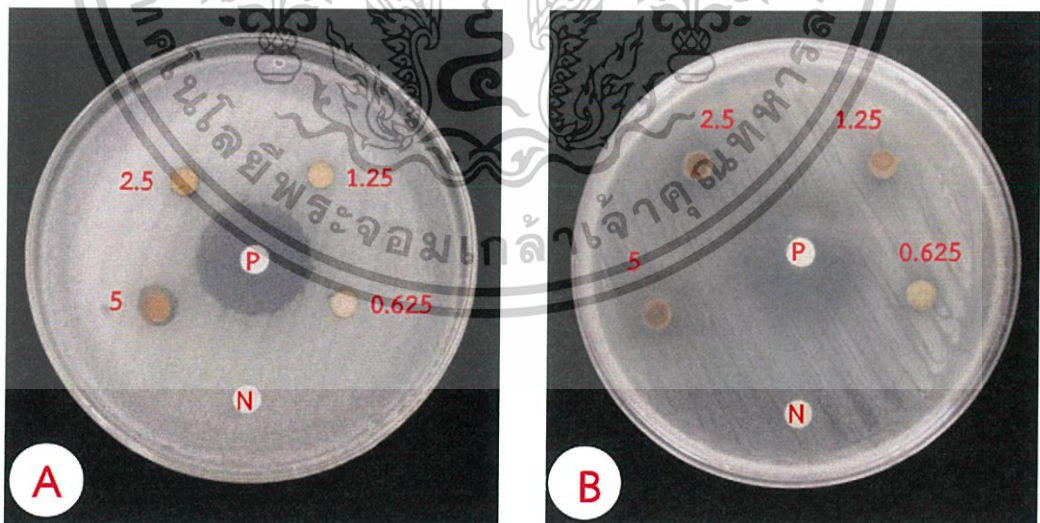
4.2.1 ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมทิลแอลกอฮอล์จากกลีบเลี้ยงของพิกล

ผลจากการทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion โดยสารสกัดหยาบ เมทิลแอลกอฮอล์จากกลีบเลี้ยงของพิกลที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์ และมียาปฏิชีวนะเจนตาไมซิน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และ เมทิลแอลกอฮอล์ เป็นตัวควบคุมเชิงลบ โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 7 ชนิดในการทดสอบ ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* ที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าสารสกัดในชั้นเมทิลแอลกอฮอล์ มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *B. subtilis* (รูปที่ 4.1 A) และ *M. luteus* ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีบริเวณต้านแบคทีเรียเป็น 8.77 ± 0.08 และ 8.65 ± 0.14 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ *Pr. acnes* (รูปที่ 4.1 B) ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีบริเวณต้านแบคทีเรียเป็น 12.50 ± 0.49 , 9.69 ± 0.25 , 8.65 ± 0.50 และ 6.95 ± 0.30 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมทิลแอลกอฮอล์จาก กลีบเลี้ยงของพิกุล

เชื้อแบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณต้านแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)				
	เจนน้าไมซิน 10 ไมโครกรัม ต่อดิสก์	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อดิสก์)			
		0.625	1.25	2.50	5.00
<i>Bacillus subtilis</i>	23.91±0.46	-	-	-	8.77±0.08
<i>Micrococcus luteus</i>	36.80±1.92	-	-	-	8.65±0.14
<i>Staphylococcus aureus</i>	27.20±0.27	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	28.96±1.03	-	-	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	30.58±1.06	6.95±0.30	8.65±0.50	9.69±0.25	12.50±0.49
<i>Escherichia coli</i>	22.11±0.30	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20.12±0.72	-	-	-	-

หมายเหตุ : 1. ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณต้านแบคทีเรียแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
2. (-) คือไม่มีบริเวณที่ต้านแบคทีเรีย



รูปที่ 4.1 บริเวณต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุลด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ต่อเชื้อแบคทีเรีย (A) *Bacillus subtilis* (B) *Propionibacterium acnes*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบุคลากรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
หมายเหตุ : P คือ เจนน้าไมซิน N คือ เอทิลแอลกอฮอล์
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ จากกลีบเลี้ยงของพิกุล

จากตารางที่ 4.2 พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเมทิลแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*, *M. luteus* และ *Pr. acnes* จึงนำมาศึกษาเพิ่มเติม โดยทำการสกัดด้วยตัวทำละลายในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ ด้วยวิธี partition จากสารสกัดหยาบเมทิลแอลกอฮอล์ และใช้วิธีทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียเช่นเดียวกันกับสารละลายเมทิลแอลกอฮอล์ แต่ใช้ตัวควบคุมเชิงลบเป็นสารละลายตัวนั้น ๆ พบว่าสารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* (รูปที่ 4.3 A) ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิस्क มีบริเวณต้านแบคทีเรียเป็น 8.72 ± 0.10 , 8.34 ± 0.11 , 7.57 ± 0.05 และ 7.12 ± 0.02 มิลลิเมตร ตามลำดับ และยังมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อดิस्क มีบริเวณต้านแบคทีเรียเป็น 8.31 ± 0.24 และ 7.31 ± 0.32 มิลลิเมตร ตามลำดับ รวมถึงมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Pr. acnes* (รูปที่ 4.3 B) ที่ความเข้มข้น 5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อดิस्क มีบริเวณต้านแบคทีเรียเป็น 8.91 ± 0.36 และ 8.31 ± 0.22 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่สารสกัดในชั้นเฮกเซนที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Pr. acnes* (รูปที่ 4.2) ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิस्क มีบริเวณต้านแบคทีเรียเป็น 8.60 ± 0.04 , 7.83 ± 0.17 , 7.44 ± 0.27 และ 7.10 ± 0.23 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดในชั้นบิวทานอลมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อดิस्क มีบริเวณต้านแบคทีเรียเป็น 7.16 ± 0.06 มิลลิเมตร และสารสกัดในชั้นน้ำไม่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย แสดงดังตารางที่ 4.3

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมทิลแอลกอฮอล์ และสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ จากกลีบเลี้ยงของพิกุล เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับพบว่าสารสกัดชั้นเมทิลแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Pr. acnes* ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดชั้นเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท แต่สารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทต้องมีความเข้มข้นที่สูง รวมถึงสารสกัดชั้นเมทิลแอลกอฮอล์ยังมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *S. aureus* อีกด้วย

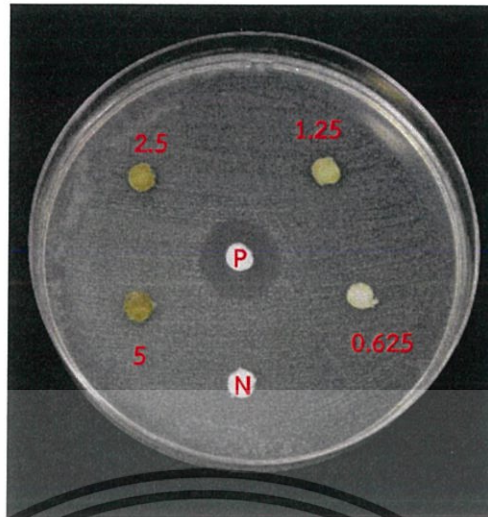
จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิดของสารสกัดหยาบชั้นเมทิลแอลกอฮอล์จากกลีบเลี้ยงของพิกุลมีฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*, *M. luteus* และ *Pr. acnes* ที่ 5 มิลลิกรัมต่อดิस्क ซึ่งไม่ตรงกับงานวิจัยของ Sircar และ Mandel (2016) ที่ตรวจพบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *Ps. aeruginosa* จากสารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์สารสกัดจากใบ เปลือก และเมล็ด และในงานวิจัยของ Milimita และ Sujata (2013) พบว่าสารสกัดเมทิลแอลกอฮอล์จากใบของพิกุลมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* และ *Ps. aeruginosa* ที่ 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีโซนวงใส 24.66 ± 1.15 , 14.33 ± 1.52 , 28.33 ± 1.52 และ 18.66 ± 1.52 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่จากงานวิจัยของ Durre และ Muhammad (2009) พบว่าสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทจากเปลือกของพิกุลมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *M. luteus* เช่นเดียวกับกับผลการทดสอบในชั้นเมทิลแอลกอฮอล์จากกลีบเลี้ยงของพิกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณด้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพืชในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์

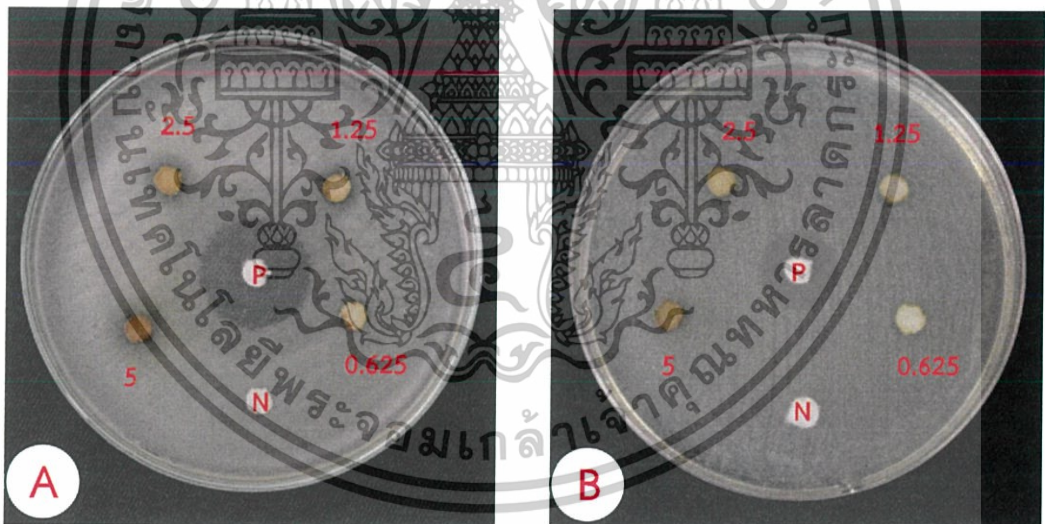
ตัวทำละลาย	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ ดิสก์)	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณด้านแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)							
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
เฮกเซน	0.625	-	-	-	-	-	7.10±0.23	-	-
	1.250	-	-	-	-	-	7.44±0.27	-	-
	2.500	-	-	-	-	-	7.83±0.17	-	-
	5.000	-	-	-	-	-	8.60±0.04	-	-
เอทิลอะซิเตท	0.625	7.12±0.02	-	-	-	-	-	-	-
	1.250	7.57±0.05	-	-	-	-	-	-	-
	2.500	8.34±0.11	-	7.31±0.32	-	-	8.31±0.22	-	-
	5.000	8.72±0.10	-	8.31±0.24	-	-	8.91±0.36	-	-
บิวทานอล	0.625	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.250	-	-	-	-	-	-	-	-
	2.500	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.000	7.16±0.06	-	-	-	-	-	-	-
น้ำ	0.625	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.250	-	-	-	-	-	-	-	-
	2.500	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.000	-	-	-	-	-	-	-	-
ยาปฏิชีวนะ เงินตำไมซิน	10 ไมโครกรัม ต่อดิสก์	26.37±2.36	32.81±1.97	29.47±0.79	26.27±1.30	19.21±3.57	28.36±1.40	23.67±1.07	

หมายเหตุ : 1. ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณด้านแบคทีเรียแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
2. (-) คือไม่มีบริเวณที่ด้านแบคทีเรีย



รูปที่ 4.2 บริเวณต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุลด้วยเฮกเซน ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes*

หมายเหตุ : P คือ เจนต้าไมซิน N คือ เฮกเซน



รูปที่ 4.3 บริเวณต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุลด้วยเอทิลอะซิเตท ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ต่อเชื้อแบคทีเรีย (A) *Bacillus subtilis* (B) *Propionibacterium acnes*

หมายเหตุ : P คือ เจนต้าไมซิน N คือ เอทิลอะซิเตท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากกลีบเลี้ยงของพิกุล

ผลจากการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DOPA chrome โดยสารสกัดหยาบจากกลีบเลี้ยงของพิกุลในชั้นเมทิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีสารมาตรฐานเป็นกรดแอสคอร์บิก ที่มีความเข้มข้น 300, 250, 200, 150, 100 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวเปรียบเทียบค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 โดยใช้ L-DOPA ที่มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ เป็นสารตั้งต้น พบว่าสารสกัดหยาบจากกลีบเลี้ยงของพิกุลในชั้นเมทิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระที่ 19.03 ± 5.51 แสดงในตารางที่ 4.4 และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิกที่มีการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 50 มีค่าเป็น 165.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งคำนวณจากการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกที่ 300, 250, 200, 150, 100 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของกรดแอสคอร์บิกที่ 92.42 ± 0.10 , 77.54 ± 3.79 , 60.25 ± 1.84 , 43.82 ± 1.40 , 29.19 ± 2.15 และ 15.29 ± 0.47 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.5 จะได้สมการเส้นตรงของกรดแอสคอร์บิก $Y = 0.3126X - 1.628$ โดย Y เป็นร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ และ X เป็นความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก ดังรูปที่ 4.4 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันพบว่าสารสกัดชั้นเมทิลแอลกอฮอล์จากกลีบเลี้ยงของพิกุล 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเทียบเท่ากับกรดแอสคอร์บิก 66.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.4 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเมทิลแอลกอฮอล์จากกลีบเลี้ยงของพิกุล

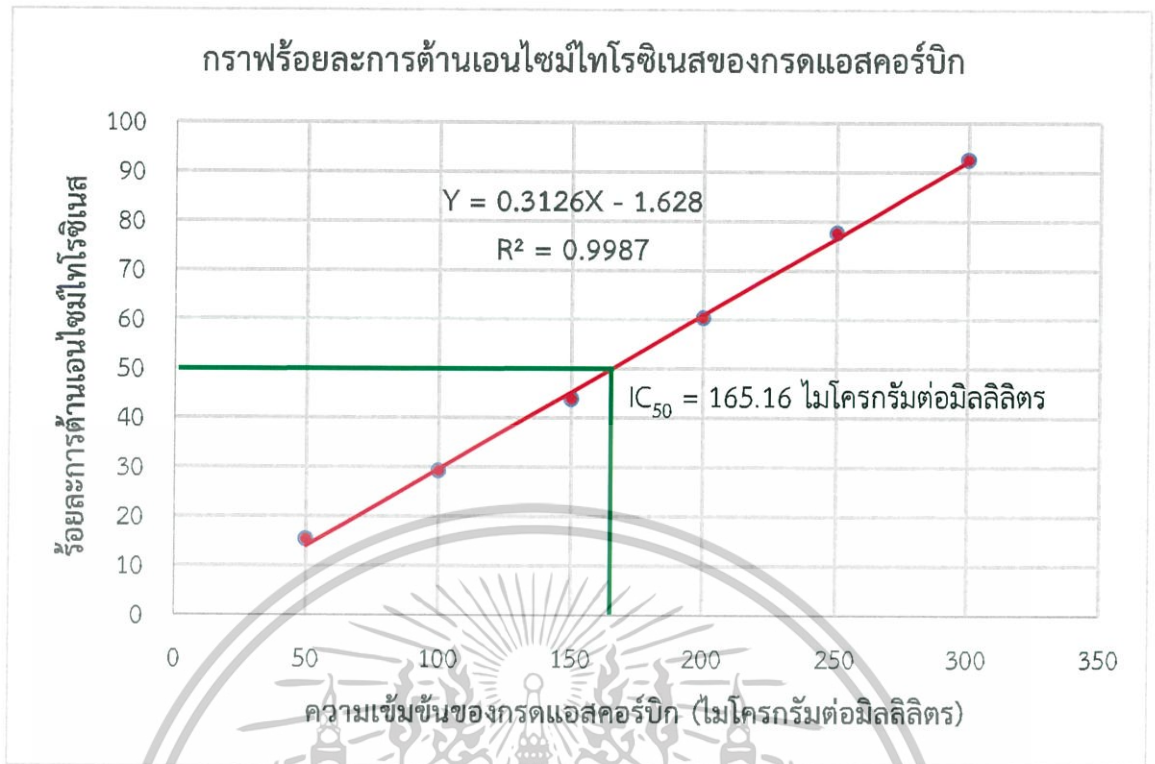
สารสกัด	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			เฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
รอบที่ 1	23.91	15.18	16.00	19.03±5.51
รอบที่ 2	26.57	12.28	20.23	

หมายเหตุ : ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 4.5 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของกรดแอสคอร์บิก

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของกรดแอสคอร์บิก
50	15.29±0.47
100	29.19±2.15
150	43.82±1.40
200	60.25±1.84
250	77.54±3.79
300	92.42±0.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 หมายเหตุ : ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.4 ร้อยละการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของกรดแอสคอร์บิก

หมายเหตุ : Y คือ ร้อยละการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส
 X คือ ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
 R^2 คือ สัมประสิทธิ์การกำหนด
 IC_{50} คือ ความเข้มข้นที่สามารถต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบชั้นเมทิลแอลกอฮอล์จากกลีบเลี้ยงของพิกุล พบว่าที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ร้อยละ 19.03 ซึ่งน้อยกว่างานวิจัยของ Narayanaswamy และคณะ (2011) ที่พบว่าสารสกัดชั้นเมทิลแอลกอฮอล์จากดอกของพิกุลมีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดถึงร้อยละ 89.85 และที่ร้อยละ 50 มีความเข้มข้นถึง 401 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับงานวิจัยนี้แล้วพบว่าวิธีการสกัดสารของ Narayanaswamy และคณะ (2011) มีประสิทธิภาพในการสกัดสารชั้นเมทิลแอลกอฮอล์ได้ดีกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการทดลองการสกัดสารสกัดหยาบเมทิลแอลกอฮอล์จากกลีบเลี้ยงของพิกุล โดยได้ผลจากการบดกลีบเลี้ยงของพิกุล 1,350 กรัม นำมาทำเป็นสารสกัดหยาบจากเมทิลแอลกอฮอล์ได้จำนวน 91.84 กรัม คิดเป็นผลได้ร้อยละ 6.8 และนำมาทำการทดสอบฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

ในการทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบชั้นเมทิลแอลกอฮอล์ จากกลีบเลี้ยงของพิกุล ที่มีความเข้มข้นที่ 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์ โดยมียาปฏิชีวนะเจนต้าไมซิน ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และเมทิลแอลกอฮอล์เป็นตัวควบคุมเชิงลบ โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 7 ชนิดในการทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes* และ *Micrococcus luteus* พบว่าสารสกัดในชั้นเมทิลแอลกอฮอล์ มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *B. subtilis*, *M. luteus* และ *Pr. acnes* ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ โดยเฉพาะ *Pr. acnes* มีบริเวณการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุดเป็น 12.50 ± 0.49 มิลลิเมตร จึงนำมาศึกษาต่อโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ แต่ใช้ตัวควบคุมเชิงลบเป็นสารละลายตัวนั้น ๆ พบว่าสารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตทสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*, *S. aureus* และ *Pr. acnes* ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ และสารสกัดในชั้นเฮกเซนมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Pr. acnes* ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ แต่สารสกัดชั้นเฮกเซน และชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Pr. acnes* น้อยกว่าสารสกัดหยาบเมทิลแอลกอฮอล์

ในการทดสอบฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบชั้นเมทิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 300, 250, 200, 150, 100 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเมทิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 19.03 ซึ่งมีฤทธิ์น้อยมากเมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิก ที่มีค่าการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 165.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าเทียบเท่ากับกรดแอสคอร์บิก 66.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. นำดอกพิกุลไปวิเคราะห์สารประกอบภายในด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หรือ Gas Chromatography (GC)
2. นำดอกพิกุลไปศึกษาด้วยตัวทำละลายที่มากขึ้น เช่น ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอลกอฮอล์ และ

ปิโตรเลียมอีเทอร์
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- ประสาทร บิริสุทธิเพ็ชร และสาธร พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. “การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของ สมุนไพรในท้องปฏิบัติการณ์” *วารสารสัตว์แพทย์ทางเลือกวันนี้* 9(1) : 91-101.
- ประไพพิศ อินเสน. 2561. “การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินจากพืชกลุ่มเบอร์รี่ไทย” *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย* 12(2) : 69-81.
- สุชาติา จันทรพรหมมา. 2554. “การสังเคราะห์ และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารอนุพันธ์ Chalcones และ Bischalcones” *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์* 6(1) : 71-86.
- Arya, P.G. 2011. “Taxonomy, Ethnobotany and Antimicrobial Activity of *Alstonia scholaris* L. *Carissa carandas* L. and *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.” *International Journal of Biotechnology and Biosciences* 2(6) : 102-112.
- Chanda, S., Baravalia, Y., Kaneria, M. and Rakholiya, K. 2010. **Fruit and Vegetable Peels-Strong Natural Source of Antimicrobics.** Badajoz. : Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.
- Durre, S. and Muhammad, A.R. 2009. “In Vitro Antibacterial Activity of Extracts of *Mimusops elengi* Against Gram Positive and Gram Negative Bacteria.” *African Journal of Microbiology Research* 3(8) : 458-462.
- Franklin, R., Matthew, A., Bush, K., Dudley, M.N., Eliopoulos, G.M., Hardy, D.J., Hecht, DW., Hindler, J.A., Patel, J.B., Powell, M., Thomson, R.B., Turnidge, J.D., Weinstein, M.P., Zimmer, B.L., Ferraro, M.J. and Swenson, J.M. 2011. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty - First Informational Supplement.** Wayne. : Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Gilchrist, T.C. 1900. “A Bacteriological and Microscopical Study of Over 300 Vesicular and Pustular Lesions of the Skin, with a Research Upon the Etiology of *Acne vulgaris*.” *Johns Hopkins Hospital Report* 9(7) : 409-430.
- Hossain, M.A., Akhtar, S. and Said, S. 2014. “Evaluation of Different Extraction Methods on Antimicrobial Potency of *Adenium Obesum* Stem Against Food Borne Pathogenic Bacterial Strains in Oman.” *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4(2) : 985-989.
- Mariyam, R., Begum, W. Majeedi, S.F. and Saiyed, A. 2015. “A Review on Traditional Uses and Phytochemical Properties of *Mimusops elengi* Linn.” *International Journal of Herbal Medicine* 2(6) : 20-23.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Milimita, P. and Sujata, M. 2013. "Evaluation of Antibacterial Potential of Leaf Extracts of *Mimusops elengi*." *International Journal of Biological Sciences* 2(7) : 46-49.
- Narayanaswamy, N., Rohini, S., Duraisamy, A. and Balakrishnan K.P. 2011. "Antityrosinase and Antioxidant Activities of Various Parts of *Mimusops elengi* : A Comparative Study." *International Journal of Research in Cosmetic Science* 1(1) : 17-22.
- Naresh, K. 2013. "*Mimusops elengi* Linn. (Bakul) - A Potential Medicinal Plant: a Review." *Pharmaceutical and Phytopharmacological Research* 2(5) : 332-339.
- Natungnuy, K. and Poeaim, S. 2018. "Antioxidant and Cytotoxic Activities of Methanolic Extracts from *Mimusops elengi* Flowers." *International Journal of Agricultural Technology* 14(5) : 731-740.
- Ribeiro, A.S., Estanqueiro, M., Oliveira, M.B. and Lobo, J.M.S., 2015. "Main Benefits and Applicability of Plant Extracts in Skin Care Products." *Cosmetics* 2(1) : 48-65.
- Sircar, B. and Mandal, S. 2016. "Antibacterial Activity of *Mimusops elengi* Leaf, Seed and Bark Extracts Alone and In Combination with Antibiotics Against Human Pathogenic Bacteria." *Translational Medicine* 6(4) : 187-191.
- Toshiya, M., Daiki, Y., Yoshio, T. and Shigetomo, T. 2005 "Screening for Tyrosinase Inhibitors Among Extracts of Seashore Plants and Identification of Potent Inhibitors from *Garcinia subelliptica*." *Biosci, Biotechnol and Biochem.* 69(1) : 197-201.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) จากอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปสำหรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

 ซึ่งอาหารสำเร็จรูป 13.00 กรัม

 วัน 17.00 กรัม

 น้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ละลายอาหาร NA สำเร็จรูปด้วยน้ำกลั่น จากนั้นผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) จากอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปสำหรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

 ซึ่งอาหารสำเร็จรูป 21.00 กรัม

 วัน 17.00 กรัม

 น้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ละลายอาหาร MHA สำเร็จรูปด้วยน้ำกลั่น จากนั้นผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI) จากอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปสำหรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

 ซึ่งอาหารสำเร็จรูป 37.00 กรัม

 วัน 17.00 กรัม

 น้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ละลายอาหาร BHI สำเร็จรูปด้วยน้ำกลั่น จากนั้นผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 การเตรียมน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์

 ซึ่ง NaCl 8.5 กรัม ใส่ในขวดตูแรนขนาด 1,000 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมสารเคมีในการทดสอบเอนไซม์ไทโรซิเนส

2.1 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.8

สาร A คือ Di sodium hydrogen phosphate (MW : 141.96 กรัมต่อโมล)

$$\begin{aligned} \text{สาร A ความเข้มข้น } 1.00 \text{ โมลาร์ จะมีเนื้อสาร} & 141.96 \text{ กรัมต่อลิตร} \\ \text{เตรียมที่ความเข้มข้น } 0.05 \text{ โมลาร์ จะมีเนื้อสาร} & = (141.96 \times 0.05) / 1 \\ & = 7.098 \text{ กรัมต่อลิตร} \end{aligned}$$

สาร B คือ Sodium dihydrogen phosphate (MW : 137.99 กรัมต่อโมล)

$$\begin{aligned} \text{สาร B ความเข้มข้น } 1.00 \text{ โมลาร์ จะมีเนื้อสาร} & 137.99 \text{ กรัมต่อลิตร} \\ \text{เตรียมที่ความเข้มข้น } 0.05 \text{ โมลาร์ จะมีเนื้อสาร} & = (137.99 \times 0.05) / 1 \\ & = 6.899 \text{ กรัมต่อลิตร} \end{aligned}$$

ละลายสาร A และ B ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนำไปหนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นผสมสาร A กับ B ที่อัตราส่วนสาร A 24.5 มิลลิลิตร และสาร B 25.5 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้เป็น 6.8 และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนำไปหนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2 การเตรียม L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) 2.5 มิลลิโมลาร์

สาร L-DOPA ความเข้มข้น 1.0000 โมลาร์ จะมีเนื้อสาร 197.19 กรัม

$$\begin{aligned} \text{เตรียมที่ความเข้มข้น } 0.0025 \text{ โมลาร์ จะมีเนื้อสาร} & = (197.19 \times 0.0025) / 1 \\ & = 492 \text{ มิลลิกรัมต่อลิตร} \\ \text{เตรียมที่ปริมาตร } 50 \text{ มิลลิกรัม จะมีเนื้อสาร} & = (492 \times 50) / 1,000 \\ & = 24.6 \text{ มิลลิกรัม} \end{aligned}$$

ชั่งสาร L-DOPA 24.6 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์อ่อน 50 มิลลิลิตร

2.3 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 25 หน่วยต่อมิลลิลิตร

เตรียมจาก stock เอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 2,687 หน่วยต่อมิลลิกรัม ชั่งด้วยเครื่องชั่งสี่ตำแหน่งชั่งออกมาใส่ หลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร 1 มิลลิกรัม จากนั้นเติมน้ำ DI 1 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันจะได้ 2,687 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดไปใส่หลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร 372 ไมโครลิตร และเติมน้ำ DI 628 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ 1,000 หน่วย ต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดมาใส่หลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร และเติมน้ำ DI 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดมาใส่หลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร 250 ไมโครลิตร และเติมน้ำ DI 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ 25 หน่วยต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การเตรียมสารสกัด

นำสารสกัดที่แห้งแล้วมาชั่งใส่ในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง การเตรียมสารสกัดสำหรับวิธีการ Disc Diffusion โดยชั่งสารสกัดใส่ในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร 500 มิลลิกรัม และเติมตัวทำละลายของสารสกัดนั้น ๆ 1000 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน จะได้ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดมาใส่หลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร 500 ไมโครลิตร และเติมตัวทำละลายของสารสกัดนั้น ๆ 500 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันจะได้ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดมาใส่หลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร 500 ไมโครลิตร และเติมตัวทำละลายของสารสกัดนั้น ๆ 500 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันจะได้ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดมาใส่หลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร 500 ไมโครลิตร และเติมตัวทำละลายของสารสกัดนั้น ๆ 500 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันจะได้ 62.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมสารสกัดสำหรับวิธีการ DOPA chrome โดยชั่งสารสกัดใส่ในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร 20 มิลลิกรัม และเติม DMSO 200 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน และเติมฟอสเฟตบัพเฟอร์ 800 ไมโครลิตรจะได้ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดมาใส่หลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร 500 ไมโครลิตร และเติมฟอสเฟตบัพเฟอร์ 500 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันจะได้ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดมาใส่หลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร และเติมฟอสเฟตบัพเฟอร์ 900 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันจะได้ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข้อมูลการทดลอง

ตารางที่ ข-1 ค่าการดูดกลืนแสง และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด
เมทิลแอลกอฮอล์จากกลีบเลี้ยงของพิกุล

ตัวอย่าง			ค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร				ร้อยละ
			Control	Blank Control	Sample	Blank Sample	
รอบที่ 1	ครั้งที่ 1	ซ้ำที่ 1	0.639	0.093	0.597	0.169	23.91
		ซ้ำที่ 2	0.621	0.086	0.588	0.182	
		ซ้ำที่ 3	0.650	0.079	0.608	0.183	
	ครั้งที่ 2	ซ้ำที่ 1	0.649	0.089	0.678	0.194	15.18
		ซ้ำที่ 2	0.637	0.081	0.668	0.197	
		ซ้ำที่ 3	0.621	0.090	0.661	0.196	
	ครั้งที่ 3	ซ้ำที่ 1	0.691	0.078	0.629	0.176	16.00
		ซ้ำที่ 2	0.702	0.077	0.611	0.200	
		ซ้ำที่ 3	0.597	0.088	0.679	0.188	
รอบที่ 2	ครั้งที่ 1	ซ้ำที่ 1	0.853	0.092	0.625	0.282	26.57
		ซ้ำที่ 2	0.700	0.108	0.748	0.278	
		ซ้ำที่ 3	0.716	0.155	0.700	0.245	
	ครั้งที่ 2	ซ้ำที่ 1	0.685	0.124	0.728	0.209	12.28
		ซ้ำที่ 2	0.712	0.133	0.724	0.231	
		ซ้ำที่ 3	0.708	0.140	0.725	0.226	
	ครั้งที่ 3	ซ้ำที่ 1	0.688	0.089	0.762	0.325	20.23
		ซ้ำที่ 2	0.743	0.098	0.758	0.259	
		ซ้ำที่ 3	0.687	0.093	0.765	0.232	

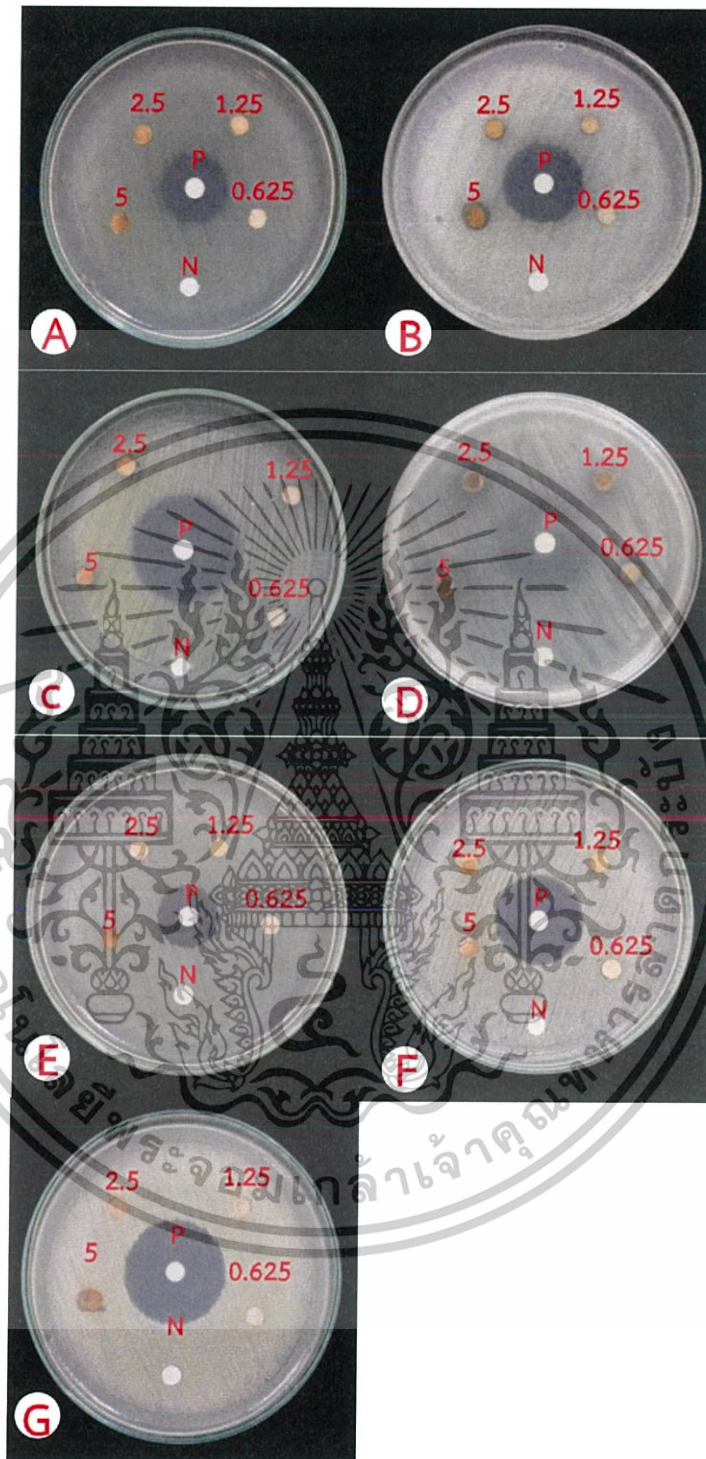
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน

ตารางที่ ข-2 ค่าการดูดกลืนแสงของกรดแอสคอร์บิก

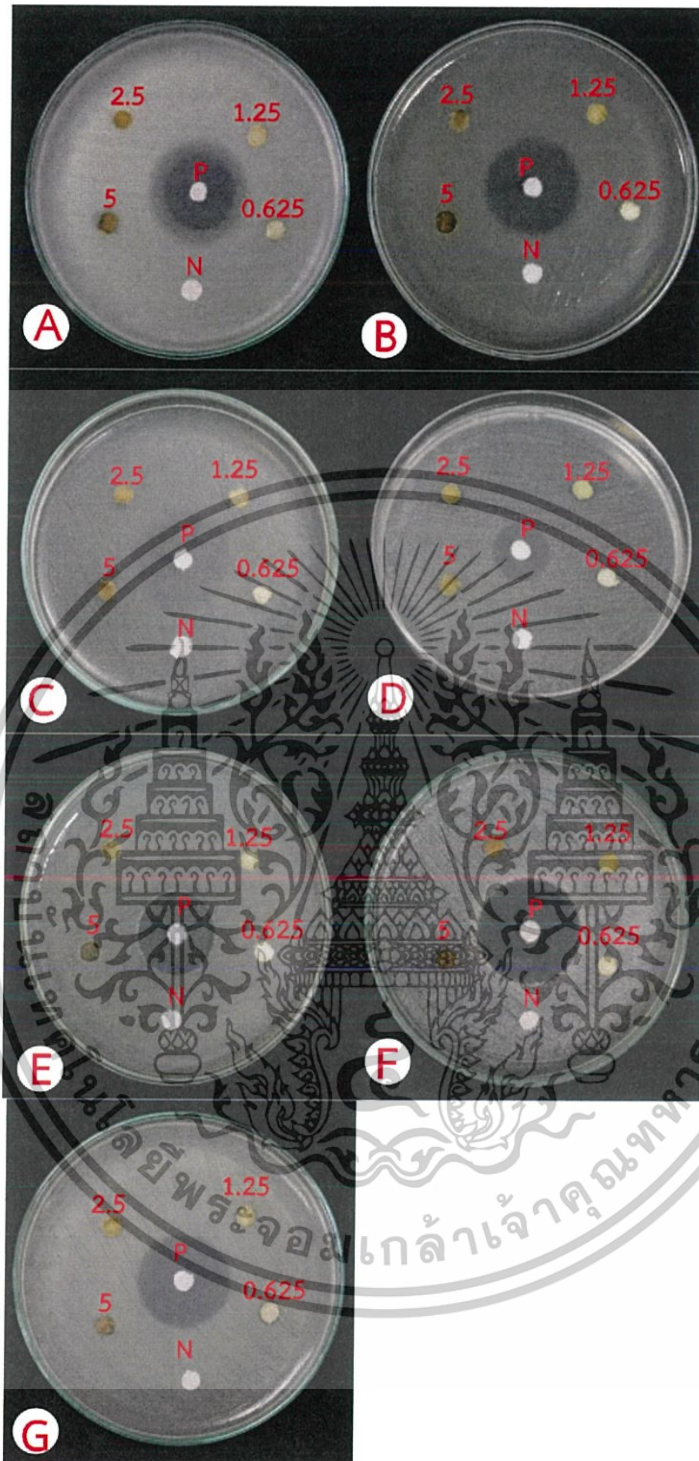
ตัวอย่าง		ค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร													
		Sample							Blank						
		Control	ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)						Control	ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)					
			50	100	150	200	250	300		50	100	150	200	250	300
ครั้งที่ 1	ซ้ำที่ 1	0.643	0.637	0.662	0.629	0.623	0.616	0.534	0.072	0.073	0.077	0.074	0.073	0.08	0.077
	ซ้ำที่ 2	0.622	0.604	0.628	0.633	0.628	0.635	0.534	0.073	0.075	0.072	0.074	0.073	0.076	0.076
	ซ้ำที่ 3	0.619	0.609	0.62	0.626	0.624	0.609	0.536	0.071	0.083	0.079	0.073	0.074	0.072	0.074
ครั้งที่ 2	ซ้ำที่ 1	0.741	0.762	0.529	0.435	0.335	0.251	0.124	0.079	0.325	0.083	0.076	0.074	0.072	0.071
	ซ้ำที่ 2	0.693	0.758	0.536	0.457	0.365	0.234	0.139	0.075	0.259	0.128	0.072	0.076	0.08	0.087
	ซ้ำที่ 3	0.699	0.765	0.54	0.45	0.363	0.249	0.147	0.074	0.232	0.074	0.078	0.073	0.071	0.071

ผลการต้านแบคทีเรียของตัวทำละลายต่าง ๆ ของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุล



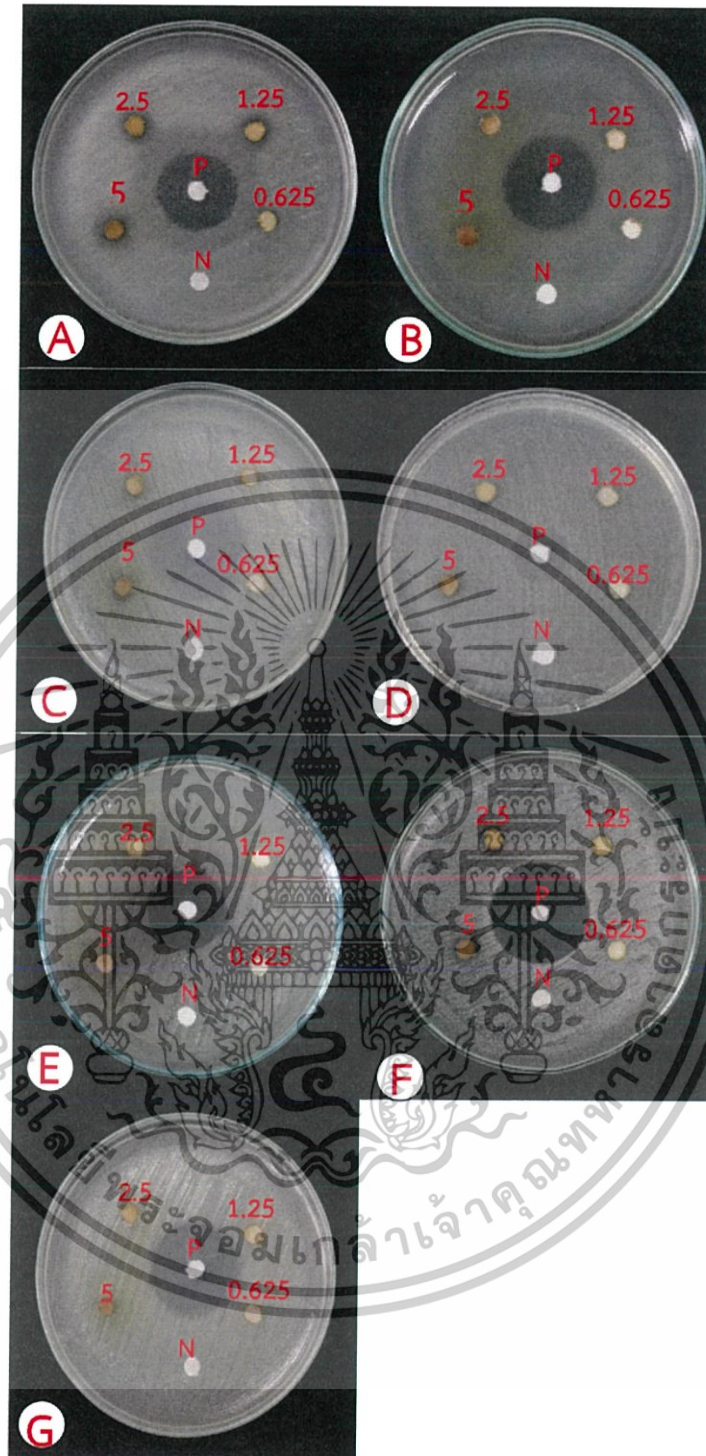
รูปที่ ข-1 บริเวณต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุลด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิสก์ เชื้อแบคทีเรีย (A) *Bacillus subtilis* (B) *Escherichia coli* (C) *Micrococcus luteus* (D) *Propionibacterium acnes* (E) *Pseudomonas aeruginosa* (F) *Staphylococcus aureus* (G) *Staphylococcus epidermidis* P: เจนตาไมซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ N : เมทิลแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของโรงเรียนเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นชอบที่จะใช้เอกสารนี้ในทางที่ผิด
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนําไปใช้

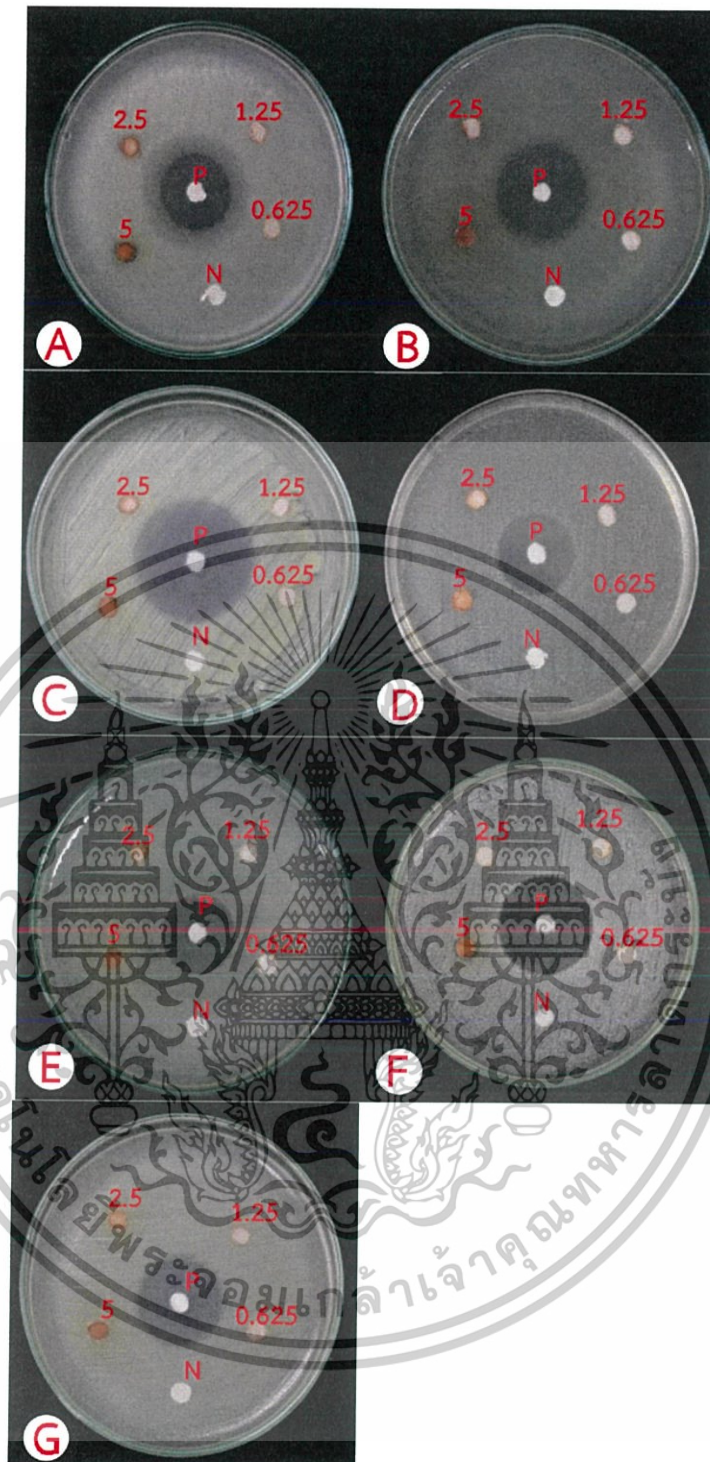


รูปที่ ข-2 บริเวณด้านแบคทีเรียของสารสกัดจากสลิปเลียงของพืชด้วยเฮกเซนที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิस्क ต่อเชื้อแบคทีเรีย (A) *Bacillus subtilis* (B) *Escherichia coli* (C) *Micrococcus luteus* (D) *Propionibacterium acnes* (E) *Pseudomonas aeruginosa* (F) *Staphylococcus aureus* (G) *Staphylococcus epidermidis* P: เจนตัวไมซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิस्क N: เฮกเซน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่โดยไม่หวังกำไรและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

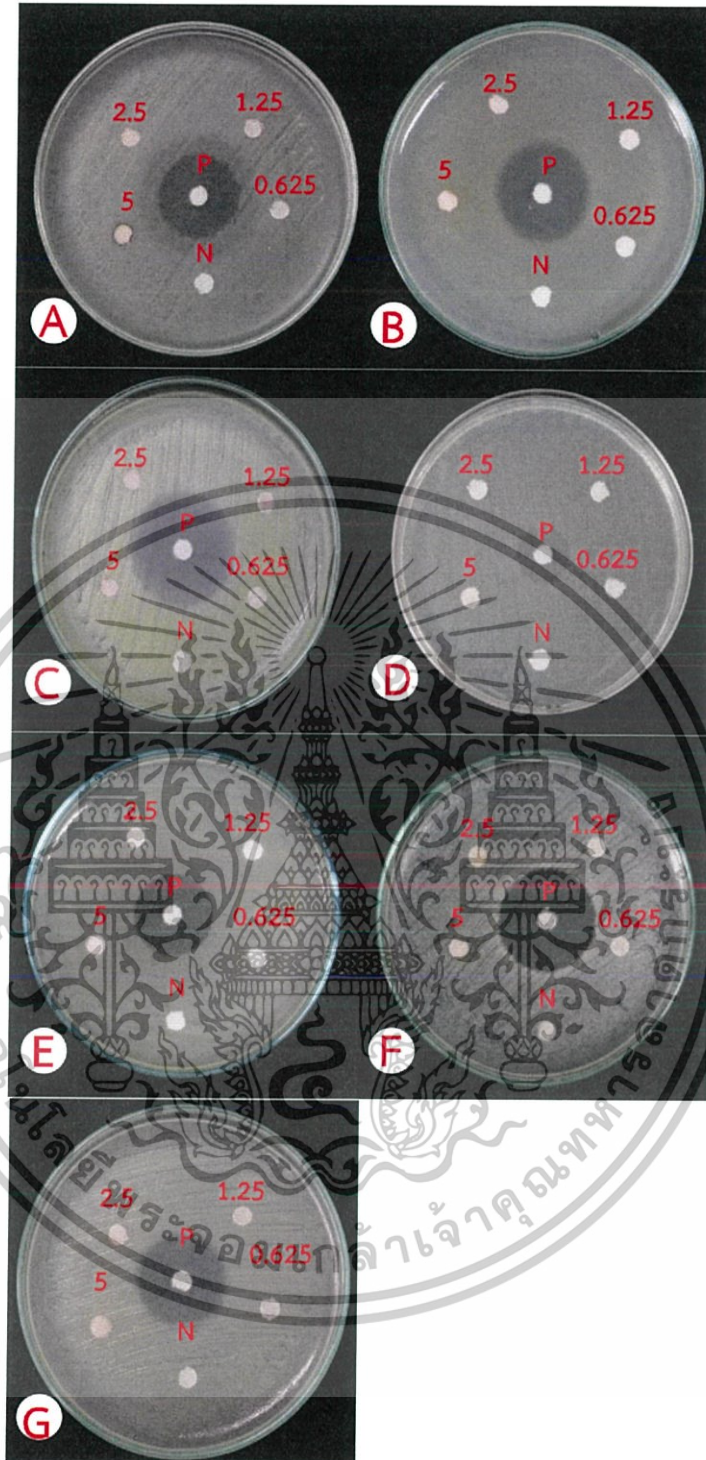


รูปที่ ข-3 บริเวณด้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุลด้วยเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิस्क ต่อเชื้อแบคทีเรีย (A) *Bacillus subtilis* (B) *Escherichia coli* (C) *Micrococcus luteus* (D) *Propionibacterium acnes* (E) *Pseudomonas aeruginosa* (F) *Staphylococcus aureus* (G) *Staphylococcus epidermidis* P : เจนต้าไมซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิस्क N : เอทิลอะซิเตท เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-4 บริเวณต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากสปีดของพิกุลด้วยบิวทานอลที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อดิस्क ต่อเชื้อแบคทีเรีย (A) *Bacillus subtilis* (B) *Escherichia coli* (C) *Micrococcus luteus* (D) *Propionibacterium acnes* (E) *Pseudomonas aeruginosa* (F) *Staphylococcus aureus* (G) *Staphylococcus epidermidis* P : เจนต้าไมซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิस्क N : บิวทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๕-5 บริเวณด้านแบคทีเรียของสารสกัดจากกลีบเลี้ยงของพิกุลด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อติสต์ ต่อเชื้อแบคทีเรีย (A) *Bacillus subtilis* (B) *Escherichia coli* (C) *Micrococcus luteus* (D) *Propionibacterium acnes* (E) *Pseudomonas aeruginosa* (F) *Staphylococcus aureus* (G) *Staphylococcus epidermidis* P : เจนตำไมซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อติสต์ N : น้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางที่ ค-1 ข้อมูลผล 3 ซ้ำของขนาดบริเวณการต้านแบคทีเรียของสารสกัดเมทิลแอลกอฮอล์จาก
กลีบเลี้ยงของพิทูล

เชื้อแบคทีเรีย	ซ้ำที่	เจนน้้าไมซิน 10 ไมโครกรัม ต่อดิสก์	ความเข้มข้นของสารสกัดเมทิลแอลกอฮอล์จาก กลีบเลี้ยงของพิทูล (มิลลิกรัมต่อดิสก์)			
			0.625	1.25	2.5	5
<i>Bacillus subtilis</i>	1	23.39	-	-	-	8.83
	2	24.06	-	-	-	8.68
	3	24.28	-	-	-	8.80
<i>Micrococcus luteus</i>	1	35.03	-	-	-	8.80
	2	38.84	-	-	-	8.52
	3	36.52	-	-	-	8.64
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	27.34	-	-	-	-
	2	26.89	-	-	-	-
	3	27.38	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	28.60	-	-	-	-
	2	28.15	-	-	-	-
	3	30.12	-	-	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	31.40	6.62	8.56	9.92	12.21
	2	30.96	7.03	9.18	9.42	13.07
	3	29.38	7.20	8.20	9.72	12.22
<i>Escherichia coli</i>	1	22.26	-	-	-	-
	2	21.76	-	-	-	-
	3	22.31	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	20.05	-	-	-	-
	2	19.43	-	-	-	-
	3	20.87	-	-	-	-

หมายเหตุ : (-) คือไม่มีบริเวณที่ต้านแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-2 ข้อมูลผล 3 ซ้ำของขนาดบริเวณการต้านแบคทีเรียของสารสกัดเหกเซนจากกลีบเลี้ยงของพิทูล

แบคทีเรีย	ซ้ำที่	เจนน้าไมซิน 10 ไมโครกรัม ต่อดิสก์	ความเข้มข้นของสารสกัดเหกเซนจากกลีบ เลี้ยงของพิทูล (มิลลิกรัมต่อดิสก์)			
			0.625	1.25	2.5	5
<i>Bacillus subtilis</i>	1	29.92	-	-	-	-
	2	28.14	-	-	-	-
	3	28.20	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	1	29.77	-	-	-	-
	2	31.81	-	-	-	-
	3	30.80	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	30.64	-	-	-	-
	2	30.29	-	-	-	-
	3	30.27	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	26.23	-	-	-	-
	2	26.53	-	-	-	-
	3	26.78	-	-	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	21.41	6.97	7.20	7.99	8.64
	2	20.57	6.97	7.39	7.66	8.56
	3	22.15	7.37	7.73	7.83	8.60
<i>Escherichia coli</i>	1	25.67	-	-	-	-
	2	29.74	-	-	-	-
	3	26.86	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	24.44	-	-	-	-
	2	24.48	-	-	-	-
	3	24.73	-	-	-	-

หมายเหตุ : (-) คือไม่มีบริเวณที่ต้านแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-3 ข้อมูลผล 3 ซ้ำของขนาดบริเวณการต้านแบคทีเรียของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจาก
กลีบเลี้ยงของพิกุล

เชื้อแบคทีเรีย	ซ้ำที่	เจนน้าไมซิน 10 ไมโครกรัม ต่อดิสก์	ความเข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจาก กลีบเลี้ยงของพิกุล (มิลลิกรัมต่อดิสก์)			
			0.625	1.25	2.5	5
<i>Bacillus subtilis</i>	1	26.05	7.11	7.52	8.46	8.78
	2	26.35	7.11	7.56	8.31	8.61
	3	26.81	7.14	7.62	8.25	8.77
<i>Micrococcus luteus</i>	1	34.39	-	-	-	-
	2	34.37	-	-	-	-
	3	30.18	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	29.99	-	-	7.64	8.13
	2	29.23	-	-	7.00	8.58
	3	29.15	-	-	7.30	8.22
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	25.48	-	-	-	-
	2	27.86	-	-	-	-
	3	28.80	-	-	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	15.76	-	-	8.05	8.58
	2	15.89	-	-	8.45	8.86
	3	15.40	-	-	8.42	9.30
<i>Escherichia coli</i>	1	27.87	-	-	-	-
	2	30.61	-	-	-	-
	3	27.93	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	24.69	-	-	-	-
	2	24.13	-	-	-	-
	3	24.89	-	-	-	-

หมายเหตุ : (-) คือไม่มีบริเวณที่ต้านแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-4 ข้อมูลผล 3 ซ้ำของขนาดบริเวณการต้านแบคทีเรียของสารสกัดบิวทานอลจากกลีบเลี้ยงของพิกุล

เชื้อแบคทีเรีย	ซ้ำที่	เจนน้าไมซิน 10 ไมโครกรัม ต่อดิสก์	ความเข้มข้นของสารสกัดบิวทานอลจากกลีบ เลี้ยงของพิกุล (มิลลิกรัมต่อดิสก์)			
			0.625	1.25	2.5	5
<i>Bacillus subtilis</i>	1	29.96	-	-	-	7.11
	2	24.11	-	-	-	7.22
	3	25.98	-	-	-	7.15
<i>Micrococcus luteus</i>	1	33.98	-	-	-	-
	2	34.00	-	-	-	-
	3	34.58	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	28.94	-	-	-	-
	2	28.81	-	-	-	-
	3	28.05	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	25.34	-	-	-	-
	2	26.14	-	-	-	-
	3	27.46	-	-	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	24.76	-	-	-	-
	2	23.32	-	-	-	-
	3	22.59	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	1	27.78	-	-	-	-
	2	28.40	-	-	-	-
	3	27.54	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	21.81	-	-	-	-
	2	22.57	-	-	-	-
	3	22.21	-	-	-	-

หมายเหตุ : (-) คือไม่มีบริเวณที่ต้านแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-5 ข้อมูลผล 3 ซ้ำของขนาดบริเวณการด้านแบคทีเรียของสารสกัดน้ำจากกลีบเลี้ยงของ
พิทูล

ชื่อแบคทีเรีย	ซ้ำที่	เจนด้าไมซิน 10 ไมโครกรัม ต่อดิสก์	ความเข้มข้นของสารสกัดน้ำจากกลีบเลี้ยงของ พิทูล (มิลลิกรัมต่อดิสก์)			
			0.625	1.25	2.5	5
<i>Bacillus subtilis</i>	1	24.00	-	-	-	-
	2	24.13	-	-	-	-
	3	22.76	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	1	32.08	-	-	-	-
	2	31.84	-	-	-	-
	3	35.87	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	30.20	-	-	-	-
	2	29.31	-	-	-	-
	3	28.75	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	24.47	-	-	-	-
	2	25.45	-	-	-	-
	3	24.72	-	-	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	16.40	-	-	-	-
	2	15.44	-	-	-	-
	3	16.77	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	1	30.01	-	-	-	-
	2	29.29	-	-	-	-
	3	28.64	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	23.87	-	-	-	-
	2	23.19	-	-	-	-
	3	23.07	-	-	-	-

หมายเหตุ : (-) คือไม่มีบริเวณที่ด้านแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้