การประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์ *(Euphobia hirta)* ในการเก็บรักษาเนื้อปลานิล *(Oreochromis niloticus)* แบบแช่เย็น

APPLICATION OF CRUDE EXTRACTS FROM GARDEN SPURGE *(Euphobia hirta)* TO PRESERVE CHILLED NILE TILAPIA *(Oreochromis niloticus)*

กชกร ไชยมะโน

ตรัณ ตระกูลสว่าง

วัชรี จันทร์สุภาเสน

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

APPLICATION OF CRUDE EXTRACTS FROM GARDEN SPURGE *(Euphobia hirta)* TO PRESERVE CHILLED NILE TILAPIA *(Oreochromis niloticus)*

KOTCHAKORN CHAIMANO
TARAN TRAGOONSAWANG
WATCHAREE CHANSUPASEN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์ *(Euphobia hirta)* ในการเก็บรักษาเนื้อปลานิล *(Oreochromis niloticus)* แบบแช่เย็น Application of crude extracts from Garden spurge *(Euphobia hirta)* to preserve chilled Nile tilapia *(Oreochromis niloticus)*
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกชกร ไชยมะโน รหัสนักศึกษา 58050852 นายตรัณ ตระกูลสว่าง รหัสนักศึกษา 58050890 นางสาววัชรี จันทร์สุภาเสน รหัสนักศึกษา 58050971
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการ	
ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์ *(Euphobia hirta)* ในการเก็บรักษาเนื้อปลานิล *(Oreochromis niloticus)* แบบแช่เย็น Application of crude extracts from Garden spurge *(Euphobia hirta)* to preserve chilled Nile tilapia *(Oreochromis niloticus)*
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกชกร ไชยมะโน รหัสนักศึกษา 58050852 นายตรัณ ตระกูลสว่าง รหัสนักศึกษา 58050890 นางสาววัชรี จันทร์สุภาเสน รหัสนักศึกษา 58050971
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ

บทคัดย่อ

สารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในทางเภสัชวิทยา แต่ยังไม่มีรายงานการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์อาหาร การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ ของน้ำนมราชสีห์กับการเก็บรักษาเนื้อปลาด้วยวิธีการแช่เย็น โดยทำการวิเคราะห์การต้านจุลินทรีย์จากส่วนใบ ดอก ต้น และราก จากนั้นคัดเลือกส่วนที่มีสารออกฤทธิ์มากที่สุด ที่ความเข้มข้น 500 mg/mL มาใช้ทดสอบในเนื้อปลาโดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มทดลอง ได้แก่ กลุ่มที่ไม่ได้แช่สารสกัดหยาบ และกลุ่มที่นำมาแช่สารสกัดหยาบ เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำเนื้อปลาใส่ถุงโพลีเอทิลีน และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ (ค่าสี เนื้อสัมผัส และ pH) เคมี (TBARS TVB-N และปริมาณไขมัน) จุลชีววิทยา และประสาทสัมผัส ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 0, 7 และ 14 วัน ผลการวิเคราะห์พบว่าค่าสี L* a* b* pH TVB-N และ TBARS ของเนื้อปลานิลที่ผ่านการแช่ สารสกัดหยาบมีค่าลดลง เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) และปริมาณไขมันในเนื้อปลานิลมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยปลาที่แช่สารสกัดหยาบมีค่าน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการทดสอบประสาทสัมผัสด้วยผู้ทดสอบ 30 คน มีความพึงพอใจต่อเนื้อปลาที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากน้ำนมราชสีห์มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติที่ดี และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ประมงเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ประมงแปรรูป

คำสำคัญ : น้ำนมราชสีห์, ปลานิล, สารสกัดหยาบ, การต้านจุลินทรีย์, การเก็บรักษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Application of crude extracts from Garden spurge (*Euphobia hirta*) to preserve chilled Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)
Students	Miss Kotchakorn Chaimano Student ID 58050852
	Mr. Taran Tragoonsawang Student ID 58050890
	Miss Watcharee Chansupasen Student ID 58050971
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2018
Advisor	Asst.Prof.Dr.Worakrit Worananthakij

Abstract

The crude extracts of *Euphobia hirta* are widely used in pharmacology. However, there is no applied in the foods product industry yet. Then, this study aims to analyzed the antimicrobial activity of crude extracts and evaluate the active compound to fillet preservation. The crude extracts from leaves, flowers, roots and stem of *E. hirta* was evaluated. The highest active compound was selected for next experiment. Two groups of chilled Nile tilapia storage were tested. One group was dip in 500 mg / ml of crude extract of *E. hirta* for 5 minutes and the others was control group. Both of filets were put in plastic bag and kept in refrigerator at 8 °C. Data collections such as physical analysis (color, texture and pH), chemistry properties (TBARS, TVB-N and crude fat), microbiology and sensory effects on chilled were examined at 0, 7, and 14 day. The assessment result showed that analysis of color value L*, a*, b*, pH, TVB-N and TBARS of treatment was decreased. Total viable count (TVC) and crude fat were increased in treatment group that lower than control group ($p < 0.05$). Sensory test from 30 persons preferred treatment group than control group ($p < 0.05$). This study provided the alternative of antimicrobial compound from natural material that could be useful for fishery products preservation.

Keywords: *Euphobia hirta*, *Oreochromis niloticus*, Crude extract, Antimicrobial, Preservation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานพิเศษในหัวข้อเรื่อง การประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์ (*Euphobia hirta*) ในการเก็บรักษาเนื้อปลานิล (*Oreochromis niloticus*) แบบแช่เย็น โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากทางผู้จัดทำโครงงานพิเศษได้รับความกรุณาเป็นอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสาตราจารย์ ดร.วรกฤต วรนันทกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่คอยให้คำปรึกษา ให้ความรู้ และคำแนะนำที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องในโครงงานพิเศษนี้ นอกจากนี้ผู้จัดทำโครงงานพิเศษขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสาตราจารย์ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ประธานกรรมการสอบ และผู้ช่วยศาสาตราจารย์ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการสอบ ที่ให้ความกรุณาให้ คำแนะนำในการแก้ไขข้อบกพร่องของโครงงานพิเศษนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ ประสบการณ์ และคอยสนับสนุน ตลอดจนให้คำแนะนำ เพื่อนำไปแก้ไขข้อบกพร่องให้กับผู้จัดทำโครงงานพิเศษนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาแนะนำการใช้เครื่อง อุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์อย่างถูกต้อง ตลอดจนสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในโครงงานพิเศษนี้ ขอบคุณเพื่อนทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจ คอยให้คำปรึกษาแนะนำ และช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัวไชยมะโน ครอบครัวตระกูลสว่าง และครอบครัวจันทร์สุภาเสน เป็นอย่างสูง ที่คอยให้กำลังใจ และคอยสนับสนุนมาโดยตลอด ทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กชกร ไชยมะโน
ตรัณ ตระกูลสว่าง
วัชรี จันทร์สุภาเสน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	2
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 น้ำนมราชสีห์ (*Euphobia hirta*)	3
2.2 สารสกัดหยาบ	4
2.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากพืช	7
2.4 องค์ประกอบของสารพฤกษเคมีของน้ำนมราชสีห์	9
2.5 ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)	12
2.6 แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อปลานิลเน่าเสีย	12
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	19
3.1 พืชที่ใช้ในการทดสอบ	19
3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ	19
3.3 อุปกรณ์	19
3.4 สารเคมี	20
3.5 การเตรียมสารสกัดหยาบ	21
3.6 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar disc diffusion	21
3.7 การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.8 การประเมินคุณภาพในเนื้อปลานิล	22
3.8.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ	22
3.8.2 การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค Pour plate	22
3.8.3 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี	22
3.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ	23
3.10 การทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส	24
3.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ	24
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	25
4.1 ร้อยละ และปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้	25
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar disc diffusion	25
4.3 ผลการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้	34
4.4 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography – Mass spectrometer (GC - MS)	35
4.5 ผลการวิเคราะห์คุณภาพในเนื้อปลานิล	40
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	46
5.1 สรุปผลการวิจัย	46
5.2 ข้อเสนอแนะ	47
เอกสารอ้างอิง	48
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	53
ภาคผนวก ข ภาพสถานที่เก็บตัวอย่างพืช	55
ภาคผนวก ค การคำนวณ และตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้	25
4.2 ผลการทดสอบบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากน้ำนมราชสีห์	26
4.3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้	34
4.4 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography – Mass spectrometer (GC - MS)	35
4.5 การประเมินทางประสาทสัมผัสในเนื้อปลานิล	45
ค.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633	56
ค.2 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633	57
ค.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 1261	58
ค.4 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 1261	59
ค.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus* sp.	60
ค.6 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Micrococcus* sp.	61
ค.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466	62
ค.8 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466	63
ค.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* sp.	64
ค.10 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* sp.	65
ค.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Vibrio* sp.	66
ค.12 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Vibrio* sp.	67
ค.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าสี	68
ค.14 การจัดกลุ่มข้อมูลค่าสี L* a* b* ในแต่ละชุดการทดลอง	68
ค.15 การเปรียบเทียบความแตกต่างการประเมินคุณภาพความเป็นpH	69
ค.16 การเปรียบเทียบความแตกต่างการประเมินคุณภาพทางเคมี	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของน้ำนมราชสีห์	3
2.2 เครื่องโรตารีอีวาโพเรเตอร์ (rotary evaporator)	7
2.3 โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบ ฟลาโวนอยด์ (flavonoid compounds)	9
2.4 โครงสร้างของแทนนิน (tannin)	10
2.5 โครงสร้างของซาโปนิน (saponins)	11
2.6 โครงสร้างของคาร์ดิแอก ไกลโคไซด์ (cardiac glycosides)	11
2.7 ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)	12
4.1 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633	28
4.2 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 1261	29
4.3 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus* sp	30
4.4 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466	31
4.5 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp	32
4.6 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio* sp	33
4.7 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบน้ำนมราชสีห์	37
4.8 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์	38
4.9 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากรากน้ำนมราชสีห์	38
4.10 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากดอกน้ำนมราชสีห์	39
4.11 การเปลี่ยนแปลงของค่าสี (L* a* b*) ในเนื้อปลานิล	40
4.12 การเปลี่ยนแปลงความเป็น pH ในเนื้อปลานิล	41
4.13 การเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัมผัสในเนื้อปลานิล	41
4.14 การเปลี่ยนแปลงของการวิเคราะห์ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ในเนื้อปลานิล	42
4.15 การเปลี่ยนแปลงของการวิเคราะห์ ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) ในเนื้อปลานิล	42
4.16 การเปลี่ยนแปลงของการวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Crude fat)ในเนื้อปลานิล	43
4.17 การเปลี่ยนแปลงของการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค Pour plate ในเนื้อปลานิล	44
ข.1 สถานที่เก็บตัวอย่างพืช	55
ข.2 ตัวอย่างพืช	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

อุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร เป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของไทย โดยเกี่ยวข้องตั้งแต่ระดับเกษตรกร ผู้ผลิต ผู้ขนส่ง ตลอดจนผู้บริโภค มูลค่าการผลิตอาหารจากภาคเกษตร ปศุสัตว์และประมงในปี 2559 มีสัดส่วนสูงขึ้นร้อยละ 20 ของมูลค่าผลิตภัณฑ์มวลรวม ในประเทศ (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2560) ทั้งนี้ตามนโยบายของรัฐบาลที่จะขยายอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารเพื่อยกระดับมูลค่าผลิตภัณฑ์มวลรวมในประเทศให้สูงขึ้น รัฐบาลจึงให้ความสำคัญในเรื่องการควบคุมมาตรฐาน และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์แปรรูปอาหาร เป็นการส่งเสริมศักยภาพการแข่งขันในกลุ่มผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป ซึ่งปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการผลิต คือ การตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยที่อาจถูกละเลย จากผู้ประกอบการทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปอาจเกิดการปนเปื้อนทางเคมี จุลินทรีย์ และทางกายภาพได้

ในปัจจุบันการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารยังคงเป็นปัญหาของผู้บริโภค และผู้ประกอบการจากข้อมูลของสำนักงานกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุขได้ดำเนินการตรวจสอบความปลอดภัยด้านอาหารพบว่า การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหารโดยรวมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (สำนักงานกรรมการอาหารและยา, 2560) ตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร และภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 เนื้อสดของสัตว์น้ำแช่เย็นหรือแช่แข็ง เช่น กุ้ง ปลา และปู เป็นต้น ควรพบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่า 1×10^6 CFU/g ซึ่งหากพบปริมาณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมากกว่าค่าที่กำหนด อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคร้ายแรงในผู้บริโภค เช่น อาหารเป็นพิษ หรือร้ายแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ (ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560)

การยืดอายุการเก็บรักษาโดยใช้สารสกัดหยาบจากสมุนไพรในธรรมชาติ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร ในประเทศไทยมีสมุนไพรหลายชนิด และสมุนไพรท้องถิ่นจะมีสรรพคุณที่แตกต่างกันไป เป็นเอกลักษณ์ตามภูมิภาคนั้น ๆ ต้นน้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta*) เป็นพืชที่มีการเจริญในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นไม้ล้มลุก ลำต้นมักอวบน้ำและมีหนามน้ำยางสีขาว (สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, 2559) มีรายงานในการใช้เป็นตำรับยาทางการแพทย์มีคุณสมบัติทางเคมีที่สำคัญ เช่น ฟลาโวนอยด์ โพลีฟีนอล แทนนิน ไตรเทอร์ปีน (ฤทธิรงค์, 2556) คุณสมบัติทางเคมีดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารได้

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดที่นิยมผลิต และบริโภคในประเทศไทย เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย มีความแข็งแรง ปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี จึงเป็นปลาที่มีความสำคัญเชิงพาณิชย์ อีกทั้งมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์แปรรูปจากปลานิลที่หลากหลาย แต่การส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศ หรือพื้นที่ไกล ๆ ยังถูกจำกัด และอาจจะพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Arthrobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Aeromonas* sp.,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pseudomonas sp., *Edwardsiella* sp., *Flexibacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Bacillus* sp. และ *Escherichia coli* ที่เป็นสาเหตุทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อปลานิลเน่าเสีย (Salah *et al.*, 2008 ; Huicab *et al.*, 2017)

โครงงานพิเศษนี้จึงมุ่งเน้นที่จะนำสารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์มาประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาเนื้อปลานิลแบบแช่เย็น เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา และยังลดต้นทุนการผลิตให้แก่ผู้ประกอบการรวมทั้งยังเพิ่มความมั่นใจในความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารต่อผู้บริโภคอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1) เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เนื้อปลานิลเน่าเสีย โดยใช้สารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์

2) เพื่อประเมินคุณภาพ และทดสอบทางประสาทสัมผัสของเนื้อปลานิลแบบแช่เย็นที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เก็บตัวอย่างต้นน้ำนมราชสีห์ อำเภอเวียงชัย จังหวัดเชียงราย 19°54'43.9"N 99°54'32.0"E แล้วทำการแยกส่วนของพืชแบ่งออกเป็นลำต้น ใบ ราก และดอก นำไปสกัดโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในอัตราส่วน 1 : 8 จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์ โดยวิธี Agar disc diffusion ทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) กับแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เนื้อปลานิลเน่าเสีย ได้แก่ *Vibrio* sp., *Staphyloccus aureus*, *Bacilus subtilis*, *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp. และ *Escherichia coli* จากนั้นนำไปประยุกต์ใช้ในตัวอย่างเนื้อปลานิล โดยการแช่ในสารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลง ในวันที่ 0 7 และ 14 แล้วทำการประเมินคุณภาพทางกายภาพ ทางเคมี ทางจุลชีววิทยา และทดสอบทางประสาทสัมผัส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เนื้อปลานิลเน่าเสีย โดยใช้สารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์

2) ประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาความสดของเนื้อปลานิลแบบแช่เย็น หรือผลิตภัณฑ์จากปลาน้ำจืด โดยใช้สารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำนมราชสีห์ *(Euphobia hirta)*

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Euphobia hirta*

วงศ์ : Euphorbiaceae

ชื่อสามัญ : Asthma plant, Garden spurge

ชื่ออื่น ๆ : นมราชสีห์ น้ำนมราชสีห์ ผักโขมแดง (ภาคกลาง) หญ้าน้ำหมึก (ภาคเหนือ) หญ้าหลังอึ่ง (เงี้ยว-แม่ฮ่องสอน)

น้ำนมราชสีห์ เป็นไม้ล้มลุก สูงได้ถึง 50 เซนติเมตร ลำต้นมีสีเขียวอมแดงหรือน้ำตาล มีขนหยาบยาว หูใบรูปสามเหลี่ยม ใบเรียงตรงข้าม รูปรี รูปไข่ หรือรูปขอบขนาน ขอบจักฟันเลื่อย แผ่นใบมีขนกระจายทั้งสองด้าน เส้นโคนใบข้างละ 1 เส้น ก้านใบ ยาว 1 - 3 มิลลิเมตร ช่อดอกออกตามซอกใบ 1 - 6 ช่อ ก้านช่อ ยาว 0.5 - 1.5 เซนติเมตร ดอกเรียงแน่นแบบช่อกระจุกซ้อน ใบประดับรูปแถบ ยาว 0.5 - 1 มิลลิเมตร วงใบประดับรูปถ้วยสูง 0.8 มิลลิเมตร ก้านชูอับเรณูสั้นติดบนก้านดอก รังไข่มีก้านเกสรเพศเมีย ยาว 0.3 มิลลิเมตร ผลจัก 3 พู ยาว 1 มิลลิเมตร มีขนสั้นนุ่ม ก้านผล ยาว 0.5 มิลลิเมตร เมล็ดรูปรีเป็นเหลี่ยม ยาว 0.7 มิลลิเมตร สีน้ำตาลแดงเรียบ ดังแสดงในรูป 2.1 (สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, 2559)

รูปที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของน้ำนมราชสีห์ : ใบ ดอก และลำต้น (ก) ราก (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำนมราชสีห์ เป็นพืชสมุนไพรที่นิยมใช้ในการแพทย์แผนไทย เช่น ยาต้ม หรือแช่ เพื่อรักษาโรคต่าง ๆ อาทิ ส่วนของใบและเมล็ดแก้ท้องเสีย โรคบิดที่เกิดจากติดเชื้อในลำไส้ แก้ไอ แก้หวัด แก้ไตพิการ แก้กระษัย ขับปัสสาวะ รักษาโรคผิวหนัง แก้กลากเกลื้อน แผลในทางเดินอาหาร กรดไหลย้อน อาเจียน ไข้ละอองฟาง นิ่วในไต ประจำเดือน พืชทั้งต้นใช้บำรุงน้ำนม แก้ไข้จับสั่น ท้องร่วง บิด ทาแก้อักเสบ ผื่นคัน ริดสีดวงทวาร หูน้ำหนวก ยางสดใช้รักษาบาดแผล ทากันหูด นอกจากนี้ยังใช้รักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อราบางชนิดและเป็นน้ำยาฆ่าเชื้อในการรักษาแผล (Basma *et al*., 2011 ; ฤทธิรงค์, 2556)

2.2 สารสกัดหยาบ (Crude Extract)

สารสกัดหยาบ (Crude Extract) หมายถึง สารสกัดหยาบขั้นต้นจากสมุนไพรที่ยังไม่ถึงขั้นสกัดเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ โดยใช้วิธีการสกัดที่ไม่ยุ่งยาก สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรงหรือต้องผ่านวิธีการผลิตก่อนที่จะนำไปใช้งาน (อมรรัตน์ และคณะ, 2550) ในการสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรจำเป็นต้องคำนึงถึงสภาวะที่เหมาะสม วิธีที่ใช้ในการสกัด รวมถึงตัวทำละลายในการสกัด และสารที่ได้จากการสกัดหยาบ

2.2.1 ขั้นตอนการสกัดหยาบจากพืช (Extract)

การคัดเลือกพืชมาใช้ ควรคำนึงถึงคุณสมบัติของพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ สามารถหาได้ง่ายในทุกฤดู มีจำนวนมากพอ จากนั้นแยกเป็นส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ราก ลำต้น ใบ ดอก และเมล็ด นำไปสกัดโดยใช้วิธีต่าง ๆ ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ (กรมวิชาการเกษตร, 2535) วิธีที่นิยมใช้ในการสกัดสารจากสมุนไพร ได้แก่

2.2.1.1 การแช่ในตัวทำละลาย (maceration)

วิธีที่นิยมใช้มากที่สุดในการสกัดสารจากพืชสมุนไพร และยังเป็นวิธีที่ใช้ได้กับทุกส่วนของพืช เช่น กิ่ง ก้าน เปลือก ใบ และราก ข้อได้เปรียบของวิธีนี้คือ ใช้เครื่องมือ และขั้นตอนในการสกัดไม่ยุ่งยาก ทั้งสารเคมีที่ใช้มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่ข้อเสีย คือระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดด้วยวิธีนี้ค่อนข้างนาน หากเปรียบเทียบกับวิธีอื่น การสกัดสารจะเริ่มต้นด้วยการเตรียมส่วนต่าง ๆ ของพืชที่จะสกัดให้แห้งโดยใช้วิธีตากแดดหรืออบในตู้บ่ม (incubator) ใช้อุณหภูมิในช่วง 30 - 60 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับปริมาณความชื้นของชิ้นส่วนพืชที่เรานำมาสกัด จากนั้นนำส่วนที่แห้งไปปั่นหรือบดให้ละเอียดเพื่อเพิ่มพื้นผิวสัมผัส แช่กับตัวทำละลายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดด้วยตัวทำละลายละลายอินทรีย์ เวลาที่ใช้ในการสกัดก็จะแตกต่างกันไป อาจใช้เวลาในการสกัดประมาณ 3 - 7 วัน โดยทำการสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเดิม หรือใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกันในการสกัด เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและให้ได้ปริมาณของสารสกัดหยาบที่จะนำมาศึกษามากขึ้น วิธีการแช่ในตัวทำละลายจะแช่สมุนไพรในตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้องที่พ้นแสง โดยทั่วไปแล้วจะใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักของสมุนไพรต่อปริมาตรของตัวทำละลายตั้งแต่ 1 : 4 ไปจนถึง 1 : 20

2.2.1.2 การสกัดด้วยการให้ตัวทำละลายไหลผ่าน (percolation)

วิธีการเหมือนกับการสกัดด้วยการแช่ในตัวทำละลายต้องเตรียมตัวอย่างที่จะสกัดให้แห้งนำไปปั่นหรือบดให้ละเอียด และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว (polarity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่ขั้นตอนการสกัดมีความแตกต่างกัน คือ จะใช้วิธีการสกัดโดยแช่สมุนไพรในตัวทำละลายทิ้งไว้ประมาณ 2 - 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจะเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปเพิ่ม แล้วปล่อยให้มีการไหลของตัวทำละลายผ่านสมุนไพรช้า ๆ ด้วยอัตราเร็วเหมาะสมกับการเติมตัวทำละลายเข้าไปแทนที่แต่ข้อเสียของการสกัดด้วยวิธีนี้ คือ จำเป็นต้องใช้ปริมาณตัวทำละลายในการสกัดมากกว่า

2.2.1.3 วิธีการย่อย (digestion)

วิธีนี้เป็นวิธีเดียวกับการสกัดสารด้วยการแช่ในตัวทำละลาย แต่ระหว่างขั้นตอนการแช่สมุนไพรในตัวทำละลายนั้น ที่จะใช้อุณหภูมิประมาณ 30 - 50 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยในการสกัดสารให้ละลายออกมาได้ดีขึ้น วิธีนี้จะใช้สกัดสารจากพืชส่วนที่มีความแข็ง และมีองค์ประกอบของพวกโพลิเมอร์ เช่น แทนนิน (tannins) ลิกนิน (lignin) ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (water-insoluble) ได้แก่ ส่วนเปลือก (bark) และราก (root) ของพืช ในการสกัดด้วยวิธีการย่อยจะใช้เวลาสั้นกว่าการแช่ในตัวทำละลาย โดยใช้ระยะเวลาตั้งแต่ 1 ชั่วโมงจนถึงหนึ่งวัน ขึ้นกับส่วนของพืชที่นำมาสกัด ข้อควรระวังของการสกัดสารด้วยวิธีนี้ คือ อุณหภูมิอาจมีผลต่อการสลายของสารบางอย่างในสมุนไพรเมื่อได้รับความร้อน

2.2.1.4 การสกัดด้วยวิธีการชง (infusion)

วิธีการนี้ใช้ได้ดีกับการสกัดสารที่มีคุณสมบัติในการละลายในน้ำได้ดี ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ น้ำ การสกัดจะใช้วิธีการแช่สมุนไพรในน้ำเดือด และแช่ทิ้งไว้ประมาณ 15 - 30 นาทีจากนั้นกรองกากที่เหลืออยู่ด้วยกระดาษกรอง หรือผ้าขาวบาง แล้วนำสารละลายที่ได้จากการสกัดไปศึกษาต่อ ตัวอย่างการสกัดด้วยวิธีนี้ที่ เช่น การชงชา ที่จะแช่ใบชาแห้ง ในน้ำเดือดทิ้งไว้จากนั้นก็ดื่มเฉพาะส่วนน้ำที่ได้ละลายสารที่อยู่ในใบชาออกมา เป็นต้น

2.2.1.5 การสกัดด้วยวิธีการต้มในน้ำเดือด(decoction)

การสกัดสารด้วยวิธีนี้ คือการต้มสมุนไพรในน้ำเดือด ใช้ระยะเวลาในการสกัดประมาณ 15 นาที ถึง 1 ชั่วโมง ซึ่งใช้เวลาที่สั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นข้อควรระวังของการสกัด คือ ความร้อนอาจทำลายสารที่เราสนใจจากสารสกัดหยาบสมุนไพร การสกัดสารด้วยการต้มในน้ำเดือดใช้ได้ดีกับส่วน ราก ใบ ดอก ก้าน แต่หลังจากการสกัดโดยต้มในน้ำเดือด จะต้องกรองกากเพื่อที่จะนำส่วนสารละลายไปใช้ศึกษาต่อ (กิตติพัฒน์ และปานทิพย์, 2560)

2.2.2 การเลือกตัวทำละลาย

ในการเลือกตัวทำละลายนั้นควรเลือกน้ำยาสกัดให้เหมาะสมกับชนิดของสารที่ต้องการสกัด โดยตัวทำละลายควรมีคุณสมบัติ ดังนี้ 1) ความสามารถในการละลายสาระสำคัญมากที่สุดและไม่ละลาย หรือละลายองค์ประกอบอื่น ๆ ได้น้อย (selectivity) 2) มีความคงตัวดี หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย 3) ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป 4) สภาพของสมุนไพรที่ทำการสกัด เช่น ส่วนที่มีไขมันอยู่มาก ควรขจัดไขมันพวกนี้ก่อน โดยสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทไม่มีขั้ว แล้วจึงนำกากพืชที่เหลือไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

2.2.2.1 น้ำ เป็นตัวทำละลายที่ดี หาง่าย และราคาถูก แต่การใช้น้ำอย่างเดียวเป็นตัวทำละลายในการสกัดพืชสมุนไพร มีข้อเสีย คือ สามารถละลายองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มาก นอกจากนี้น้ำระเหยได้ที่อุณหภูมิสูง ถ้าต้องการทำให้สารสกัดหยาบในน้ำเข้มข้นจะต้องใช้อุณหภูมิสูงในการระเหยไล่น้ำออกไป ซึ่งอาจจะเกิดความเสียหายกับสารสำคัญได้

2.2.2.2 แอลกอฮอล์ เป็นตัวทำละลายที่ดีมากเมื่อเทียบกับน้ำข้อดีของตัวทำละลายแอลกอฮอล์มีดังนี้ 1) มีความจำเพาะในการละลายมากกว่า 2) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ 3) หากต้องการทำให้สารสกัดหยาบเข้มข้น และสามารถระเหยได้ง่าย

2.2.2.3 น้ำผสมแอลกอฮอล์ (Hydroalcoholic mixture) เป็นทำละลายที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถละลายสาระสำคัญในพืชสมุนไพรได้ใกล้เคียง แต่ราคาถูกกว่า และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการแยกตัวของสารต่าง ๆ

2.2.2.4 **ตัวทำลายอินทรีย์อื่น** ที่นิยมใช้ในการสกัด ได้แก่ เฮกเซน (hexane) เอทิลอะซิเตท (ethylacetate) เมทานอล (methanol) และเอทานอล (ethanol) ซึ่งทำให้สารที่ถูกสกัดออกมาในชั้นของตัวทำละลายแต่ละชนิด มีความ เป็นขั้วมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด

2.2.3 การทำให้สารสกัดหยาบให้เข้มข้น (Concentration)

สารสกัดหยาบอย่างหยาบที่ได้จะมีปริมาตรมากและเจือจางทำให้น้ำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพจึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

2.2.3.1 การระเหย (free evaporation) เป็นการนำตัวทำละลายออกจากน้ำยา สกัดโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือแผ่นความร้อน (hot plate) วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสารสกัดหยาบสลายตัวได้เนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไปและหากใช้สารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในการสกัดการระเหยโดยให้ความร้อนโดยตรง (direct heat) บนแผ่นความร้อนอาจเกิดอันตรายได้ง่ายนอกจากนี้ควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญเมื่อใช้ความร้อน

2.2.3.2 การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (distillation in vacuum) จัดเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดเป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำพร้อมทั้งลดความดันให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) เครื่องมือนี้ เรียกว่า โรตารีอีวาโพเรเตอร์ (rotary evaporator) (รูปที่2.2) ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ 3 ส่วน คือ ภาชนะบรรจุสารสกัดหยาบที่จะกลั่น (distillation flask) ส่วนคอนเดนเซอร์ หรือส่วนควบแน่นไอสารละลาย (condenser) และภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่น (receiving flask) โดยสารสกัดหยาบ ซึ่งบรรจุในภาชนะจะแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้ และจะหมุน (rotate) ตลอดเวลาที่ทำงานเพื่อให้มีการกระจายความร้อนอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ ภาชนะบรรจุสารสกัดหยาบนี้ จะต่อเข้ากับส่วนควบแน่น ซึ่งมีระบบทำความเย็นหล่ออยู่ตลอดเวลา ปลายของส่วนควบแน่นจะมีภาชนะรองรับโดยทั้งระบบจะต่อเข้ากับระบบสุญญากาศ สารละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุจะควบแน่นที่บริเวณคอนเดนเซอร์ และหยดลงมาในภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่นซึ่งสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์ และนำกลับมาใช้ใหม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.3 การทำให้แห้ง (drying) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดจนแห้งได้สารสกัดหยาบออกมาในสภาพของแข็งหรือถึงของแข็งมีหลายวิธีเช่นการใช้ความเย็น (lyophilizer หรือ freeze dryer) หรือการใช้ความร้อน (spray dryer)

2.2.3.4 อัลตราฟิลเทรชั่น (ultrafiltration) เป็นการทำสารสกัดหยาบด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นเมมเบรน (membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) สูงกว่า 5,000 (รัตนา, 2547)

รูปที่ 2.2 เครื่องโรตารีอีวาโพเรเตอร์ (rotary evaporator)
ที่มา : Handbook of Synthetic Organic Chemistry (2017)

2.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากพืช

วิธีทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพร มีทั้งวิธีการทดสอบในเชิงคุณภาพและวิธีการทดสอบในเชิงปริมาณ ดังนี้ (ประสาทพร และคณะ, 2551)

2.3.1 วิธีการแพร่ (Diffusion method)

วิธีการแพร่นี้อาจแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีคือ disc diffusion test และ hole-plate diffusion

2.3.1.1 วิธี disc diffusion method วิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุด เนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพสามารถบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อสารทดสอบหรือไม่ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถบอกค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) หรือ Minimun Bactericidal Concentration (MBC) ไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญช้า และเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ หลักการทั่วไป คือ วาง paper disc ที่มีสารทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (อาหารเลี้ยงเชื้อนี้จะต้องกระจายเชื้อ (spread) ในปริมาณที่เหมาะสมไว้แล้ว) สารที่ทดสอบบนจะแพร่ไปสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งความสามารถในการละลายของสารทดสอบและขนาดของโมเลกุลของสารทดสอบจะมีผลต่อการแทรกซึมของสารทดสอบ ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์จะไม่สามารถเจริญรอบ paper disc จะเรียกว่า zone of inhibition หรือ clear zone (Brantner *et al.*, 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.2 วิธี hole-plate diffusion หรือการเจาะหลุม ใช้วิธีเดียวกับ disc diffusion test แต่ทำโดยการเจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วหยดสารละลายสมุนไพรลงไปในแต่ละหลุมแล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อเช่นเดียวกันวัดผลโดยการวัดวงใส (clear zone หรือ zone of inhibition) ที่เกิดขึ้น ความกว้างของ clear zone ที่เกิดขึ้นจะแสดงถึงความสัมพันธ์ของความไวของเชื้อทดสอบต่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งการรายงานผลจะรายงานผลการทดสอบดังนี้ (Davidson and Branen, 1993)

2.3.2 วิธีการเจือจาง (Dilution method)

วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงปริมาณ สามารถบอกค่าความเข้มข้นของสารที่ต้าน และทำลายเชื้อได้ นิยมใช้ทดสอบเชื้อที่เจริญได้ช้า ใช้ทดสอบยืนยันผล วิธี diffusion method ที่ให้ความไวปานกลางหรือดื้อยา เพื่อว่าจะสามารถใช้สารสกัดหยาบสมุนไพรนั้นในจำนวนสูง ๆ ได้ และใช้ทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ การทดสอบนี้แบ่งออกเป็นวิธีแบบที่ใช้อาหารเหลว และวิธีแบบที่ใช้อาหารวุ้น หลักการโดยทั่วไปของวิธีทดสอบแบบใช้อาหารเหลว และแบบที่ใช้อาหารวุ้นจะคล้ายคลึงกัน คือ จะเจือจางสารสกัดหยาบสมุนไพรในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นจึงใส่เชื้อลงใน หรือบน อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสมุนไพร ภายหลังการบ่มเชื้อ ให้ดูค่า MIC ทั้งนี้โดยสังเกตความขุ่นหรือใสของอาหารเหลว และสามารถดูค่า MBC จากมีหรือไม่มีเชื้อเจริญขึ้นบนอาหารวุ้น (Baron and Finegold, 1990)

2.3.2.1 วิธีการเจือจางในอาหารวุ้น (Agar dilution method)

วิธีการเจือจางในอาหารวุ้น เป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบความไวของเชื้อแบบปริมาณวิเคราะห์โดยการเจือจางสารทดสอบในอาหารวุ้น และถ่ายเชื้อลงบนผิวของอาหารวุ้น เป็นจุด เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการทดสอบเชื้อจำนวนมาก ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนอาหารจานเดียวกันได้ ตรวจผลโดยดูการเจริญของเชื้อ ความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้เชื้อไม่เจริญถือว่าเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารนั้นในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ MIC และความเข้มข้นต่ำสุดของสารนั้นในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ คือ ค่า MBC (เอกรินทร์, 2550)

2.3.2.2 วิธีการเจือจางในอาหารเหลว (Broth dilution method)

การเจือจางในอาหารเหลว วิธีการนี้สามารถแบ่งเป็น microdilution (tube test) และ microdilution (dilution test) Broth Macrodilution test จะทำในหลอดทดลอง โดยทำการเจือจางสารสกัดหยาบสมุนไพร stock solution ด้วยตัวเจือจาง หรือด้วยอาหารเหลวในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution) ไปเรื่อยๆ ปริมาตรสุดท้ายที่อยู่ในหลอดเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร และต้องมีหลอดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดหยาบสมุนไพรด้วย การเตรียมเชื้อที่ทดสอบให้ได้ปริมาณเชื้อตามต้องการ โดยอาจใช้วิธีเทียบความขุ่นกับ สารละลายแบเรียมซัลเฟต (McFarland) เบอร์ 0.5 หรืออาจใช้การวัดความขุ่นด้วย spectrophotometer แล้วเจือจางลงเพื่อให้ได้ขนาดเชื้อที่ต้องการ Broth Microdilution test ทำใน microtiter plate 96-well โดยเจือจาง stock solution ด้วยอาหารเหลว แบบลดลงทุก 2 เท่า มีหลุมควบคุมเป็นอาหารเหลวที่ไม่มีสารสกัดหยาบสมุนไพรด้วย จากนั้นใส่เชื้อที่ปรับปริมาณเชื้อแล้ว (ประมาณ 10^6 CFU/mL) ลงในแต่ละหลุมแล้วปิดฝาก่อนนำไปบ่มเพาะ อ่านค่า MIC ด้วยการสังเกตด้วยสายตา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดูความขุ่น หรืออาจใช้สารบางอย่างที่สามารถบ่งชี้การเจริญของเชื้อได้เพื่อให้อ่านค่า ได้ง่ายขึ้น เพื่อลดการรบกวนการอ่านผลเนื่องจากสีและความขุ่นของสมุนไพรบางชนิด ในการดูความขุ่นด้วยตาเปล่า

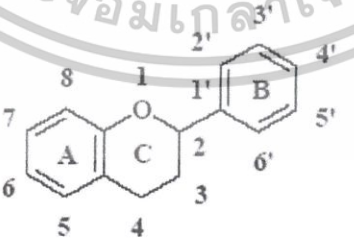
การทดสอบค่า MBC จะทำต่อเนื่องจากการหาค่า MIC ซึ่งนิยมทำจาก broth dilution test โดยการ subculture เชื้อจาก broth ที่ไม่มีเชื้อขึ้นตั้งแต่ช่วงค่า MIC ขึ้นไป streak บน agar plate เพื่อให้เปรียบเทียบได้ชัดขึ้น ควรเพาะจากหลอดควบคุม ที่ไม่มีสมุนไพรด้วย จากนั้นนำ plate ไปบ่มแล้วดูการเจริญของเชื้อเพื่ออ่าน MBC โดยที่ความเข้มข้น ดังกล่าวจะต้องไม่มีเชื้อขึ้นหรือเกือบไม่มีเชื้อขึ้น (ร้อยละ 99.9 ของเชื้อถูกฆ่า) (ประสาทพร และคณะ, 2551)

2.4 องค์ประกอบสารพฤกษเคมีของต้นน้ำนมราชสีห์

พืชสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคมีมากมายหลายชนิด และกระจายอยู่ทั่วไป คุณภาพของพืชสมุนไพรขึ้นอยู่กับปัจจัยหลาย ๆ อย่าง เช่น สภาวะแวดล้อมในการปลูก ฤดูกาล และช่วงเวลาที่เก็บสมุนไพร เป็นต้น ต้นน้ำนมราชสีห์ ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีหลายชนิด บางชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological action) เช่น

2.4.1 ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

สารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid compounds) เป็นกลุ่มหนึ่งของสารประกอบโพลิฟีนอล (รูปที่ 2.3) สามารถพบได้มากมายในผัก ผลไม้ และสมุนไพร จะเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่น (hydroxylation reaction) และปฏิกิริยาเอสเตอริฟิเคชั่น (esterification reaction) กับน้ำตาล และบางครั้งก็มีหมู่เอซิล (acyl group) อยู่ในโมเลกุลด้วยเช่นเดียวกับแอนโธไซยานิน (anthocyanin) ฟลาโวนอยด์หลายชนิดมีน้ำตาลเป็นโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharides) หรือ ไดแซคคาไรด์ (disaccharides) อยู่ในโมเลกุลด้วย ซึ่งน้ำตาลที่พบ คือ กลูโคส (glucose) และ แรมโนส (rhamnose) (ณัฏริกา, 2549) ซึ่งมีนิวเคลียสเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน (2-phenylbenzopyrone) คือ มีวงแหวนไพแรน (pyran ring) เชื่อมติดกับวงแหวนเบนซิน (benzene ring) ซึ่งมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา เช่น ดาอิดเซอิน (daidzein) และเจนิสเทอิน (genistine) (รัตนา, 2547) ทั้งนี้หน้าที่หลักของฟลาโวนอยด์คือ antioxidant activity โดยทำหน้าที่เป็นตัวขัดขวางหรือหยุดปฏิกิริยาต่อเนื่องของอนุมูลอิสระ (free radical chain terminator) ตัวจับออกซิเจน (oxygen scavenger) หรือเป็น chelating agent ของโลหะ เป็นต้น (ณัฏริกา, 2549)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบ ฟลาโวนอยด์ (flavonoid compounds)
ที่มา : ณัฏริกา (2549)

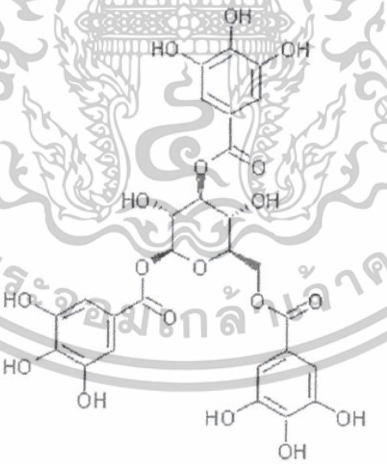
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 อัลคาลอยด์ (alkaloids)

อัลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นกลุ่มสารอินทรีย์ที่มีธาตุไนโตรเจน (nitrogen; N) อยู่ภายในโมเลกุล โดยอาจมีไนโตรเจนอยู่หนึ่งอะตอมหรือมากกว่าหนึ่งก็ได้ในรูปของเอมีน (amine) เอมีนออกไซด์ (amine oxide) หรืออาจพบอยู่ในรูปของเอไมด์ (amide) และอิไมด์ (imide) ไนโตรเจนในอัลคาลอยด์ได้มาจากกรดอะมิโนซึ่งเป็นสารตั้งต้นในชีวสังเคราะห์ของอัลคาลอยด์ชนิดต่างๆ โดยทั่วไปอัลคาลอยด์จะมีคุณสมบัติเป็นเบสเนื่องจากมีไนโตรเจน แต่ทั้งนี้จะมีความเป็นเบสมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนของไนโตรเจนภายในโมเลกุล อัลคาลอยด์มักมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาอย่างเด่นชัด ในธรรมชาติจะพบอัลคาลอยด์มากในพืชชั้นสูง พบน้อยในพืชชั้นต่ำ สัตว์ และจุลินทรีย์ ในพืชชั้นสูงนั้นสามารถพบอัลคาลอยด์ได้ในส่วนต่างๆ ของพืชเช่น ใบ ดอก ผล เมล็ด รากและเปลือก เป็นต้น และขึ้นอยู่กับชนิดของพืชด้วย (ณัฏริกา, 2549)

2.4.3 แทนนิน (tannins)

แทนนิน (tannins) เป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่ และมีโครงสร้างซับซ้อน (รูปที่ 2.4) มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดรสฝาดในพืช พบได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืชหลายชนิด และมีคุณสมบัติช่วยในการตกตะกอนโปรตีนทำให้หนังสัตว์ไม่เน่าเปื่อย จึงมีการใช้สารแทนนินในอุตสาหกรรมการฟอกหนัง ในทางการแพทย์ มีการใช้สารแทนนินเป็นยารักษาโรคท้องเสีย นอกจากนี้สารแทนนินบางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ เช่น ทีโอแกลลิน (theogallin) กรดแกลลิก (gallic acid) และกรดแอลลาจิก (ellagic acid) เป็นต้น (พีรศักดิ์, 2544)



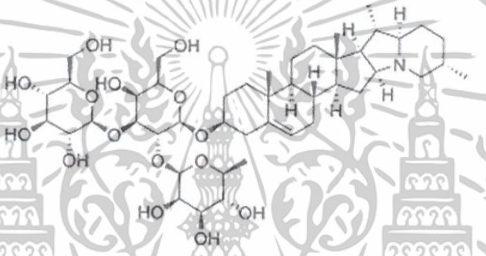
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของแทนนิน (tannin)
ที่มา : Connell (2000)

2.4.4 ซาโปนิน (saponins)

ซาโปนิน (saponins) เป็นกลุ่มหนึ่งของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) (รูปที่ 2.5) ที่พบในพืชเป็นส่วนใหญ่ โครงสร้างของซาโปนินประกอบด้วยส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล (aglycone) ซึ่งเป็นสารจำพวกไตรเทอร์ปีนส์ (triterpenes) หรือสเตียรอยด์อะไกลโคน (steroidal aglycone) เรียกส่วนนี้ว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

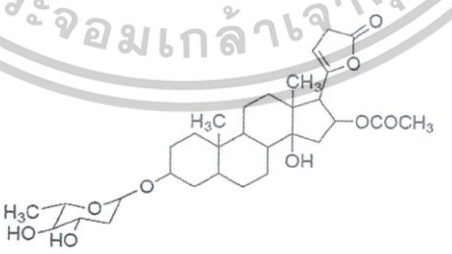
ซาโปจินิน (sapogenin) และส่วนที่เป็นน้ำตาลเรียกว่า ไกลโคน (glycone) ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรือโมเลกุลมากกว่าหนึ่งหน่วยไตรเทอร์ปีนอยด์ซาโปนิน ส่วนใหญ่พบในพืชใบเลี้ยงคู่ ส่วนสเตียรอยด์ซาโปนินพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว โมเลกุลของซาโปนินมีส่วนที่ละลายในน้ำ และส่วนที่ละลายได้ในไขมัน ทำให้มีคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์และชีววิทยาหลากหลาย ซาโปนินมีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว เป็นสารทำให้เกิดฟอง เป็นสารต้านจุลินทรีย์ ต้านเชื้อรา กำจัดศัตรูพืช ต้านมะเร็ง คอเลสเตอรอล แต่มีข้อเสียคือ เมื่อกลืนเข้าไปจะทำให้เกิดลมพิษ (urticaria) หรือผื่นคัน (skin rash) ได้ในมนุษย์ และทำให้เกิดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงขณะปล่อย ฮีโมโกลบินออกมา ถ้าฉีดเข้าในร่างกาย (hemolysis of blood cell) อีกทั้งซาโปนินยังเป็นพิษต่อสัตว์เลือดเย็น มีการนำไปประยุกต์ใช้ในอาหาร คนและสัตว์ เครื่องสำอางและทางเภสัชกรรม ตลอดจนการพัฒนากระบวนการผลิต การสกัด การทำสารให้บริสุทธิ์และนำไปใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ การตรวจหาซาโปนินในพืชด้านคุณภาพและปริมาณสามารถทำด้วยวิธีทางชีวภาพ โครมาโตกราฟ และสเปคโตรโฟโตเมตรี



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของซาโปนิน (saponins)
ที่มา : Burcio (2017)

2.4.5 คาร์ดิแอก ไกลโคไซด์ (cardiac glycosides)

คาร์ดิแอก ไกลโคไซด์ (cardiac glycosides) (รูปที่ 2.6) มีอะไกลโคนเป็นสเตียรอยด์นิวเคลียส (steroid nucleus) คือมีโครงสร้างเป็นวงแหวนไซโคเพนทาโนเพอไฮโดรฟีแนนทรีนอยู่ในโมเลกุลมีฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดพบได้ในพืชชั้นสูงหลายวงศ์ (รัตนา, 2547)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของคาร์ดิแอก ไกลโคไซด์ (cardiac glycosides)
ที่มา : รัตนา (2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

ปลานิลมีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟฟริกา เป็นปลาที่เติบโตเร็ว ในปี 2560 มีการส่งออกปลานิลแช่เย็น คิดเป็นมูลค่า 189.5 ล้านบาท (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2560) ทำให้ปลานิลเป็นปลาที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูงชนิดหนึ่ง จึงมีการเลี้ยงอย่างแพร่หลาย ทั้งในบ่อ ในกระชัง รวมถึงนิยมเลี้ยงในน้ำจืดและน้ำกร่อย ในปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงปลานิลอยู่สองสายพันธุ์ คือ ปลานิลดำ และปลานิลแดง ลักษณะทั่วของปลานิล มีรูปร่างคล้ายปลาหมอเทศ แตกต่างกันที่ลายสีดำและจุดสีขาวสลับกันไปบริเวณครีบหลัง ครีบก้น และลำตัวมี สีเขียวปนน้ำตาล มีลายดำพาดขวางตามลำตัว มีความยาวประมาณ 10 – 30 เซนติเมตร มีนิสัยชอบอยู่ร่วมกับเป็นฝูง มีความอดทน ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ปลานิลมีการทนต่อความเค็มได้ดีถึง 20 ส่วนในพันส่วน ทนต่อความเป็น pH ได้ดีในช่วง 6.5 - 8.3 ทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 40 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ปลานิลมักปรับตัวและเจริญเติบโตได้ไม่ดีนัก (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง, 2553)

รูปที่ 2.7 ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

2.6 แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อปลานิลเน่าเสีย

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดที่พบได้ในแหล่งน้ำทุกภาคของประเทศไทย เนื่องจากเลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว เป็นที่นิยมในการเลี้ยงของเกษตรกรทั่วไป อีกทั้งยังเป็นปลาที่มีความต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ แต่ปัญหาของการส่งออกปลานิลไปยังตลาดในต่างประเทศยังถูกจำกัด เนื่องจากพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp. และ *Escherichia coli* ที่เป็นสาเหตุทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อปลานิลเน่าเสีย (ภัคดี, 2556)

Bacillus subtilis

แบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งมีการสร้างสปอร์มีขนาดของเซลล์ต่าง ๆ ขนาด 0.5 x 2 - 2.5 x 10 ไมโครเมตร มีเอนโดสปอร์ซึ่งมีรูปร่างแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อพบได้ทั่วไปตามพื้นดินต้นไม้ส่วนใบ ลำต้น และบริเวณรากพืช เจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี เจริญได้ในอาหารหลายชนิด เติบโตได้ดีในอุณหภูมิปกติ และ pH เป็นกลาง จัดเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคแก่คนและสัตว์ อีกทั้งสามารถย่อยสลายสารเพคติน และพอลิแซ็กคาไรด์ในเนื้อเยื่อ และเป็นสาเหตุการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์อาหาร (Boer and Diderichsen, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Staphylococcus aureus

แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (coccus) ไม่เคลื่อนที่ (non motile) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.5 - 1.5 ไมโครเมตร อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือ อยู่รวมกันคล้ายพวงองุ่น ลักษณะเชื้อ *S. aureus* โคโลนีมีสีขาวถึงสีทอง ส่วนใหญ่ไม่สร้าง แคปซูล สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย เจริญได้ดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส แต่ไม่ทนต่อรังสีแกมมา หรืออัตราไวโอเลต ส่วนใหญ่ค่อนข้างทนความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสได้นาน 30 นาทีแต่จะตายเมื่อถูกความร้อน 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แต่แบคทีเรียสกุลนี้เป็นสิ่งบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่าย (ณัฐชา, 2559)

Escherichier coli

แบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง (rod shape) มีขนาดตั้งแต่ 1.1 - 1.5 x 2.0 - 6.0 ไมโครเมตร สายพันธุ์ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ (motile) โดยอาศัย flagella ที่มีอยู่รอบตัว ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobe) และสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ปกติสามารถเจริญบนอาหารธรรมดาที่ใช้ในห้องปฏิบัติการที่ ช่วงอุณหภูมิ 7 - 46 องศาเซลเซียส pH ของอาหารตั้งแต่ 4.4 - 10 มี capsule บาง ๆ หุ้มอยู่รอบตัวทำให้เชื้อทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆได้ดี เช่น มีชีวิตอยู่ตามเสื้อผ้าแห้งและในฝุ่นละอองได้หลายวัน อยู่ในน้ำได้นานหลายสัปดาห์ แต่ถูกทำลายที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการท้องร่วงและการปนเปื้อนหลังการผลิต (Doyle, 1989)

Vibrio cholerae

จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae แบคทีเรียสกุล Vibrio ที่ก่อโรคได้บ่อยและมีความสำคัญทางการแพทย์ คือ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* (Tarr *et al.*, 2007) โดย *V. cholerae* เป็นสาเหตุของโรคอหิวาตกโรคหรือโรคอุจจาระร่วงอย่าง รุนแรง (Siddiqui *et al.*, 2006) *V. cholerae* เป็นแบคทีเรียกรัมลบรูปร่างแท่งโค้ง (curved rod, comma-shaped rods) มีขนาด 0.5-0.8 x 1.4-2.6 ไมโครเมตร, เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลัม เส้นเดียวที่ขั้ว (single polar flagellum), เจริญได้ทั้งในสภาวะที่ มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes), ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase), หมักน้ำตาลได้หลายชนิด,เจริญได้ในสภาวะที่มี เกลือ 0-8%, เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20-37 องศาเซลเซียส และมี mol% G+C ของ DNA เท่ากับ 38-51% (Farmer and Janda, 1984)

Pseudomonas sp.

สกุล Pseudomonas ของวงศ์ Pseudomonadaceae เป็นแบคทีเรียแอโรบิกที่เป็นแกรมลบเคลื่อนที่ 2 - 4 ไมครอน แท่งยาว (plumpshaped) ด้วยเสา flagella ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโรคไม่สามารถสร้างเม็ดสีเช่น pyocyanine (greenblue) และ pyorubrin (เหลืองเขียว) *P. aeruginosa* สามารถผลิตสารพิษนอกเซลล์ขนาดใหญ่มากมายรวมถึง exotoxin A และ enterotoxins สารอื่น ๆ เช่นกรดไฮโดรไซยานิคเอนไซม์โปรตีโอไลต์เมือกผิวที่เป็นพิษ และสารฮีโมลิซีติคก็อาจนำไปสู่การก่อโรคของสายพันธุ์นี้ สารพิษที่รวมกับสารที่เป็นอันตรายเป็นปัจจัยที่กำหนดความรุนแรงของ *P. aeruginosa* ในโฮสต์ที่แตกต่างหลากหลาย (Burdon *et al.*, 1967)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Micrococcus sp.

สกุล *Micrococcus* ประกอบด้วยทรงกลม Gram-positive ไม่มีการเคลื่อนไหว และไม่แพร่กระจาย พวกเขาเป็นบวก catalase และแอโรบิกมักจะมีการเผาผลาญทางเดินหายใจ สปีชีส์ส่วนใหญ่ผลิตเม็ดสี แคโรทีนอยด์ ข้อมูล DNA การวิเคราะห์ผนังเซลล์เคมีและการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับ 16S rRNA บ่งชี้ว่าสกุล *Micrococcus* มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับสกุล Arthrobacter มากกว่าสกุล coccoi อื่น ๆ เช่น *Staphylococcus* และ *Planococcus* ด้วยเหตุผลเหล่านี้จึงไม่สามารถรวมอยู่ในสกุล *Staphylococcus* และ *Planococcus* ในวงศ์ Micrococcaceae เดียวกัน ดังนั้นทั้งสกุล *Micrococcus* และสกุล Arthrobacter มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด แต่จำพวกแยกกันอีก ทั้งเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (microbial spoilage) ได้หลายประเภท เช่น การเสื่อมเสียของไข่ การเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์ สัตว์ปีก อาหารกึ่งแห้ง อาหารทะเล ปลา หอย รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอก แฮม(Keddie *et al.*, 1974)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.7.1 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของสมุนไพร

Lugasi *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของสารสกัดหยาบจากพืชที่มีผลต่อผลิตภัณฑ์ปลา สำหรับปลาแมคเคอเรลจะแช่สารสกัดหยาบในช่วง 60 นาทีจากนั้นแช่แข็งนานสูงสุด 12 เดือนที่ -20 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตัวอย่างเดือนที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 12 การทดลองประกอบด้วย 2 ตัวควบคุม คือ ปลาที่ไม่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบ (ตัวควบคุม) และปลาที่ผ่านการแช่น้ำ ภายใต้สภาวะเดียวกัน ความเสียหายของไขมันโดยการวัดจาก lipolysis development (การก่อตัวของกรดไขมันอิสระ) การเกิดกลิ่นหืน (conjugated dienes : CDs) สารประกอบออกซิเดชั่นที่สอง สารประกอบเรืองแสง และคลอเรียมออกไซด์) และการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (กลิ่น ความแน่น และสี) ผลจากการแช่สารสกัดหยาบพืช พบว่าได้กลิ่นและสีที่ดีขึ้นซึ่งทำให้อายุการเก็บรักษานานขึ้น 7 เดือน และมากกว่าทั้งสองตัวควบคุม 5 เดือน ตามการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส การผ่านการแช่น้ำยังแสดงให้เห็นผลลัพธ์ที่ดีกว่าในการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (กลิ่น และสี) กว่าตัวควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบ ในปัจจุบันการทดลองนี้มีผลต่อการแช่ปลาทะเลในสารสกัดหยาบจากพืชเพื่อการค้าของผลิตภัณฑ์แช่แข็ง

Serra *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษากิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่ได้จากของเสีย จากน้ำมันมะกอกและของเสียที่ได้จากกระบวนการผลิตไวน์ที่อุดมไปด้วยโพลีฟีนอล (quercetin, hydroxytyrosol และ oleuropein) เมื่อทดสอบกับ 5 สายพันธุ์จุลินทรีย์ (Escherichia coli, Salmonella poona, Bacillus cereus, Saccharomyces cerevisiae และ Candida albicans) การทดสอบนี้จะใช้ microplate photometer ในการวิเคราะห์ ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจากธรรมชาติ อาจมีการใช้เป็นตัวแทนยาต้านจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร เช่นเดียวกับการใช้ทางการแพทย์ในอนาคตได้ สารสกัดหยาบจากธรรมชาติแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้มากกว่าการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ การศึกษานี้มีความเกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมอาหารในการพัฒนาสารกันบูดธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพต่ออาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gao *et al.* (2014) ได้ศึกษาผลกระทบของสารสกัดหยาบจากโรสแมรี่ (RE) ร่วมกับนิซิน (N) ต่อคุณภาพของปลาจาระเม็ด (*Trochinotus ovarus*) ได้รับการประเมินตลอด 15 วัน ของการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ทางเคมีกายภาพ (ค่าเปอร์ออกไซด์, thiobarbituric acid, ไนโตรเจนพื้นฐานระเหยทั้งหมด ค่า pH ค่า K การวัดค่าเนื้อสัมผัสและสี) การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสและลักษณะแบคทีเรียที่พบในเนื้อปลา การใช้สารสกัดหยาบจากโรสแมรี่กับนิซิน ทำให้ค่าคุณภาพทางเคมี กายภาพ ลักษณะทางประสาทสัมผัสดีขึ้น และการลดลงของจุลินทรีย์ เมื่อเทียบกับการใช้สารสกัดหยาบจากโรสแมรี่หรือนิซิน เพียงอย่างเดียวหรือตัวควบคุมซึ่งส่งผลให้อายุ การเก็บรักษาของปลาจาระเม็ดมีความสำคัญ ดังนั้นสารสกัดหยาบจากโรสแมรี่กับนิซิน อาจเป็นวิธีที่มีแนวโน้มในการรักษาคุณภาพ และยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อปลาจาระเม็ดแช่เย็น

Doloh *et al.* (2016) ได้ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบชะพลู (*Piper sarmentusum*) (1% w/v) มัลเบอร์รี่ (*Morus alba*) (1% w/v) และดอกกระทิง (*Thunbergia laurifolia Lindl.*) (1% w/v) ต่อคุณภาพของเนื้อปลานิลในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเนื้อปลานิลที่แช่สารสกัดหยาบจากดอกกระทิง มีจุลินทรีย์ และสารเคมีที่ต่ำ (TBARs) เมื่อเทียบกับการใช้สารสกัดหยาบจากมัลเบอร์รี่ และใบชะพลู ยิ่งกว่านั้นตัวอย่างที่ใช้สารสกัดหยาบจากดอกกระทิงมีคะแนนความชอบกลิ่น และรสที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ใช้สารสกัดหยาบจากพืชอื่น ๆ ตลอดการเก็บรักษา 15 วัน ดังนั้นสารสกัดหยาบจากดอกกระทิง แสดงให้เห็นว่าเป็นวิธีที่มีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ในการเก็บรักษาเนื้อปลานิล

Raeisi *et al.* (2016) ได้ทำการศึกษางานวิจัยนี้ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากหอมแดง (*Allium ascalonicum* L.) และเมล็ด ajwain (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague) ต่อคุณภาพของเนื้อปลาเทราท์สีรุ้งเคลือบกึ่งทอด (*Oncorhynchus mykiss*) ที่เก็บในตู้เย็น การวิเคราะห์ทางเคมี (ค่าเปอร์ออกไซด์ ค่ากรด thiobarbituric ค่าไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด trimethylamine nitrogen และค่ากรด), การทดสอบทางจุลชีววิทยา (จำนวนที่นับได้ทั้งหมด จำนวน แบคทีเรีย psychophilic จำนวน *Pseudomonas* spp.) และคุณภาพทางประสาทสัมผัส เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม การเกิดออกซิเดชันของไขมันและการย่อยสลายทางจุลชีววิทยาล่าช้าอย่างมีนัยสำคัญในตัวอย่างที่ได้รับสารสกัดหยาบจากพืช ($p < 0.05$) สารสกัดหยาบเหล่านี้ยังช่วยให้มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสที่สูงขึ้นและการยอมรับโดยรวม ($p < 0.05$) การประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบจาก 3% เมล็ด ajwain ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดรวมถึงคะแนนทางประสาทสัมผัส การเก็บรักษานานถึง 15 วัน โดยใช้สารสกัดหยาบจาก 3% หอมแดง และผลไม้ การวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นสารกันบูดตามธรรมชาติ เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลา

Reddy and Babu (2016) ได้ทำการศึกษาการทดสอบพืชสมุนไพรซึ่งเป็นที่รู้จักทางเภสัชวิทยาต่างๆเช่น antiallergic activity คุณสมบัติต้านการอักเสบ และต้านมะเร็ง *Euphorbia nivulia* (Euphorbiaceae) เป็นพืชที่ใช้ในการแพทย์แผนโบราณในการรักษาโรคหอบหืด การอักเสบ และความผิดปกติจำนวนมาก โดยการประเมินพื้นฐานที่ใช้พืช การประเมินฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของพืชทั้งหมด สารสกัดหยาบจากพืชแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์กับแบคทีเรียแกรมลบ แกรมบวก และเชื้อรา การศึกษาครั้งนี้เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในพืช องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผงของพืชถูกสกัดโดยใช้ตัวทำละลายน้ำ และอินทรีย์ (เมทานอล) กิจกรรมต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบเข้มข้นได้รับการประเมินโดยการหาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนการยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมลบ แกรมบวก และเชื้อราโดยใช้วิธี disc diffusion ผลของการศึกษาทางพฤกษเคมี พบว่ามีแทนนินซาโปนิน sesquiterpenes อัลคาลอยด์และสารสกัดหยาบยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ กิจกรรมของสารสกัดหยาบจากพืชทั้งหมดไม่ได้รับผลกระทบเมื่อได้รับสารสกัดหยาบในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน (4°C, 30°C, 60°C และ 100°C) แต่ลดลงที่ pH อัลคาไลน์ การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของการยับยั้งจุลินทรีย์ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าจุลินทรีย์ (MBC) ของสารสกัดหยาบ แสดงให้เห็นว่า MIC ต่ำสุด และ MBC ต่ำสุด คือ *Salmonella paratyphi, Bacillus subtili* และ *Salmonella typhi* ค่า MIC สูงสุด และ MBC สูงสุด คือ *Staphylococcus aureus Euphorbia nivulia* มีการต้านเชื้อแบคทีเรีย และเป็นแหล่งยาปฏิชีวนะที่อาจเป็นประโยชน์สำหรับการรักษาด้วยสารเคมี และการควบคุมโรคติดเชื้อ

Faith *et al.* (2017) ทำการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากพืชธรรมชาติต่อคุณภาพทางเคมี ปริมาณกรดไขมันและคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของปลาทะเบ้าที่บรรจุแบบสุญญากาศและแช่ในตู้เย็น (2 ± 1 องศาเซลเซียส) ปลาทะเบ้าแยกออกเป็นสามกลุ่ม ซึ่งถูกแช่ในสารสกัดหยาบจาก 1% ลาเวนเดอร์ (FL) หรือ สะระแหน่ (LB) และตัวควบคุม (C) ที่ไม่มีสารสกัดหยาบจากพืช การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสอายุการเก็บของปลาทะเบ้าคือ 7 วันสำหรับการควบคุมและ 11 วันสำหรับปลาที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบทั้งสอง เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการเก็บรักษาพบว่าค่า PUFA และโอเมก้า 3 คือ 24.43%, 30.97% และ 27.88% ของกลุ่ม C, FL และ LB ตามลำดับ นอกจากนี้ ค่า TVB-N ที่ยอมรับได้ของกลุ่ม C (7 วัน) คือ 41.17 mg/100 g ของกลุ่ม FL และ LB (9 วัน) คือ 37.42 mg/100 g. และ 42.86 mg/100 g ตามลำดับ ค่า PV และ TBA มีค่าต่ำ จะพบในเนื้อปลาแช่ด้วยสารสกัดหยาบ LB เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ ($p \leq 0.05$) ในกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบจากพืชทำให้ค่า FFA และ pH ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาด้วยสารสกัดหยาบ FL และ LB ช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันในเลือดและลดค่า TVB-N ในเนื้อปลาทะเบ้าทำให้ยืดอายุการเก็บรักษาของปลาได้

Ashraf *et al.* (2018) ได้ศึกษาการป้องกันการเน่าเสียของอาหารและโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดขึ้นได้จากการใช้สารเคมีที่มีผลกระทบในทางลบ ได้แก่ อันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์จากการใช้สารเคมี สารเคมีตกค้างในอาหาร และอาหารสัตว์ เนื่องจากปัญหาดังกล่าว จึงมีความจำเป็นในการค้นหาสารกันบูดจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพ และมีความปลอดภัยต่อสุขภาพ ในวารสารส่วนใหญ่มีการใช้สารสกัดหยาบจากพืชเพื่อควบคุมโรคอาหารเป็นพิษและรักษาอาหาร ตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากพืชห้าชนิดต่อเชื้อ *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella typhi* โดยใช้เทคนิค disc diffusion สารสกัดหยาบเอทานอลจากทับทิม กานพลู ขิง และ ไทม์ มีประสิทธิภาพกับเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10 mg/mL สารสกัดหยาบจากทับทิม และกานพลู เป็นสารสกัดหยาบจากพืช ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร และไวต่อการยับยั้ง *S. aureus* และ *P. aeruginosa* โดยมีค่า MIC ตั้งแต่ 2.5 และ 5.0 mg/mL และ MBC ที่ 5.0 และ 10 mg/mL แต่ *P. aeruginosa* ซึ่งมีความไวน้อยกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ MBC ของ *S. aromaticum* ที่ 12.5 mg/mL ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากพืชทั้ง 4 ชนิด แสดงให้เห็นว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ อาจนำมาใช้เป็นสารป้องกันทางธรรมชาติในการควบคุมโรคอาหาร เป็นพิษและเก็บรักษาอาหารเพื่อหลีกเลี่ยงอันตรายที่มีผลต่อสุขภาพจากการใช้สารเคมี

Palmeri *et al.* (2018) ได้ทำการวิจัยต้นกระบองเพชรมีวัตถุประสงค์เพื่อขยายความรู้ในการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติในการถนอมอาหาร ผลของต้นกระบองเพชรถูกสกัดด้วยน้ำและประเมินปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด สารต้านอนุมูลอิสระ ประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์เพื่อยับยั้งการเน่าเสียของอาหาร และแบคทีเรียก่อโรค และปริมาณ tacyanin และ betaxanthin สารสกัดหยาบถูกนำไปประยุกต์ใช้โดยเทคนิคการจุ่มกับเนื้อวัวสไลด์ที่บรรจุแล้วเพื่อประเมินผลกระทบทางด้านกายภาพ และเคมี การรักษาสภาพสีและเนื้อสัมผัสตลอดจนการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในช่วงอายุการเก็บรักษาในสภาพการเก็บรักษาในการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากผลของต้นกระบองเพชรแสดงให้เห็นว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

Ramirez *et al.* (2018) ได้ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากมะเขือเทศ และนำไปเคลือบด้วยไคโตซานที่บริโภคได้ต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของเนื้อปลาเซียร่าที่แช่แข็งเป็นเวลา 15 วัน ต่อมาเตรียมสารสกัดหยาบจากมะเขือเทศที่ผ่านการอบแห้งซึ่งถูกนำมาผสมกับเนื้อปลาเซียร่าโดยการแช่สารสกัดหยาบเพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซานที่กินได้ การรักษาต่อไปนี้ใช้ : C (ไคโตซาน), TPE (สารสกัดหยาบจากมะเขือเทศ) , TPE - C (TPE - ไคโตซาน) และตัวควบคุม (ไม่มีไคโตซานและสารสกัดหยาบ) สีค่า pH WHC, สารประกอบที่เกี่ยวข้องกับ ATP, และค่า K ถูกตรวจสอบในช่วง 15 วันของการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง ในทำนองเดียวกัน ปริมาณของ mesophiles ทั้งหมดพบว่าการใช้ C, TPE และ TPE - C มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จาก lot control ในความเข้มข้นของสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับ ATP, ค่า K, pH และจำนวน mesophilic ทั้งหมดสรุปได้ว่าการใช้สารสกัดหยาบเพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับไคโตซานช่วยให้สามารถปรับปรุงคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของเนื้อปลาเซียร่า

2.7.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของน้ำนมราชสีห์

Bhuvaneshwar *et al.* (2010) ได้ศึกษาว่าใบของต้นน้ำนมราชสีห์ในทางการแพทย์โบราณถูกใช้ ในการรักษาฝี โรคบิด ลำไส้อักเสบและสภาพผิวต่าง ๆ ถูกสกัดโดยเมทานอล ในอาหารที่แตกต่างกัน และใช้วิธี disc diffusion เพื่อตรวจสอบกิจกรรมต้านเชื้อแบคทีเรียกับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจำนวนมาก (สายพันธุ์เดิม และสายพันธุ์ปรับแต่ง) การทดสอบความไวต่อการต้านแบคทีเรียแสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. aureus*, *E. coli* และ *B. subtilis* ที่แตกต่างกันในขณะที่ *K. pneumonia* เป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อสารสกัดหยาบเหล่านี้มากที่สุด ความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบที่ยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *S. entertidis* อยู่ในช่วง 0.1mg/ml การวิเคราะห์สารพฤกษเคมีพบว่ามีเทอร์ปีน, แทนนิน, อัลคาลอยด์ และฟลาโวนอยด์ซึ่งอาจมีผลต่อคุณสมบัติของยาปฏิชีวนะ

Basma *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาการประเมินสารสกัดหยาบจากใบ ดอกไม้ ลำต้น และรากของต้นน้ำนมราชสีห์ ในการต้านแบคทีเรียและเชื้อรา ที่มีความสำคัญทางการแพทย์โดยจะใช้วิธี disc diffusion ทำการทดสอบกับเชื้อแกรมบวก (*Staphylococcus aureus Micrococcus sp.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bacillus subtilis และ *Bacillus thuringensis*) แกรมลบ (*Escherichia coli Klebsiella pneumonia Salmonella typhi* และ *P. mirabilis*) และยีสต์ 1 ตัว (*Candida albicans*) โซนการยับยั้งอยู่ระหว่าง 16 - 29 mm. สารสกัดหยาบจากใบยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยโซนการยับยั้งขนาดใหญ่ตามด้วยดอกซึ่งยับยั้งแบคทีเรียทั้งหมดยกเว้น *C. albicans* จุลินทรีย์ที่ไวต่อสารสกัดหยาบทั้งหมดคือ *S. aureus* และ *Micrococcus sp.* สารสกัดหยาบจากรากแสดงโซนยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ใหญ่กว่าแบคทีเรียแกรมลบและมีโซนยับยั้งใหญ่กว่าสารสกัดหยาบจากลำต้น ค่า MIC ต่ำสุดได้จาก *E. coli* และ *C. albicans* (3.12 mg/mL) ตามด้วย *S. aureus* (12.50 mg/mL) และ *P. mirabilis* (50.00 mg/mL) แบคทีเรียอื่น ๆ มีค่า MIC อยู่ที่ 100.00 mg/mL จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเซลล์ที่สัมผัสกับสารสกัดหยาบจากใบแสดงพื้นผิวที่หยาบกร้านเมื่อเพิ่มเวลาในการทดสอบและเซลล์ที่สัมผัสกับสารสกัดหยาบจากใบเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำให้ผิวหยาบกร้านมากขึ้น ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของเซลล์และการสูญเสียการทำงาน การทดสอบการยับยั้งของ *C. albicans* พบว่าที่ MIC 1 และ 2 เท่า สารสกัดหยาบมีค่า LC_{50} ที่ 0.71, 0.66, 0.41 และ 0.03 mg/mL ตามด้วยลำต้นใบรากและดอกตามลำดับ ดังนั้นพืชเหล่านี้สามารถใช้ในการค้นพบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ซึ่งอาจนำไปพัฒนายาตัวใหม่ได้

Sheikhlar *et al.* (2017) ได้ทำการศึกษาสารสกัดหยาบด้วยน้ำ และเมทานอลของเปลือกมะนาว (*Citrus limon*) *Euphorbia hirta* (ส่วนที่อยู่เหนือดิน) และ เมล็ดลูกซัด (*Trigonella foenun-graecum*) ทดสอบการต้านจุลินทรีย์กับ *Aeromonas hydrophila* ด้วยวิธี disc diffution แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบเมทานอลของ *E. hirta* (EHE) มีบริเวณการยับยั้งที่ใหญ่ที่สุดและความเข้มข้นในการยับยั้งน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบสมุนไพรอื่น ๆ ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 พืชที่ใช้ในการทดสอบ

ต้นน้ำนมราชสีห์ที่นำมาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ บริเวณพื้นที่หมู่ 6 ตำบลเวียงเหนือ อำเภอเวียงชัย จังหวัดเชียงราย 19°54'43.9"N 99°54'32.0"E โดยเก็บตัวอย่างในช่วงวันที่ 18 – 19 สิงหาคม 2561 ในการเก็บตัวอย่างทำการคัดเลือกจากลักษณะของดอก ใบ ราก และลำต้น โดยเลือกเก็บจากต้นที่สมบรูณ์คือ ไม่มีโรค ไม่มีเชื้อรา ส่วนต่าง ๆ ของต้นไม่มีรอยขาดหรือรอยกัดจากแมลง และปราศจากสิ่งเจือปนอื่น ๆ จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด และตากในที่ร่มเป็นเวลา 1-2 วัน เก็บไว้ในที่พ้นแสงเพื่อใช้ในการดำเนินงานวิจัยต่อไป

3.2 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

3.2.1 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั่วไป

Bacillus subtilis ATCC 6633

Escherichia coli ATCC 1261

Micrococcus sp.

Staphylococcus aureus TISTR 1466

3.2.2 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลา

Pseudomonas sp.

Vibrio sp.

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบ

3.3.1.1 ตู้อบลมร้อน

3.3.1.2 เครื่องบดสมุนไพรความเร็วสูง

3.3.1.3 ขวดโถพลาสติกสำหรับการแช่สมุนไพร

3.3.1.4 ผ้าขาวบาง

3.3.1.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.3.1.6 ขวดแก้วสีชาสำหรับเก็บตัวอย่าง

3.3.1.7 เครื่อง Rotary evaporator ยี่ห้อ Heidolph

3.3.1.8 ชุดกรองแก้วสุญญากาศ

3.3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

3.3.2.1 จานเลี้ยงเชื้อ

3.3.2.2 ตู้บ่มเชื้อ

3.3.2.3 หม้อนึ่งอัดไอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.4 ตู้ปลอดเชื้อ
3.3.2.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์
3.3.2.6 ไม้พันสำลี
3.3.2.7 ตู้อบลมร้อน
3.3.2.8 เวอร์เนียคาลิปเปอร์
3.3.2.9 ออโตปิเปต
3.3.2.10 แท่งแก้วรูปตัวแอล
3.3.2.11 ไมโครเวลเพลต
3.3.2.12 กระดาษกรอง เบอร์ 1
3.3.2.13 แผ่นดิสก์

3.3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการประเมินคุณภาพเนื้อปลานิล
3.3.3.1 ถาดพลาสติกสำหรับแช่เนื้อปลา
3.3.3.2 ถุงโพลีเอทิลีน
3.3.3.3 ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ
3.3.3.4 เครื่องวัดค่าเป็นกรด – ด่าง
3.3.3.5 เครื่องวัดค่าสี
3.3.3.6 เครื่องวัดเนื้อสัมผัส
3.3.3.7 ชุดสกัดไขมัน
3.3.3.8 เครื่องอ่านไมโครเพลท
3.3.3.9 เครื่องกลั่นโปรตีน
3.3.3.10 เครื่องปั่นเหวี่ยง
3.3.3.11 ชุดทดสอบทางประสาทสัมผัส

3.4 สารเคมี

3.4.1 Ethanol 95 %
3.4.2 Dimethyl sulfoxide (DMSO)
3.4.3 Streptomycin
3.4.4 Gentamycin
3.4.5 McFarland Standard 0.5
3.4.6 0.1% peptone
3.4.7 0.85% Sodium chloride (NaCl)
3.4.8 0.375% TBA
3.4.9 15% TCA
3.4.10 0.25 M HCl
3.4.11 7.5% trichloroacetic acid (TCA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.12 10% Sodium hydroxide
3.4.13 Indicator (methyl red ผสมกับ bromocresol green)
3.4.14 Petroleum ether
3.4.15 อาหารเลี้ยงเชื้อTryptic soy agar (TSA)
3.4.16 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA)
3.4.17 อาหารเลี้ยงเชื้อTryptic soy broth (TSB)
3.4.18 อาการเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

3.5 การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำต้นน้ำนมราชสีห์แยกส่วนของพืชออกเป็นลำต้น ใบ ราก และดอก นำทุกส่วนของพืชไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C จากนั้นทำการบด และนำตัวอย่างแต่ละส่วนทำเป็นลูกประคบ โดยชั่งน้ำหนักส่วนใบ และต้น 450 กรัม ดอก และราก 300 กรัม และสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วน 1:8 เก็บไว้ในที่มืด และเขย่าวันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 3 วัน หลังจาก 3 วัน ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารสกัดหยาบรวมกันแล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง จากนั้นนำไประเหยด้วยเครื่องกลั่นแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) โดยใช้อุณหภูมิ 40 °C จะได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะหนืดสีเขียวเข้มใสขวดสีชา และเก็บในโถดูดความชื้นเพื่อระเหยตัวทำละลายออกให้หมด แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ และเก็บสารสกัดหยาบไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

3.6 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์ โดยวิธี Agar disc diffusion

เตรียมสารสกัดหยาบให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100, 200, 300, 400 และ 500 mg/mL โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ (Pisano *et al.*, 2016) แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Micrococus* sp., *Staphylococcus aureus* และ *Bacilus subtilis* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp. และ *Escherichia coli*

3.7 การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum inhibitory concentration; MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration; MBC)

การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) โดยนำสารสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ จากต้นน้ำนมราชสีห์เจือจางด้วยอาหารเหลวแบบสองเท่า เติมลงในไมโครเวลเพลท 96 หลุม หลุมละ 100 µL เติมอาหารเหลว หลุมละ 100 µL จากนั้นเติมเชื้อที่ใช้ทดสอบ หลุมละ 100 µL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16 - 18 ชม. เมื่อครบเวลาที่กำหนดไมโครเวลเพลท 96 หลุมวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 595 nm. (Okeke *et al.*, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) นำสารสกัดหยาบในหลุมที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียโดยมีลักษณะใสไม่มีความขุ่นจากการทดลอง MIC ไป spread plate บนอาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16 - 18 ชม. ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่สามารถฆ่าเชื้อได้ก็จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำค่า MIC ที่ดีที่สุดทำการประยุกต์ใช้กับเนื้อปลานิลเพื่อประเมินคุณภาพต่อไป

3.8 การประเมินคุณภาพในเนื้อปลานิล

นำปลานิล มาทำการล้างด้วยน้ำสะอาด และแล่ตัวอย่างเนื้อปลาขนาด 15 x 15 ซม. โดยมีน้ำหนัก 100 ถึง 150 กรัม เก็บที่อุณหภูมิ 8 °C แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ แช่เนื้อปลาในน้ำกลั่น (ตัวควบคุม) และแช่เนื้อปลาในสารสกัดหยาบเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปบรรจุในถุงโพลีเอทิลีน และเก็บที่ 8 °C เป็นเวลา 14 วัน โดยทำการตรวจผลในวันที่ 0, 7 และ 14 (Wenqian *et al.*, 2018)

3.8.1 วิเคราะห์คุณภาพกายภาพ

3.8.1.1 การวิเคราะห์สี

นำตัวอย่างเนื้อปลานิลขนาด 3 x 3 เซนติเมตรในแต่ละชุดการทดลองมาทำการวิเคราะห์สีบนพื้นผิวของตัวอย่างด้วยเครื่อง color meter และแสดงผลเป็นค่า L * (ความสว่าง) a * (สีแดง) และ b * (สีเหลือง) (Wenqian *et al.*, 2017)

3.8.1.2 การหาค่า pH

นำตัวอย่างเนื้อปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง ต้มในน้ำกลั่นเดือด แล้วตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำทำการวิเคราะห์หาค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter (Mengsha *et al.*, 2014)

3.8.1.3 การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส

นำตัวอย่างปลานิล 1 x 1 x 1 นิ้วในแต่ละชุดการทดลองมาทำการวิเคราะห์เนื้อสัมผัสด้วยเครื่อง texture analyzer โดยใช้หัววัดชนิด Stainless steel cylindrical No. P/5 วัดตามแนวขวางของเส้นใยกล้ามเนื้อ (Mengsha *et al.*, 2014)

3.8.2 การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างด้วยเทคนิค Pour plate

นำตัวอย่างเนื้อปลานิลน้ำหนัก 25 g ในแต่ละชุดการทดลอง มาทดสอบทางชีวภาพในวันที่ 0, 7 และ 14 ผสมกับ 0.1% peptone ปริมาตร 225 mL ลงถุงพลาสติกปราศจากเชื้อและตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหาร เวลา 1 นาที เจือจางตัวอย่าง จากนั้นทำการ Pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) และบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 – 48 ชม. ตรวจผลโดยการนับโคโลนีบนจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 25 – 250 โคโลนีคำนวณในรูปของ CFU/g (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2557)

3.8.3 การประเมินคุณภาพทางเคมีในเนื้อปลานิล

3.8.3.1 การทดสอบ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

นำตัวอย่างปลาที่ผ่านการบดแล้วมา 0.5 กรัมผสมกับ 2.5 mixture (0.375% TBA, 15% TCA, 0.25 M HCl) ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที รอให้เย็นจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3600 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรโดยเครื่อง spectrophotometer

3.8.3.2 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total Volatile Basic Nitrogen : TVB-N) ด้วยวิธีการกลั่น (distillation) (Pierre and Martine, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่งตัวอย่างเนื้อปลา 100 กรัม และเติม 7.5% trichloroacetic acid (TCA) 200 มิลลิลิตร ปั่นเนื้อปลาให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย โฮโมจีไนเซอร์ที่ความเร็วสูงนาน 1 นาทีจากนั้นปั่น เหวี่ยงที่ 4000 rpm นาน 15 นาทีนำส่วนใส 25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดกลั่น ทำการกลั่นด้วย Kjeldahl-type distillator เติม 10% โซเดียมไฮดอกไซด์ 6 มิลลิลิตร ลงในหลอดกลั่น ระวังอย่าให้เนื้อปลาติดที่ด้านข้างหลอด จากนั้นนำบีกเกอร์ที่บรรจุ 4% กรดบอริค 10 มิลลิลิตร และหยดโปรตีน อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด (methyl red ผสมกับ bromocresol green) จะสังเกตเห็นว่าสารละลายกรดบอริคจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว จากนั้นไทเทรตกับ 0.1 N กรดซัลฟูริค จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู คำนวณ TVB-N จาก (แสดงค่าออกเป็น mg TVB-N/100 g ตัวอย่าง)

$$\text{mg TVB-N} = \frac{\text{ปริมาณของกรดที่ใช้} \times 14 \times \text{ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ไทเทรต}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้}}$$

3.8.3.3 การวิเคราะห์หาไขมัน (crude fat) (AOAC, 1999)

ชั่งน้ำหนักของฟลาสต์สกัดไขมัน และตัวอย่างเนื้อปลา 5 กรัม ใส่ทิมเบิล (thimble) เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ลงในฟลาสต์สำหรับสกัดไขมัน 150 มิลลิลิตร จากนั้นนำทิมเบิลใส่ลงไปวางฟลาสต์ลงในเครื่องสกัดไขมัน ทำการสกัดประมาณ 2 ชั่วโมง แยกเอาฟลาสต์ออกจากเครื่องสกัดแล้วใช้คีมคีบทิมเบิลที่ใส่ตัวอย่างเนื้อปลาออกจากฟลาสต์ นำฟลาสต์ไประเหยเอาปิโตรเลียมอีเทอร์ออกแล้วอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนกว่าตัวทำละลายจะระเหยหมด จากนั้นทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก

$$\text{คำนวณหาปริมาณไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักไขมัน}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

3.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบจากข้อ 3.5 มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas Chromatograph - Mass Spectrometer (GC-MS) (Hewlett Packard 247 HP6890/5973) ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทำการวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ DB-5 ขนาด 30 m. x 250 pm. X 0.25 pm. อุณหภูมิเริ่มต้น 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จนกระทั่งถึง 150 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในอัตรา 10 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอุณหภูมิสุดท้ายเป็น 260 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิของสารที่เข้า เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส ช่วงมวลในการวิเคราะห์ 30 – 500 Atomic mass unit ดัดแปลงวิธีการจาก Yang *et al.*, 2019

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10 การทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส

กำหนดผู้ทดสอบจำนวน 30 คน ให้คะแนนความชอบ (Hedonic scale)ลักษณะทั่วไป กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับ โดยคะแนน 5 = ชอบมากที่สุด 4 = ชอบมาก 3 = ชอบปานกลาง 2 = ชอบน้อย และ 1 = ไม่ชอบเลย (Watt *et al.*, 1989)

3.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลจากทั้งสามการทดลองจะรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ข้อมูลจะถูกวิเคราะห์ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และการทดสอบ Duncan post test และการทดสอบ T-test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics software ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้

นำส่วนประกอบจากน้ำนมราชสีห์ 4 ส่วน ได้แก่ ต้น ใบ ดอก และราก ทำให้แห้งแล้วบดละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพรความเร็วสูง จำนวน 450 450 300 และ 300 กรัม ตามลำดับ มาทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมีร้อยละปริมาณของสารสกัดหยาบ ที่ได้มากที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดหยาบจากต้น ราก และดอก โดยร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ ร้อยละเท่ากับ 3.73, 2.83, 2.56 และ2.04 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดหยาบจากใบ ต้น ราก และดอก ของต้นน้ำนมราชสีห์

สารสกัดหยาบ	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ปริมาณสารสกัดหยาบ (กรัม)	ร้อยละปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้
ใบ	450	16.77	3.73
ต้น	450	12.75	2.83
ราก	300	7.70	2.56
ดอก	300	6.12	2.04

จากสารสกัดหยาบจากน้ำนมราชสีห์ พบว่า ร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ของสารสกัดหยาบจากใบของน้ำนมราชสีห์มีปริมาณมากที่สุด เนื่องจากส่วนใบของพืชมีรงควัตถุชนิดต่างๆ ที่อยู่บนไทลาคอยด์จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มมีการเกาะตัวอยู่กับโปรตีนหลายชนิดซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์แสง รวมทั้งความชื้นในใบยิ่งความชื้นต่ำ ร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้จะมีค่าสูง จึงทำให้สารสกัดหยาบจากใบมีร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้สูง (Asha, 2015) ในขณะที่ร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ของต้นราก และดอกมีร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้น้อยกว่าใบตามลำดับ เนื่องสารสกัดหยาบส่วนดอก ราก ลำต้นมีองค์ประกอบของสารบางชนิด เป็นสารในกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งจะละลายในเอทานอลได้ไม่ดีส่งผลให้ร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้มีปริมาณน้อย (จันทร์เพ็ญ, 2559) อย่างไรก็ตามร้อยละปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบ แต่จะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีที่พบในแต่ละส่วนของพืช

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion

จากการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์โดยวิธี Agar disc diffusion ในการยับยั้งของแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Micrococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., และ *Vibrio* sp. โดยใช้สารสกัดหยาบจากส่วนประกอบของต้นน้ำนมราชสีห์ที่แตกต่างกัน ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500 mg/mL พบว่า สารสกัดหยาบจากใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และต้นมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ได้มากที่สุด โดยความเข้มข้นอยู่ช่วง 400 – 500 mg/mL สารสกัดหยาบจากราก และดอกมีฤทธิ์ในต้านจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 500 mg/mL แสดงในดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion

เชื้อทดสอบ	ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)					
	Positive control	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)				
		100	200	300	400	500
Bacillus subtilis	20.35 ± 0.43					
ใบน้ำนมราชสีห์		-	9.21±1.78^{b}	10.87±0.61^{ab}	11.96±0.94^{a}	12.44±1.37^{a}
ต้นน้ำนมราชสีห์		-	5.09±4.44^{a}	7.69±1.13^{a}	8.32±1.58^{a}	9.03±1.66^{a}
ดอกน้ำนมราชสีห์		-	-	-	-	7.77± 0.72^{a}
รากน้ำนมราชสีห์		-	-	2.58±4.47^{b}	5.09±4.54^{ab}	8.76±1.25^{a}
Micrococcus sp.	26.56 ±1.20					
ใบน้ำนมราชสีห์		-	10.17±3.23^{ab}	11.63±3.46^{ab}	13.02±3.29^{a}	16.41±4.83^{a}
ต้นน้ำนมราชสีห์		-	-	4.32±3.98^{a}	4.74±4.52^{a}	5.94±6.09^{a}
ดอกน้ำนมราชสีห์		-	-	-	-	1.20±2.07^{a}
รากน้ำนมราชสีห์		-	1.02±1.78^{ab}	6.60±6.24^{ab}	7.25±6.49^{ab}	9.45±5.43^{a}
Staphylococcus aureus	19.16 ±0.04					
ใบน้ำนมราชสีห์		-	8.52±1.45^{c}	10.67±0.79^{b}	11.12±0.16^{b}	12.57±0.59^{a}
ต้นน้ำนมราชสีห์		-	2.67±4.62^{a}	2.68±4.65^{a}	2.83±4.90^{a}	3.24±5.61^{a}
ดอกน้ำนมราชสีห์		-	-	-	0.95±1.65^{ab}	2.79±2.49^{a}
รากน้ำนมราชสีห์		-	-	-	-	1.37±2.37^{a}
Escherichia coli	28.97 ±0.22	-	-	-	-	-
ใบน้ำนมราชสีห์		5.99±5.99^{b}	10.26±10.26^{ab}	11.66±11.66^{a}	12.22 ±12.22^{a}	14.17 ±14.17^{a}
ต้นน้ำนมราชสีห์		-	2.15±3.72^{a}	2.49±4.31^{a}	2.61±4.51^{a}	2.14±3.71^{a}
ดอกน้ำนมราชสีห์		-	-	-	1.66±1.66^{a}	2.59±2.58^{a}
รากน้ำนมราชสีห์		-	-	0.99±1.72^{a}	6.07±5.26^{a}	6.75±5.85^{a}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion (ต่อ)

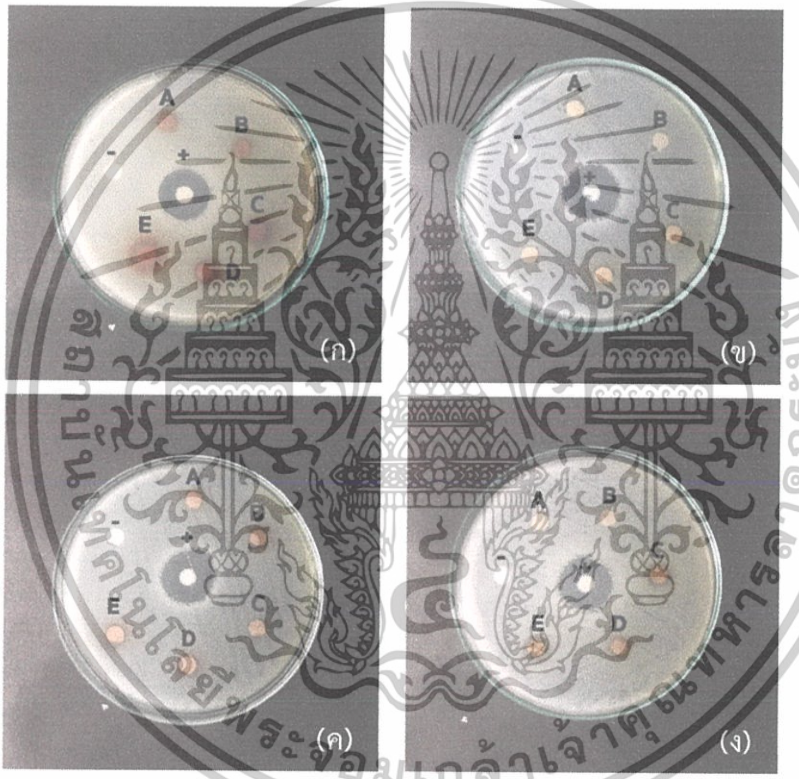
เชื้อทดสอบ	ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)					
	Positive control	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)				
		100	200	300	400	500
Pseudomonas sp.	26.03 ± 0.11					
ใบน้ำนมราชสีห์		3.48 ± 6.02^{b}	8.86 ± 2.05^{ab}	10.63 ± 1.83^{a}	11.26 ± 0.66^{a}	14.63 ± 0.61^{a}
ต้นน้ำนมราชสีห์		-	1.02 ± 1.76^{a}	2.10 ± 3.64^{a}	2.06 ± 3.57^{a}	2.37 ± 4.10^{a}
ดอกน้ำนมราชสีห์		-	-	-	3.05±5.28^{a}	3.07 ± 5.31^{a}
รากน้ำนมราชสีห์		1.36 ± 2.36^{a}	3.75 ± 6.50^{a}	3.77 ± 6.52^{a}	3.31 ± 5.74^{a}	3.11 ± 5.39^{a}
Vibrio sp.	25.71 ±0.38					
ใบน้ำนมราชสีห์		9.74 ± 1.06^{b}	9.81 ± 0.30^{b}	11.14 ±0.75^{b}	12.33±1.63^{ab}	14.94±2.81^{a}
ต้นน้ำนมราชสีห์		1.40 ± 2.42^{a}	1.02 ± 1.76^{a}	5.76 ± 5.18^{a}	5.37 ± 4.65^{a}	7.22 ± 6.30^{a}
ดอกน้ำนมราชสีห์		-	-	2.59 ± 4.48^{a}	2.77 ± 4.80^{a}	6.54 ± 5.67^{a}
รากน้ำนมราชสีห์		5.93 ± 10.28^{a}	1.55 ± 2.68^{a}	3.77 ± 6.52^{a}	4.97 ± 4.43^{a}	5.51 ± 4.94^{a}

หมายเหตุ : เครื่องหมาย – หมายถึง ไม่เกิดการยับยั้ง
ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวนอนที่ต่างกัน บ่งบอกความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ของสารสกัดหยาบจากใบ ต้น ราก และดอก น้ำนมราชสีห์

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ของสารสกัดหยาบจากใบ ต้น ราก และดอก น้ำนมราชสีห์ พบว่าสารสกัดหยาบจากใบ มีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด ที่ความเข้มข้น 100-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 7.95-12.10 mm. รองลงมาสารสกัดหยาบจากต้น มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 200-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 7.54 - 10.12 mm. สารสกัดหยาบจากราก มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 300-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 7.89-9.52 mm. และสารสกัดหยาบจากดอก มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 8.57 mm. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ของสารสกัดหยาบจากใบ (ก) ต้น (ข) ราก (ค) และดอก (ง) ของต้นน้ำนมราชสีห์ ที่ความเข้มข้น

(A) : ความเข้มข้น 100mg/mL ; (B) : ความเข้มข้น 200 mg/mL

(C) : ความเข้มข้น 300 mg/mL ; (D) : ความเข้มข้น 400 mg/mL

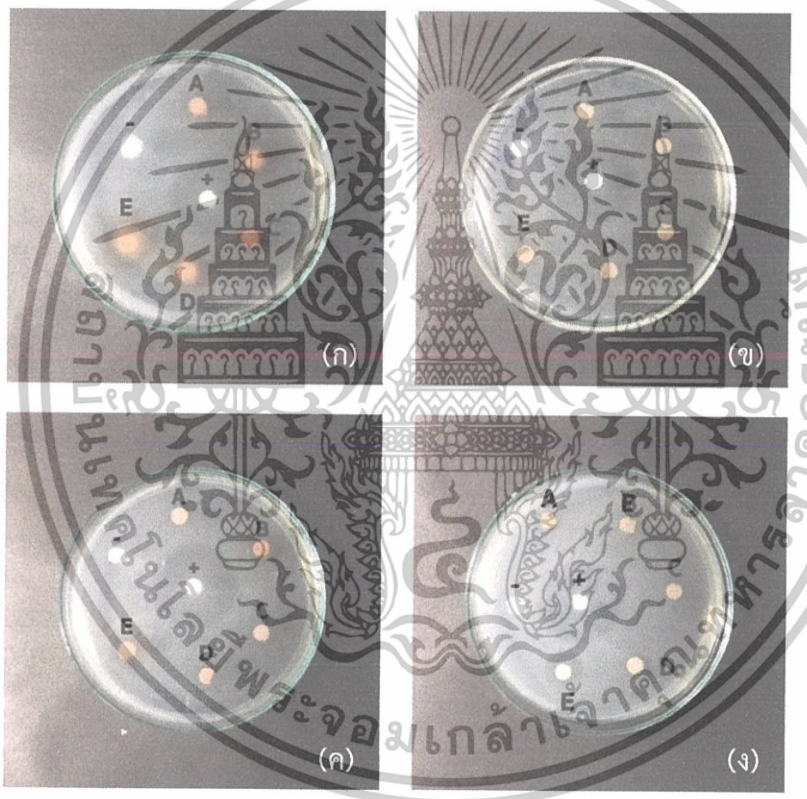
(D) : ความเข้มข้น 500 mg/mL ; (+) : Positive control (Gentamicin)

(-) : Negative control (DMSO)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 1261ของสารสกัดหยาบจากใบ ต้น ราก และดอก น้ำนมราชสีห์

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 1261ของสารสกัดหยาบจากใบ ต้น ราก และดอก น้ำนมราชสีห์ พบว่าสารสกัดหยาบจากใบ มีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด ที่ความเข้มข้น 200-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 10.18-13.67 mm. รองลงมาสารสกัดหยาบจากต้น มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 200-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 7.11-9.30 mm. สารสกัดหยาบจากราก มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 300-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 9.24-10.17 mm. และสารสกัดหยาบจากดอก มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 100-200 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 8.13-8.56 mm. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 1261 ของสารสกัดหยาบจากใบ (ก) ต้น (ข) ราก (ค) และดอก (ง) ของต้นน้ำนมราชสีห์ ที่ความเข้มข้น

(A) : ความเข้มข้น 100mg/mL ; (B) : ความเข้มข้น 200 mg/mL

(B) : ความเข้มข้น 300 mg/mL ; (D) : ความเข้มข้น 400 mg/mL

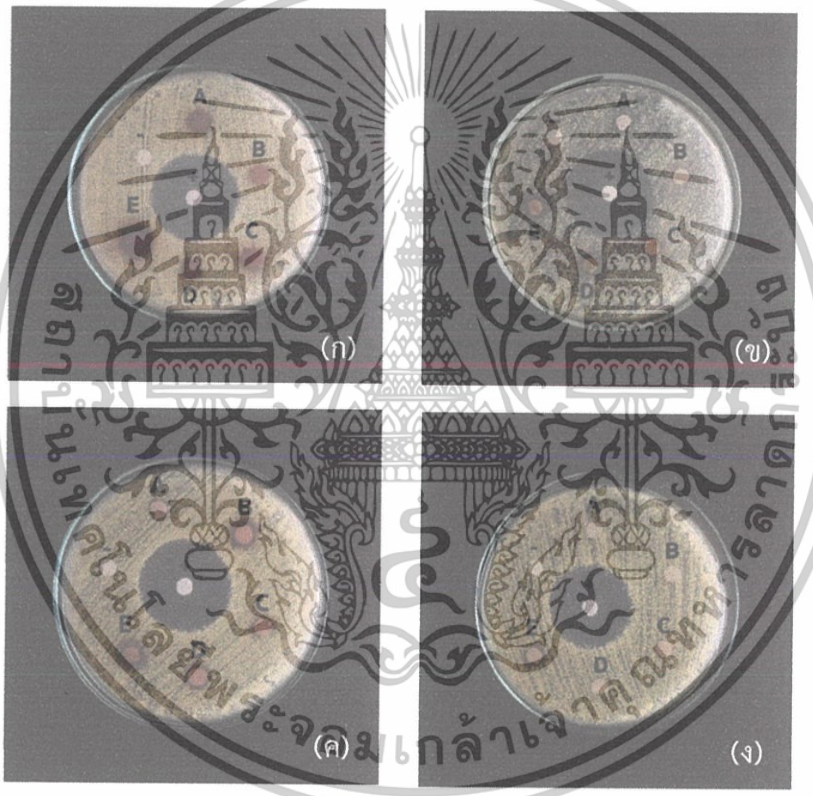
(C) : ความเข้มข้น 500 mg/mL ; (+) : Positive control (Gentamicin)

(-) : Negative control (DMSO)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus* sp. ของสารสกัดหยาบจากใบ ต้น ราก และดอก น้ำนมราชสีห์

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus* sp. ของสารสกัดหยาบจากใบ ต้น ราก และดอก น้ำนมราชสีห์ พบว่าสารสกัดหยาบจากใบ มีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด ที่ความเข้มข้น 100-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 10.39-19.90 mm. รองลงมาสารสกัดหยาบจากราก มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 200-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 7.37-11.50 mm. สารสกัดหยาบจากต้น มีฤทธิ์ยับยั้ง ที่ความเข้มข้น 300-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 7.85-12.12 mm. และสารสกัดหยาบจากดอกมีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 7.10 mm. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus* sp. ของสารสกัดหยาบจากใบ (ก) ต้น (ข) ราก (ค) และดอก (ง) ของต้นน้ำนมราชสีห์ ที่ความเข้มข้น

(A) : ความเข้มข้น 100mg/mL ; (B) : ความเข้มข้น 200 mg/mL

(B) : ความเข้มข้น 300 mg/mL ; (D) : ความเข้มข้น 400 mg/mL

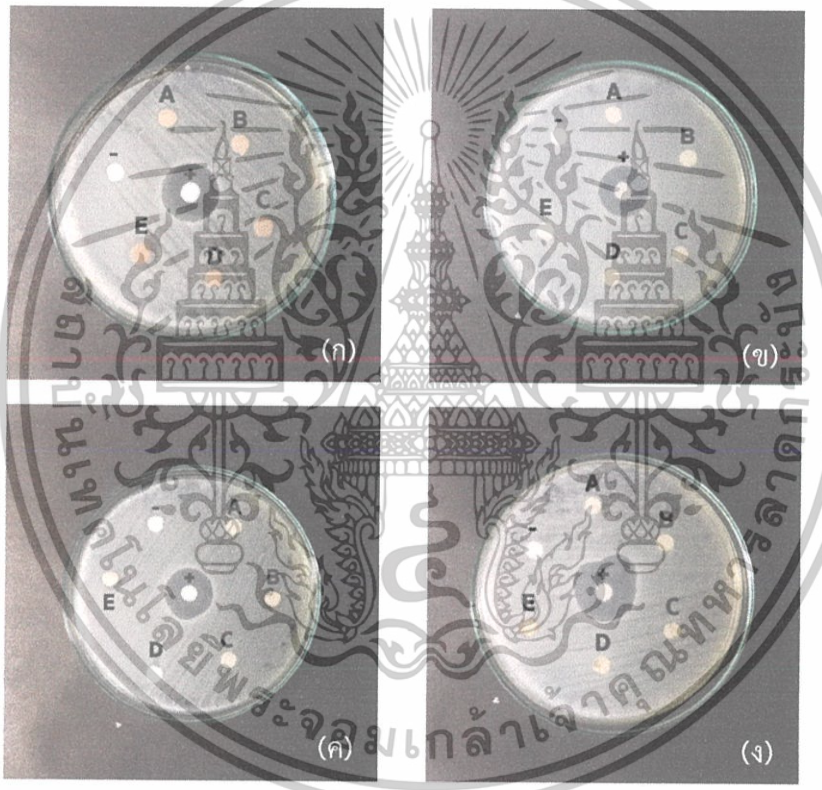
(C) : ความเข้มข้น 500 mg/mL ; (+) : Positive control (Gentamicin)

(-) : Negative control (DMSO)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบจากใบ ต้น ราก และดอก น้ำนมราชสีห์

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบจากใบ ต้น ราก และดอก น้ำนมราชสีห์ พบว่าสารสกัดหยาบจากใบ มีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด ที่ความเข้มข้น 200-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 9.07-12.97 mm. รองลงมาสารสกัดหยาบจากต้น มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 200-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 8.64-10.26 mm. สารสกัดหยาบจากดอก มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 400-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 7.21-7.58 mm. และสารสกัดหยาบจากราก มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 8.60 mm. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบจากใบ (ก) ต้น (ข) ราก (ค) และดอก (ง) ของต้นน้ำนมราชสีห์ ที่ความเข้มข้น

(A) : ความเข้มข้น 100mg/mL ; (B) : ความเข้มข้น 200 mg/mL

(B) : ความเข้มข้น 300 mg/mL ; (D) : ความเข้มข้น 400 mg/mL

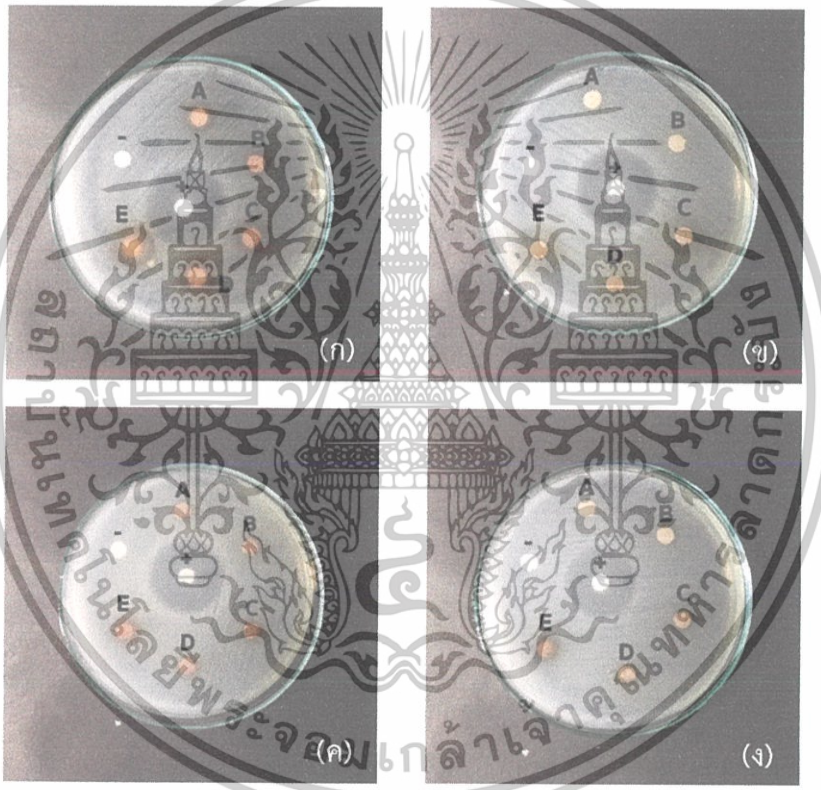
(C) : ความเข้มข้น 500 mg/mL ; (+) : Positive control (Gentamicin)

(-) : Negative control (DMSO)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* sp. ของสารสกัดหยาบจากใบ ต้น ราก และดอก น้ำนมราชสีห์

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* sp. ของสารสกัดหยาบจากใบ ต้น ราก และดอก น้ำนมราชสีห์ พบว่าสารสกัดหยาบจากใบ มีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด ที่ความเข้มข้น 100-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 10.43-15.26 mm. รองลงมาสารสกัดหยาบจากต้น มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 200-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 6.09-7.11 mm. สารสกัดหยาบจากราก มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 100-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 8.17-9.33 mm. และสารสกัดหยาบจากดอก มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 400-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 9.14-9.20 mm. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ของสารสกัดหยาบจากใบ (ก) ต้น (ข) ราก (ค) และดอก (ง) ของต้นน้ำนมราชสีห์ ที่ความเข้มข้น

(A) : ความเข้มข้น 100mg/mL ; (B) : ความเข้มข้น 200 mg/mL

(B) : ความเข้มข้น 300 mg/mL ; (D) : ความเข้มข้น 400 mg/mL

(C) : ความเข้มข้น 500 mg/mL ; (+) : Positive control (Gentamicin)

(-) : Negative control (DMSO)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Vibrio* sp. ของสารสกัดหยาบจากใบ ต้น ราก และดอกน้ำนมราชสีห์

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Vibrio* sp.ของสารสกัดหยาบจากใบ ต้น ราก และดอกน้ำนมราชสีห์ พบว่าสารสกัดหยาบจากใบ มีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด ที่ความเข้มข้น 100-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 10.95-13.50 mm. รองลงมาสารสกัดหยาบจากต้น มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 100-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 7.23-10.03 mm. สารสกัดหยาบจากราก มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 100-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 8.51-9.53 mm. และสารสกัดหยาบจากดอกมีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 100-500 mg/mL บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 8.32-9.59 mm. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.6

รูปที่ 4.6 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio* sp. ของสารสกัดหยาบจากใบ (ก) ต้น (ข) ราก (ค) และดอก (ง) ของต้นน้ำนมราชสีห์ ที่ความเข้มข้น

(A) : ความเข้มข้น 100mg/mL ; (B) : ความเข้มข้น 200 mg/mL

(B) : ความเข้มข้น 300 mg/mL ; (D) : ความเข้มข้น 400 mg/mL

(C) : ความเข้มข้น 500 mg/mL ; (+) : Positive control (Gentamicin)

(-) : Negative control (DMSO)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้

จากการศึกษาการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ โดยนำสารสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ จากต้นน้ำนมราชสีห์เจือจางแบบสองเท่าด้วยอาหารเหลว ให้ได้ความเข้มข้น 1.95 – 500 mg/mL พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนต้นมีค่า MIC ต่อเชื้อ *B. subtilis* และ *Pseudomonas* sp. ต่ำสุดเท่ากับ 250 mg/mL จากสกัดหยาบส่วนใบมีค่า MIC ต่อเชื้อ *Vibrio* sp. ต่ำสุดเท่ากับ 62.50 mg/mL สารสกัดหยาบส่วนดอก และราก ค่า MIC ต่อเชื้อ *Vibrio* sp. ต่ำสุดเท่ากับ 500 mg/mL และจากการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) สารสกัดหยาบส่วนใบมีค่า MBC ต่อเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด โดยเฉพาะเชื้อ *Vibrio* sp. เท่ากับ 62.50 mg/mL จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดหยาบส่วนใบมีผลในการยับยั้งมากที่สุดจึงนำประยุกต์ใช้ในการทดสอบกับเนื้อปลานิลต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum Bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์

เชื้อทดสอบ	ต้น		ดอก		ใบ		ราก	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
B. subtilis	250	500	>500	>500	500	500	>500	>500
Micrococcus sp.	500	>500	>500	>500	500	250	>500	>500
S. aureus	>500	>500	>500	500	250	125	>500	>500
E. coli	>500	500	>500	>500	500	500	>500	>500
Pseudomonas sp.	250	500	>500	500	250	250	500	>500
Vibrio sp.	500	500	500	>500	62.50	62.50	500	500

หมายเหตุ : Positive Control ; Gentamicin MICs (Gram Positive) 100 µg/mL ; Streptomycin (Gram Negative) 100 µg/mL

จากผลการทดสอบนี้ ในส่วนของสายพันธุ์ *E. hirta* ทั้ง 4 ส่วน สามารถยับยั้งเชื้อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ใช้ในการทดสอบทุกชนิดโดยสารสกัดหยาบจากใบมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากต้น ดอก และราก ด้วยค่า MIC ที่ต่ำกว่า เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ ได้แก่ Glycerin, Hexadecanoic Acid, Hexadecanamide และ Alpha-amyrin สารทั้ง 4 ชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยเฉพาะ *E. coli* และ*S. aureus* (Biskup *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตามผลในฤทธิ์ต้านของสารสกัดหยาบจากพืชมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความเข้มข้นของสารประกอบที่มีฤทธิ์ (active components) เนื่องจากองค์ประกอบของพืชที่แตกต่างกัน ความหลากหลายในการสกัด เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และความต้านทานของจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography – Mass spectrometer (GC-MS)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากดอก ใบ ราก และลำต้นของต้นน้ำนมราชสีห์ โดยใช้เครื่อง Gas chromatography – Mass spectrometer (GC - MS) พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากทั้ง 4 ส่วน ได้แก่ Glycerin, Hexadecanoic acid, Hexadecanamide และ 9-Octadecenamide องค์ประกอบทางเคมีที่พบเฉพาะในใบ และต้นน้ำนมราชสีห์ พบ 3 ชนิด ได้แก่ γ-sitosterol, Napthalene, α-amyrin และฤทธิ์ของสารสกัดหยาบองค์ประกอบทางเคมีที่พบเฉพาะในใบน้ำนมราชสีห์ ได้แก่ 2(4H)-Benzofuranone แสดงผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography – Mass spectrometer (GC-MS) ของสารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์

ลำดับที่	สารประกอบทางเคมี	ปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบ (%)			
		ใบ	ต้น	ราก	ดอก
1	2-Propanone	-	0.495	0.828	0.557
2	Glycerin	3.589	0.525	2.080	0.897
3	2, 3-Dihydro-3, 5-dihydroxy-6-metyl-4H-pyran-4-one	-	0.801	0.449	0.801
4	2-Furancarboxaldehyde	1.313	-	0.311	0.581
5	2-Methoxy-4-vinylphenol	-	0.813	0.206	-
6	Ethyl. α-d-glucopyranoside	3.299	-	1.046	3.779
7	2(4H)-Benzofuranone	0.787	-	-	-
8	Phenol	-	1.862	-	-
9	Hexadecanoic acid	2.650	1.054	3.937	3.336
10	9- Octadecenoic acid	-	0.625	2.120	1.719
11	Phytol	4.546	-	-	0.523
12	9, 12, 15-Octadecatrien-1-ol	1.825	-	3.472	4.309
13	9, 12, 15-octadecatrienoic acid	4.061	-	3.630	3.571
14	Hexadecanamide	3.221	1.189	3.426	4.094
15	Octadecanoic acid	1.521	-	0.582	0.932
16	9-Octadecenamide	38.510	16.544	48.735	45.221
17	Erucylamide	0.732	-	2.694	1.065
18	γ-sitosterol	0.943	6.206	-	-
19	Napthalene	0.948	4.108	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography – Mass spectrometer (GC-MS) ของสารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์ (ต่อ)

20	α-amyrin	1.634	7.989	-	-
21	9, 19-Cyclolanost-24-en-3-ol	9.411	40.586	2.452	-
22	Heptacosane	-	-	1.638	-

4.4.1 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบน้ำนมราชสีห์

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบน้ำนมราชสีห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีหลัก ได้แก่ Glycerin3.589%, 2-Furancarboxaldehyde 1.313%, Ethyl. α-d-glucopyranoside 3.299%, 2(4H)-Benzofuranone 0.787%, Hexadecanoic acid 2.650%, Phytol 4.546%, 9, 12, 15-Octadecatrien-1-ol 1.825%, 9, 12, 15-octadecatrienoic acid 4.061%, Hexadecanamide 3.221%, Octadecanoic acid 1.521%, 9-Octadecenamide 38.510%, Erucylamide 0.732%, γ-sitosterol 0.943%, Napthalene 0.948%, α-amyrin 1.634%, 9, 19-Cyclolanost-24-en-3-ol 9.411% ในนาทีที่ 6.285, 9.857, 17.966, 20.664, 23.167, 24.856, 25.104, 25.412, 25.504, 25.628, 27.182, 29.329, 33.753, 35.005, 37.811 และ 38.183 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.7

4.4.2 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบต้นน้ำนมราชสีห์

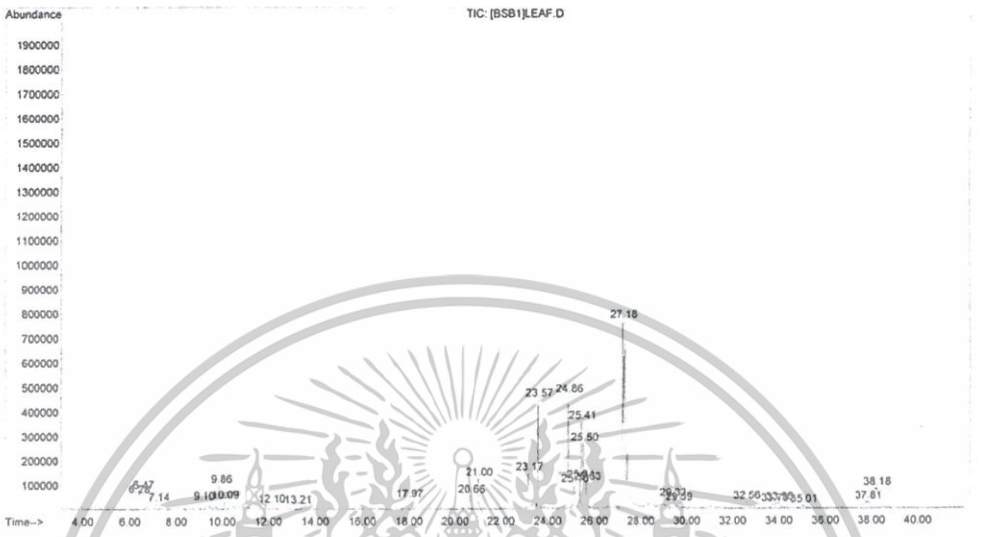
จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบต้นน้ำนมราชสีห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีหลัก ได้แก่ 2-Propanone 0.495%, Glycerin 0.525%, 2, 3-Dihydro-3, 5-dihydroxy-6-metyl-4H-pyran-4-one 0.801%, 2-Methoxy-4-vinylphenol 0.813%, Phenol 1.862%, Hexadecanoic acid 1.054%, 9- Octadecenoic acid 0.605%, Hexadecanamide 1.189%, 9-Octadecenamide 16.544%, γ-sitosterol 6.206%, Napthalene 4.108%, α-amyrin 7.989%, 9, 19-Cyclolanost-24-en-3-ol 40.586%, ในนาทีที่ 4.752, 6.279, 8.675, 10.094, 13.585, 23.173, 23.572, 25.504, 27.182, 33.824, 33.991,37.833, และ38.361 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.8

4.4.3 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบรากน้ำนมราชสีห์

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบรากน้ำนมราชสีห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีหลัก ได้แก่ 2-Propanone 0.828%,Glycerin 2.080%, 2, 3-Dihydro-3, 5-dihydroxy-6-metyl-4H-pyran-4-one 0.449%, 2-Furancarboxaldehyde 0.311%, 2-Methoxy-4-vinylphenol 0.206%, Ethyl. α-d-glucopyranoside 1.046%, Hexadecanoic acid 3.937%, 9-Octadecenoic acid 2.120%, 9, 12, 15-Octadecatrien-1-ol 3.472%, 9, 12, 15-octadecatrienoic acid 3.630%, Hexadecanamide 3.426%, Octadecanoic acid 0.582%, 9-Octadecenamide 48.735%, Erucylamide 2.694%, 9, 19-Cyclolanost-24-en-3-ol 2.452%, Heptacosane 1.638% ในนาทีที่ 4.474,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.425, 8.680, 9.862, 11.173, 18.015, 23.577, 24.727, 25.121, 25.412, 25.514, 26.588, 27.198, 29.340, 38.151, 31.050 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.9

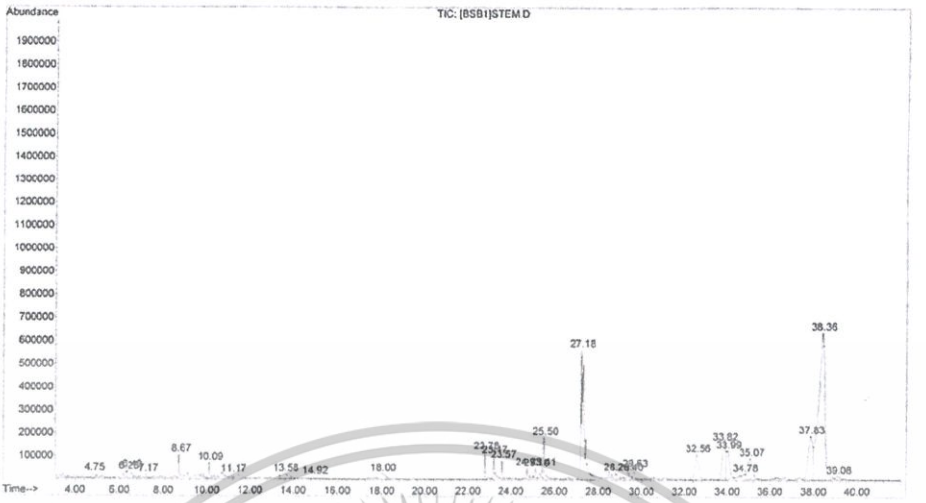


รูปที่ 4.7 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบน้ำนมราชสีห์

4.4.4 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบดอกน้ำนมราชสีห์

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบรากน้ำนมราชสีห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีหลัก ได้แก่ 2-Propanone 0.557%, Glycerin 0.897%, 2, 3-Dihydro-3, 5-dihydroxy-6-metyl-4H-pyran-4-one 0.801%, 2-Furancarboxaldehyde 0.581%, Ethyl. α-d-glucopyranoside 3.779%, Hexadecanoic acid 3.336%, 9- Octadecenoic acid 1.719%, Phytol 0.523%, 9, 12, 15-Octadecatrien-1-ol 4.309%, 9, 12, 15-octadecatrienoic acid 3.571%, Hexadecanamide 4.094%, Octadecanoic acid 0.932%, 9-Octadecenamide 45.221%, Erucylamide 1.065% ในนาทีที่ 4.752, 6.139, 9.857, 18.004, 23.567, 24.721, 24.851, 25.104, 25.407, 25.498, 25.662, 27.182, 29.399 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.10

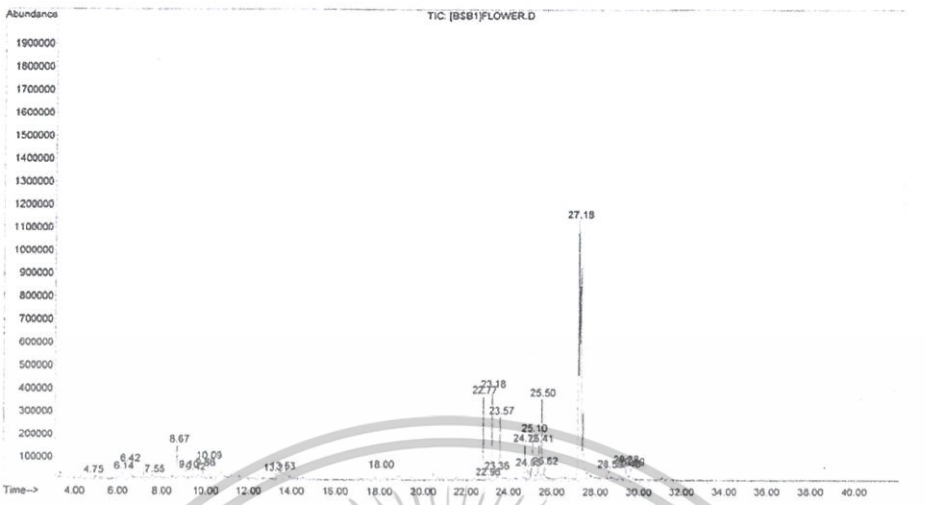
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากต้นน้ำนมราชสีห์

รูปที่ 4.9 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากรากน้ำนมราชสีห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากดอกน้ำนมราชสีห์

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของต้นน้ำนมราชสีห์ โดยจัดจำแนกตามกลุ่มการออกฤทธิ์ได้ดังนี้

1) องค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ของการยับยั้งจุลินทรีย์ พบ 4 ชนิด ได้แก่ Glycerin, Hexadecanoic Acid, Hexadecanamide และ α-amyrin สารทั้ง 4 ชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะ E. coli และ S. aureus มีศักยภาพเป็นลดอาการปวดอักเสบที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ นิยมนำมาใช้เป็นยาแก้ปวด ลดอาการอักเสบ (Biskup *et al.*, 2012 ; José Eduardo *et al.*, 2012 ; Sureshjani *et al.*, 2015 ; Zhong-hui *et al.*, 2010)

2) องค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระ พบ 2 ชนิด ได้แก่ 2(4)-Benzofuranone และ γ-sitosterol สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิรสระได้ดี สามารถพัฒนาเป็นยารักษาโรคเบาหวาน เนื่องจากมีกลุ่มโปรตีนที่แสดงให้เห็นว่านี่เป็นโมเลกุลที่ดี (Balamurugan *et al.*, 2012 ; Meng *et al.*, 2010)

3) องค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ของการยับยั้งจุลินทรีย์ และฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระ พบ 1 ชนิด ได้แก่ 9-Octadecenamide เป็นกรดไขมัน มีฤทธิ์ในการการยับยั้งจุลินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่เป็นยาแก้ปวด นอกจากนี้ และยังมีกิจกรรมทางชีวเคมีที่หลากหลาย มีคุณสมบัติคล้ายยากล่อมประสาท (Cheng *et al.*, 2010)

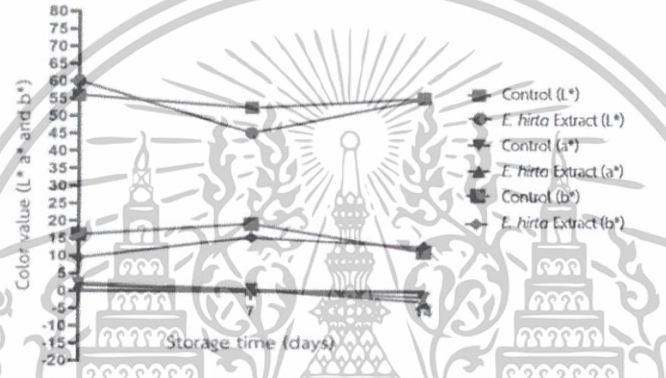
4) องค์ประกอบทางเคมีที่มีความเป็นพิษ (Toxic) พบ 1 ชนิด ได้แก่ Naphthalene เป็นโพลีอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่พบในน้ำมันดิน ถูกเสนอชื่อโดยสถาบันวิทยาศาสตร์สุขภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติจากผลของโปรแกรมพิษวิทยาแห่งชาติ (NTP) การศึกษาการสูดดมเป็นเวลาสองปีซึ่งได้ข้อสรุปว่าแนพทาลีนเป็นสารก่อมะเร็งในหนู Naphthalene ได้รับการประเมินโดยองค์การระหว่างประเทศเพื่อการวิจัยโรคมะเร็ง และจำแนกว่าอาจเป็นสารก่อมะเร็งต่อมนุษย์ (กลุ่ม 2B) จากหลักฐานเพียงพอของการก่อมะเร็งในสัตว์ (Thomas *et al.*, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาการประเมินคุณภาพในเนื้อปลานิล

4.5.1 การวิเคราะห์ค่าสี (L*,a*,b*)

เมื่อนำตัวอย่างปลาในแต่ละชุดการทดลองทำการวิเคราะห์สี ด้วยเครื่องวัดค่าสี (Color meter) พบว่า ค่าความสว่าง (L^*) ในเนื้อปลานิลที่แช่สารสกัดหยาบมีค่าความสว่างลดลงน้อยกว่าชุดควบคุม ค่าความเป็นสีแดง (a^*) ของชุดควบคุมมีค่าติดลบในวันที่ 7 ในขณะที่เนื้อปลาที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบยังมีค่าความเป็นบวก ค่าความเป็นสีเหลือง (b*) ของเนื้อปลาที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 ($p < 0.05$) พบว่า ค่า a* ของค่าสีมีค่าแปรปรวนค่อนข้างมาก เนื่องจากมีการติดสีของสารสกัดหยาบ และการเสื่อมสภาพของเนื้อปลาเมื่อเวลาผ่านไป ดังแสดงในรูปที่ 4.11

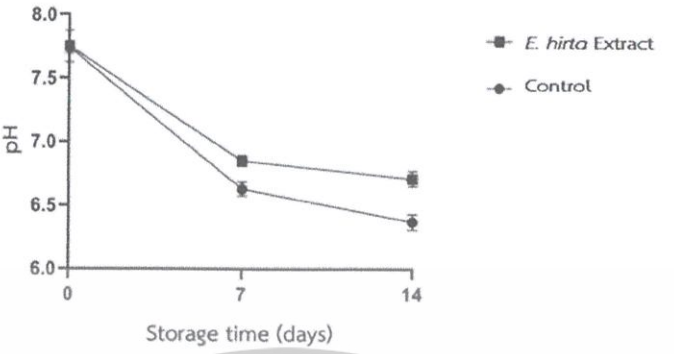


รูปที่ 4.11 การวิเคราะห์ค่าสี (L* a* b*) ในเนื้อปลานิลที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบและชุดควบคุมระหว่างระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เย็น

4.5.2 การวิเคราะห์ความเป็น pH

เมื่อนำตัวอย่างปลาในแต่ละชุดการทดลอง ทำการวิเคราะห์ค่า pH ด้วยเครื่อง pH Meter พบว่า ในวันที่ 0 ค่า pH ทั้งสองชุดการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 7.5 - 7.6 เมื่อเวลาผ่านไป pH ในเนื้อปลาที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าชุดควบคุม โดยค่า pH มีสภาพความเป็นกรดมากขึ้น ซึ่งเกิดจากการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตเกิดจากการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตที่ทำให้เน่าเสียและเกิดรสชาติเปรี้ยวจากกรดอินทรีย์ (Malle and Poumeyrol., 1989) ดังแสดงในรูปที่ 4.12

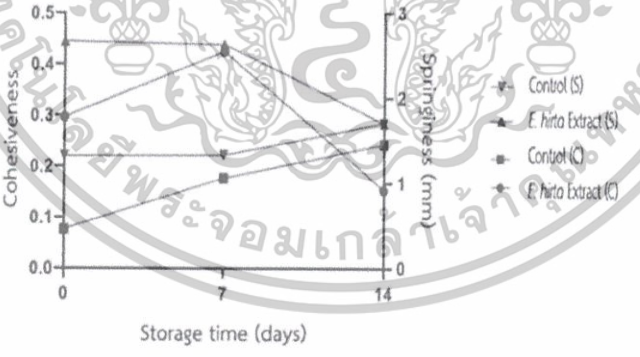
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 การวิเคราะห์ค่าความเป็น pH ในเนื้อปลานิลที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบและชุดควบคุม ระหว่างระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เย็น

4.5.3 การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส

เมื่อนำตัวอย่างเนื้อปลาในแต่ละชุดการทดลอง ทำการวิเคราะห์เนื้อสัมผัสด้วยเครื่อง texture analyzer พบว่าในวันที่ 7 ค่าความเหนียว และค่าความยืดหยุ่นของเนื้อปลานิล ชุดควบคุมและเนื้อปลานิลที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น หลังจากนั้นค่าความเหนียวและค่าความยืดหยุ่นมีค่าลดลง เนื่องจากเนื่องจากการตายของปลาทำให้เกิดการ autolysis จากนั้นเนื้อก็จะนิ่มลงและสูญเสียความยืดหยุ่นซึ่งเกิดจากจุลินทรีย์ ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย ดังแสดงในรูปที่ 4.13

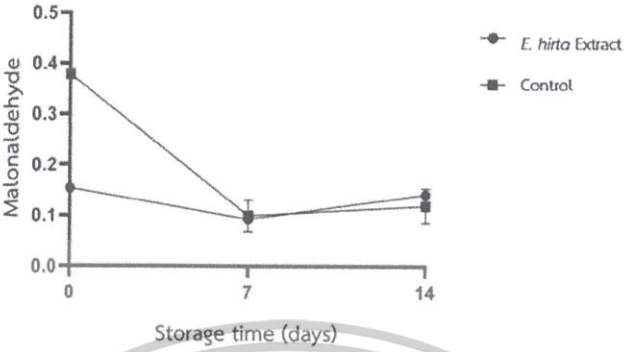


รูปที่ 4.13 การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส ในเนื้อปลานิลที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบและชุดควบคุม ระหว่างระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เย็น

4.5.4 การวิเคราะห์ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

จากการวิเคราะห์ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) พบว่าในวันที่ 7 ชุดควบคุมและสารสกัดหยาบ มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรเพิ่มขึ้น วันที่ 14 ค่า TBARS มีค่าลดลงเนื้อปลานิลที่แช่สารสกัดหยาบมีค่าลดลงมากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

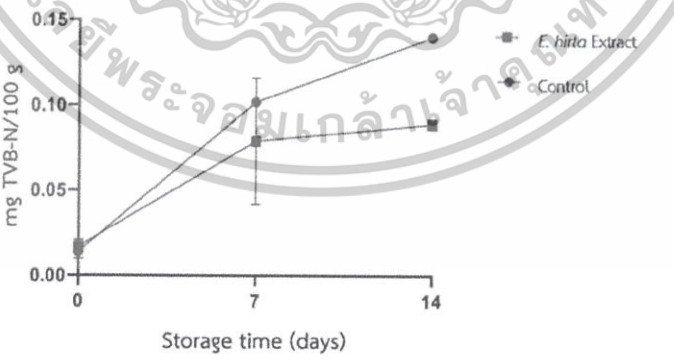


รูปที่ 4.14 การวิเคราะห์ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ในเนื้อปลานิลที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบ และชุดควบคุม ระหว่างระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เย็น

4.5.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total Volatile Basic Nitrogen; TVB-N)

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ปริมาณไนโตเจนที่ระเหย (TVB-N) ในเนื้อปลานิลจะเพิ่มขึ้นด้วย โดยในชุดควบคุมมีค่าสูงกว่าชุดที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบ ดังแสดงในรูปที่ 4.15

อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี การวิเคราะห์ TBARS การหาปริมาณTVB-N ค่าที่วิเคราะห์ได้เกิดจากการย่อยสลายของไกลโคเจน และการสร้างกรดอะมิโนอิสระ นำไปสู่การสะสมของ trimethylamine, dimethylamine, monoethylamine, แอมโมเนีย และสารระเหยอื่น ๆ จึงเกิดกลิ่นเหม็นในเนื้อปลา (Gao *et al.*, 2014)



รูปที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงของการวิเคราะห์ ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) ในเนื้อปลานิลที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบ และชุดควบคุม ระหว่างระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.6 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Crude fat)

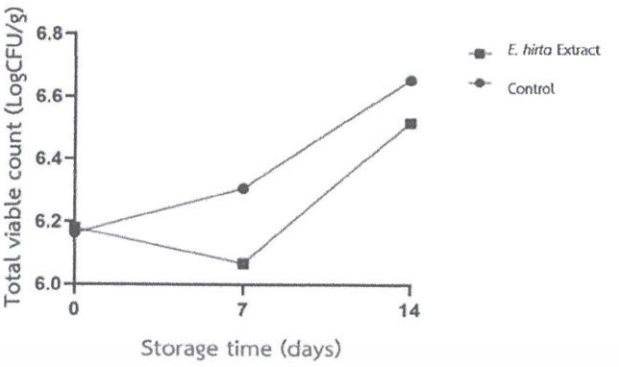
จากการวิเคราะห์ไขมันในวันที่ 0 พบว่าเนื้อปลานิลชุดควบคุมมีปริมาณไขมันน้อยกว่าเนื้อปลานิลที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบ เมื่อเวลาผ่านไปชุดควบคุมมีปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีค่าสูงกว่าชุดที่แช่สารสกัดหยาบ เนื่องจากในสารสกัดหยาบจากน้ำนมราชสีห์มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย จึงอาจมีผลในการชะลอการเน่าเสียในเนื้อปลาและชะลอการเกิดออกซิเดชั่นของไขมัน (Aytul, 2010) ทำให้ปริมาณไขมันในเนื้อปลาที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบ มีค่าไขมันต่ำกว่าชุดควบคุม นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ทำให้ค่าไขมันเพิ่มขึ้นได้แก่ เกิดจากสภาวะความเครียดของปลาก่อนตายเป็นสาเหตุในการเหม็นหืนในเนื้อปลา อีกทั้งขึ้นอยู่กับเพศและฤดูกาลด้วย (Secsi and Parisi, 2016) ดังแสดงในรูปที่ 4.16

รูปที่ 4.16 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Crude fat) ในเนื้อปลานิลที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบและชุดควบคุม ระหว่างระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เย็น

4.5.7 การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างด้วยเทคนิค Pour plate

นำตัวอย่างเนื้อปลานิลแต่ละชุดการทดลองเจือจางด้วย 0.1% peptone ทำการ Pour plate ตรวจผลโดยการนับโคโลนีอยู่ในช่วง 25 – 250 โคโลนี พบว่า เนื้อปลานิลที่แช่สารสกัดหยาบ ในวันที่ 7 จำนวนจุลินทรีย์ลดลง แต่ชุดควบคุมมีจำนวนของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น เนื่องจากอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่ออัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนจุลินทรีย์ ดังแสดงในรูป 4.17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างด้วยเทคนิค Pour plateในเนื้อปลานิล ที่ผ่านการแช่สารสกัดหยาบ และชุดควบคุม ระหว่างระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เย็น

4.5.7 การวิเคราะห์การยอมรับทางประสาทสัมผัส

4.5.7.1 สี

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสสำหรับการเก็บรักษาเนื้อปลานิลแบบแช่เย็นของชุดควบคุม และชุดแช่สารสกัดหยาบ เป็นเวลา 14 วัน เมื่อพิจารณาด้านความชอบด้านสีของเนื้อปลานิล ในวันที่ 0 7 และ 14 แต่ละชุดการทดลอง พบว่า ชุดควบคุม และชุดแช่สารสกัดหยาบของแต่ละวัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ยกเว้นชุดการทดลองวันที่ 7 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ผู้ทดสอบชื่นชอบสีของเนื้อปลานิลที่ระยะการเก็บรักษาในวันที่ 0 มากที่สุด โดยมีค่าการประเมินเท่ากับ 3.77 ± 0.50

4.5.7.2 กลิ่น

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสสำหรับการเก็บรักษาเนื้อปลานิลแบบแช่เย็น ของชุดควบคุม และชุดแช่สารสกัดหยาบ เป็นเวลา 14 วัน เมื่อพิจารณาด้านความชอบด้านกลิ่น พบว่า กลิ่นของเนื้อปลานิล ของชุดควบคุม ของแต่ละวันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) แต่ชุดแช่สารสกัดหยาบของวันที่ 0 7 และ14 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบชุดควบคุมกับชุดแช่สารสกัดหยาบของวันที่ 0 และ 14 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ยกเว้น วันที่ 7 ความชอบด้านกลิ่น ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) โดยมีค่าประเมินความชอบของกลิ่นมากที่สุด คือ ชุดควบคุมวันที่ 0 มีค่าอยู่ที่ 2.98 ± 0.31

4.5.7.3 รสชาติ

เมื่อพิจารณาคะแนนการประเมินทางประสาทสัมผัสการเก็บรักษาเนื้อปลานิลด้านรสชาติ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบรสชาติของชุดควบคุม กับชุดแช่สารสกัดหยาบของวันที่ 0 และ 7 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาชุดควบคุมของแต่ละวันในการทดสอบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 95 ($p < 0.05$) และผู้ทำการทดสอบชื่นชอบรสชาติของชุดแช่สารสกัดหยาบวันที่ 0 มากที่สุด มีค่าอยู่ที่ 3.33 ± 0.93

4.5.7.4 เนื้อสัมผัส

จากผู้ทดสอบ พบว่า การประเมินทางประสาทสัมผัสการเก็บรักษาเนื้อปลานิลด้านเนื้อสัมผัส เมื่อเปรียบเทียบชุดควบคุมกับชุดแช่สารสกัดหยาบ ของแต่ละวัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาด้านเนื้อสัมผัสของชุดควบคุมในวันที่ 0 และวันที่ 7 กับ 14 ไม่มีความความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) แสดงค่าเช่นเดียวกับชุดแช่สารสกัดหยาบ ซึ่งผู้ทำการทดสอบชื่นชอบเนื้อสัมผัสของชุดควบคุมวันที่ 0 มีค่าอยู่ที่ 3.32 ± 0.65

4.5.7.5 ความชอบโดยรวม

ความชอบโดยรวมของผู้ทำแบบทดสอบจำนวน 30 คน พบว่าในวันที่ 7 และ 14 ความชอบโดนรวมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ในวันที่ 7 ความชอบโดยรวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และในวันที่ 14 ทุกการทดสอบยกเว้นเนื้อสัมผัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 การประเมินทางประสาทสัมผัสสำหรับการเก็บรักษาเนื้อปลานิลแบบแช่เย็น

ประสาทสัมผัส	ตัวอย่าง	ระยะเวลาในการเก็บรักษา (วัน)		
		0	7	14
สี	ชุดควบคุม	3.77 ± 0.50^{a}	3.03 ± 0.58^{b}	1.62 ± 0.28^{d}
	ชุดแช่สารสกัดหยาบ	3.16 ± 0.75^{b}	2.92 ± 0.96^{bc}	2.62 ± 0.30^{c}
กลิ่น	ชุดควบคุม	2.98 ± 0.31^{a}	2.64 ± 0.53^{b}	1.91 ± 0.22^{c}
	ชุดแช่สารสกัดหยาบ	2.64 ± 0.87^{b}	2.51 ± 0.99^{b}	2.65 ± 0.28^{b}
รสชาติ	ชุดควบคุม	3.21 ± 0.62^{a}	2.82 ± 0.66^{b}	1.66 ± 0.21^{c}
	ชุดแช่สารสกัดหยาบ	3.33 ± 0.93^{a}	2.81 ± 0.85^{b}	2.49 ± 0.30^{b}
เนื้อสัมผัส	ชุดควบคุม	3.32 ± 0.65^{a}	2.81 ± 0.55^{b}	2.70 ± 0.32^{b}
	ชุดแช่สารสกัดหยาบ	3.24 ± 0.87^{a}	3.05 ± 0.91^{ab}	2.73 ± 0.22^{b}
ความชอบโดยรวม	ชุดควบคุม	3.35 ± 0.42^{a}	2.72 ± 0.43^{b}	1.48 ± 0.32^{d}
	ชุดแช่สารสกัดหยาบ	3.27 ± 0.83^{a}	3.15 ± 0.70^{a}	2.32 ± 0.31^{c}

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษในแถว และคอลัมน์เดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากใบ ต้น ดอก และราก ของน้ำนมราชสีห์ พบว่า สารสกัดหยาบจากใบมีค่าร้อยละปริมาณของสารสกัดหยาบที่ได้มากที่สุดเท่ากับ 3.73 รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากต้น ราก และดอก น้ำนมราชสีห์ โดยมีค่าร้อยละปริมาณของสารสกัดหยาบที่ได้เท่ากับ 2.83, 2.56 และ 2.04 ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบ ต้น ดอก และราก ด้วยวิธี Agar well diffusion ในแบคทีเรียก่อโรคทั่วไป ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 1261, *Micrococcus* sp., *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 และแบคทีเรียก่อโรคในปลา ได้แก่ *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp. พบว่า สารสกัดหยาบทั้ง 4 ส่วนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* sp. ที่ช่วงความเข้มข้นต่ำสุด 100 mg/mL

จากผลการทดสอบผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนต้นมีค่า MIC ต่อเชื้อ *B. subtilis* และ *Pseudomonas* sp. ต่ำสุดเท่ากับ 250 mg/mL จากสกัดหยาบส่วนใบมีค่า MIC ต่อเชื้อ *Vibrio* sp. ต่ำสุดเท่ากับ 62.50 mg/mL สารสกัดหยาบส่วนดอก และราก ค่า MIC ต่อเชื้อ *Vibrio* sp. ต่ำสุดเท่ากับ 500 mg/mL และค่า MBC ของสารสกัดหยาบส่วนใบสามารถฆ่าเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด โดยเฉพาะเชื้อ *Vibrio* sp. เท่ากับ 62.50 mg/mL

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC-MS ของสารสกัดหยาบดอก ใบ ราก และลำต้นของต้นน้ำนมราชสีห์ พบว่า องค์ประกอบทางเคมีที่ที่พบทั้งใบ ดอก ต้น และราก ของต้นน้ำนมราชสีห์ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Glycerin, Hexadecanoic acid, Hexadecanamide และ9-Octadecenamide โดยสารสกัดหยาบแต่ละส่วนมีองค์ประกอบทางเคมี และปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน มีผลต่อคุณสมบัติของสารข้างต้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ และสารอนุมูลอิสระ

การประเมินคุณภาพในเนื้อปลานิล การวิเคราะห์ทางกายภาพ เมื่อเวลาผ่านไป พบว่า ค่าสีมีการแปรปรวนของค่า a* ค่อนข้างมาก ค่าความเป็น pH มีความเป็นกรดมากขึ้น และในเนื้อสัมผัสค่าความเหนียว และค่าความยืดหยุ่นของเนื้อปลานิลมีค่าลดลง เนื่องจากการเกิด autolysis เมื่อปลาตาย การวิเคราะห์ทางเคมี ในเนื้อปลานิล พบว่า เมื่อเวลาผ่านไปเกิดจากการย่อยสลายของไกลโคเจน และการสร้างกรดอะมิโนอิสระ นำไปสู่การสะสมของ trimethylamine, dimethylamine, monoethylamine, แอมโมเนีย และสารระเหยอื่น ๆ ที่ส่งผลของการเหม็นหืนในเนื้อปลา ซึ่งเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนของค่า TBARS มีค่าลดลง ส่วนTVB-N และปริมาณไขมันมีค่าเพิ่มขึ้น เกิดจากสภาวะความเครียดของปลาก่อนที่ปลาตาย จึงทำให้เกิดการออกซิเดชันของไขมัน การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา และทางประสาทสัมผัส พบว่า เนื้อปลาที่ผ่านการแช่สารสกัด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เป็นสาเหตุทำให้เนื้อปลามีกลิ่น อีกทั้งการเกิดการเน่าเสีย ให้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยไม่ส่งผลกระทบในการส่งออก

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงการรักษาคุณภาพการยืดอายุการเก็บรักษาของเนื้อปลานิล ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาในเชิงอุตสาหกรรมอาหารต่อไปในอนาคตได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ของสารสกัดหยาบจากน้ำนมราชสีห์

5.2.2 ควรศึกษาวิธีการกำจัดกลิ่น สี และรสชาติฝาดของพืชสมุนไพร ก่อนที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2557. **วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร**. เล่มที่ 2.กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.

จันทร์เพ็ญ โคตรภูธร. 2559. การสกัดสารพฤกษเคมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาจากเพกา. *วิทยานิพนธ์หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*. 1 – 75.

ณัฏฐิกา ศิลาลาย. 2549. ฟลาโวนอยด์ในใบชา หน้าที่ การใช้ประโยชน์ และการวิเคราะห์. *วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม*. 2(1)

พีรศักดิ์ วรสุนทรโรสถ. 2544. ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 3 พืชที่ให้สีย้อมและแทนนิน สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.). ห้างหุ้นส่วนจำกัด กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ชวนพิมพ์

สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช. 2559. **สารานุกรมพืชในประเทศไทย (ฉบับย่อ)**. กรุงเทพมหานคร : สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง. 2553. **การเพาะเลี้ยงปลานิล**. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. **การตรวจสอบและการสกัดแยกสำคัญจากสมุนไพร**. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อมรรัตน์ สีสุกอง, กัลยาภรณ์ จันตรี, ศรีสุดา หาญภาคภูมิ, นาฏสดา อ่อนวิมล และทิฐิมา นวลบุญ. 2550. "การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากวัชพืชท้องถิ่นในจังหวัดนนทบุรี" โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต.

ฤทธิรงค์ ทองออน, เกษศิรินทร์ ภูมลี, พรรณรัตน์ อกนิษฐาภิชาติ และศิริมา สุวรรณกูฏ จันต๊ะมา. 2556. "ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบสมุนไพรจากน้ำนมราชสีห์และน้ำนมราชสีห์เล็ก Antibacterial activities of herbal extracts from *Euphorbia hirta* and *Euphorbia thymifolia*" *วารสาร วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*. 15(2): 42.

Ajayi, E.I.O., Adeleke, M.A., Adewumi, T.Y. and Adeyemi, A.A. 2017. "Antiplasmodial activities of ethanol extracts of *Euphorbia hirta* whole plant and *Vernonia amygdalina* leaves in *Plasmodium berghei*-infected mice". *Journal of Taibah University for Science*. 831-835.

Amuamuta, A., Mekonnen, Z. and Agazie, A. 2014. "Extraction and Analysis of Oil/Fat and Fatty Acids Content from Different Indigenous Fish of Lake Tana Source, Northwest Ethiopia". *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 417-423.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Asha, S., Thirunavukkarasu, P. and Mohamad Sadiq, A. 2015. "Phytochemical screening of *Euphorbia hirta* L. leaf extracts". *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 245-255

Balamurugan, R., Stalin, A., and Ignacimuthu, S. 2012. "Molecular docking of g-sitosterol with some targets related to diabetes". *European Journal of Medicinal Chemistry*. 38 – 43.

Basma, A.A., Zakaria, Z., Latha, L.Y. and Sasidharan, S. 2011. "Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L". *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 386-390.

Biskup, E., Marek. G., Gniadecki, R., Stepnowski, P. and Lojkowska, E. 2012. "Triterpenoid α-amyrin stimulates proliferation of human". *Biochemical Polonical*. 255 – 260.

Burdon, D.W. and Whittby, J.L. 1967. "Contamination of Hospital Disinfectants with *Pseudomonas* Species". *Medical Journal*. 153 – 155.

Cheng, M.C., Ker, Y.B., Yu, T.H., LIN, L.Y., Robert, Y.P. And Peng, C.H. 2010. "Chemical Synthesis of 9(Z)-Octadecenamide and Its". *Agriculture and Food Chemistry*. 1502 – 1508.

Doloh, A., Masniyom, P., Maneesri, J. and Suanphairoch, S. 2016. "Effect of plant-extracts on quality changes of refrigerated Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fillets". *Khon Kaen Agriculture Journal*. 44

Fatih, O., Aksun, E.,Rana, O. and José M.L. 2017. "Effect of lavender and lemon balm extracts on fatty acid profile, chemical quality parameters and sensory quality of vacuum packaged anchovy (Engraulis encrasicolus) fillets under refrigerated condition". *Food science and technology*. 529 – 535.

Gao, M., Feng, L., Jiang, T., Zhu, J., Fu, L., Yuan, D. and Li, J. 2014. "The use of rosemary extract in combination with nisin to extend the shelf life of pompano (*Trachinotus ovatus*) fillet during chilled storage". *Food Control*. 37: 1 - 8.

Huicab-Pech, Z.G., Castaneda-Chavez, M.R. and Lango-Reynoso, F. 2017. "Pathogenic Bacteria in *Oreochromis Niloticus* Var. Stirling Tilapia Culture". *Fisheries and Aquaculture Journal* . 197.

José, E.R., Gabriel, N.V., Christopher, J.F., Francisco, J.M., Myrna, D.C. and Vinicio, G.S. 2012. "N-(4-Methoxy-2-nitrophenyl) hexadecanamide, a palmitoylethanolamide analogue, *reduces formalin-induced nociception". Life Sciences*. 1288 – 1294.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lugasi, A., Losada, V., Hóvári, J., Lebovics, V., Jakóczi, I. and Aubourg, S. 2007. "Effect of pre-soaking whole pelagic fish in a plant extract on sensory and biochemical changes during subsequent frozen storage". *Food science and technology.* 930 - 936.

Malle, P. and Poumeyrol, M. 1989. "A New Chemical Criterion for the Quality Control of Fish: Trimethylamine/Total Volatile Basic Nitrogen (%)". *Journal of Food Protection.* 52: 419 - 423.

Okeke, M.I., Iroegbu, C.U., Eze, E.N., Okoli, A.S. and Esimone, C.O. 2014. "Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity". *Journal of Ethnopharmacology.* 78: 119 - 127.

Palmeri, R., Parafati, L., Restuccia, C. and Fallico, B. 2018. "Application of prickly pear fruit extract to improve domestic shelf life, quality and microbial safety of sliced beef". *Food and Chemical Toxicology.* 355 - 360.

Pisano, M.B., Cosentino, S., Viale, S., Spanò, D., Corona, A. and Esposito, F. 2016. "Biological Activities of Aerial Parts Extracts of *Euphorbia characias*". *BioMed Research Int.* 1 - 11.

Raeisi, S., Sharifi-Rad, M., Quek, S.Y., Shabanpour, B. and Sharifi-Rad, J. 2016. "Evaluation of antioxidant and antimicrobial effects of shallot (*Allium ascalonicum* L.) fruit and ajwain (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague) seed extract in semi-fried coated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets for shelf life extension". *Food science and technology.* 112 - 121.

Ramírez-Guerra, H.E., Castillo-Yañez, F.J., Montaño-Cota, E.A., Ruíz-Cruz, S., Márquez-Ríos, E., Canizales-Rodríguez, D.F., Torres-Arreola, W., Montoya-Camacho N., and Ocaño-Higuera, V.M. 2017. "Protective Effect of an Edible Tomato Plant Extract/Chitosan Coating on the Quality and Shelf Life of Sierra Fish Fillets". *Journal of Chemistry.* 131 - 137.

Reddy, Y.R. and Babu, V.H. 2016. "Evaluation of antimicrobial and antibacterial activity of *Euphorbia nivulia*". *World Journal of Pharmaceutical Sciences.* 12 – 17.

Salah, M.A., Azza, M.A., George, J. and Mohamed, F.M. 2008. "Characterization of Some Bacteria Isolated from *Oreochromis niloticus* and their Potential Use as Probiotics". *Aquaculture.* 277(1): 1-6.

Secci, G. and Parisi, G. 2016. "From farm to fork: lipid oxidation in fish products". *Italian Journal of Animal Science.* 15:1, 124-136

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Serra, A.T., Matias, A.A., Nunes, V.M., Leitão, M.C., Brito, D., Bronze, R., Silva, S., Pires, A., Crespo, M.T., San Romão, M.V. and Duarte, C.M. 2008. "In *vitro* evaluation of olive- and *grape-based* natural extracts as potential preservatives for food". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 311-319.

Sheikhlar, A., Meng, G. Y., Alimon, R., Romano, N., & Ebrahimi, M. 2017. "Dietary *Euphorbia hirta* Extract Improved the Resistance of Sharptooth Catfish *Clarias gariepinus* to *Aeromonas hydrophila*". *Journal of Aquatic Animal Health*. 225–235.

Thomas, R., Garner, S. and Atwood, S. 2002. "Report on Carcinogens Background Document for Naphthalene". *European Journal of Medicinal Chemistry*. 5 – 8.

Weiqing, L., Xu, C., Qiaoling, X., Ting, W., Ruoyan, D., Jing, X., Min, H. and Han, L. 2018. "Sensory and chemical assessment of silver pomfret (*Pampus argenteus*) treated with *Ginko biloba* leaf extract treatment during storage in ice". *Fisheries and Aquaculture Journal*. 3(1): 30 - 37.

Yang, J.F., Yang, C.H., Chang, H.W., Yang, C.S. and Chuang, L.Y. 2009. "Antioxidant and antibacterial properties of *Pericarpium trichosanthis* against nosocomial drug resistant strains of Acinetobacter baumannii in Taiwan". *Journal of Medicinal Plants Research*. 982-991.

Yuan, W., Lee, H.W. and Yuk, H.G. 2017. "Antimicrobial efficacy of *Cinnamomum javanicum* plant extract against *Listeria monocytogenes* and its application potential with smoked salmon". *International Journal Food Microbiology*. 260: 42 - 50.

Zhong-hui1, P., Zhang, Y., Yin, Z., Jiao, X., Jia, R., Yang, L. and Yang, F. 2010. "Antibacterial Activity of 9-Octadecanoic Acid-Hexadecanoic AcidTetrahydrofuran-3,4-Diyl Ester from Neem Oil". *Agricultural Sciences in China*. 1236 – 1240.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร Nutrient Agar (NA)

Peptone	5.00	กรัม
Beef extract	3.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม

ทำการชั่งส่วนประกอบของอาหารดังส่วนข้างต้น โดยทำการละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ของอาหารในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และทำการให้ความร้อนด้วยวิธีการต้มจนกระทั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

2. สูตรอาหาร Plate Count Agar (PCA)

Tryptone	5.00	กรัม
Yeast extract	2.50	กรัม
Glucose	1.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม
ปรับค่าพีเอช (pH) ให้อยู่ในช่วง	7.0 ± 0.2	

ทำการชั่งส่วนประกอบของอาหารดังส่วนข้างต้น โดยทำการละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ของอาหารในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และทำการให้ความร้อนด้วยวิธีการต้มจนกระทั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหาร Trptic Soy Agar (TSA)

Pancreatic Digest of Casein	15.00	กรัม
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5.00	กรัม
Sodium Chloride	5.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม

ปรับค่าพีเอช (pH) ให้อยู่ในช่วง 7.3 ± 0.2

ทำการชั่งส่วนประกอบของอาหารดังส่วนข้างต้น โดยทำการละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ของอาหารในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และเติมเกลือ Nacl เป็นลำดับสุดท้าย และทำการให้ความร้อนด้วยวิธีการต้มจนกระทั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สูตรอาหาร Trptic Soy Broth (TSB)

Pancreatic Digest of Casein	15.00 กรัม
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5.00 กรัม
Sodium Chloride	5.00 กรัม
ปรับค่าพีเอช (pH) ให้อยู่ในช่วง	7.3 ± 0.2

ทำการชั่งส่วนประกอบของอาหารดังส่วนข้างต้น โดยทำการละลายส่วนประกอบต่าง ๆ ของอาหารในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และเติมเกลือ Nacl เป็นลำดับสุดท้าย และทำการให้ความร้อนด้วยวิธีการต้มจนกระทั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ภาพสถานที่เก็บตัวอย่างพืช

รูปภาคผนวก ข.1 สถานที่เก็บตัวอย่างพืช

รูปภาคผนวก ข.2 ตัวอย่างพืช

พื้นที่การเก็บตัวอย่างต้นน้ำนมราชสีห์จากบริเวณหมู่ 6 ตำบลเวียงเหนือ อำเภอเวียงชัย จังหวัดเชียงราย มีลักษณะภูมิประเทศที่อุดมสมบูรณ์ ภูมิอากาศร้อนชื้น บริเวณล้อมรอบด้วยทุ่งนาและลำคลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
การคำนวณและตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ค.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

ANOVA

ส่วนประกอบของพืช	สารสกัดหยาบ	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ต้นน้ำนมราชสีห์	Between Groups	162.793	4	40.698	7.746	.004
	Within Groups	52.544	10	5.254		
	Total	215.337	14			
ดอกน้ำนมราชสีห์	Between Groups	144.895	4	36.224	350.937	.000
	Within Groups	1.032	10	.103		
	Total	145.927	14			
ใบน้ำนมราชสีห์	Between Groups	315.246	4	78.812	62.791	.000
	Within Groups	12.551	10	1.255		
	Total	327.798	14			
รากน้ำนมราชสีห์	Between Groups	166.035	4	41.509	4.919	.019
	Within Groups	84.387	10	8.439		
	Total	250.422	14			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.2 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ของสารสกัดหยาบลำต้น ดอก ใบ และราก น้ำนมราชสีห์ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95.0

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ของสารสกัดหยาบต้นน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset	
		1	2
100	3	.0000	
200	3		5.0933
300	3		7.6933
400	3		8.3233
500	3		9.0300
Sig.		1.000	.078

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ของสารสกัดหยาบดอกน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset	
		1	2
100	3	.0000	
200	3	.0000	
300	3	.0000	
400	3	.0000	
500	3		7.7700
Sig.		1.000	1.000

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ของสารสกัดหยาบใบน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset		
		1	2	3
100	.0000			.0000
200		9.2100		
300		10.8700	10.8700	
400			11.9600	
500			12.4400	
Sig.	1.000	.100	.132	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ของสารสกัดหยาบรากน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset 1	Subset 2
100	3	.0000	
200	3	.0000	
300	3	2.5833	
400	3	5.0900	5.0900
500	3		8.7633
Sig.		.073	.152

ตารางภาคผนวก ค.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli ATCC1261* โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

ANOVA

ส่วนประกอบของพืช	สารสกัดหยาบ	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ต้นน้ำนมราชสีห์	Between Groups	77.413	4	19.353	.711	.603
	Within Groups	272.018	10	27.202		
	Total	349.430	14			
ดอกน้ำนมราชสีห์	Between Groups	17.518	4	4.379	.772	.567
	Within Groups	56.693	10	5.669		
	Total	74.211	14			
ใบน้ำนมราชสีห์	Between Groups	112.437	4	28.109	4.031	.034
	Within Groups	69.734	10	6.973		
	Total	182.171	14			
รากน้ำนมราชสีห์	Between Groups	79.663	4	19.916	.766	.571
	Within Groups	259.853	10	25.985		
	Total	339.516	14			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.4 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli ATCC 1261* ของสารสกัดหยาบต้น ดอก ใบ และราก น้ำนมราชสีห์ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95.0

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli ATCC 1261* ของสารสกัดหยาบต้นน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset
		1
100	3	8.0083
200	3	2.1500
300	3	2.4900
400	3	2.6067
500	3	2.1433
Sig.		.233

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli ATCC 1261* ของสารสกัดหยาบดอกน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset
		1
100	3	2.5850
200	3	1.6633
300	3	.0000
400	3	.0000
500	3	.0000
Sig.		.248

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli ATCC 1261* ของสารสกัดหยาบใบน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset	
		1	2
100	3	5.9917	
200	3	10.2600	10.2600
300	3		11.6567
400	3		12.2200
500	3		14.1667
Sig.	3	5.9917	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli ATCC 1261* ของสารสกัดหยาบรากน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset
		1
100	3	4.3600
200	3	1.6433
300	3	.9950
400	3	6.0700
500	3	6.7500
Sig.		.231

ตารางภาคผนวก ค.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Micrococcus* sp. โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

		ANOVA				
ส่วนประกอบของพืช	สารสกัดหยาบ	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ต้นน้ำนมราชสีห์	Between Groups	94.121	4	23.530	1.605	.248
	Within Groups	146.624	10	14.662		
	Total	240.745	14			
ดอกน้ำนมราชสีห์	Between Groups	3.437	4	.859	1.000	.452
	Within Groups	8.592	10	.859		
	Total	12.029	14			
ใบน้ำนมราชสีห์	Between Groups	270.550	4	67.637	3.596	.046
	Within Groups	188.117	10	18.812		
	Total	458.667	14			
รากน้ำนมราชสีห์	Between Groups	204.536	4	51.134	2.248	.136
	Within Groups	227.468	10	22.747		
	Total	432.004	14			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.6 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus* sp. ของสารสกัดหยาบต้น ดอก ใบ และราก น้ำนมราชสีห์ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95.0

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Micrococcus* sp. ของสารสกัดหยาบต้นน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset
		1
100	3	.0000
200	3	.0000
300	3	4.3167
400	3	4.7367
500	3	5.9367
Sig.		.111

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Micrococcus* sp. ของสารสกัดหยาบดอกน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset
		1
100	3	.0000
200	3	.0000
300	3	.0000
400	3	.0000
500	3	1.1967
Sig.		.176

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Micrococcus* sp. ของสารสกัดหยาบใบน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset	
		1	2
100	3	3.5333	
200	3	10.1700	10.1700
300	3	11.6367	11.6367
400	3		13.0200
500	3		16.4100
Sig.		.053	.131

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Micrococcus* sp. ของสารสกัดหยาบรากน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset	
		1	2
100	3	.0000	
200	3	1.0250	1.0250
300	3	6.6017	6.6017
400	3	7.2517	7.2517
500	3		9.4533
Sig.		.113	.071

ตารางภาคผนวก ค.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

ANOVA						
ส่วนประกอบของพืช	สารสกัดหยาบ	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ต้นน้ำนมราชสีห์	Between Groups	.937	4	.234	.010	1.000
	Within Groups	234.727	10	23.473		
	Total	235.664	14			
ดอกน้ำนมราชสีห์	Between Groups	17.671	4	4.418	2.477	.112
	Within Groups	17.837	10	1.784		
	Total	35.509	14			
ใบน้ำนมราชสีห์	Between Groups	300.988	4	75.247	121.011	.000
	Within Groups	6.218	10	.622		
	Total	307.206	14			
รากน้ำนมราชสีห์	Between Groups	4.505	4	1.126	1.000	.452
	Within Groups	11.261	10	1.126		
	Total	15.766	14			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.8 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 ของสารสกัดหยาบต้น ดอก ใบ และราก น้ำนมราชสีห์ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 ของสารสกัดหยาบต้นน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset
		1
100	3	2.5033
200	3	2.6700
300	3	2.6833
400	3	2.8333
500	3	3.2400
Sig.		.866

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus TISTR 1466* ของสารสกัดหยาบดอกน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset	
		1	2
100	3	.0000	
200	3	.0000	
300	3	.0000	
400	3	.9533	.9533
500	3		2.7900
Sig.		.433	.123

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus TISTR 1466* ของสารสกัดหยาบใบน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset			
		1	2	3	4
100	3	.0000			
200	3		8.5167		
300	3			10.6667	
400	3			11.1167	
500	3				12.5700
Sig.		1.000	1.000	.501	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus TISTR 1466* ของสารสกัดหยาบรากน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset
		1
100	3	.0000
200	3	.0000
300	3	.0000
400	3	.0000
500	3	1.3700
Sig.		.176

ตารางภาคผนวก ค.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas sp.* โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

ANOVA						
ส่วนประกอบของพืช	สารสกัดหยาบ	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ต้นน้ำนมราชสีห์	Between Groups	11.753	4	2.938	.320	.858
	Within Groups	91.909	10	9.191		
	Total	103.662	14			
ดอกน้ำนมราชสีห์	Between Groups	30.710	4	7.677	.504	.734
	Within Groups	152.213	10	15.221		
	Total	182.923	14			
ใบน้ำนมราชสีห์	Between Groups	200.932	4	50.233	5.632	.012
	Within Groups	89.198	10	8.920		
	Total	290.129	14			
รากน้ำนมราชสีห์	Between Groups	11.779	4	2.945	.097	.981
	Within Groups	304.528	10	30.453		
	Total	316.307	14			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.10 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas sp.* ของสารสกัดหยาบ ต้น ดอก ใบ และราก น้ำนมราชสีห์ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas sp.* ของสารสกัดหยาบต้นน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset
		1
100	3	.0000
200	3	1.0167
300	3	2.0600
400	3	2.1033
500	3	2.3700
Sig.		.397

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas sp.* ของสารสกัดหยาบดอกน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset
		1
100	3	.0000
200	3	.0000
300	3	2.5850
400	3	3.0467
500	3	3.0667
Sig.		.395

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas sp.* ของสารสกัดหยาบใบน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset	
		1	2
100	3	3.4767	
200	3	8.8567	8.8567
300	3		10.6300
400	3		11.2567
500	3		14.6267
Sig.		.052	.052

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas sp.* ของสารสกัดหยาบรากน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset
		1
100	3	1.3617
200	3	3.1100
300	3	3.3133
400	3	3.7517
500	3	3.7650
Sig.		.632

ตารางภาคผนวก ค.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Vibrio sp.* โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

ANOVA

ส่วนประกอบของพืช	สารสกัดหยาบ	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ต้นน้ำนมราชสีห์	Between Groups	92.746	4	23.186	1.192	.372
	Within Groups	194.497	10	19.450		
	Total	287.242	14			
ดอกน้ำนมราชสีห์	Between Groups	86.493	4	21.623	1.437	.292
	Within Groups	150.496	10	15.050		
	Total	236.989	14			
ใบน้ำนมราชสีห์	Between Groups	55.633	4	13.908	5.631	.012
	Within Groups	24.701	10	2.470		
	Total	80.334	14			
รากน้ำนมราชสีห์	Between Groups	37.326	4	9.331	.234	.913
	Within Groups	398.678	10	39.868		
	Total	436.003	14			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.12 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Vibrio sp.* ของสารสกัดหยาบ ต้น ดอก ใบ และราก น้ำนมราชสีห์ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio sp.* ของสารสกัดหยาบต้นน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset
		1
100	3	1.0167
200	3	1.3983
300	3	5.3700
400	3	5.7600
500	3	7.2233
Sig.		.144

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio sp.* ของสารสกัดหยาบดอกน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset
		1
100	3	.0000
200	3	.0000
300	3	2.5850
400	3	2.7733
500	3	6.5400
Sig.		.087

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio sp.* ของสารสกัดหยาบใบน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset	
		1	2
100	3	9.7383	
200	3	9.8100	
300	3	11.1433	
400	3	12.3300	12.3300
500	3		14.9367
Sig.		.089	.070

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio sp.* ของสารสกัดหยาบรากน้ำนมราชสีห์

ความเข้มข้น (mg/mL)	N	Subset 1
100	3	1.5467
200	3	3.7650
300	3	4.9733
400	3	5.5100
500	3	5.9333
Sig.		.450

ตารางภาคผนวก ค.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าสี โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
L	Between Groups	405.297	7	57.900	479.449	.000
	Within Groups	1.932	16	.121		
	Total	407.229	23			
a	Between Groups	92.901	7	13.272	1124.307	.000
	Within Groups	.189	16	.012		
	Total	93.089	23			
b	Between Groups	246.777	7	35.254	193.596	.000
	Within Groups	2.914	16	.182		
	Total	249.691	23			

ตารางภาคผนวก ค.14 การจัดกลุ่มของข้อมูลค่าสี L* a* b* ในแต่ละชุดการทดลอง โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

การวิเคราะห์ค่า สี L*

ข้อมูล	N	Subset 1	2	3	4	5	6
วันที่ 7 ชุดควบคุม	3	45.34					
วันที่ 7 ชุดแช่สารสกัดหยาบ	3		52.56				
วันที่ 14 ชุดควบคุม	3			55.16			
วันที่ 14 ชุดแช่สารสกัดหยาบ	3			55.30			
วันที่ 0 ชุดแช่สารสกัดหยาบ	3				55.99		
วันที่ 0 ชุดควบคุม	3						60.10
Sig.		1.000	1.000	.637	1.000	.078	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ค่า สี a*

ข้อมูล	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
วันที่ 14 ชุดควบคุม	3		-3.01				
วันที่ 14 ชุดแช่สารสกัดหยาบ	3				-1.66		
วันที่ 7 ชุดควบคุม	3					.47	
วันที่ 7 ชุดแช่สารสกัดหยาบ	3					.56	
วันที่ 0 ชุดควบคุม	3						1.58
วันที่ 0 ชุดแช่สารสกัดหยาบ	3						
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.343	1.000

การวิเคราะห์ค่า สี b*

ข้อมูล	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
วันที่ 0 ชุดควบคุม	3	9.54					
วันที่ 14 ชุดแช่สารสกัดหยาบ	3		11.32				
วันที่ 14 ชุดควบคุม	3			12.70			
วันที่ 7 ชุดควบคุม	3				15.44	15.44	
วันที่ 0 ชุดแช่สารสกัดหยาบ	3					16.10	
วันที่ 7 ชุดแช่สารสกัดหยาบ	3						19.28
Sig.		1.000	1.000	1.000	.632	.076	.158

ตารางภาคผนวก ค.15 การเปรียบเทียบความแตกต่างการประเมินคุณภาพความเป็นpH โดยวิธี T –test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

Source	ระยะเวลาในการเก็บรักษา (วัน)	Control	Extract	t	Sig.
pH	0	7.740 ± 0.046	7.750 ± 0.125	-.173	0.871
	7	6.630 ± 0.055	6.850 ± 0.042	-5.519	0.005
	14	6.380 ± 0.061	6.710 ± 0.060	-6.794	0.002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.16 การเปรียบเทียบความแตกต่างการประเมินคุณภาพทางเคมี โดยวิธี T –test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

Source	ระยะเวลาในการเก็บรักษา (วัน)	Control	Extract	t	Sig.
TBARS	0	0.209 ±0.006	0.085±0.009	19.313	0.000
	7	0.329 ±0.002	0.320±0.031	0.533	0.622
	14	0.224 ±0.008	0.265±0.034	-2.009	0.115
	21	0.200 ±0.022	0.170±0.010	1.391	0.237
TVB-N	0	0.140 ±0.004	0.351±0.004	-1.299	0.264
	7	0.102 ±0.002	0.080±0.009	4.484	0.011
	14	0.140 ±0.002	0.090±0.003	29.810	0.000
	21	0.148 ± 0.004	0.098±0.007	11.318	0.000
ปริมาณไขมัน	0	20.400±0.200	22.067±0.306	-7.906	0.001
	7	24.940±0.070	23.467±0.117	18.695	0.000
	14	26.767± 0.652	25.113±0.199	3.645	0.022
	21	27.857±0.641	25.793±0.325	4.970	0.008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้