

สารสกัดจากเปลือกพะยอมที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคใน

อาหาร

Shorea roxburghii G.Don EXTRACT FOR FOOD

PATHOGEN INHIBITION



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยขึ้นด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต
ปีการศึกษา 2560

Shorea roxburghii G.Don EXTRACT FOR FOOD
PATHOGEN INHIBITION



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ทั้งทางเนื้อในเพื่อใช้ศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้จัดทำเห็นชอบจะเปิดเผยในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงการพิเศษ สารสกัดจากเปลือกพะยอมที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร
Shorea roxburghii G.Don extract for food pathogen inhibition

ชื่อนักศึกษา นางสาวจุลย์วัลย์ มะธิตะโน รหัสนักศึกษา 57050812
 นางสาวสุรางค์ เทศปาน รหัสนักศึกษา 57050913

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
 ภาควิชา ชีววิทยา
 ปีการศึกษา 2560
 อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.นิลเนตร อัคระศิริจินดา
 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.กานต์ วงศาริยะ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
 โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา
 อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.กานต์ วงศาริยะ ประธานกรรมการ	
ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ กรรมการ	
ดร.นิลเนตร อัคระศิริจินดา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

หัวข้อรายงาน	สารสกัดจากเปลือกพะยอมที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร
ชื่อนักศึกษา	นางสาวจุลย์วัลย์ มะริตะใน รหัสนักศึกษา 57050812 นางสาวสุรางค์ เทศปาน รหัสนักศึกษา 57050913
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.นิลเนตร อัสวะศิริจินดา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.กานต์ วงศาริยะ

บทคัดย่อ

การศึกษาการสกัดสารสกัดหยาบจากเปลือกต้นพะยอม (*Shorea roxburghii* G.Don) ด้วยวิธีการหมักด้วยตัวทำละลาย (Maceration) โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล 95% เมทานอล และเฮกเซน 70% พบว่าการสกัดสารสกัดหยาบจากเปลือกต้นพะยอมที่มีน้ำหนักแห้ง 30 กรัม จะได้ปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้เท่ากับ 31.00% 36.10% และ 14.70% ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Enterobacter aerogenes* *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio parahaemolyticus* ด้วยวิธี Agar well diffusion เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร พบว่าสารสกัดที่ได้จากการใช้เอทานอล 95% เมทานอล และเฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดบริเวณใส และจากการทดลองหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (MBC) ด้วยวิธี Broth micro dilution พบว่าสารสกัดที่ใช้เอทานอล 95% เมทานอล และเฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย สามารถฆ่าเชื้อได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ ทั้งนี้ สารสกัดที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายสามารถฆ่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MBC เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดที่ใช้เอทานอล 95% และเฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย สามารถฆ่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้โดยมีค่า MBC เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานในห้องปฏิบัติการเท่านั้น เมื่อผู้ดูแลเห็นว่าเป็นประโยชน์ตามการค้นคว้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับ *L. monocytogenes* และ *E. aerogenes* สารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ให้ค่า MBC ที่เท่ากัน คือ 5 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากการศึกษานี้จึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดเปลือกพะยอมสามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารสายพันธุ์ *Listeria monocytogenes* ได้ดีที่สุด โดยแบคทีเรียดังกล่าว เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ในขณะที่ *V. parahaemolyticus* และ *E. aerogenes* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จึงคาดว่าสารสกัดจากเปลือกพะยอมสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

คำสำคัญ : ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สารสกัดเปลือกพะยอม

Enterobacter aerogenes *Listeria monocytogenes* *Vibrio parahaemolyticus*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	<i>Shorea roxburghii</i> G.Don extract for food pathogen inhibition		
Student	Miss Julaiwal Mathitanai	Student ID	57050812
	Miss Surang Tespan	Student ID	57050913
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2017		
Advisor	Dr. Nilnate Assavasirijinda		
Co-Advisor	Dr. Karn Wongsariya		

Abstract

The study on the antibacterial activities of *Shorea roxburghii* G.Don (Payom) bark were performed by using 95% ethanol, methanol and 70% hexane extractions. The yields of crude extracts from *Shorea roxburghii* G.Don were 31.00% 36.10% and 14.70% when used 95% ethanol, methanol and 70% hexane extraction, respectively. Antimicrobial activity of the crude extracts was investigated on 3 strains of food poisoning pathogens which are *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus*. Agar well diffusion method was used for observing inhibition activity. The result shows that the 95% ethanol, methanol and 70% hexane extracts of *Shorea roxburghii* G.Don have an inhibition potential to all strains of bacteria. Moreover, the crude extracts show the most effective to inhibit *L. monocytogenes* when compared the lowest concentration of crude extract which gave the largest inhibition zone. The study on Minimum Bactericidal Concentration (MBC) by using broth micro dilution method shows bactericidal activity of the crude extracts on 3 food pathogens. The methanol extract gives the highest bactericidal activity to *V. parahaemolyticus* with the MBC value of 2.5 mg/ml. The 95% ethanol and 70% hexane extracts give a bactericidal activity on *V. Parahaemolyticus* with the MBC value of 10 mg/ml. Besides, the bactericidal activity on *L. monocytogenes* and *E. aerogenes* by

using 95% ethanol, methanol and 70% hexane extracts are not different which the MBC values are 5, 20 mg/ml, respectively.

This study shows that the bark of *Shorea roxburghii* G.Don extracts have potentials either antimicrobial or bactericidal activity on food poisoning pathogens. This study shows the most effective to *L. monocytogenes* which is Gram positive bacteria. So, the *Shorea roxburghii* G.Don extracts could have possibility to inhibit and kill on Gram positive bacteria than Gram negative bacteria.

Keywords : Antibacterial activity, *Shorea roxburghii* G.Don extract, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากท่านอาจารย์ คณะผู้จัดทำขอกราบ
ขอบพระคุณ ดร.นิลเนตร อัครวะศิริจินดา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ และดร.กานต์ วงศาริยะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความกรุณาช่วยเหลือ แนะนำ และชี้แนวทางในการทำโครงการพิเศษ
ตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ต่างๆแก่คณะผู้จัดทำ

คณะผู้จัดทำโครงการพิเศษขอกราบขอบพระคุณ ดร.กานต์ วงศาริยะ ประธานกรรมการ
สอบโครงการพิเศษ และดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ กรรมการการสอบโครงการพิเศษ รวมทั้งให้คำแนะนำ
ในการทำโครงการพิเศษนี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่
อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือในการปฏิบัติงานต่างๆ รวมถึงอำนวยความสะดวก
สะดวกในการเบิกอุปกรณ์ สารเคมีต่างๆในการทดลอง

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และเพื่อนๆ พี่ๆ ที่คอยสนับสนุนให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ
และให้ข้อเสนอแนะกับคณะผู้จัดทำ

นางสาวจุลย์วัลย์ มะธิตะไน
นางสาวสุรางค์ เทศปาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป.....	ญ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ท
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	3
1.3 ขอบเขตโครงการ.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ต้นพะยอม.....	4
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.....	4
2.1.2 สรรพคุณของต้นพะยอม.....	5
2.1.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในไม้พะยอม.....	6
2.1.4 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา.....	6
2.2 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร.....	6
2.2.1 ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสารสำคัญจากพืช.....	7
2.2.2 ชนิดตัวทำละลาย.....	7
2.2.3 ตัวทำละลาย.....	8
2.2.4 การสกัดสารจากพืช.....	11
2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์.....	13
2.3.1 การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารยับยั้งจุลินทรีย์.....	13
2.3.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพร.....	14
2.4 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ.....	19

เอกสารนี้เป็นเอกสาร 2.4.1 *Listeria monocytogenes*.....สิทธินี้สงวนไว้สำหรับ.....ไม่อนุญาตให้แก้ไขหรือดัดแปลง.....ราคา 19 บาท
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	20
2.4.3 <i>Enterobacter aerogenes</i>	22
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	27
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี.....	27
3.1.1 วัสดุดิบ.....	27
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์.....	27
3.1.3 สารเคมี.....	27
3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	27
3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	28
3.2 วิธีการทดลอง.....	29
3.2.1 การเตรียมตัวอย่าง.....	29
3.2.2 การสกัดสาร.....	30
3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบ.....	31
3.2.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (Minimal Inhibitory Concentration : MIC) โดยใช้วิธี Broth dilution method.....	32
3.2.5 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (Minimal Bactericidal Concentration : MBC).....	33
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	33
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	34
4.1 ผลการสกัดสารจากเปลือกไม้พะยอม.....	34
4.2 ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกพะยอมในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์....	35
4.2.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งโดยวิธี Agar well diffusion.....	35
4.3 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (Minimal Inhibitory Concentration : MIC).....	41
4.4 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (Minimal Bactericidal Concentration : MBC).....	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับของงานวิจัยที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่ายหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	49
5.1 การสกัดสารจากเปลือกไม้พะยอม.....	49
5.2 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งโดยวิธี Agar well diffusion.....	49
5.3 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (Minimal Inhibitory Concentration : MIC).....	50
5.4 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (Minimal Bactericidal Concentration : MBC).....	51
5.5 ข้อเสนอแนะ.....	52
เอกสารอ้างอิง.....	53
ภาคผนวก.....	59
ภาคผนวก ก.....	60
ภาคผนวก ข.....	63
ภาคผนวก ค.....	67
ภาคผนวก ง.....	72
ภาคผนวก จ.....	76
ภาคผนวก ฉ.....	79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สรุปลักษณะสมบัติของตัวทำละลายบางชนิดที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร.....	10
4.1 ลักษณะสารสกัดและปริมาณสารสกัด ที่สกัดจากตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล 95% เมทานอล และเฮกเซน 70%.....	34
4.2 ขนาดของบริเวณสีที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอมที่ใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกัน.....	36
4.3 แสดงค่า MBC ของแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกพะยอม.....	43
จ-1 แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณสีที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรีย โดยสารสกัดเปลือกพะยอม โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย.....	77
จ-2 แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณสีที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรีย โดยสารสกัดเปลือกพะยอม โดยใช้เมทานอล เป็นตัวทำละลาย.....	77
จ-3 แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณสีที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรีย โดยสารสกัดเปลือกพะยอม โดยใช้เฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย.....	78
ฉ-1 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณสีที่เกิดการยับยั้ง โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ในระดับความเข้มข้น 0.125 – 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย.....	80
ฉ-1.1 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณสีที่เกิดการยับยั้ง โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ในระดับความเข้มข้น 1.25 - 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย.....	81
ฉ-2 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณสีที่เกิดการยับยั้ง โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ในระดับความเข้มข้น 0.125 – 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย.....	85
ฉ-2.1 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณสีที่เกิดการยับยั้ง โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ในระดับความเข้มข้น 1.25 - 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย.....	86
ฉ-3 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณสีที่เกิดการยับยั้ง โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ในระดับความเข้มข้น 0.125 – 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้เฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย.....	90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ฉ-3.1 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดการยับยั้ง โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ในระดับความเข้มข้น 1.25 - 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้ เฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย.....	91



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะ ดอก ต้น ผลและใบของต้นพะยอม.....	5
2.2 โครงสร้างของเอทิลแอลกอฮอล์.....	8
2.3 โครงสร้างของเมทิลแอลกอฮอล์.....	9
2.4 โครงสร้างของเฮกเซน.....	10
2.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดแบบ Maceration.....	11
2.6 เครื่องสกัดแบบ Soxhlet Extractor.....	12
2.7 เครื่อง Evaporator.....	13
2.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Macro dilution test.....	15
2.9 การทดสอบด้วยวิธี Broth micro dilution test.....	16
2.10 การทำ Agar dilution test.....	17
2.11 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพร : A โดยวิธี Disc diffusion B โดยวิธี Agar well diffusion และ C โดยวิธี Agar plug diffusion	18
2.12 ลักษณะโคโลนีและการติดสีแกรมของ <i>Listeria monocytogenes</i>	19
2.13 ลักษณะโคโลนีและการติดสีแกรมของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	20
2.14 ลักษณะโคโลนีและการติดสีแกรมของ <i>Enterobacter aerogene</i>	22
3.1 เปลือกพะยอมที่ใช้ในการสกัด.....	30
3.2 ตำแหน่งที่เติมสารสกัดเปลือกพะยอม.....	32
4.1 สารสกัดหยาบของเปลือกพะยอมที่สกัดจากตัวทำละลายเอทานอล 95% (ก) เมทานอล (ข) และเฮกเซน 70% (ค).....	35
4.2 ลักษณะของบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ <i>Enterobacter aerogenes</i> โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.125 0.25 0.625 1.25 2.5 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	37
4.3 ลักษณะของบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.125 0.25 0.625 1.25 2.5 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	38
4.4 ลักษณะของบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.125 0.25 0.625 1.25 2.5 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	39

เอกสารนี้ 0.25 0.625 1.25 2.5 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร..... 39

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.5 แสดงการเกิดตะกอนเมื่อละลายสารสกัดหยาบจากเปลือกพะยอมด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ และเติมลงในอาหารเหลว.....	42
4.6 แสดงการเจริญของเชื้อ <i>E. aerogenes</i> จากการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อด้วยวิธีการหาค่า MBC โดยนำเชื้อมาซีดบนอาหารแข็ง TSA.....	44
4.7 แสดงการเจริญของเชื้อ <i>L. monocytogenes</i> จากการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อด้วยวิธีการหาค่า MBC โดยนำเชื้อมาซีดบนอาหารแข็ง BHI.....	45
4.8 แสดงการเจริญของเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> จากการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อด้วยวิธีการหาค่า MBC โดยนำเชื้อมาซีดบนอาหารแข็ง BHI.....	46
ข-1 ขั้นตอนการเจือจางและการเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>Enterobacter aerogenes</i>	65
ข-2 ขั้นตอนการเจือจางและการเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>Listeria monocytogenes</i>	65
ข-3 ขั้นตอนการเจือจางและการเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	66
ค-1 ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ <i>Enterobacter aerogenes</i>	67
ค-2 ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i>	67
ค-3 ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	68
ค-4 ลักษณะของ <i>Enterobacter aerogenes</i>	69
ค-5 ลักษณะของ <i>Listeria monocytogenes</i>	69
ค-6 ลักษณะของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	70
ค-7 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์.....	71
ง-1 กราฟการเจริญเติบโตของ <i>Enterobacter aerogenes</i> ที่สภาวะ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จุดที่เป็น Late log คือชั่วโมงที่ 6 มีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.588	73
ง-2 กราฟการเจริญเติบโตของ <i>Listeria monocytogenes</i> ที่สภาวะ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จุดที่เป็น Late log คือชั่วโมงที่ 9 มีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.238.....	74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ง-3 กราฟการเจริญเติบโตของ <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ที่สภาวะ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จุดที่เป็น Late log คือชั่วโมงที่ 6 มีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง เท่ากับ 1.202.....	75



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
MIC	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal Inhibitory Concentration)
MBC	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration)
BHI	อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion
TSA	อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง Tryptic Soy Agar
TSB	อาหารเลี้ยงแบบเหลว Tryptic Soy Broth
μ l	ไมโครลิตร
ml	มิลลิลิตร
SE	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard error)
mg	มิลลิกรัม
CFU	Colony forming unit

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยถือว่าเป็นที่นิยมกันอย่างมาก เป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่สามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศทั้งการส่งออกและการค้าขายภายในประเทศ แต่ทว่าทั้งการกระบวนการจัดหาวัตถุดิบ กระบวนการผลิตและกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์นั้นมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ จากการจัดการและการปรุงที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เมื่อผู้บริโภครับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคเข้าไปจะสามารถแสดงอาการได้หลากหลาย เช่น ท้องเสีย ปวดท้อง อาเจียน และบางรายอาจถึงกับชีวิตได้ อีกทั้งผู้ประกอบการอาหารบางรายไม่ให้ความสนใจเรื่องสุขลักษณะของผู้บริโภคมากนัก ทำให้ผู้บริโภคไม่เชื่อมั่นและไม่ไว้วางใจในผลิตภัณฑ์ ทำให้ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยอย่างมาก ดังนั้นถ้าสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหารได้ก็จะสามารถช่วยพยุงอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยได้อีกทาง (สภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย, 2560)

แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร เป็นกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่ติดต่อมาสู่คนผ่านทางอาหารเป็นหลัก ทำให้เกิดความผิดปกติได้ 2 ลักษณะ คือ อาหารเป็นพิษและโรคติดเชื้อจากอาหาร โรคจากอาหารที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในสัตว์ที่สำคัญได้แก่ โรค Listeriosis โรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (Gastroenteritis) และโรคติดเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งปัญหาเหล่านี้ล้วนมีผลต่ออุตสาหกรรมอาหารของประเทศไทย (U.S. Centers for Disease Control and Prevention, 2017) มีรายงานว่าองค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (U.S. Food and Drug Administration, USFDA) ได้แจ้งให้ทางการประเทศไทยติดตามและตรวจสอบแอปเปิ้ลนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค Listeriosis ซึ่งเป็นอันตรายต่อเด็กแรกเกิด หญิงมีครรภ์และ คนชรา หรือผู้มีภูมิคุ้มกันบกพร่องและยังมีรายงานเพิ่มเติมว่าโรค Listeriosis เป็นเชื้อสาเหตุสำคัญลำดับที่ 3 ของการป่วยตายเนื่องจากโรคอาหารเป็นพิษในประเทศสหรัฐอเมริกา ร้อยละ 90 ของผู้ที่ติดเชื้อคือหญิงมีครรภ์ ทารก ผู้สูงอายุ และ ผู้ที่มีภาวะ ภูมิคุ้มกันบกพร่อง หญิงมีครรภ์ที่ติดเชื้ออาจทำให้แท้งบุตร และอัตราป่วยตายคือร้อยละ 24 ประเทศไทยพบการปนเปื้อนของเชื้อร้อยละ 29.70 ในเนื้อสัตว์แช่แข็ง 4,331 ตัวอย่าง (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2558) โรค Gastroenteritis ซึ่งมีสาเหตุมาจาก *Vibrio parahaemolyticus* พบได้ทั่วไปในอาหารทะเล อาการปวดท้องเกร็ง อาเจียน อุจจาระมีมูกเลือด มีไข้ต่ำ หรืออาจเสียชีวิตได้ (พิมพ์เพ็ญและนิธิยา, 2558) ข้อมูลจากสำนักกระบาดวิทยา พบว่าประเทศไทยพบเชื้อนี้เป็นสาเหตุอันดับ 1 ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษคิดเป็นร้อยละ 56, 56, 58, 60, 61 และ 78 ของผู้ป่วยโรค

อาหารเป็นพิษทั้งหมดในปี พ.ศ.2540-2545 (ศรีวรรณ, 2545) โรคติดเชื้อ *E. coli* โดยปกติแล้วเชื้อ *E. coli* จะอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและยังอาศัยอยู่ในสัตว์เช่น สุกร โค กระบือ เป็นต้น ดังนั้นเชื้อจะถูกขับผ่านออกมากับอุจจาระสัตว์ได้ถ้าสัตว์ถ่ายอุจจาระลงดินหรือแหล่งน้ำ ซึ่งใช้เป็นแหล่งเพาะปลูกหรืออุปโภคบริโภค เชื้อที่ปนเปื้อนไปกับผลผลิตและน้ำดื่มจะเข้าสู่ร่างกายคนโดยการรับประทาน อาการ มีได้ตั้งแต่ไม่แสดงอาการจนถึงอาการรุนแรง บางรายถ่ายเหลวเป็นน้ำ บางรายอาจมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ต่ำร่วมด้วย และอาจรุนแรงถึงขั้นมีอาการปวดบิด การ फैาระวังการดื้อยาของเชื้อ *E. coli* ในห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จากข้อมูลย้อนหลัง 7 ปี (พ.ศ. 2550 – 2556) พบเชื้อ *E. coli* ก่อโรคอุจจาระร่วง ทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 10.1 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2557)

ประเทศไทยถือว่าเป็นประเทศแห่งสมุนไพรซึ่งประเทศไทยนั้นมีสมุนไพรหลากหลายและมีการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์มากมาย รวมไปถึงเปลือกของไม้พะยอม (*Shorea roxburghii* G. Don) จัดเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ผลัดใบ มีความสูงประมาณ 15-20 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นอาจยาวถึง 300 เซนติเมตร เปลือกต้นมีสีน้ำตาลหรือสีเทาเข้ม แตกเป็นร่องตามยาวและเป็นสะเก็ดหนา ส่วนเนื้อไม้มีสีเหลืองถึงสีน้ำตาล ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ดและการตอนกิ่ง ซึ่งในปัจจุบันพันธุ์ไม้ชนิดนี้กำลังเริ่มลดน้อยลงไปเรื่อย ๆ โดยสามารถพบได้ตามป่าเบญจพรรณแล้งและชื้น หรือป่าดิบแล้งทั่วไป ประโยชน์เปลือกต้นและเนื้อไม้ นำมาสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในกระบอกไม้ไผ่ ไว้ใช้รองน้ำตาลสดจากต้นมะพร้าวและน้ำตาลจากต้นตาลโตนด เปลือกต้นหรือไม้ชิ้นเล็ก ๆ นำมาใช้ใส่เครื่องหมักดองเพื่อกันบูดกันเสียได้ (สันติ, 2557) มีรายงานวิจัยว่าเปลือกของไม้พะยอมสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหารได้ ดังนั้นจึงจะใช้สารสกัดจากเปลือกไม้พะยอมเพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหาร และหวังว่าสารสกัดจากเปลือกไม้พะยอมจะสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร ยืดอายุการเก็บรักษาโดยการพ่นสารสกัดที่ได้จากเปลือกไม้พะยอมลงบนอาหารได้ เพื่อทำให้อาหารมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและทำให้อุตสาหกรรมอาหารมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 ศึกษาวิธีสกัดสารจากเปลือกไม้พะยอม เพื่อให้ได้ส่วนสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้
- 1.2.2 ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้แก่ *Listeria monocytogenes* *Vibrio parahaemolyticus* และ *Enterobacter aerogenes* โดยใช้สารสกัดที่ได้จากเปลือกไม้พะยอม
- 1.2.3 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC : Minimum Bactericidal Concentration) และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC: Minimum Inhibitory Concentration)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 สกัดสารจากเปลือกไม้พะยอมโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดได้แก่ เอทานอล 95% เมทานอล และเฮกเซน 70%
- 1.3.2 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารได้แก่ *Listeria monocytogenes* *Vibrio parahaemolyticus* และ *Enterobacter aerogenes*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบถึงวิธีการสกัดสารสำคัญจากเปลือกไม้พะยอมโดยวิธีการสกัดเย็น
- 1.4.2 ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของสารสกัดที่ได้จากเปลือกพะยอม
- 1.4.3 นำผลที่ได้จากการทดลองไปต่อยอดองค์ความรู้เกี่ยวกับสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

พฤกษศาสตร์และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ต้นพะยอม

อาณาจักร : Plantae

ดิวิชัน : Tracheophyta

คลาส : Magnoliopsida

ออเดอร์ : Theales

วงศ์ : Dipterocarpaceae

สกุล : *Shorea*

สปีชีส์ : *S. roxburghii*

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Shorea roxburghii* G.Don

ชื่อสามัญ : Shorea, White meranti

ชื่อเรียกอื่นๆ : แคน (เลย), ยางหยวก (น่าน), กะยอม เชียง เชียง เชียง (เชียงใหม่), พะยอมทอง (ปราจีนบุรี สุราษฎร์ธานี), ขะยอมดง พะยอมดง (ภาคเหนือ), สุกกรม (ภาคกลาง), คะยอม ขะยอม (อีสาน), ยอม (ภาคใต้), ขะยอม (ลาว), พะยอมแดง แคน พะยอม (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2560)

ต้นกำเนิด : มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยและเอเชีย เช่น ประเทศพม่า ลาว ศรีลังกา และฟิลิปปินส์ และเป็นต้นไม้ยืนต้นที่มีดอกและผล โดยสามารถพบได้ตามป่าเบญจพรรณแล้งและชื้น หรือป่าดิบแล้งทั่วไป ทุกภาคของประเทศที่ความสูงจากระดับน้ำทะเล 60-1,200 เมตร และดอกพะยอมยังเป็นดอกไม้ประจำจังหวัดกาฬสินธุ์ด้วย (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2560)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้นพะยอม จัดเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ผลัดใบ มีความสูงประมาณ 15-20 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นอาจยาวถึง 300 เซนติเมตร เปลือกต้นมีสีน้ำตาลหรือสีเทาเข้ม แตกเป็นร่องตามยาวและเป็นสะเก็ดหนา ส่วนเนื้อไม้มีสีเหลืองถึงสีน้ำตาล ลักษณะของต้นเป็นทรงพุ่มกลมสวยงามมาก แตกกิ่งก้านจำนวนมาก เป็นต้นไม้ที่สวยงามโดยธรรมชาติ

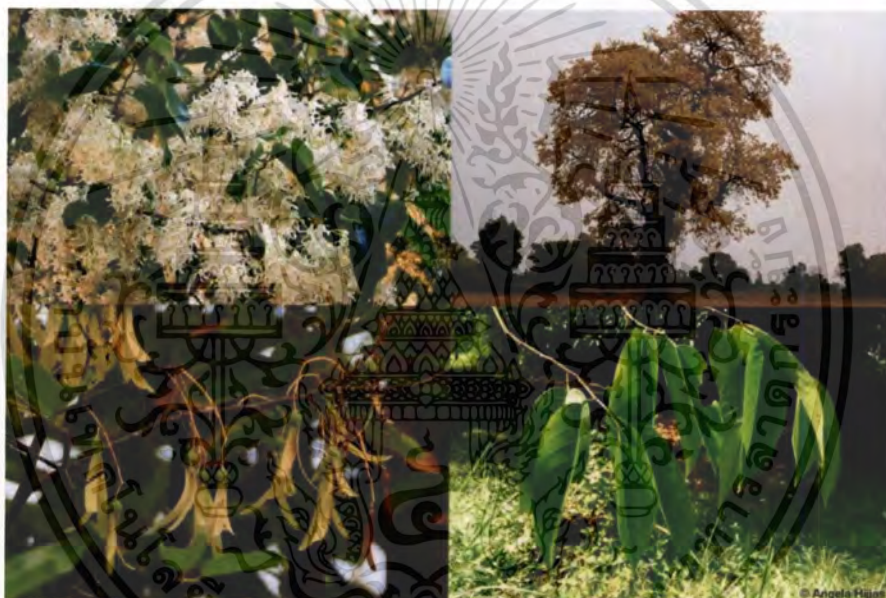
ใบพะยอม ลักษณะของใบเป็นรูปมนรี ผิวใบเกลี้ยงเป็นมัน โคนใบสอบมน ปลายใบแหลม ขอบเรียบเป็นคลื่น ด้านหลังใบจะมีเส้นใบมองเห็นชัดเจน ใบมีความยาวประมาณ 12-18 เซนติเมตรและกว้างประมาณ 6-8 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ข้อมูลนี้ไปยังสื่อออนไลน์หรือช่องทางอื่นๆ ที่มิใช่

ดอกพะยอม ออกดอกเป็นช่อใหญ่ ออกดอกตามส่วนยอดของต้น ดอกมีสีเหลือง

อ่อนและมีกลิ่นหอม ดอกมีกลีบ 3 กลีบ กลีบดอกเรียบโค้งเล็กน้อย ยาวประมาณ 4-6 เซนติเมตร โคนกลีบดอกติดกับก้านดอก มีลักษณะกลม ออกดอกพร้อมกันเกือบทั้งต้น โดยจะออกดอกในช่วงเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์

ผลพะยอม ผลแห้งมีปีกแบบ Samara ลักษณะเป็นทรงไข่และกระสวย ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ซ่อนตัวอยู่ในกระพุ้ง โคนปีกมี 5 ปีก ประกอบด้วยปีกยาวรูปขอบขนาน 3 ปีก ยาวประมาณ 8 เซนติเมตร มีเส้นตามยาวของปีกประมาณ 10 เส้น และปีกสั้นมี 2 ปีก มีความยาวไม่เกิน 3 เซนติเมตร ในผลมีเมล็ดหนึ่งเมล็ด ออกผลในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม ลักษณะส่วนประกอบต่างๆ ของต้นพะยอมแสดงดังรูปที่ 2.1 (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช, 2560)



รูปที่ 2.1 ลักษณะ ดอก ต้น ผลและใบของต้นพะยอม

ที่มา : <https://medthai.com/พะยอม/>

2.1.2 สรรพคุณของต้นพะยอม

ต้นพะยอมมีประโยชน์ต่างๆ ดังนี้ ส่วนเปลือกไม้พะยอมสามารถป้องกันการปนเปื้อนแบคทีเรีย ใช้ในการเก็บเกี่ยวน้ำตาลมะพร้าว สามารถใช้เป็นยาฝาดสมานแผลในลำไส้ได้ และใช้ใส่เครื่องหมักดองเพื่อกันบูดกันเสียได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สวดอกพะยอมช่วยบำรุงหัวใจเป็นยาแก้ไข้ โดยคุณค่าทางโภชนาการของดอกพะยอมไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในส่วนที่กินได้ต่อ 100 กรัม ประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรต 7.2 กรัม, โปรตีน 4.4 กรัม, ไขมัน 1.1 กรัม, เส้นใย 2.8 กรัม, ธาตุเหล็ก 0.3 มิลลิกรัม, และธาตุแคลเซียม 46 มิลลิกรัม

ไม้พะยอม มีสีเหลืองอ่อนถึงสีน้ำตาล สามารถนำมาใช้ในการก่อสร้างต่างๆ ไปได้ นำไปใช้ทำหมอนรถไฟ และนำมาใช้แทนไม้ตะเคียนทองเพราะมีลักษณะคล้ายๆ กัน พะยอมเป็น ต้นไม้ที่สามารถปลูกได้ดีในที่แล้ง ซึ่งอาจปลูกไว้เพื่อความสวยงามให้ร่มเงาตามบ้านเรือนก็ได้ (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช, 2560)

2.1.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในไม้พะยอม

เปลือกไม้พะยอมมีสารแทนนิน ชนิด Pyrogallol และ Catechol ในปริมาณสูง มีคุณสมบัติยับยั้งการเน่าเปื่อยของอาหาร และพบสารฟีนอลิก สารต้านอนุมูลอิสระ (Resveratrol) Butylated hydroxytoluene หรือเรียกว่า BHT 93.93% (Shuhada *et al.*, 2013) นอกจากนี้ยังพบสารประกอบ 3-ethyl-4-phenyl-3,4 dihydroisocoumarins, phayomphenols A1 และ A2 จากการสกัดด้วยเมทานอล (Morikawa *et al.*, 2012)

2.1.4 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

2.1.4.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

พบว่าเปลือกไม้พะยอมอุดมไปด้วยแทนนินซึ่งเป็นสารประกอบจำพวกโพลีฟีนอล ละลายด้วยแอลกอฮอล์ให้สีเหลืองหรือสีน้ำตาล โดยสารประกอบโพลีฟีนอลเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสูงกว่าวิตามินซีหลายพันเท่า (สยามเคมี, 2561) ซึ่งมีประโยชน์ช่วยลดน้ำตาลในเลือด ป้องกันและ บำรุงหัวใจ ช่วยสมานแผลในกระเพาะอาหาร (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช, 2560)

2.1.4.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

สารสกัดจากเปลือกพะยอมมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แก่ Methicillin resistance *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* (Shuhada *et al.*, 2013) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 19113, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC19115 และ *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 (นิลเนตร, 2553)

2.2 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

ในการสกัดสมุนไพรทำได้หลายวิธีเช่น การสกัดร้อน และการสกัดเย็นที่ไม่ใช้ความร้อน ขึ้นอยู่กับกลุ่มสารที่ต้องการสกัดและนำไปใช้ วิธีที่ไม่ใช้ความร้อนเช่น การหมักในตัวทำละลายต่างๆ การบีบเย็น (มักใช้กับการสกัดน้ำมันพืช และน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม) ส่วนใหญ่จะใช้สกัดสารที่ไม่ทนต่อความร้อน ส่วนการสกัดด้วยความร้อน เช่น การสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยการกลั่นด้วยน้ำ การต้มด้วยน้ำ เช่นการต้มพวงยาหม้อต่างๆ การสกัดด้วยตัวทำละลายโดยใช้ความร้อน เนื่องจากความร้อน

จะช่วยในการสกัดให้สารออกมาจากพืชและละลายอยู่ในน้ำและตัวทำละลายได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม สารที่ไม่คงตัวด้วยความร้อนอาจสลายตัวได้ แต่ไม่ว่าสกัดด้วยวิธีใดก็ตาม จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดได้จากพืชสมุนไพร สารสกัดหยาบนี้เป็นองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร โดยจะมีทั้งองค์ประกอบที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เรียกว่าสารสำคัญ และองค์ประกอบที่ไม่ออกฤทธิ์ทางเภสัช เรียกว่า สารเฉื่อย ซึ่งพืชสมุนไพรแต่ละชนิดจะมีสัดส่วนของทั้งสองแตกต่างกัน วัตถุประสงค์ของการสกัดสารจากพืชสมุนไพรคือเพื่อสกัดเอาสารสำคัญออกจากพืชสมุนไพร เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นของสารสำคัญสูง (สำนักข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2559)

2.2.1 ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสารสำคัญจากพืช

เมื่อทำการเตรียมตัวอย่างสมุนไพรสำหรับการสกัดแล้วควรเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมกับชนิดของสารที่ต้องการสกัด โดยทั่ว ๆ ไป ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัด ควรจะมีสมบัติดังนี้

1. สามารถละลายสารสำคัญได้มากที่สุดและไม่ละลายหรือละลายองค์ประกอบอื่น ๆ ได้น้อยที่สุด เนื่องจากสารสำคัญส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ซึ่งอาจจะมีโครงสร้างซับซ้อนแตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องพิจารณาสภาพหรือรูปแบบของสารสำคัญที่ต้องการสกัด ได้แก่ ความมีขี้ผึ้ง ไม่มีขี้ผึ้ง หากต้องการพวกน้ำมันซึ่งเป็นพวกที่ไม่มีขี้ผึ้ง ก็ใช้ตัวทำละลายไม่มีขี้ผึ้ง ถ้าต้องการพวกที่มีขี้ผึ้งก็ใช้ตัวทำละลายที่มีขี้ผึ้งสูงขึ้นมา

2. ไม่ทำปฏิกิริยาการสกัด
3. มีความคงตัวดี หาง่าย ราคาถูก และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย
4. ควรจะแยกออกจากสารละลายได้ง่าย สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย
5. ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป

2.2.2 ชนิดตัวทำละลาย

ตัวทำละลายแบ่งออกเป็น 3 ชนิดตามโครงสร้าง ได้แก่ นอน-โพลาร์ โพลาร์อะโพรติก และโพลาร์โพรติก ซึ่งอธิบายได้ดังนี้

2.2.2.1 นอน-โพลาร์ (Non-Polar) คือตัวทำละลายที่ไม่มีขี้ผึ้ง จะมีค่าไดโพลโมเมนต์ และ ไดอิเล็กตริกคอนสแตนต์ต่ำหรือเป็นศูนย์ เช่น ปีโตรเลียมอีเทอร์ อีเทอร์ เบนซีน ไดเอทิลอีเทอร์ เอทิลอะซิเตท โทลูอีน และเฮกเซน

2.2.2.2 โพลาร์อะโพรติก (Polar Aprotic) เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีไฮโดรเจนอะตอม ชนิดที่มีความเป็นกรดไม่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้ เช่น คลอโรฟอร์ม และอะซิโตน

2.2.2.3 โพลาร์โพรติก (Polar Protic) เป็นตัวทำละลายที่มีไฮโดรเจนอะตอมชนิดที่

ไม่ว่องไวใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

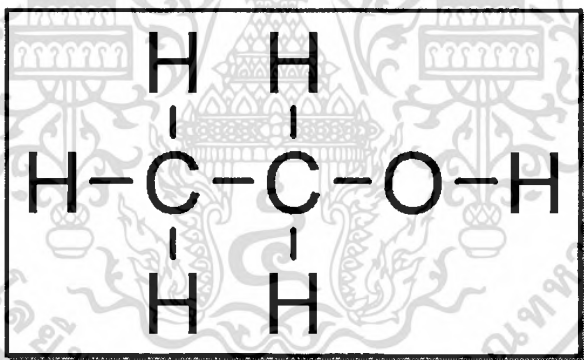
มีความเป็นกรดสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้ เช่น น้ำ แอลกอฮอล์ กรดคาร์บอกซิลิก โดยจะมีหมู่ OH อยู่ในโมเลกุล (อภัย, 2555)

2.2.3 ตัวทำละลาย

2.2.3.1 เอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอล ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)

เอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอลเป็นของเหลวใสไม่มีสี ระเหยง่าย และมีกลิ่นเฉพาะตัว สูตรโมเลกุล $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ โดยโครงสร้างของเอทิลแอลกอฮอล์แสดงดังรูปที่ 2.2 น้ำหนักโมเลกุล 46.07 กรัม/โมล จุดเยือกแข็ง -114.1 องศาเซลเซียส จุดเดือด 78.32 องศาเซลเซียส จุดวาบไฟ 14 องศาเซลเซียส อุณหภูมิวิกฤต 243.1 องศาเซลเซียส ความดันวิกฤต 6383.48 กิโลปาสกาล ความหนาแน่น 0.7893 กรัม/มิลลิลิตร สามารถละลายน้ำ ละลายได้ดีมาก

เอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ปฐมภูมิสามารถผลิตได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี และกระบวนการหมักวัตถุดิบจำพวกแป้ง และน้ำตาลด้วยจุลินทรีย์ นิยมนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตสารเคมีอื่นๆ ใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับการสกัดสารอินทรีย์จากพืชหรือสัตว์ใช้ผสมในเชื้อเพลิงเพื่อเพิ่มค่าออกเทน (สยามเคมี, 2558)



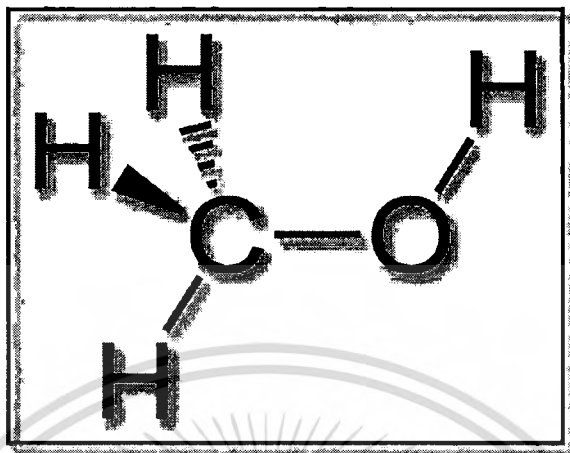
รูปที่ 2.2 โครงสร้างของเอทิลแอลกอฮอล์

ที่มา : <https://th.wikipedia.org/wiki/เอทานอล>

2.2.3.2 เมทานอลหรือเมทิลแอลกอฮอล์ (CH_3OH)

เมทานอลหรือเมทิลแอลกอฮอล์เป็นของเหลวใส ระเหยง่าย เป็นพิษ นิยมใช้เป็นตัวทำละลาย และใช้เป็นเชื้อเพลิงในธรรมชาติ เมทานอลเป็นผลิตภัณฑ์จากการสลายสารอาหารแบบไม่ใช้ออกซิเจนของแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งเมทานอลจะระเหยออกสู่อากาศภายนอก แล้วสลายตัวได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ สูตรโมเลกุล CH_3OH โดยโครงสร้างของเมทิลแอลกอฮอล์แสดงดังรูปที่ 2.3 น้ำหนักโมเลกุล 32.05 กรัม/โมล ความหนาแน่น 0.7918 กรัม/มิลลิลิตร (ของเหลว) จุด

หลอมเหลว -97 องศาเซลเซียส จุดเดือด 64.7 องศาเซลเซียส สามารถละลายน้ำได้ (สยามเคมี, 2558)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเมทิลแอลกอฮอล์

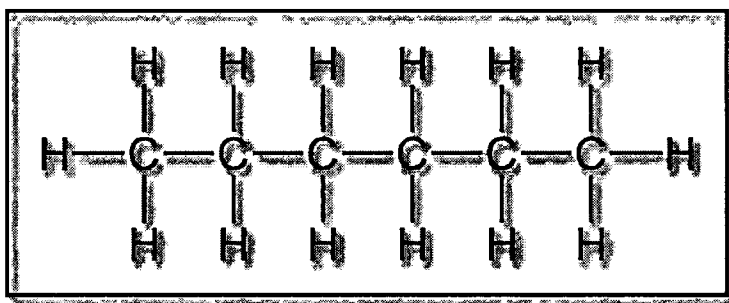
ที่มา : <https://th.wikipedia.org/wiki/เมทานอล>

2.2.3.3 เฮกเซน ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)

เฮกเซนเป็นของเหลวใส ไม่มีสี กลิ่นฉุน สูตรโมเลกุล $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ โดยโครงสร้างของเฮกเซนแสดงดังรูปที่ 2.4 น้ำหนักโมเลกุล 86.1766 จุดหลอมเหลว -100 ถึง -95 องศาเซลเซียส จุดเดือด 69 องศาเซลเซียส ความถ่วงจำเพาะ 0.660 การละลายน้ำ 10.5 มิลลิกรัม/ลิตร ดัชนีหักเหแสง 1.375 จุดวาบไฟ -27 องศาเซลเซียส จัดเป็นวัตถุอันตรายที่เป็นของเหลว และไอระเหยมีความไวไฟสูง สารที่เข้ากันไม่ได้ เช่น สารออกซิไดซ์ แมกนีเซียมเปอร์คลอเรท คลอรีน ฟลูออรีน และพลาสติก

เป็นสารที่ผลิตได้จากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบหรือการแยกก๊าซปิโตรเลียมเหลว ที่ถูกนำมาใช้งานสำหรับเป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมต่างๆ อาทิ การสกัดสารอินทรีย์จากสมุนไพร การสกัดน้ำมันหอมระเหย การสกัดน้ำมันจากเมล็ดธัญพืช (สยามเคมี, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของเฮกเซน

ที่มา : <https://th.wikipedia.org/wiki/เฮกเซน>

ในการสกัดสารจากพืชควรเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารสกัดที่ต้องการจากพืช โดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ซึ่งมีคุณสมบัติดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สรุปคุณสมบัติของตัวทำละลายบางชนิดที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร

ตัวทำละลาย	คุณสมบัติ
1.Ether	เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่ได้จำกัดชนิด ไม่ละลายสารอื่นๆ ชนิดอื่นที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อสมุนไพร แต่เกิด Oxidize ได้ง่าย
2.Hexane	เหมาะสำหรับสารที่ไม่มีขี้ ราคากถูก
3.Acetone	เป็นตัวทำละลายที่กำจัดไขมันได้ดี แต่สามารถละลายสารพื้นฐานในพืชได้บ้าง ข้อเสีย คือ มีกลิ่นฉุน กำจัดได้ยาก
4.Chloroform	เป็นตัวทำละลายที่สามารถละลายสารได้เกือบทุกชนิด แต่ไม่นิยมใช้เนื่องจากรับประทานมากจะเป็นสารก่อมะเร็ง
5.Ester	เป็นตัวทำละลายในการสกัดยาสมุนไพร ทำให้ตัวยาสำคัญเข้มข้นและทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย
6.Methylene chloride	เกิดอิมัลชัน แต่ไม่ทำให้แห้งหรือระเหย
7.Alcohol	เป็นที่นิยมใช้เพราะมีความเป็นพิษต่ำ มี 2 ชนิด คือ methanol ethanol มีความสามารถในการละลายสารกว้างมากและยังใช้ทำละลายเอนไซม์ในพืชได้ ลดปฏิกิริยาการสลายตัวของน้ำขจัดออกได้ง่ายโดยไม่ต้องใช้ความร้อนสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ตัวทำละลาย	คุณสมบัติ
8. Water	เป็นตัวทำละลายที่สำคัญ ไม้ไวไฟ ไม้เป็นพิษ หาง่าย ราคาถูก และสกัดสารได้มากชนิดแต่ไม่มีความคงตัวอาจทำให้การเกิดปฏิกิริยาได้ง่าย ก่อนนำมาใช้ต้องผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ

ที่มา : สมศักดิ์ (2559)

2.2.4 การสกัดสารจากพืช

การสกัด หมายถึงกระบวนการแยกสารออกฤทธิ์ออกจากสารที่เป็นของแข็งหรือของเหลวโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งสามารถละลายสารออกฤทธิ์ที่ต้องการออกมาให้ได้มากที่สุด การสกัดสารจากพืช สามารถทำได้ 3 วิธี ได้แก่

2.2.4.1 การหมัก (Maceration)

วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด เป็นวิธีการสกัดโดยนำสมุนไพรหมักกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด ทิ้งไว้ 3-7 วัน เขย่าหรือคนบ่อยๆ แล้วกรองเอาสารสกัดไปใช้ ถ้าต้องการให้หมดจดอาจต้องสกัดหลายครั้ง ข้อดีคือ สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก และมักไม่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายเนื่องจากจะทำให้บูด โดยอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดแสดงดังรูปที่ 2.5 (สมศักดิ์, 2559)



รูปที่ 2.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดแบบ Maceration

ที่มา : http://www.kpi.msu.ac.th/upload/ag_tor_ref_byval/ag_16_in_1.2.1.2_17 (2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการใช้งานในกรณีฉุกเฉินเท่านั้น ไม่สามารถนำ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4.2 การสกัดร้อนโดยใช้ Soxhlet Extractor

เป็นวิธีที่ใช้ความร้อนในการสกัดและต้องอาศัยการควบแน่น เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ ใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในขวดรูปชมพู่ ระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมา จนถึงจุดหนึ่งก็จะไหลกลับลงไปใน flask ใหม่ โดยใช้วิธีการกลั่นน้ำแล้วกลั่นตัวขึ้นไปใหม่จนสกัดได้หมดจดในที่สุด โดยอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดแสดงดังรูปที่ 2.6 (สมศักดิ์, 2559)



รูปที่ 2.6 เครื่องสกัดแบบ Soxhlet Extractor

ที่มา : <https://www.gotoknow.org/posts/457805>

2.2.4.3 การสกัดเย็น (Cold extraction)

การสกัดเย็น คือ การแยกสารสำคัญออกจากเมล็ด หัว ใบ ดอก ผล เปลือก ลำต้นของพืชโดยไม่ใช้ความร้อนและสารเคมี และทำการแยกเอาตัวทำละลายออกจากสารสกัด โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) แสดงดังรูปที่ 2.7 โดยตัวทำละลายที่ละลายสารที่สนใจจะถูกทำให้กลายเป็นไอด้วยระบบสุญญากาศจากปั๊มและให้ความร้อนแก่สารละลายตัวอย่าง เพื่อให้การกลายเป็นไอง่ายขึ้น (การลดความดันในระบบจะช่วยลดอุณหภูมิของจุดเดือดของตัวทำละลาย ทำให้ใช้อุณหภูมิต่ำลงและทำให้ตัวทำละลายระเหยได้ เพราะฉะนั้นสารสำคัญก็จะไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนที่สูงเกินไป) จากนั้นไอสารละลายจะผ่านคอนเดนเซอร์ (Condenser) ที่มีระบบหล่อเย็น ทำให้ไอสารควบแน่นกลายเป็นของเหลว ไหลลงสู่ภาชนะรองรับ (Receiving flask) และสามารถนำตัวทำละลายที่แยกออกมาได้กลับไปใช้สกัดสารจากพืชใหม่ได้ (สำนักข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 เครื่อง Evaporator

ที่มา : <https://thai.alibaba.com/g/herbal-extraction-equipment.html>

2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์หมายถึง ความสามารถในการยับยั้งการเจริญ (Microbiostatic) หรือความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Microbicidal) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสมุนไพร คือ การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารยับยั้งที่มีอยู่ในสมุนไพร (ประสาทร, 2551)

2.3.1 การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารยับยั้งจุลินทรีย์

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ได้มีการกำหนดวิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารยับยั้งจุลินทรีย์เป็นวิธีมาตรฐานเพื่อให้สามารถเปรียบเทียบกันได้ระหว่างห้องปฏิบัติการต่างๆ โดยมีขั้นตอนที่ชัดเจนตามชนิดของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ ความหนาแน่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมเชื้อในการทดสอบ อุณหภูมิ เวลา และสภาวะในการบ่ม (คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2557)

2.3.1.1 MIC (Minimal Inhibitory Concentration)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หน่วยที่ใช้โดยทั่วไปคือ ไมโครกรัม (μg) ต่อมิลลิลิตร (ml) หรือหน่วยสากล (IU, International unit) ต่อมิลลิลิตร ค่า MIC นี้ สามารถนำมาใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อหนึ่งๆ ต่อยาต้านจุลชีพ หลายๆ ชนิด หรือความไวของเชื้อหลายๆ ชนิดต่อหนึ่งๆ และรวมทั้งเพื่อประเมินค่าอื่นที่เกี่ยวข้องกับยาหรือ

แปรผลของยาต่อเชื้อ ในการทดสอบเพื่อหาค่า MIC ยา ควรได้รับการเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ทุกๆ 2 เท่า (2-Fold serial dilution) (ประสาทร, 2551)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.2 MLC (Minimal Lethal Concentration)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อ (หรือมีเชื้อเจริญไม่เกินกำหนด) หากเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรีย อาจใช้คำที่จำเพาะเจาะจงกว่า คือ MBC (Minimal bactericidal concentration) ยาต้านจุลชีพที่มีวิธีการออกฤทธิ์เป็นชนิดฆ่าทำลาย (Microbicidal) จะมีค่า MIC และ MLC เหมือนหรือใกล้เคียงกัน (ไม่เกินหนึ่งหรือสองความเข้มข้น $MLC/MIC \leq 4$) (ประสาทร, 2551)

2.3.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพร

2.3.2.1 Minimal Inhibitory Concentration (MIC) หรือ Dilution

Susceptibility Test

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Dilution test จะเป็นการทดสอบในเชิงปริมาณ นิยมใช้ทดสอบเชื้อที่เจริญได้ช้า ใช้ทดสอบยีส่นย่นผลวิธี Diffusion ที่ให้ความไวปานกลางหรือดียา เพื่อว่าจะสามารถใช้สารสกัดสมุนไพรนั้นในจำนวนสูงๆ ได้และใช้ทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ ที่เจริญแบบไม่ใช้อากาศ (Anaerobe) หลักการโดยทั่วไปของวิธีทดสอบแบบ Broth และ Agar dilution susceptibility test จะคล้ายคลึงกัน คือ จะเจือจางสารสกัดสมุนไพรใน medium ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นจึงใส่เชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสมุนไพร ภายหลังการบ่มเพาะ ให้ดูค่า MIC โดยสังเกตความขุ่นหรือใสของอาหารเหลว และมีหรือไม่มีเชื้อเจริญขึ้นบนอาหารแข็ง (ประสาทร, 2551)

2.3.2.1.1 Broth dilution test

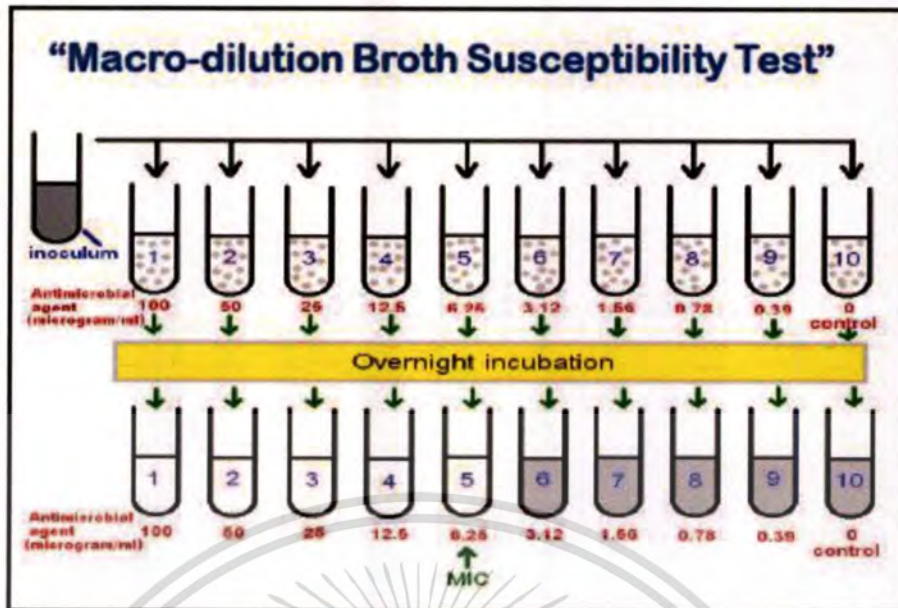
เป็นการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสมุนไพรที่ละเอียดวิธีหนึ่ง การทดสอบนี้จะทำให้ทราบทั้ง MIC และ MBC ของสมุนไพรนั้นๆ กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำกรทดสอบ หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้คือ เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีสารสกัดสมุนไพรในปริมาณต่างๆ กันผสมอยู่และสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ วิธีการนี้ยังสามารถแบ่งเป็น Macro dilution (หรือ tube) test และ Micro dilution test

2.3.2.1.1.1 Broth macro dilution test

ทำในหลอดทดลอง โดยทำการเจือจางสารสกัดสมุนไพร Stock solution ด้วยตัวเจือจาง หรือด้วยอาหารเหลว ในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-Fold serial dilution) ไปเรื่อยๆ ปริมาตรสุดท้ายที่อยู่ในหลอด เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร และต้องมีหลอดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร ด้วย เตรียมเชื้อทดสอบให้ได้ขนาด โดยอาจใช้วิธีเทียบความขุ่นกับ McFarland เบอร์ 0.5 หรืออาจใช้

การวัดความขุ่นด้วย Spectrophotometer แล้วเจือจางลงเพื่อให้ได้ขนาดเชื้อที่ต้องการ การทดสอบ
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ด้วยวิธี Broth macro dilution test แสดงดังรูปที่ 2.8 (ประสาทร, 2551)

ไมวารกรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



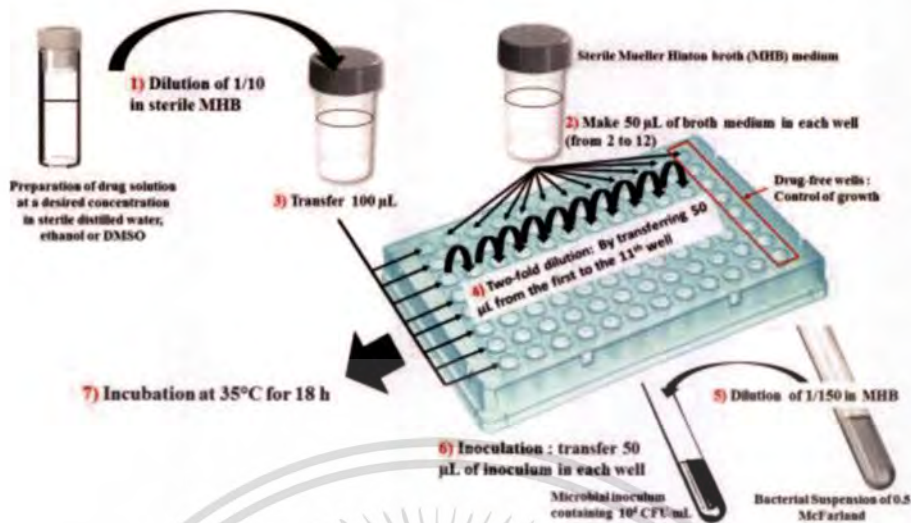
รูปที่ 2.8 การทดสอบฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์โดยวิธี Macro dilution test

ที่มา : file:///C:/Users/user/Downloads/Documents/8%20(2011)%20Drug%20Interaction-Susceptibility%20Test.pdf

2.3.2.1.1.2 Broth micro dilution test

ทำใน Microtiter plate 96-well โดยเจือจาง Stock solution ด้วยอาหารเหลวแบบ 2-Fold serial dilution มีหลุมควบคุมเป็นอาหารเหลว ที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร ในแต่ละหลุมจะมีปริมาตรเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เชื้อที่ปรับขนาดแล้ว (ใช้เชื้อประมาณ 10^5 CFU/ml) 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วปิดฝาก่อนนำไปปั่นเพาะ อ่านค่า MIC โดยดูความขุ่นด้วยตาเปล่า หรืออาจใช้สารบางอย่างที่สามารถบ่งชี้การเจริญของเชื้อได้เพื่อให้อ่านค่าได้ง่ายขึ้น ดังเช่นงานวิจัยของ Eloff (1998) ที่ได้ทดลองโดยใช้สาร Tetrazolium dye หลายชนิด ได้แก่ Tetrazolium red, Thiazolyl blue และ P-lodonitrotetrazolium violet (INT) เป็นสารบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรีย (Biologically active organisms) โดยหากเชื้อมีการเจริญจะสามารถเปลี่ยนสารที่ไม่มีสีเป็นสารที่มีสีได้ซึ่งพบว่า P-lodonitrotetrazolium violet ให้ผลการวัด การเจริญได้ของเชื้อที่ดีที่สุด โดยการทดสอบด้วยวิธี Broth micro dilution test แสดงดังรูปที่ 2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 การทดสอบด้วยวิธี Broth micro dilution test

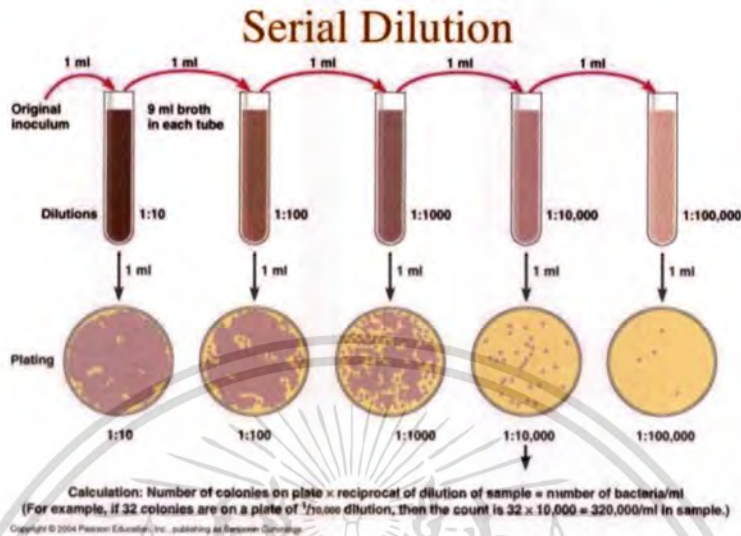
ที่มา : https://www.researchgate.net/figure/Broth-microdilution-for-antibacterial-testing-as-recommended-by-CLSI-protocol_fig4_285656686

2.3.2.1.2 Agar dilution test

เป็นการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียที่โดยมีหลักการทดสอบคล้ายคลึงกับ Broth dilution method ต่างกันเพียงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น กล่าวคือทำการทดสอบโดยการเจือจางสารทดสอบในอาหารแข็งที่ยังเหลวอยู่ และถ่ายเชื้อลงบนผิวของอาหารแข็ง ข้อดีของวิธี นี้คือสามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานเดียวกันได้ วิธีนี้สามารถหา ค่า MIC ได้แต่ไม่สามารถหาค่า MBC ได้ค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อเป็นค่า MIC

วิธีการทำ Agar dilution test นำ Stock solution มาเจือจางด้วยน้ำหรือตัวเจือจางที่เหมาะสมจนได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ แล้วจึงใส่ในอาหารแข็งซึ่งหลอมไว้ (45-50 องศาเซลเซียส) การเตรียมขนาดเชื้อด้วยวิธีการเดียวกับที่ทำใน Broth dilution test แต่เจือจางขนาดเชื้อลงให้ได้ขนาดเชื้อซึ่งเมื่อแต่ละลงบนอาหารแข็ง แล้วให้ได้เชื้อประมาณ 1×10^4 ตัวต่อจุด เมื่อแต่ละ เชื้อลงบน อาหารแข็งทดสอบแล้ว ต้องทิ้งให้ซีมหมดก่อนคว่ำจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 16- 20 ชั่วโมง (เชื้อที่เจริญช้าอาจให้นาน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากกว่า 48 ชั่วโมง) แล้วอ่านค่า MIC ที่ความเข้มข้นที่ จะต้องไม่มีเชื้อขึ้นเลย การทำ Agar dilution test แสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 การทำ Agar dilution test

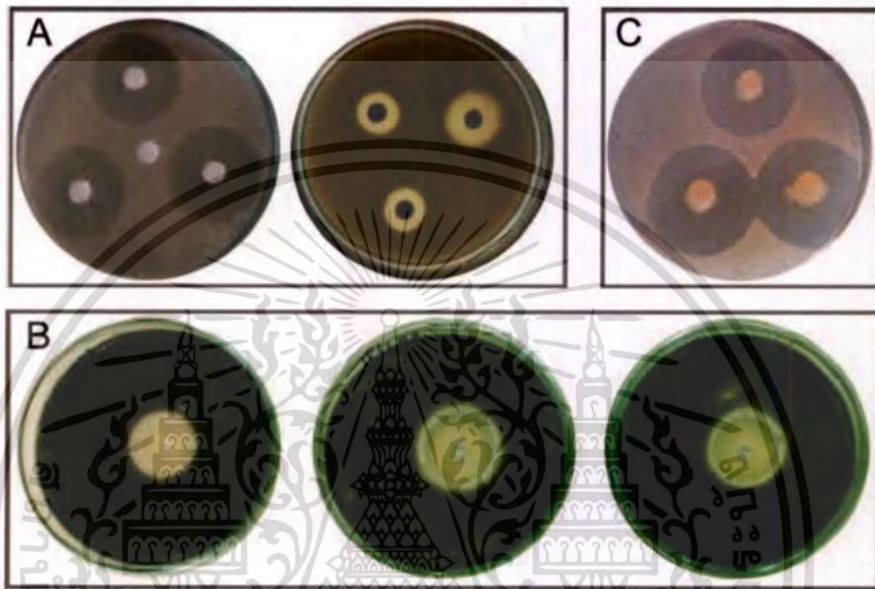
ที่มา : https://www.researchgate.net/publication/315707161_The_Effect_of_Probiotics_on_Interleukin_8_and_Intestinal_Flora_in_Irritable_Bowel_Syndrome_in_Hospital_of_Zagazig_University

2.3.2.1.3 Agar diffusion test

Disc diffusion method (Kirby-Bauer test) เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่นๆ วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่า เชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ ไม่อาจทราบค่า MIC หรือ MLC ได้ ไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญช้า และเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ หลักการทั่วไปคือ การทำให้สารสกัดสมุนไพรที่มีในแผ่นกระดาษกรอง (Paper disc) ที่เตรียมไว้ก่อน ซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อ (Spread) ในจำนวนที่เหมาะสมไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ถูกยับยั้ง ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสไม่มีโคโลนีเชื้อรอบๆ แผ่นดิสก์ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแปรตามขนาดของบริเวณที่ถูกยับยั้ง วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบสมุนไพรเพียงความเข้มข้นเดียว และใช้เป็นการตรวจกรองฤทธิ์ด้านเชื้อของสมุนไพรในเบื้องต้น

นอกจากขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบแล้ว ยังอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพร ไม่วากรณ์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งหากมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากมีการนำไปใช้

ความสามารถในการละลายหรือซึบไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของสมุนไพร อัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรด-ด่าง และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อ สำหรับแหล่งรองรับสมุนไพร (Drug reservoir) ที่ใช้มักใช้เป็นกระดาษซับวงกลม (Filter paper disc) หรือ อาจเรียกว่า Disc sensitivity test หรือ อาจเป็นหลุมที่เจาะลงในอาหารแข็ง โดยการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละวิธีแสดงดังรูปที่ 2.11 (Balouiri *et al.*, 2016)



รูปที่ 2.11 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพร : A โดยวิธี Disc diffusion, B โดยวิธี Agar well diffusion และ C โดยวิธี Agar plug diffusion

ที่มา : Balouiri, M./Journal of Pharmaceutical Analysis 6 (2016)71–79

วิธีการทำ Agar well diffusion ทำได้โดยเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบโดยเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว วัดความขุ่นของเชื้อเพื่อให้ได้จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมกับการทดสอบ เกลี่ยเชื้อลงในอาหารแข็ง Mueller-Hinton ให้ทั่ว จากนั้นเจาะรูที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ถึง 8 มิลลิเมตร โดยใช้ Cork borer แล้วหยดสารละลายสมุนไพรลงไปประมาณ 40 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มเพาะเขื่อนาน 24 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ถูกยับยั้งโดยเทียบกับ ชุดควบคุมผลบวกที่ใช้ยาปฏิชีวนะที่ทราบปริมาณ (Balouiri *et al.*, 2016)

2.3.2.2 Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับงานวิจัยของศูนย์วิจัยสมุนไพรแห่งชาติเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ได้โดยไม่ได้รับอนุญาต
การทดสอบ MBC จะทำต่อเนื่องจากการหาค่า MIC ซึ่งนิยมทำจาก Broth dilution ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

test โดยการถ่ายเชื้อจากอาหารเหลวที่ไม่มีเชื้อขึ้นตั้งแต่ช่วงค่า MIC ขึ้นไปขีดเชื้อลงบนอาหารแข็ง เพื่อให้เปรียบเทียบได้ชัดเจน ควรเพาะจากหลอดควบคุม ที่ไม่มีสปอร์ด้วย จากนั้นนำอาหารแข็งไปบ่มแล้วดูการเจริญของเชื้อเพื่ออ่าน MLC (MBC หรือ MFC) โดยที่ความเข้มข้นดังกล่าวจะต้องไม่มีเชื้อขึ้นหรือเกือบไม่มีเชื้อขึ้น (99.9% ของเชื้อถูกฆ่า)

2.4 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

2.4.1 *Listeria monocytogenes*



รูปที่ 2.12 ลักษณะโคโลนีและการติดสีแกรมของ *Listeria monocytogenes*

การจัดจำแนก *Listeria monocytogenes*

Kingdom: Eubacteria

Phylum: Firmicutes

Class: Bacilli

Order: Bacillales

Family: Listeriaceae

Genus: *Listeria*

Species: *L. monocytogenes*

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรีย ที่มีลักษณะรูปท่อนสั้น มักเรียงตัวเป็นสายต่อกัน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับเป็นเอกสารที่เผยแพร่ในวงกว้าง 3-5 เซลล์ หรือมากกว่านั้น โดยลักษณะโคโลนีและการติดสีแกรมแสดงดังรูปที่ 2.12 เป็นแบคทีเรียที่

ไม่สร้างสปอร์ หรือ แคปซูล อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต คือ 37 องศาเซลเซียส แต่สามารถเติบโตได้ทุกอุณหภูมิ แม้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 2.5 องศาเซลเซียส และสามารถทนความร้อนได้ดี

แหล่งที่พบเชื้อ *L. monocytogenes* พบได้ทั่วไปในน้ำ น้ำเสีย อุจจาระคนและสัตว์ จึงสามารถปนเปื้อนลงไปในอาหารได้ง่าย โดยพบเชื้อได้ในวัตถุดิบที่จะนำไปประกอบอาหาร โดยเฉพาะเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น นม *L. monocytogenes* ถูกทำลายได้โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการปรุงอาหารหรือความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรส์ ดังนั้นการปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้ในอาหารจึงเกิดขึ้นหลังขั้นตอนการปรุงหรือเกิดการปนเปื้อนซ้ำในระหว่างขั้นตอนการบรรจุ การขนส่ง และการวางจำหน่าย

L. monocytogenes เป็นแบคทีเรีย ที่ก่อให้เกิดโรค Listeriosis โลหิตเป็นพิษและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ มีอาการคล้ายเป็นหวัด เช่น มีไข้ ปวดหัว มีอาการท้องเสีย อาเจียน อาการติดเชื้อในกระแสเลือด อื่นๆ มักพบในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอหรือทารกที่เกิดจากมารดาที่ได้รับเชื้อขณะตั้งครรภ์ และยังมีรายงานว่า มีผู้เสียชีวิตเนื่องจากบริโภคอาหารที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนอีกด้วย *L. monocytogenes* จึงเป็นดัชนีตัวหนึ่ง que แสดงถึงความปลอดภัยของอาหารด้วย (สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม, 2561)

2.4.2 *Vibrio parahaemolyticus*



รูปที่ 2.13 ลักษณะโคโลนีและการติดสีแกรมของ *Vibrio parahaemolyticus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจัดจำแนก *Vibrio parahaemolyticus*

Kingdom:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Class:	Gamma Proteobacteria
Order:	Vibrionales
Family:	Vibrionaceae
Genus:	<i>Vibrio</i>
Species:	<i>V. parahaemolyticus</i>

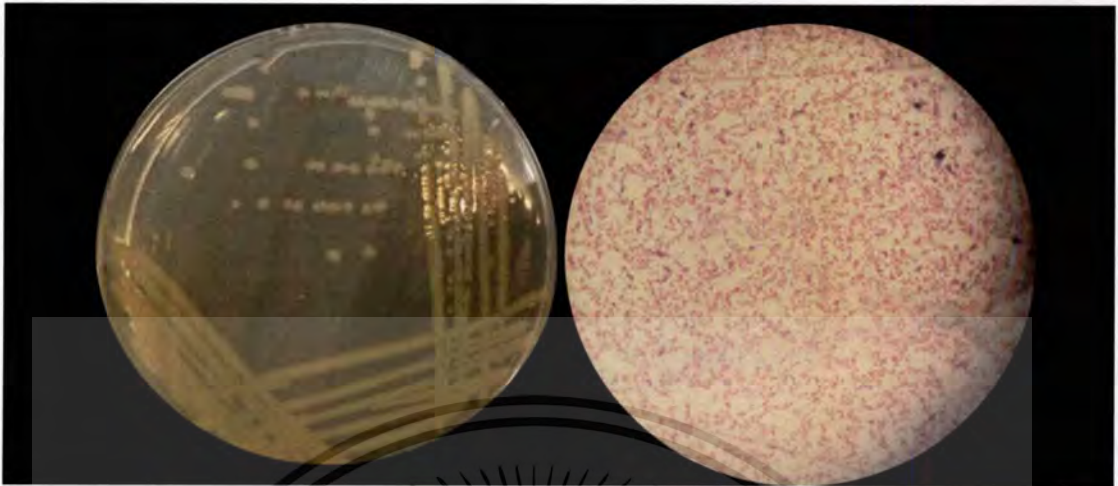
Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรีย ที่มีลักษณะรูปท่อนตรงหรือโค้ง ขนาด 0.5 x 1.5- 3 ไมโครเมตร โดยลักษณะโคโลนีและการติดสีแกรมแสดงดังรูปที่ 2.13 ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างแคปซูล แต่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตอยู่ระหว่าง 35-37 องศาเซลเซียส ช่วงอุณหภูมิในการเติบโตอยู่ที่ 10-44 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอชในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 6-9 *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรีย ที่ต้องการเกลือในการเจริญประมาณ 1-3% และสามารถเจริญได้ในที่ที่มีเกลือ 7%

แหล่งที่พบเป็น *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ตามธรรมชาติโดยเชื้อจะอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ตามชายฝั่งทะเล ในฤดูที่มีอากาศหนาวเย็นจะพบเชื้อชนิดนี้ได้ตามตะกอนโคลนตมในทะเล แต่ในช่วงฤดูที่มีอากาศอบอุ่น จะพบเชื้อนี้อยู่ทั่วไปในน้ำทะเล ในปลา กุ้ง หอย และปู นอกจากนี้ยังพบได้ตามแหล่งน้ำจืด ทั่วไปและบริเวณปากอ่าวแม่น้ำ ซึ่งมีทั้งชนิดที่เป็นเชื้อก่อโรคและไม่เป็นเชื้อก่อโรค

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ และเป็นสาเหตุของการเกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ เชื้อชนิดนี้มีระยะฟักตัว 4-96 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อผู้ป่วยจะแสดงอาการเมื่อเชื้อรอดชีวิตไปอยู่ที่ลำไส้เล็กแล้ว ปล่อยสารพิษโดยยังไม่สามารถระบุชนิดของสารพิษได้ ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อจะเกิดอาการท้องเสีย เป็นตะคริวในช่องท้อง มีอาการคลื่นเหียน วิงเวียน อาเจียน ปวดหัว มีไข้และหนาวสั่น อาการป่วยค่อนข้างจะบางเบาหรืออยู่เพียงระดับกลางๆ แต่ก็มีบางรายที่จะต้องเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาล (สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม, 2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 *Enterobacter aerogenes*



รูปที่ 2.14 ลักษณะโคโลนีและการติดสีแกรมของ *Enterobacter aerogenes*

การจัดจำแนก *Enterobacter aerogenes*

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: *Enterobacter aerogenes*

Species: *E. aerogenes*

Enterobacter aerogenes เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง โดยลักษณะโคโลนีและการติดสีแกรมแสดงดังรูปที่ 2.14 ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดสแต่สร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ หมักน้ำตาลกลูโคสและรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ได้ มีทั้งพวกที่เคลื่อนที่ได้และไม่เคลื่อนที่ โดยพวกที่เคลื่อนที่ได้จะอาศัยแฟลเจลลารอบเซลล์ แบคทีเรียวงค์นี้พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำและพืช นอกจากนี้ยังพบในลำไส้ของคนและสัตว์จึงมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “Enteric bacilli” (ศิริพร, 2561)

แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นได้ทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจริง (True pathogen) และจุลินทรีย์ก่อโรคแบบฉวยโอกาส (Opportunistic pathogen) ในสภาวะที่ร่างกายอ่อนแอ จินัสที่พบเป็นเชื้อก่อโรคจริง ได้แก่ *Salmonella* spp. *Shigella* spp. *Yersinia enterocolitica* และบางสายพันธุ์ของ

Escherichia coli โดยแบคทีเรียเหล่านี้มักก่อโรคอาหารเป็นพิษในระบบทางเดินอาหาร มีอาการของโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ (Gastroenteritis) โดยการกินอาหารหรือดื่มน้ำที่มีเชื้อเข้าไป และกรณีการพบเป็นเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาส ก่อให้เกิดการติดเชื้อนอกระบบทางเดินอาหารและเป็นสาเหตุสำคัญส่วนใหญ่จะเป็นการติดเชื้อในโรงพยาบาล โรคที่พบบ่อยที่สุด คือกระเพาะปัสสาวะอักเสบ (Cystitis) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียวงศ์นี้เป็นสาเหตุของโรคนี้อันถึงร้อยละ 70 ของเชื้อที่เป็นสาเหตุทั้งหมด (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2553)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Shuhada *et al.* (2013) ได้ทำการศึกษาต้นพะยอม หรือที่รู้จักกันในชื่อ Meranti temak nipis หนึ่งในหลายสปีชีส์ของพะยอมที่พบในป่าของประเทศมาเลเซีย เป็นสปีชีส์หนึ่งในวงศ์ Dipterocarpaceae และเป็นที่ยอมรับว่ามี Oligomers resveratrol จัดอยู่ในกลุ่มของพืชที่สร้าง สารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ ที่มีฤทธิ์เป็น Biological activities ในการศึกษาวิเคราะห์ส่วนเปลือกของพะยอมที่ได้เก็บรวบรวมมาจากป่า FRIM Mata Ayer รัฐเปอร์ลิส (Perlis) ประเทศมาเลเซีย และสกัดด้วยอะซิโตนที่อุณหภูมิห้อง ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Chromatographic techniques แยกสารสกัดหยาบออกจากอะซิโตน ทำให้เกิดการแยกของ Tetramer resveratrol พบว่าเป็น Hopeaphenol โครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้ถูกทำให้ชัดเจนโดยใช้ Spectroscopic methods (IR, 1D และ 2D NMR) และเปรียบเทียบกับวิจัยอื่นๆ ที่ได้ศึกษาไว้แล้ว สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดจากส่วนเปลือกของพะยอมนำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ (MRSA, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Shigella dysenteriae* โดยใช้วิธี Kirby Baueur disc diffusion ผลการทดสอบทำให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกพะยอมทำให้เกิดโซนใส 10 มิลลิเมตรของเชื้อ MRSA และทำให้เกิดโซนใส 7 มิลลิเมตรของ *S. dysenteriae* และทดสอบกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH assay พบว่าสามารถยับยั้งได้ถึง 91.08 % และพบ Butylated hydroxytoluene หรือเรียกย่อว่า BHT 93.93%.

Ramasamy *et al.* (2013) ได้ทำการศึกษากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดที่สกัดจากเปลือกไม้พะยอมโดยใช้เมทานอลและอะซิโตนเป็นตัวทำละลาย ปริมาณฟีนอลิกและกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระพิจารณาจาก DPPH, Radical scavenging, Ferric ion reducing power, Hydroxyl radical, ABTS radical scavenging และ Hydrogen peroxide scavenging activities สารสกัดที่สกัดจากเปลือกพะยอมทั้งใช้เมทานอลหรืออะซิโตนเป็นตัวทำละลาย พบสารต้านอนุมูลอิสระ และได้รับการสนับสนุนจากวิทยาศาสตร์ในเรื่องปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่สูง พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกพะยอมมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นดานการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pimpa (2003) ได้ทำการศึกษาคณสมบัติสารกันบูดของสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากเปลือกของพะยอม และเม็ดมะม่วง *Mangifera duperreana* Pierre (พันธุ์กะล่อนและป่า) ใช้เอทานอล 50% เป็นตัวทำละลาย สารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดพิจารณาจาก Folin-Ciocalteu Reagent assay (FCR) และปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพิจารณาจาก 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay (DPPH) และ Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียใช้วิธี Agar macro dilution method สารสกัดจากเม็ดมะม่วงมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมากกว่า สารสกัดจากเปลือกพะยอม แต่สารสกัดจากเปลือกพะยอมก็สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แต่น้อยกว่าสารสกัดจากเม็ดมะม่วง

ธรรพ และคณะ (2558) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. โดยใช้วิธีการหมัก (Maceration) สกัดสารหยาบจากหอมหัวใหญ่ ใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทานอล เมทานอล พบว่าสารสกัดหยาบจากหอมหัวใหญ่ที่มีน้ำหนักแห้ง 2 กิโลกรัม จะได้ปริมาณสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดเท่ากับ 1.305 3.260 และ 1.306 กรัม ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ โดยมีขนาดของวงใสเท่ากับ 6 มิลลิเมตรแต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* spp. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* จากการคัดเลือกผลจากวิธี Disc diffusion ซึ่งพบว่าสารสกัดหอมหัวใหญ่ที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้จึงทำการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ด้วยวิธี Macro broth dilution พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหอมหัวใหญ่เท่ากับ 5 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการตกตะกอนของสารสกัด และสารละลายด้านบนมีลักษณะใส แสดงว่า *E. coli* ไม่สามารถเจริญได้ เมื่อเปรียบเทียบกับที่ความเข้มข้นที่น้อยกว่า 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารละลายขุ่นทั้งหมด แสดงว่า *E. coli* สามารถเจริญได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

มณฑล (2560) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียก่อโรครกลุ่ม Staphylococci ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปตามผิวหนังและเยื่อของมนุษย์และสัตว์ ทั้งยังสามารถปรับตัวให้ทนต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาได้ดี ดังนั้นการค้นหาสารออกฤทธิ์จากพืช เพื่อควบคุมเชื้อกลุ่มนี้จึงมีความจำเป็น ในการวิจัยนี้ได้มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากส่วนต่างๆ ของพืชท้องถิ่นที่พบในจังหวัดนครราชสีมา จำนวนทั้งหมด 58 ตัวอย่าง จากพืช 47 ชนิด ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ด้วยวิธี Agar disc diffusion และ Broth micro dilution การตรวจสอบเบื้องต้นพบว่า

ไมวารณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งหมด 16 ชนิด โดยผักแขยง และผลกรวยป่าให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสมากกว่าสารสกัดชนิดอื่น และเมื่อหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (ค่า Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) พบว่าค่า MIC/MBC ของสารสกัดจากเหง้ากระชาย ผลกรวยป่า และใบพรวด มีค่าเท่ากับ 0.156/0.156 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.625/0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.312/0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะให้ค่า MIC ที่ดีกว่าสารสกัดชนิดอื่น จึงสามารถจัดอยู่ในกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งดี (มีค่า MIC < 1 mg/ml) ส่วนกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลาง (มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 1-2.5 mg/ml) มีทั้งหมด 20 ชนิด และกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งอ่อน (มีค่า MIC > 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มี 35 ชนิด งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่า นอกจาก กระชาย และพรวด กรวยป่าน่าจะเป็นพืชที่มีศักยภาพ สำหรับการศึกษาวิจัยในเชิงลึกเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อไป

นิลเนตร (2553) ได้ทำการศึกษา Antibacterial activity จากสกัดที่ได้จากเปลือกต้นพะยอม (*Shorea roxburghii* G.Don) โดยให้ตัวละลายเอทิล อะซีเตท เอทานอล และน้ำ ต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร 6 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Salmonella typhimurium* ATCC 19113 *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 และ *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 โดยวิธี Disc diffusion method และหาค่า MIC (Minimal Inhibition Concentration) และค่า MBC (Minimal Bactericidal Concentration) โดยใช้วิธี Broth dilution method พบว่า สารสกัดพะยอมโดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดได้ โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.049-25.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC อยู่ระหว่าง 0.098-25.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นสารสกัดพะยอมโดยใช้ตัวทำละลายน้ำ ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *E.coli* ATCC 25922 และ *S. typhimurium* ATCC 19113 สารสกัดพะยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล อะซีเตท มีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด สำหรับสารสกัดพะยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เมทานอล และน้ำ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียลดน้อยลงตามลำดับ สารสกัดพะยอมทั้ง 4 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ATCC 11778 ได้ดีที่สุดในที่ค่า MIC 0.049 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท และค่า MBC 0.098 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอล

อมรรัตน์ และคณะ (2559) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากส่วนต้นและดอกของกกฝรั่ง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ตามการค้า และส่วนรากและใบของผักตบชวา ต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ ไม่วารณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Staphylococcus aureus *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* โดยใช้วิธีการสกัดแบบการหมัก (Maceration) โดยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทานอล และเมทานอล การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ของสารสกัดหยาบจากกกกรังกาและผักตบชวาใช้วิธี Disc diffusion techniques จากการศึกษาพบว่า สารสกัดดอกกกที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ได้ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 12 มิลลิเมตร และสารสกัดหยาบจากต้นกกกรังกาที่สกัดด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Staphylococcus aureus* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 9.3 และ 8.0 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดหยาบจากผักตบชวาไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบ การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดหยาบจากดอกกกกรังกาที่สกัดด้วยเอทานอลด้วยวิธี Macro broth dilution technique ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ได้ค่าเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากต้นกกกรังกาที่สกัดด้วยเอทานอล ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* คือ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ของสารสกัดหยาบจากต้นกกกรังกาที่สกัดด้วยเอทานอลต่อแบคทีเรียทั้ง *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* คือ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี

3.1.1 วัสดุดิบ

3.1.1.1 เปลือกพะยอม

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.2.1 *Enterobacter aerogenes*

3.1.2.2 *Listeria monocytogenes*

3.1.2.3 *Vibrio parahaemolyticus*

3.1.3 สารเคมี

3.1.3.1 เอทานอล 95% (Ethanol 95%)

3.1.3.2 เอทานอล 70% (Ethanol 70%)

3.1.3.3 เมทานอล (Methanol)

3.1.3.4 เฮกเซน (Hexane)

3.1.3.5 3% ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (3% Hydrogen Peroxide)

3.1.3.6 สีย้อมคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet)

3.1.3.7 สีย้อมซาฟรานิน (Safranin O)

3.1.3.8 สารละลายไอโอดีน (Grams Iodine)

3.1.3.9 น้ำมัน (Immersion Oil)

3.1.3.10 กลีเซอรอล (Glycerol)

3.1.3.11 สารละลายมาตรฐาน McFarland standard No. 0.5

3.1.3.12 0.85 % โซเดียมคลอไรด์

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.4.1 อาหารแข็ง Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS)

3.1.4.2 อาหารแข็ง Tryptic Soy (TSA)

3.1.4.3 อาหารเหลว Tryptic Soy (TSB)

3.1.4.4 อาหารแข็ง Brain Heart Infusion (BHI)

3.1.4.5 อาหารเหลว Brain Heart Infusion (BHI)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1.5.1 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.5.2 ไฟแช็ค
- 3.1.5.3 เข็มเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.1.5.4 ช้อนตักสาร (Spatula)
- 3.1.5.5 ปากคีบ (Forceps)
- 3.1.5.6 แท่งแก้วคนสาร (Glass rod)
- 3.1.5.7 แท่งแก้วรูปตัวแอล (L-shape glass rod)
- 3.1.5.8 กระจกบอทดวง (Cylinder)
- 3.1.5.9 ขวดแก้วใส่สาร (Duran) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
- 3.1.5.10 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
- 3.1.5.11 จานเพาะเชื้อพลาสติก (Petri dish) ขนาด 90×15 มิลลิเมตร
- 3.1.5.12 ปิเปตแก้ว (Pipette) ชนิด B ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- 3.1.5.13 ลูกยางดูดปิเปต (Rubber bulb)
- 3.1.5.14 หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.1.5.15 หลอดทดลอง (Test tube)
- 3.1.5.16 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Rack)
- 3.1.5.17 ขวดเก็บตัวอย่างสีชา
- 3.1.5.18 คิวเวทท์ (Cuvettes)
- 3.1.5.19 ถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-Well plate)
- 3.1.5.20 ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20 - 200 ไมโครลิตร,
ยี่ห้อ Genex Beta
- 3.1.5.21 ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100 - 1000 ไมโครลิตร,
ยี่ห้อ Eppendorf Research
- 3.1.5.22 ทิป (Tip) ขนาด 20 - 200 และ 100 - 1000 ไมโครลิตร, ยี่ห้อ Gilson
- 3.1.5.23 เครื่องกรองสุญญากาศและกระดาษกรองสารเบอร์ 1 (Whatman No.1)
- 3.1.5.24 เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer GENIE 2), ยี่ห้อ Scientific Industries
รุ่น G560E
- 3.1.5.25 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow), ยี่ห้อ HOLTEN LAMINAIR
รุ่น TL 2448

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น 3.1.5.26 เครื่องระเหยสารภายใต้ระบบสุญญากาศ (Evaporator), ยี่ห้อ Heidolph

รุ่น Hei - VAP Advantage

- 3.1.5.25 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator), อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส,
ยี่ห้อ memmert รุ่น IN 110
- 3.1.5.26 ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker), ยี่ห้อ GALLENKAMP
- 3.1.5.27 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven), ยี่ห้อ BINDER รุ่น FD53
- 3.1.5.28 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดัน (Autoclave), ยี่ห้อ TOMY รุ่น ES - 315
- 3.1.5.29 เครื่องชั่ง (Balance) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง, ยี่ห้อ OHAUS รุ่น PAL14
- 3.1.5.30 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer), ยี่ห้อ SHIMADZU
รุ่น UV - 1280
- 3.1.5.31 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate Reader),
ยี่ห้อ biochrom รุ่น EZ Read 2000
- 3.1.5.32 โถดูดความชื้น (Desiccator), ยี่ห้อ DURAN vakuumfest และสารดูด
ความชื้น
- 3.1.5.33 กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope), ยี่ห้อ Olympus
- 3.1.5.34 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, ยี่ห้อ Panasonic
- 3.1.5.35 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส,
ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น TSU series
- 3.1.3.36 Cork borer

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำเปลือกหอยอมส่วนลำต้นที่ได้มาจากจังหวัดมหาสารคามมาล้างแดดให้แห้ง จากนั้นตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ดังรูปที่ 3.1 นำไปอบให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เก็บในโถดูดความชื้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนน้ำหนักแห้งคงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 เปลือกพะยอมที่ใช้ในการสกัด

3.2.2 การสกัดสาร

นำเปลือกพะยอมที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1 มาแช่ในตัวทำละลายต่างๆ ดังนี้ เอทานอล 95% เมทานอล และเฮกเซน 70% ในอัตราส่วน เปลือกพะยอมต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 1 : 10 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำหนักแห้งของเปลือกพะยอม 30 กรัม ต่อตัวทำละลาย 300 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 วัน ทำการแยกส่วนที่เป็นของเหลวและส่วนที่เป็นเปลือกพะยอมออกจากกัน นำส่วนที่เป็นของเหลวไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) โดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ จากนั้นนำส่วนที่เป็นของเหลวที่ได้จากการกรองมาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสารภายใต้ระบบสุญญากาศ (Evaporator) ได้เป็นสารสกัดหยาบ (Crude extract) เก็บสารสกัดหยาบของแต่ละตัวทำละลายไว้ในขวดปลอดเชื้อสีชา จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 - 45 องศาเซลเซียสให้แห้ง และทิ้งไว้ในโถดูดความชื้น (Desiccator) เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หาร้อยละของสารสกัดหยาบจากสูตร

$$\text{ร้อยละสารสกัดหยาบ} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดหยาบ}}{\text{น้ำหนักเปลือกพะยอมเริ่มต้น}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบ

3.2.3.1 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

1) การเก็บรักษาเชื้อบนอาหารแข็ง

เลี้ยงแบคทีเรียเรียบบนอาหารแข็งเอียง BHI หรือในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง BHI สำหรับเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio parahaemolyticus* และเลี้ยงแบคทีเรียเรียบบนอาหารแข็งเอียง TSA หรือในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง TSA สำหรับเชื้อ *Enterobacter aerogenes* บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ทดสอบ และถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ทุกสัปดาห์

2) การเก็บรักษาเชื้อโดยการแช่เยือกแข็ง

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีเดียวที่อยู่บนอาหารแข็ง BHI สำหรับเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio parahaemolyticus* และอาหารแข็ง TSA สำหรับเชื้อ *Enterobacter aerogenes* มาใส่ลงในอาหารเหลว BHI และ TSB ตามลำดับ บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บเชื้อที่อยู่ในช่วง late log ของเชื้อแต่ละตัวมาผสมกับ 60% กลีเซอรอล โดยใช้เชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต่อ 60% กลีเซอรอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกลีเซอรอลเท่ากับ 30% บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็งที่ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี

3.2.3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บไว้มา Cross streak ลงบนอาหารแข็งโดยเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio parahaemolyticus* ใช้อาหาร BHI ส่วนเชื้อ *Enterobacter aerogenes* ใช้อาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดียวมาใส่ลงในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับเชื้อแต่ละตัว บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อที่นำมาใช้ในการทดสอบการหาค่าของความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้จะมีความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นประมาณ 5×10^5 Colony Forming Unit ต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) (ดังรูปที่ ข-1 – ข-3)

3.2.3.3 การเตรียมสารสกัด

นำสารสกัดหยาบของเปลือกพะยอม 100 มิลลิกรัม มาละลายใน เอทานอล 70% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 900 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดพะยอมเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

dilution โดยการถ่ายสารละลายจากแถวที่ 2 ลงในช่องถัดไป ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเจือจางต่อไปเรื่อยๆ จนกระทั่งถึงช่องสุดท้าย จากนั้นเติมอาหารเหลว BHI ทุกช่องช่องละ 125 ไมโครลิตร แต่ในช่องแรกเติมอาหาร BHI ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ต่อมาเติมสารแขวนลอยเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.3.2 โดยแต่ละความเจือจางทำ 3 ซ้ำ จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกพะยอมในแต่ละช่องเป็นอัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 และ 1:256 ของสารละลายสารสกัดพะยอม เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาตรวจสอบการเจริญของเชื้อและหาค่า MIC โดยช่องที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อจะนำมาคำนวณหาค่า MIC ในหน่วยของมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีการสำหรับเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio parahaemolyticus* ส่วนเชื้อ *Enterobacter aerogenes* จะทำการทดลองโดยใช้อาหารเหลว TSB

3.2.5 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (Minimal Bactericidal Concentration : MBC)

หาค่า MBC โดยการนำสารละลายในแต่ละช่องที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีการเจริญของเชื้อในทุกช่องไปเขี่ยลงบนอาหารแข็ง BHI สำหรับเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio parahaemolyticus* ส่วนเชื้อ *Enterobacter aerogenes* จะใช้อาหารแข็ง TSA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบการเจริญของเชื้อ ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้จะต้องไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยค่าความเข้มข้นที่ได้จะนำไปคำนวณหาค่า MBC

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.2.3.4 ทำซ้ำ 3 ครั้ง มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) ดังนั้นจึงต้องวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance : ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 17.0 ในการวิเคราะห์

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการสกัดสารจากเปลือกไม้พะยอม

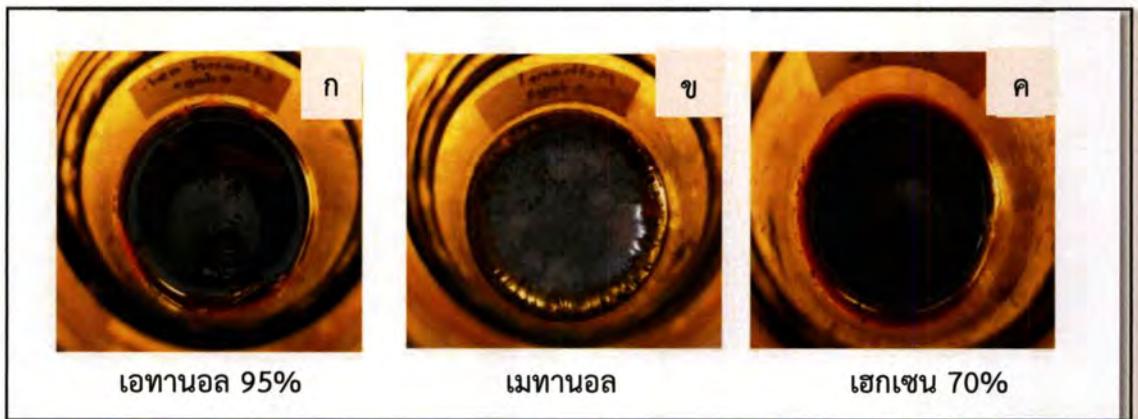
จากการนำเปลือกพะยอมที่ผ่านการอบแห้งแล้ว มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล 95% เมทานอล และเฮกเซน 70% ในอัตราส่วน 1:10 โดยใช้เปลือกไม้พะยอม 30 กรัม ต่อตัวทำละลาย 300 มิลลิลิตร และนำไปประเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้ผลของสารสกัดหยาบจากเปลือกพะยอมคิดเป็นร้อยละของสารสกัดหยาบ ดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะสารสกัดและปริมาณสารสกัด ที่สกัดจากตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล 95% เมทานอล และเฮกเซน 70%

ตัวทำละลาย	ลักษณะสารสกัดหยาบ	ร้อยละของสารสกัดหยาบ
เอทานอล 95%	ลักษณะเหนียว สีน้ำตาลแดงเข้ม	31.00
เมทานอล	ลักษณะเหนียว สีน้ำตาลแดงเข้ม	36.10
เฮกเซน 70%	ลักษณะเหนียวแข็ง สีน้ำตาลแดงเข้ม	14.70

จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดจากเปลือกพะยอมที่ใช้ เอทานอล 95% เมทานอล และเฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย พบว่าเมทานอล และเอทานอล 95% มีประสิทธิภาพในการสกัดสารได้ดีกว่าเฮกเซน เนื่องจากเมทานอลและเอทานอลมีขั้วมากกว่าเฮกเซน ซึ่งเปลือกไม้พะยอมมีปริมาณของแทนนินชนิดโปรแอนโทไซยานินสูง แทนนินเป็นสารประกอบที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในปริมาณมาก ซึ่งทำให้มีขั้วสูง จึงชอบที่จะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วตามกฎ Like dissolves like (Boonjom, 2008) ดังนั้นเมทานอลและเอทานอลจึงมีมีประสิทธิภาพในการสกัดสารจากเปลือกไม้พะยอมได้ในปริมาณสูง นำสารสกัดหยาบจากเปลือกไม้พะยอมที่สกัดได้ทั้งหมด มาละลายในเอทานอล 70% และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 100 มิลลิกรัมต่อ 900 ไมโครลิตร ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Broth micro dilution และละลายในเอทานอล 3% เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 สารสกัดหยาบของเปลือกพะยอมที่สกัดจากตัวทำละลายเอทานอล 95% (ก)
เมทานอล (ข) และเฮกเซน 70% (ค)

4.2 ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกพะยอมในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

4.2.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งโดยวิธี Agar well diffusion

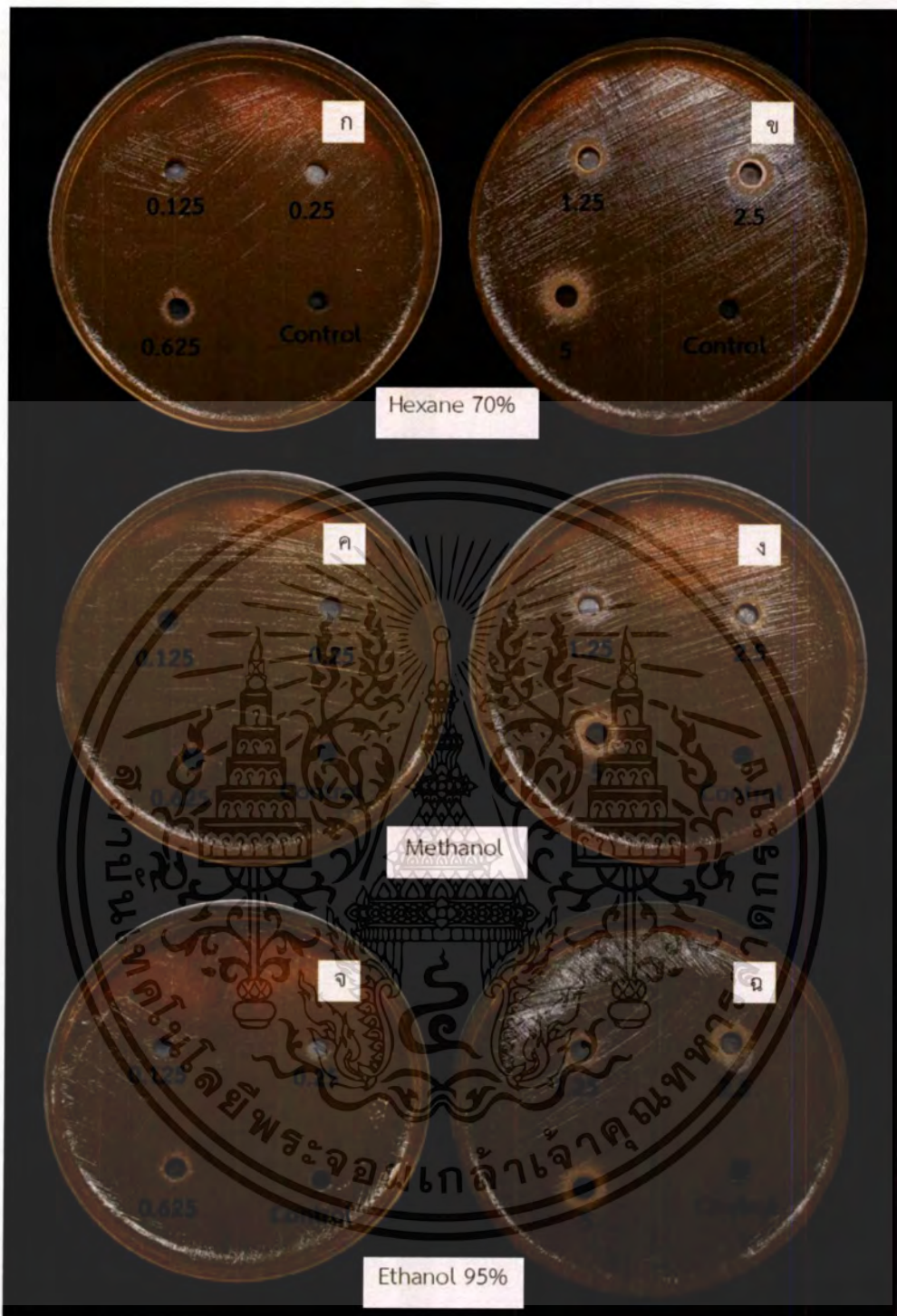
จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio parahaemolyticus* ของสารสกัดจากเปลือกพะยอมที่สกัดโดย เอทานอล 95% เมทานอล และเฮกเซน 70% โดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.125 0.25 0.625 1.25 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เอทานอล 3% เป็นตัวควบคุม ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2-4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดการยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)		
		<i>E. aerogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
เอทานอล 95%	5	8.36±0.31 ^c	14.48±0.30 ^a	10.92±0.35 ^b
	2.5	6.19±0.30 ^c	12.24±0.35 ^a	8.92±0.56 ^b
	1.25	5.60±0.11 ^c	10.11±0.21 ^a	7.06±0.48 ^b
	0.625	NA	9.83±0.33 ^a	6.37±0.14 ^b
	0.25	NA	7.85±0.35 ^a	NA
	0.125	NA	NA	NA
	ตัวควบคุม	NA	NA	NA
เมทานอล	5	7.20±0.09 ^b	13.57±0.22 ^a	10.81±98 ^b
	2.5	5.92±0.16 ^{bc}	11.41±30 ^{ab}	9.92±1.97 ^{ba}
	1.25	NA	10.35±27 ^a	7.37±55 ^b
	0.625	NA	8.62±45 ^a	6.17±24 ^b
	0.25	NA	7.19±0.15 ^a	NA
	0.125	NA	NA	NA
	ตัวควบคุม	NA	NA	NA
เฮกเซน 70%	5	7.24±0.32 ^c	14.54±0.18 ^a	10.22±0.07 ^b
	2.5	6.19±0.15 ^c	12.97±0.55 ^a	8.92±0.08 ^b
	1.25	5.24±0.10 ^c	10.46±0.40 ^a	7.73±0.23 ^b
	0.625	NA	9.46±0.27 ^a	5+9.2±0.61 ^b
	0.25	NA	9.22±1.52 ^a	NA
	0.125	NA	7.09±0.02 ^a	NA
	ตัวควบคุม	NA	NA	NA

ตารางที่ 4.2 ขนาดของบริเวณใสที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอมที่ใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกัน

หมายเหตุ : NA คือไม่เกิดบริเวณใส , (a-c) คือมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)



รูปที่ 4.2 ลักษณะของบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Enterobacter aerogenes* โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.125 0.25 0.625 1.25 2.5 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ; ก-ข คือสารสกัดเปลือกพะยอมโดยใช้เฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย; ค-ง คือสารสกัดเปลือกพะยอมโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ; จ-ฉ คือสารสกัดเปลือกพะยอมโดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย ; ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำด้านการคำนวณว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ลักษณะของบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.125 0.25 0.625 1.25 2.5 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ; ก-ข คือสารสกัดเปลือกพะยอมโดยใช้เฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย; ค-ง คือสารสกัดเปลือกพะยอมโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ; จ-ฉ คือสารสกัดเปลือกพะยอมโดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย ; ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ ด้านการคำนวณว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ลักษณะของบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio parahaemolyticus* โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.125 0.25 0.625 1.25 2.5 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ; ก-ข คือสารสกัดเปลือกพะยอมโดยใช้เฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย; ค-ง คือสารสกัดเปลือกพะยอมโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ; จ-ฉ คือสารสกัดเปลือกพะยอมโดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย ; ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ ด้านการคำนวณว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารโดยวิธี Agar well diffusion โดยใช้สารสกัดเปลือกพะยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล 95% เมทานอล และเฮกเซน 70% ในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Enterobacter aerogenes* *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยใช้เอทานอล 3% เป็นตัวควบคุม ผลที่ได้เอทานอล 3% ไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกพะยอมที่สกัดด้วยเอทานอล 95% สามารถยับยั้งเชื้อ *E. aerogenes* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 1.25 2.5 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ ได้เท่ากับ 5.60 6.19 8.36 มิลลิเมตร ตามลำดับ สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 0.625 1.25 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ ได้เท่ากับ 7.85 9.83 10.11 12.24 และ 14.48 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.625 1.25 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ ได้เท่ากับ 6.37 7.06 8.92 และ 10.92 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดเปลือกพะยอมที่ใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ได้มากที่สุด รองลงมาคือ *V. parahaemolyticus* และ *E. aerogenes* ตามลำดับ

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกพะยอมที่สกัดด้วยเมทานอล สามารถยับยั้งเชื้อ *E. aerogenes* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ ได้เท่ากับ 5.92 และ 7.20 มิลลิเมตร สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 0.625 1.25 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ ได้เท่ากับ 7.19 8.62 10.35 11.41 และ 13.57 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.625 1.25 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ ได้เท่ากับ 6.17 7.37 9.92 และ 10.81 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดเปลือกพะยอมที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้มากที่สุด รองลงมาคือ *V. parahaemolyticus* และ *E. aerogenes*. ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกพะยอบที่สกัดด้วยเฮกเซน 70% สามารถยับยั้งเชื้อ *E. aerogenes* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 1.25 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ ได้เท่ากับ 5.24 6.19 และ 7.24 มิลลิเมตร ตามลำดับ สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.125 0.25 0.625 1.25 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ ได้เท่ากับ 7.09 9.22 9.46 10.46 12.97 และ 14.54 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.625 1.25 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ ได้เท่ากับ 5.92 7.73 8.92 และ 10.22 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดเปลือกพะยอบที่ใช้เฮกเซน 70% เป็นตัวทำลายสามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้มากขึ้น รองลงมาคือ *V. parahaemolyticus* และ *E. aerogenes* ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อแต่ละสายพันธุ์ พบว่าสารสกัดเปลือกพะยอบที่ได้จากตัวทำลายเอทานอล 95% เมทานอล และเฮกเซน 70% สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ดีที่สุด รองลงมาเป็น *V. parahaemolyticus* และ *E. aerogenes* ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากเปลือกพะยอบมีฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้ง 3 สายพันธุ์

4.3 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (Minimal Inhibitory Concentration : MIC)

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกพะยอบในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร 3 สายพันธุ์ ตามวิธีในข้อ 3.2.4 นำไปหาค่า MIC ด้วยวิธี Broth micro dilution พบว่าไม่สามารถหาค่า MIC ได้ เนื่องจากไม่สามารถแยกตะกอนของสารสกัดและตะกอนของเชื้อได้ เกิดจากการละลายสารสกัดไม่สมบูรณ์ในเอทานอล 70% สารสกัดเปลือกพะยอบมีองค์ประกอบหลักเป็นแทนนิน ซึ่งแทนนินมีหมู่ไฮดรอกซิลในปริมาณมาก ทำให้มีขี้ขูด และมีประจุลบ ปกติแล้วการที่ตัวถูกละลายจะละลายในตัวทำละลายหนึ่ง ๆ ได้นั้น สารทั้งสองชนิดจะต้องมีสมบัติเหมือนกันตามกฎ Like dissolves like ก็คือ ตัวถูกละลายที่มีขี้ขูดจะละลายในตัวทำละลายที่มีขี้ขูด (สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.), 2560) โดยตัวทำละลายที่ใช้ในละลายสารสกัดเปลือกพะยอบ คือเอทานอลซึ่งมีขี้ขูด เช่นเดียวกับสารสกัดเปลือกพะยอบ แต่เมื่อหยดสารสกัดที่ละลายแล้วลงไป 96 well plate ทำให้แทนนินที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดเปลือกพะยอบทำปฏิกิริยากับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วยน้ำเป็นหลักเกิดการจับตัวกันกลายเป็นคอลลอยด์จำนวนมาก จึงเป็นสาเหตุที่ไม่สามารถแยก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่าในรูปแบบใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นทำขึ้นเพื่อเผยแพร่และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารผู้สงวนลิขสิทธิ์ไว้

ตะกอนของสารสกัดกับตะกอนของเชื้อที่มีการเจริญได้ อย่างไรก็ตามควรใช้ตัวสกัดที่มีความเป็นขี้สูง เช่น น้ำ

จากนั้นจึงได้ทำการทดสอบการเกิดตะกอนของสารสกัดจากเปลือกพะยอมเมื่อละลายสารสกัดหยาบในเอทานอลในอัตราส่วน เอทานอล : น้ำกลั่น เท่ากับ 50 : 1950 และ 40 : 1960 (ไม่โครลิตร : ไมโครลิตร) ละลายสารสกัดหยาบใน 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ในอัตราส่วน 10% DMSO : น้ำกลั่น เท่ากับ 10 : 1990 20 : 1980 30 : 1970 (ไมโครลิตร : ไมโครลิตร) และละลายสารสกัดหยาบใน 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ในอัตราส่วน 10% DMSO : เอทานอล 70% เท่ากับ 50 : 50 และนำไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 แสดงการเกิดตะกอนเมื่อละลายสารสกัดหยาบจากเปลือกพะยอมด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ และเติมลงในอาหารเหลว ; ละลายใน 10% DMSO ต่อน้ำกลั่นในอัตราส่วน 10 : 1990 (ก) 20 : 1980 (ข) และ 30 : 1970 (ค) ; ละลายในเอทานอล 70% ต่อน้ำกลั่นในอัตราส่วน 40 : 1960 (ง) และ 50 : 1950 (จ) ; ละลายใน 10% DMSO ต่เอทานอล70% ในอัตราส่วน 400 : 600 (ฉ) และ 500 : 500 (ช)

การทดสอบการเกิดตะกอนของสารสกัดจากเปลือกพะยอมด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ และเติมลงในอาหารเหลว พบว่าเกิดตะกอนในทุกตัวทำละลายที่ใช้ทดสอบ จึงไม่สามารถนำไปหาค่า MIC ด้วยวิธี Broth micro dilution ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

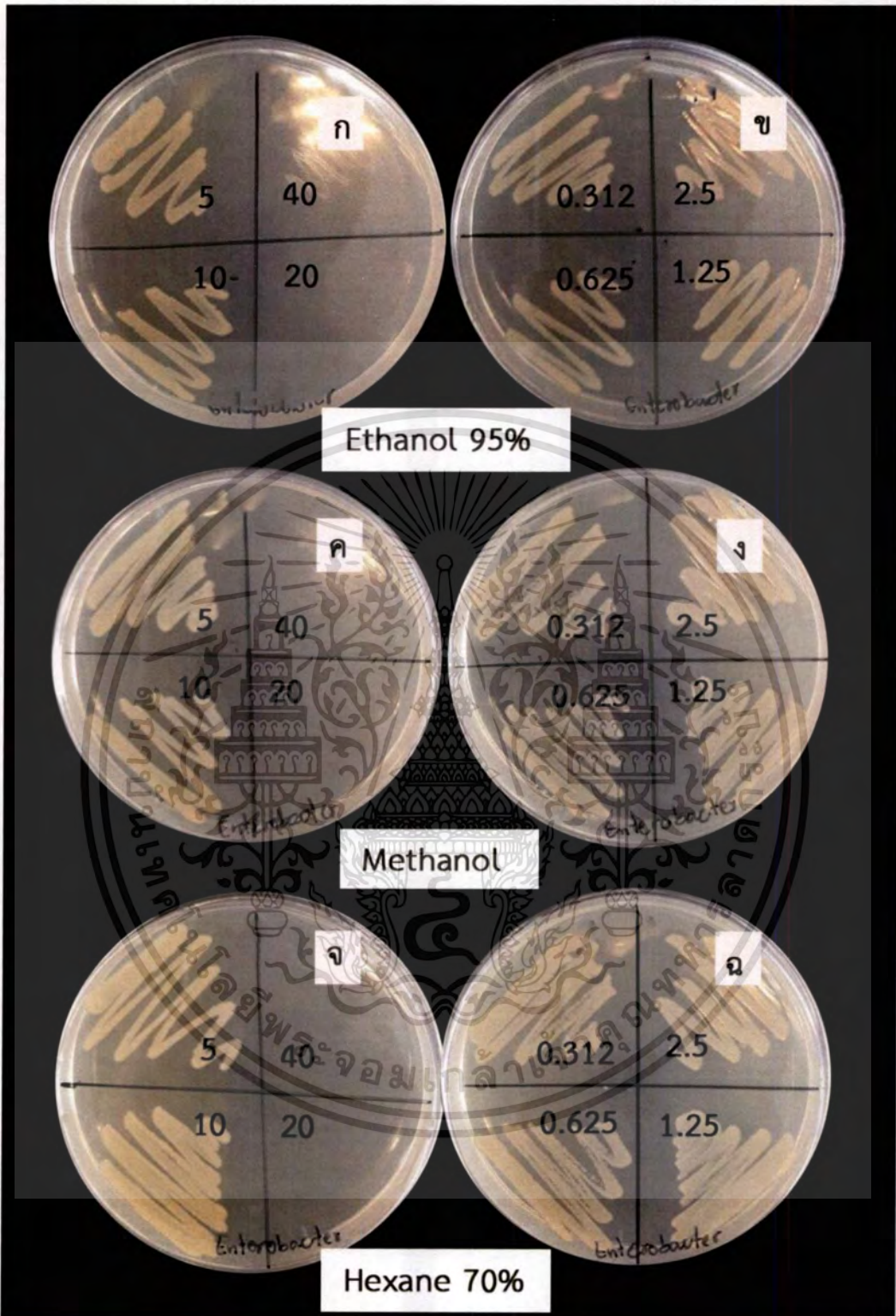
4.4 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (Minimal Bactericidal Concentration : MBC)

จากการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร 3 สายพันธุ์ ของสารสกัดจากเปลือกพะยอมด้วยวิธี Broth micro dilution และหาค่า MBC ตามวิธีในข้อ 3.2.5 ได้ค่า MBC ดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.6-4.8

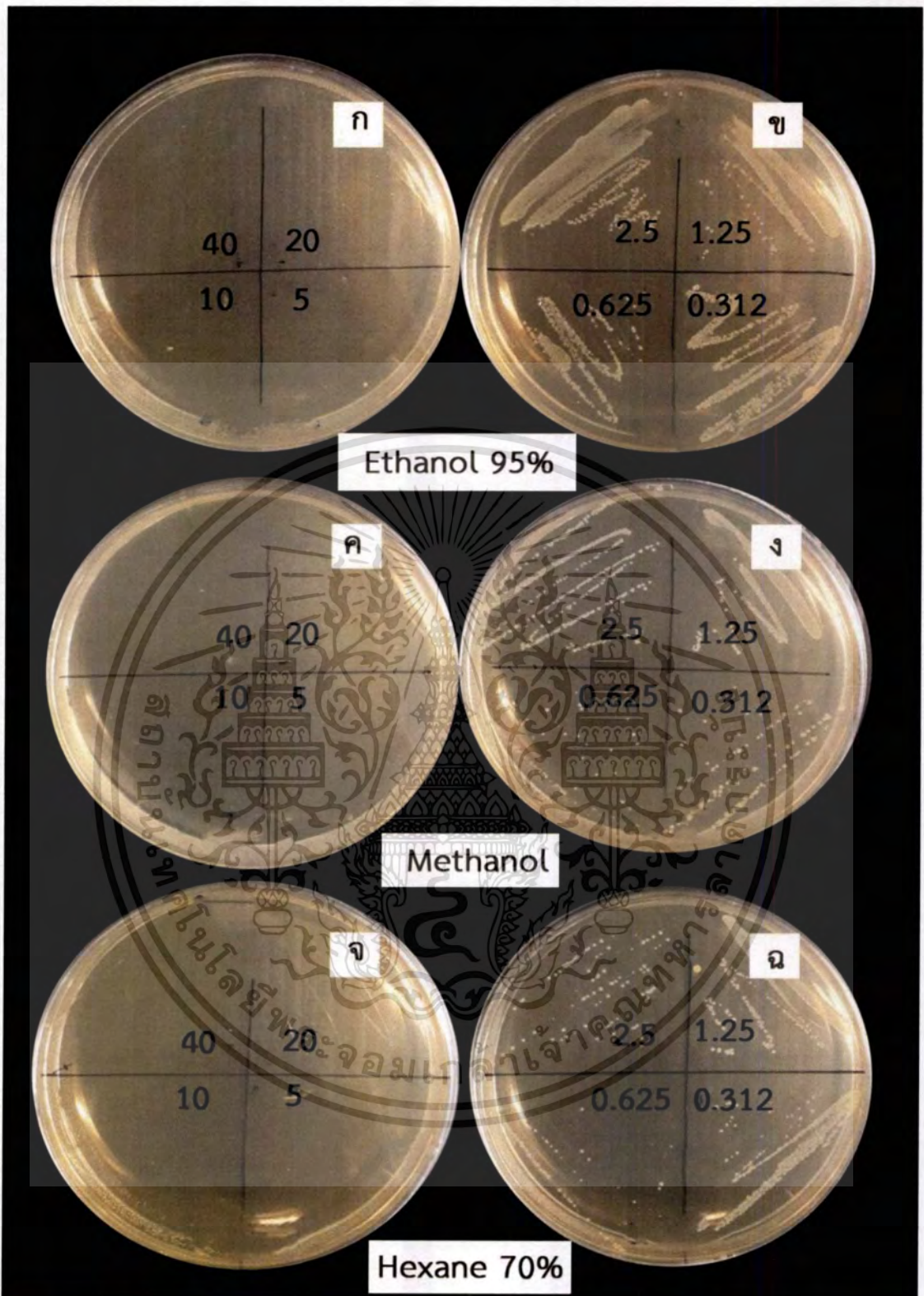
ตารางที่ 4.3 แสดงค่า MBC ของแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกพะยอม

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ค่า MBC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	เอทานอล 95%	เมทานอล	เฮกเซน 70%
<i>E. aerogenes</i>	20	20	20
<i>L.monocytigenes</i>	5	5	5
<i>V. parahaemolyticus</i>	10	2.5	10

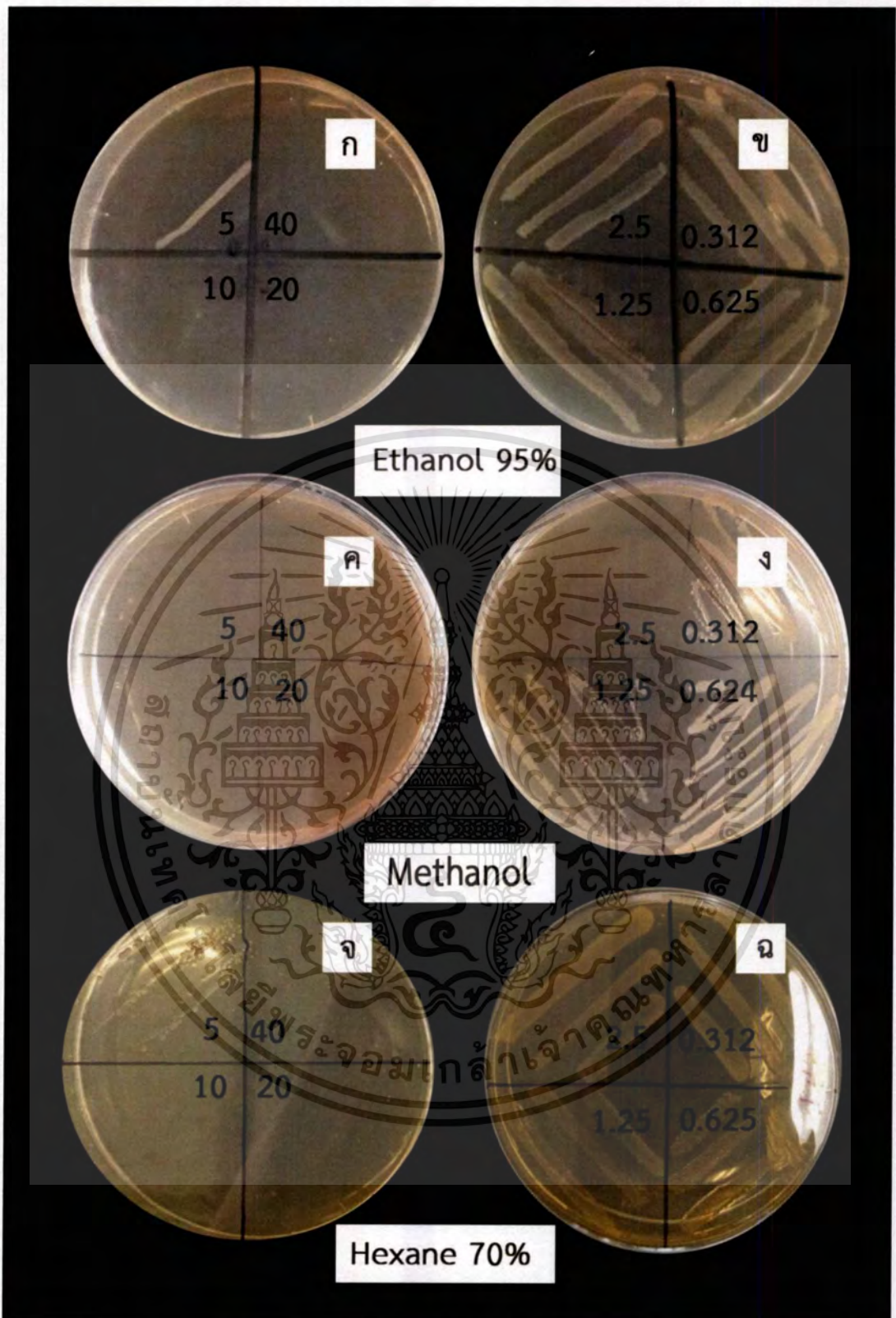
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงการเจริญของเชื้อ *E. aerogenes* จากการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อด้วยวิธีการหาค่า MBC โดยนำเชื้อมาชนิดบนอาหารแข็ง TSA ; (ก,ข) สกัดสารสกัดเปลือกพะยอมด้วยเอทานอล 95% ; (ค,ง) สกัดสารสกัดเปลือกพะยอมด้วยเมทานอล ; (จ,ฉ) สกัดสารสกัดเปลือกพะยอมด้วยเฮกเซน 70% อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* จากการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อด้วยวิธีการหาค่า MBC โดยนำเชื้อมาขึ้นบนอาหารแข็ง BHI ; (ก,ข) สกัดสารสกัดเปลือกพะยอบด้วยเอทานอล 95% ; (ค,ง) สกัดสารสกัดเปลือกพะยอบด้วยเมทานอล ; (จ,ฉ) สกัดสารสกัดเปลือกการค้ำไม้วะยอมด้วยเฮกเซน 70% มิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดงการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อด้วยวิธีการหาค่า MBC โดยนำเชื้อมาซิดบนอาหารแข็ง BHI ; (ก,ข) สกัดสารสกัดเปลือกพะยอมด้วยเอทานอล 95% ; (ค,ง) สกัดสารสกัดเปลือกพะยอมด้วยเมทานอล ; (จ,ฉ) สกัดสารสกัดเปลือกค้ำไม้วะยอมด้วยเฮกเซน 70% มิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Enterobacter aerogenes* *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio parahaemolyticus* ของสารสกัดจากเปลือกพะยอบ เมื่อนำไปหาค่า MBC โดยนำเชื้อมาชดบนอาหารแข็ง ซึ่งในการฆ่าเชื้อ *E. aerogenes* พบว่ามีค่า MBC เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด เมื่อนำไปฆ่าเชื้อ *L. monocytogenes* พบว่ามีค่า MBC เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด และเมื่อนำไปฆ่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่าเมื่อใช้เอทานอล 95% และเฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย จะมีค่า MBC เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย จะมีค่า MBC เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อเปรียบเทียบจากความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดบริเวณใส และจากการทดลองหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (MBC) ด้วยวิธี Broth micro dilution พบว่าสารสกัดที่ใช้เอทานอล 95% เมทานอล และเฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลายสามารถฆ่าเชื้อได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ ทั้งนี้สารสกัดที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายสามารถฆ่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MBC เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดที่ใช้เอทานอล 95% และเฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย สามารถฆ่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ โดยมีค่า MBC เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ *L. monocytogenes* และ *E. aerogenes* สารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ให้ค่า MBC ที่เท่ากัน คือ 5 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากเปลือกพะยอบมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ แต่จะสามารถฆ่าแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยเปลือกไม้พะยอบมีสารแทนนิน ชนิด Pyrogallol และ Catechol ในปริมาณสูง มีคุณสมบัติยับยั้งการเน่าเปื่อยของอาหาร และพบสารฟีนอลิก สารต้านอนุมูลอิสระ (Resveratrol) Butylated hydroxytoluene หรือเรียกว่า BHT 93.93% (Shuhada *et al.*, 2013)

ผลการวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าจำนวนมากที่ว่า สารแทนนินที่เป็นองค์ประกอบหลักของพืชธรรมชาติและพืชสมุนไพร สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ เช่น งานวิจัยของสุนทรและคณะ (2555) ที่ทำการศึกษากิจกรรมยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลไม้ต่างที่มีองค์ประกอบเป็นแทนนินสูงได้แก่ ทุเรียนพันธุ์หมอนทอง มังคุดสุก ส้มเขียวหวาน กล้วยน้ำว่านดิบ และหมากสงดิบ เมื่อสกัดด้วยน้ำร้อน เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 และ อะซิโตน จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วยอะซิโตนให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิดที่ทดสอบ (*Bacillus subtilis* *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium*)

สูงที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) น้อยกว่า 195.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ สารสกัดจากเปลือกทุเรียนด้วยอะซิโตน มีค่า MIC ต่อ *B. subtilis* ไม่วารณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุผลและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ *S. typhimurium* เท่ากับ 373 และ 273 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า MIC ต่อ *S. aureus* และ *E.coli* เท่ากัน คือ 2,984 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงสามารถสรุปได้ว่าเปลือกผลไม้ทุกชนิดที่ทำการศึกษามีความยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

งานวิจัยของ Shan *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาศักยภาพยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus* *Listeria monocytogenes* *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* และ *Salmonella anatum* โดยสารสกัดจากเครื่องเทศและสมุนไพร 46 ชนิด โดยใช้วิธี Agar well diffusion สารสกัดจากสมุนไพรและสารสกัดจากเครื่องเทศมีสารฟีนอลอยู่ในระดับสูงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร *S. aureus* ถูกทำลายง่ายที่สุด *E. coli* ไม่สามารถยับยั้งได้ มีความสอดคล้องกันในเชิงบวกอย่างมาก ($R^2 = 0.73-0.93$) ระหว่างกิจกรรมต้านเชื้อแบคทีเรียและปริมาณฟีนอลของสารสกัดที่ทดสอบกับแบคทีเรียแต่ละชนิด จึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อชั้นนอก (outer membrane) และ periplasmic space ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียแกรมบวก สารไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อชั้นนอก จะเป็นตัวกั้นการซึมผ่านของสารได้ดี ขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มีโครงสร้างเหล่านี้ สารต่างๆ จึงซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้ง่ายกว่าของแบคทีเรียแกรมลบ (สุคนธ์ และคณะ, 2555)

งานวิจัยของ Ceylan และ Fung (2004) ได้ทำการศึกษาสมุนไพรในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร โดยใช้สมุนไพรทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ อบเชย กานพลู กระเทียม มัสตาร์ด หอมและออริกาโน องค์ประกอบของสารต้านจุลชีพในเครื่องเทศและสมุนไพรส่วนใหญ่อยู่ส่วนสำคัญของน้ำมัน องค์ประกอบของสารต้านจุลชีพในเครื่องเทศและสมุนไพรสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยที่เครื่องเทศจะกระตุ้นการหมักกรดที่เป็นสารตั้งต้นในการสร้างฟีนอล แอลกอฮอล์ อัลดีไฮด์ คีโตน อีเทอร์และไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ในเครื่องเทศ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 การสกัดสารจากเปลือกไม้พะยอม

จากการสกัดสารจากเปลือกพะยอมโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล 95% เมทานอล และเฮกเซน 70% พบว่าเมทานอล และเอทานอล 95% มีประสิทธิภาพในการสกัดสารได้ดีกว่าเฮกเซน เนื่องจากเมทานอลและเอทานอลมีขั้วมากกว่าเฮกเซน โดยร้อยละผลได้ของสารสกัดหยาบของเมทานอลมีค่ามากที่สุดคือ 36.10% ตามด้วยเอทานอลซึ่งมีร้อยละผลได้ของสารสกัดหยาบคือ 31.00% และเฮกเซนที่มีร้อยละผลได้ของสารสกัดหยาบน้อยที่สุดคือ 14.70% ดังนั้นเมทานอลจึงมีประสิทธิภาพในการสกัดสารจากเปลือกพะยอมได้ในปริมาณสูงที่สุด

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งโดยวิธี Agar well diffusion

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Enterobacter aerogenes* *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio parahaemolyticus* ของสารสกัดจากเปลือกพะยอมโดยวิธี Agar well diffusion โดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.125 0.25 0.625 1.25 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้เอทานอล 3% เป็นตัวควบคุม พบว่าการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกพะยอมที่ใช้เอทานอล 95% เมทานอล และเฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลายสามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ดีที่สุดใน ร่องลงมาคือ *V. parahaemolyticus* และ *E. aerogenes* ตามลำดับ

สารสกัดเปลือกพะยอมมีส่วนประกอบของแทนนินอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งแทนนินมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ จากงานวิจัยของ Burman et al. (2018) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากใบของ *Combretum album* Pers. กับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยเชื้อแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์โดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) และบริเวณการยับยั้งเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน การตรวจสอบสารทางพิษเคมีเบื้องต้นได้ดำเนินการตามมาตรฐานการวิเคราะห์ FTIR เพื่อระบุกลุ่มพิษเคมีทั่วไปในสารสกัด พบว่าสารสกัดจากใบของ *Combretum album* Pers. มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ การตรวจสอบสารทางพิษเคมีและการวิเคราะห์ FTIR พบว่ามีสารแทนนิน แอลคาลอยด์

หมู่ R-CH₂-OH อะโรมาติก และฟลาโวนอยด์ ในสารสกัดที่ได้จากเอทานอล และสารเหล่านี้อาจเป็น
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นต้นการคัด
ตัวกำหนดคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากใบของ *C. album*
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากในสารสกัดจากเปลือกพะยอมมีแทนนินอยู่ในปริมาณมาก จึงคาดว่าแทนนินที่อยู่ในเปลือกพะยอมมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

5.3 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ในอาหาร (Minimal Inhibitory Concentration : MIC)

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกพะยอมในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร 3 สายพันธุ์ ตามวิธีในข้อ 3.2.4 นำไปหาค่า MIC ด้วยวิธี Broth micro dilution พบว่าไม่สามารถหาค่า MIC ได้ เนื่องจากไม่สามารถแยกตะกอนของสารสกัดและตะกอนของเชื้อได้ เกิดจากการละลายสารสกัดไม่สมบูรณ์ในเอทานอล 70% สารสกัดเปลือกพะยอมมีองค์ประกอบหลักเป็นแทนนิน ซึ่งแทนนินมีหมู่ไฮดรอกซิลในปริมาณมาก ทำให้มีขี้สูง และมีประจุลบ (สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.), 2560) โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารสกัดเปลือกพะยอม คือเอทานอลซึ่งมีขี้ เช่นเดียวกันสารสกัดเปลือกพะยอม แต่เมื่อหยดสารสกัดที่ละลายแล้วลงไป 96 well plate ทำให้แทนนินที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดเปลือกพะยอมทำปฏิกิริยากับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วยน้ำเป็นหลักเกิดการจับตัวกันกลายเป็นคอลลอยด์จำนวนมาก จึงเป็นสาเหตุที่ไม่สามารถแยกตะกอนของสารสกัดกับตะกอนของเชื้อที่มีการเจริญได้

เมื่อทำการทดสอบการเกิดตะกอนของสารสกัดจากเปลือกพะยอม โดยเปลี่ยนตัวทำละลายสารสกัดหยาบและนำไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสารละลายเกิดตะกอนเกิดขึ้นในทุกตัวทำละลายที่ใช้ทดสอบ จึงไม่สามารถนำไปหาค่า MIC ด้วยวิธี Broth micro dilution ได้ วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมในการทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเปลือกพะยอมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร หากจะใช้วิธีนี้ในการทดสอบ จะต้องทำการศึกษาหาข้อมูลเพิ่มเติมว่าด้วยการละลายอย่างสมบูรณ์ของสารสกัดที่มีแทนนินเป็นองค์ประกอบหลักนั้น ต้องใช้ตัวทำละลายชนิดไหนจึงจะไม่เกิดการละลายย้อนกลับ

5.4 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (Minimal Bactericidal Concentration : MBC)

จากการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Enterobacter aerogenes* *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio parahaemolyticus* ของสารสกัดจากเปลือกพะยอมด้วยวิธี Broth micro dilution และหาค่า MBC ตามวิธีในข้อ 3.2.5 เนื่องจากไม่สามารถทราบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (MIC) ด้วยวิธี Broth micro dilution แต่อย่างไรก็ตามสามารถหาค่า MBC ได้โดยการนำเชื้อจากทุกช่องที่ทดสอบมาชิตลงบนอาหารแข็ง ซึ่งในการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *E. aerogenes* พบว่ามีค่า MBC เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด เมื่อนำไปฆ่าเชื้อ *L. monocytogenes* พบว่ามีค่า MBC เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด และเมื่อนำไปฆ่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่าเมื่อใช้เอทานอล 95% และเฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย จะมีค่า MBC เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย จะมีค่า MBC เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อเปรียบเทียบค่า MBC ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ พบว่าสารสกัดเปลือกพะยอมที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุดในขณะที่สารสกัดเปลือกพะยอมที่ใช้เอทานอล 95% และเฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลายมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ดีที่สุดใน

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากเปลือกพะยอมมีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ แต่จะสามารถฆ่าแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากสารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบภายในของผนังเซลล์แบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อชั้นนอก (outer membrane) และ periplasmic space ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียแกรมบวก สารไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อชั้นนอก จะเป็นตัวกั้นการซึมผ่านของสารได้ดี ขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มีโครงสร้างเหล่านี้ สารต่างๆ จึงซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้ง่ายกว่าของแบคทีเรียแกรมลบ ดังที่มีรายงานการวิจัยว่าสารสกัดจากสมุนไพรมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ (Shan et al., 2007, Ceylan และ Fung, 2004, สุคนธ์ และคณะ, 2555)

ผลการวิจัยนี้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือสารสกัดจากเปลือกพะยอมสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทั้ง 3 สายพันธุ์ และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารสกัดเปลือกพะยอมได้ดีที่สุด คือ เมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ขออนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.5 ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาหาข้อมูลเพิ่มเติม ในเรื่องของการละลายอย่างสมบูรณ์ของสารสกัดที่มีแทนนินเป็นองค์ประกอบหลักว่าต้องใช้ตัวทำละลายชนิดไหนจึงจะไม่เกิดการละลายย้อนกลับ สำหรับใช้ในการทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Broth micro dilution ซึ่งต้องอ่านผลด้วยการสังเกตสารละลายสีที่มีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยตาเปล่า หากทราบตัวทำละลายที่เหมาะสมจะทำให้การทดสอบด้วยวิธีนี้ได้ผลที่รวดเร็วมากยิ่งขึ้น และควรทำการทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายมากกว่านี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช. 2557. สารานุกรมพืชในประเทศไทย (ฉบับย่อ) พะยอม.

[Online]. Available : <http://www.dnp.go.th/botany>. สืบค้นเมื่อ : 1 พฤษภาคม 2561

เดชา ศิริภัทร. 2561. พะยอม สรรพคุณและประโยชน์ของต้นพะยอม 16 ข้อ (พะยอม).

[Online]. Available : <https://medthai.com/พะยอม>. สืบค้นเมื่อ : 1 พฤษภาคม 2561

ทัศนีย์ ปัญจานนท์, กันทิมา ชูแสง และ อีรกุล อารมณ์สุวรรณ. 2548. 1 มิถุนายน 2548. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากผลยอ. วารสารสมุนไพร. ปีที่ 2 (19).

[Online]. Available : <http://www.medplant.mahidol.ac.th>. สืบค้นเมื่อ : 1 พฤษภาคม 2561

ธงชัย เฉลิมชัยกิจ. 2561. Macro broth dilution method. [Online]. Available :

file:///C:/Users/user/Downloads/Documents/8%20(2011)%20Drug%20Interaction-Susceptibility%20Test.pdf สืบค้นเมื่อ : 29 พฤษภาคม 2561

ชนภพ และคณะ. 2558. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่. ปริญญาานิพนธ์.วท.บ. (เทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.

[Online]. Available : <https://repository.rmutp.ac.th>. สืบค้นเมื่อ : 3 พฤษภาคม 2561

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร. 2551. 11 มิถุนายน 2551. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ. สัตวแพทย์ทางเลือกวันนี้. [Online]. Available : <http://vet.kku.ac.th>. สืบค้นเมื่อ : 20 พฤษภาคม 2561

นิลเนตร อัครวะศิริจินดา. 2553. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหารจากสารสกัดที่ได้จากเปลือกพยอมและสารสำคัญที่ได้จากเปลือกพยอม. รายงานวิจัย. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา. [Online]. Available : <http://ssruir.ssru.ac.th/handle/ssruir/361>. สืบค้นเมื่อ : 4 พฤษภาคม 2561

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์และนิธิตยา รัตนาปนนท์(ก). 2558. Enterobacter/เอนเทอโรแบคเตอร์.

[Online]. Available : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2014/Enterobacter> สืบค้นเมื่อ : 20 พฤษภาคม 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์และนิธิยา รัตนาปนนท์(ข). 2558. Methyl alcohol (Methanol)/ เมทิล - แอลกอฮอล์(เมทานอล). [Online]. Available : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2093/methyl-alcohol-methanol>. สืบค้นเมื่อ : 4 พฤษภาคม 2561

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์และนิธิยา รัตนาปนนท์(ค). 2558. *Vibrio parahaemolyticus*. [Online]. Available : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1304/vibrio-para-haemolyticus>. สืบค้นเมื่อ : 5 พฤษภาคม 2561

มณฑล วิสุทธิ. 2560. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกลุ่ม Staphylococci ของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นบางชนิดในจังหวัดนครราชสีมา. วิทยานิพนธ์.วท.บ. (ชีววิทยา). นครราชสีมา:บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา. [Online]. Available : http://scijournal.kku.ac.th/files/Vol_45_No_4_P_805-816.pdf. สืบค้นเมื่อ : 6 พฤษภาคม 2561

วิสุตตา คุ่มวงษา, ลลิตา ไพบูลย์ และปิยาภรณ์ สุภักด์ดำรงกุล. 2558. ประสิทธิภาพของเจลล้างมือผสมสารสกัดจากเปลือกผลไม้ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค. สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ, ปีที่ 1 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม – ธันวาคม 2558

วิกิพีเดียสารานุกรมเสรี. 2561. เมทานอล. [Online]. Available : <https://th.wikipedia.org/wiki/เมทานอล>. สืบค้นเมื่อ : 25 พฤษภาคม 2561

วิกิพีเดียสารานุกรมเสรี. 2561. เอทานอล. [Online]. Available : <https://th.wikipedia.org/เอทานอล>. สืบค้นเมื่อ : 25 พฤษภาคม 2561

วิกิพีเดียสารานุกรมเสรี. 2561. เฮกเซน. [Online]. Available : <https://th.wikipedia.org/wiki/เฮกเซน>. สืบค้นเมื่อ : 25 พฤษภาคม 2561

ศิริพร วงศ์ดินดำ. 2561. Family Enterobacteriaceae. [Online]. Available : <https://ctxm.wordpress.com/family-enterobacteriaceae/>. สืบค้นเมื่อ : 6 พฤษภาคม 2561

ศรียรรณา หัตยานานนท์. 2545. สารละลายกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*. [Online]. Available : http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=890. สืบค้นเมื่อ : 6 พฤษภาคม 2561

สันติ เทียนนาค. 2557. การใช้พืชท้องถิ่นป้องกันการเน่าเสียของน้ำตาลสด. [Online].

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับ. Available : https://prezi.com/tlg4a9emi_t-mx/presentation/. สืบค้นเมื่อ : 25 มกราคม 2561. มิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สิริมา แก้วนุช. 2561. การสกัดสมุนไพรโดยวิธี REFLUX (การสกัดแบบไหลย้อนกลับ). [Online].

Available : <https://www.gotoknow.org/posts/457805>. สืบค้นเมื่อ : 25 พฤษภาคม 2561.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2557. *Escherichia coli*.

[Online]. Available : <file:///C:/Users/user/Downloads/Documents/e-coli.pdf>. สืบค้นเมื่อ : 7 พฤษภาคม 2561

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2558.

Listeria monocytogenes. [Online]. Available : <file:///C:/Users/user/Downloads/Documents/-listeria-1.pdf>. สืบค้นเมื่อ : 7 พฤษภาคม 2561

สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม. 2561. *Listeria monocytogenes*. [Online]. Available

: file:///C:/Users/user/Downloads/Documents/listeria_monocytogenes2.pdf. สืบค้นเมื่อ : 21 พฤษภาคม 2561

สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม. 2561. *Vibrio parahaemolyticus*. [Online]. Available

: file:///C:/Users/user/Downloads/Documents/vibrio_parahaemolyticuspdf. สืบค้นเมื่อ : 21 พฤษภาคม 2561

สภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย. 2560. [Online]. Available : <file:///C:/Users/user/Downloads/Documents/.pdf>. สืบค้นเมื่อ : 8 พฤษภาคม 2561

สยามเคมี. 2561(ก). แทนนิน (tannin). [Online]. Available : <http://www.siamchemi.com/แทนนิน/>. สืบค้นเมื่อ : 8 พฤษภาคม 2561

สยามเคมี. 2561(ข). เอทานอล/เอทิลแอลกอฮอล์. [Online]. Available : <http://www.siam-chemi.com/เอทานอล/>. สืบค้นเมื่อ : 9 พฤษภาคม 2561

สยามเคมี. 2561(ค). เฮกเซน (hexane). [Online]. Available : <http://www.siamchemi.com/เฮกเซน/>. สืบค้นเมื่อ : 10 พฤษภาคม 2561

สุคนธ์ ตันติไพบูลย์วุฒิ, เทียนชัย น่วมเศรษฐี, เพชรลดา เดชาเย็นยง. 2555. ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลไม้บางชนิด, 17(6): 880-894.

สมศักดิ์ นวลแก้ว. 2559. การสกัดแยกสารเบื้องต้น. [Online]. Available : [file:///C:/Users/user/Downloads/Documents/ag_16_in_1.2.1.2_17\(2556\).pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/Documents/ag_16_in_1.2.1.2_17(2556).pdf). สืบค้นเมื่อ : 8 พฤษภาคม 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- สำนักข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2559. วิธีการสกัดสมุนไพรต่างๆ โดยการ evaporation. [Online]. Available : <http://medplant.mahidol.ac.th/user/reply.asp?id=6509>. สืบค้นเมื่อ : 19 พฤษภาคม 2561
- อภัย ราษฎร์วิจิตร. 2555. ตัวทำละลาย (Solvent). [Online]. Available : <http://haamor.com/th/ตัวทำละลาย/>. สืบค้นเมื่อ : 19 พฤษภาคม 2561
- อมรรัตน์ สีสุทอง, กัลยาภรณ์ จันตรี และ ศรีสุดา หาญภาคภูมิ. 2559. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชบางชนิด. วารสารวิจัยและพัฒนา วิทยาลัยการศึกษามหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรวิทยาดงใหญ่. [Online]. Available : <https://www.tcithaijo.org/index.php/vrurdistjournal/article/view/57973/47955>. สืบค้นเมื่อ : 19 พฤษภาคม 2561
- Alibaba. 2561. อุปกรณ์การสกัดสมุนไพร. [Online]. Available : <https://thai.alibaba.com/g/herbal-extraction-equipment.html>. สืบค้นเมื่อ : 25 พฤษภาคม 2561
- Boonjom, Y. 2008. Tannins extraction. [Online]. Available : <http://drug.pharmacy.psu.ac.th/Question.asp?ID=10552&gid=3> สืบค้นเมื่อ : 21 พฤษภาคม 2561
- Burman, S., Bhattacharya, K., Mukherjee, D. and Chandracorresponding, G. 2018. Antibacterial efficacy of leaf extracts of *Combretum album* Pers. against some pathogenic bacteria. BMC Complement Altern Med, 18: 213.
- Ceylan, E., Fung, Y. C. D. 2007. Antimicrobial activity of spices. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 12: 1-55.
- Djipa, D. C., Delme, M., Quetin-Leclercq, J. 2000. Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). Journal of Ethnopharmacology, 71: 307-313.
- Eloff, J. N. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Send to Planta Med. , 64(8): 711-713.
- Marjorie, C. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Saudi Journal of Biological Sciences, 12(4): 564-582.
- Morikawa, T. et al. 2012. Antidiabetogenic oligostilbenoids and 3-ethyl-4-phenyl-3,4-dihydroisocoumarins from the bark of *Shorea roxburghii*, 20: 832-840.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Mostafa, A. A., Al-Askar, A. A., Almaary, S. K., Dawoud, M. T., Sholkamy, N. E. and Bakri, M. M. 2018. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25: 361-366.

Mounyr, B. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6: 71-79.

Muniraj, S., Nanthakumaran, T., Shanthasubitha, S. and Shanmugapriya. 2016.

Phytochemecal Analysis, Antioxidant and Antimicrobial Activitie of resins of *Boswellia serrata* Roxb, *Canarium strictum* Roxb. and *Shorea roxburghii* G. Don. *Indo – Asian Journal of Multidisciplinary Research (IAJMR)*, 2(1): 484–493.

Pimpa, S. 2003. Thai Plant Extract of *Mangifer duperreana* Pierre and *Shorea roxburghii* G. Don as Natural Preserv Atives for Cosmetic Product. 1:167.

Pooma, R and Newman, M. 2001. Checklist of Dipterocarpaceae in Thailand. *Thai Forest Bulletin (Botany)*, 29: 156-177.

Ramasamy, S., Palanivel, S. and Vairamuthu, R. 2013. Antioxidant activity of the stem bark of *Shorea roxburghii* and its silver Reducing Power. 2: 28

Rashad, N. 2017. The Effect of Probiotics on Interleukin- 8 and Intestinal Flora in Irritable Bowel Syndrome in Hospital of Zagazig University. [Online]. Available : https://www.researchgate.net/publication/315707161_The_Effect_of_Probiotics_on_Interleukin_8_and_Intestinal_Flora_in_Irritable_Bowel_Syndrome_in_Hospital_of_Zagazig_University. สืบค้นเมื่อ : 28 พฤษภาคม 2561.

Rauha, J. P. *et al.* 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int.J.Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 56, p. 3-12

Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., Harold, C. 2007. The in vitro Antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 112–119.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Shihabudeen, H. S. M., Priscilla, D. H., Thirumurugan, K. 2010. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of selected Indian folk medicinal plants. International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR) Vol.1 (10): 430-434
- Shimada, T. 2006. Salivary proteins as a defense against dietary tannins. J. Chem. Ecol. Journal of Chemical Ecology, 32 (6): 1149-1163
- Shuhada, N. O., Zaini, Y., Amelia, A., Zurina, M. and Jannah, R. M. Z. 2013. Phytochemical and Bio-Activity Study on the Stem Bark of *Shorea Roxburghii* (Meranti Temak Nipis), 4: 251.
- U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2017. Intestinal Infections. [Online]. Available : <http://www.humanillnesses.com/Infectious-Diseases-He-My/Intestinal-Infections.html>. สืบค้นเมื่อ : 20 พฤษภาคม 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

สูตรอาหาร

1. อาหารเหลว BHI (Brain Heart Infusion Broth)

Calf Brains Infusion	7.7	กรัม
Beef Heart Infusion	9.8	กรัม
Proteose Peptone	10.0	กรัม
น้ำตาลเด็กซ์โทรส	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟต	2.5	กรัม

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับพีเอช 7.4 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารแข็ง BHI (Brain Heart Infusion Agar)

Calf Brains Infusion	7.7	กรัม
Beef Heart Infusion	9.8	กรัม
Proteose Peptone	10.0	กรัม
น้ำตาลเด็กซ์โทรส	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟต	2.5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับพีเอช 7.4 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเหลว TSB (Tryptone Soya Broth)

Pancreatic digest of casein	17.0	กรัม
Papaic digest of soybean meal	3.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต	2.5	กรัม
น้ำตาลเด็กซ์โตรส	2.50	กรัม

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับพีเอช 7.3 ± 0.2 ด้วย 6 นอร์มอล ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ และ 6 นอร์มอล ของกรดไฮโดรคลอริก ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารแข็ง TSA (Tryptone Soya Broth)

Pancreatic digest of casein	17.0	กรัม
Papaic digest of soybean meal	3.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต	2.5	กรัม
น้ำตาลเด็กซ์โตรส	2.50	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับพีเอช 7.3 ± 0.2 ด้วย 6 นอร์มอล ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ และ 6 นอร์มอล ของกรดไฮโดรคลอริก ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารแข็ง TCBS (Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar)

สารสกัดยีสต์	5	กรัม
Propeose Peptone No.3	10	กรัม
Oxgall	8	กรัม
โซเดียมซิเตรท	10	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต	10	กรัม
แซ็กคาโรส	20	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม
เฟอร์ริกซิเตรท	1	กรัม
บรอมไทมอลบลู	0.04	กรัม
ไทมอลบลู	0.04	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับพีเอช 8.6 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. การเตรียม 0.5 Mcfarland standard

เตรียมจาก 1% กรดซัลฟิวริก 99.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.175% แบริยม คลอไรด์ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นใส่หลอดฝาเกลียว เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง โดยที่ 0.5 Mcfarland standard มีปริมาณเชื้อ 1.5×10^8 CFU/ml

ภาคผนวก ข

การคำนวณในการทดสอบ

1. การคำนวณหาปริมาณสารสกัดหยาบ (% Yield Crude Extract)

ตัวอย่าง : สารสกัดเปลือกพะยอบโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล 95%
เมทานอล และ เฮกเซน 70%

วิธีการคำนวณ

$$\text{จากสูตร Yield Crude Extract} = \frac{x}{y} \times 100\%$$

X คือ สารสกัดหยาบที่สกัดได้ (กรัม)

Y คือ ปริมาณเปลือกพะยอบที่ใช้ในการสกัด (กรัม)

$$\begin{aligned} \text{Yield Crude Extract (ในตัวทำละลายเอทานอล 95\%)} &= \frac{9.3}{30} \times 100 \% \\ &= 31 \% \end{aligned}$$

ปริมาณสารสกัดจากเปลือกพะยอบในตัวทำละลายเอทานอล 95% มีค่าเท่ากับ 31%

$$\begin{aligned} \text{Yield Crude Extract (ในตัวทำละลายเมทานอล)} &= \frac{10.83}{30} \times 100 \% \\ &= 36.1 \% \end{aligned}$$

ปริมาณสารสกัดจากเปลือกพะยอบในตัวทำละลายเมทานอล มีค่าเท่ากับ 36.1%

$$\begin{aligned} \text{Yield Crude Extract (ในตัวทำละลายเฮกเซน 70\%)} &= \frac{4.41}{30} \times 100 \% \\ &= 14.7 \% \end{aligned}$$

ปริมาณสารสกัดจากเปลือกพะยอบในตัวทำละลายเฮกเซน 70% มีค่าเท่ากับ 14.7%

2. การคำนวณปริมาณเชื้อเริ่มต้น

การคำนวณหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่จะนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เริ่มจากการเลี้ยงเชื้อที่จะใช้ในการทดสอบทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* และ *Enterobacter aerogenes* ในอาหารเหลว เพื่อศึกษาการเจริญของทั้งสามเชื้อ ดังกราฟที่ ง-1,ง-2,ง-3 จากนั้นเลือกจุดที่เป็น Late Log มาเกลี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง (Spread plate) โดยทำการเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} ยกเว้น *Vibrio parahaemolyticus* ทำการเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-5} ดังรูปที่ ข-1,2,3 เลือกความเข้มข้นที่มีเชื้อเจริญในช่วง 30-300 โคโลนี โดย *Enterobacter aerogenes* ความเข้มข้นที่ใช้ได้คือ 10^{-6} เท่ากับ 146 โคโลนี *Listeria monocytogenes* ความเข้มข้นที่ใช้ได้คือ 10^{-6} เท่ากับ 257 โคโลนี และ *Vibrio parahaemolyticus* ความเข้มข้นที่ใช้ได้คือ 10^{-5} เท่ากับ 261 โคโลนี จากนั้นเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ในอาหารเหลวอีกครั้ง จนถึงจุด Late Log จุดเดิมที่นำมา Spread plate ข้างต้น จึงนำมาทำการคำนวณหาจำนวนเชื้อเริ่มต้นดังนี้

ปริมาณที่จะใช้ในการทดสอบคือ 25 ไมโครลิตร ต้องการปริมาณเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 5×10^5 CFU/ml

วิธีการคำนวณ

ถ้าในปริมาณเชื้อ 25 ไมโครลิตร มีจำนวนเชื้อ 5×10^5 CFU/ml

ถ้าในปริมาณเชื้อ 1000 ไมโครลิตร จะมีจำนวนเชื้อ $\frac{1000 \times 5 \times 10^5}{25}$
 $= 2 \times 10^7$ CFU/ml

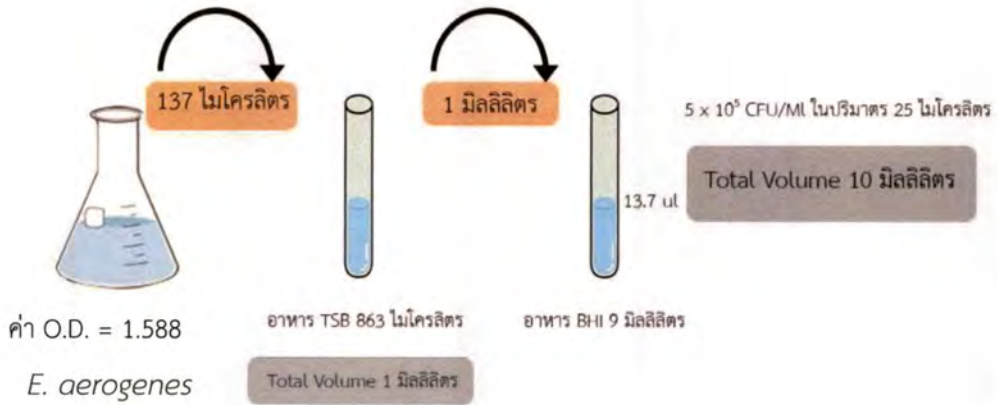
Enterobacter aerogenes ที่ค่าการดูดกลืนแสง 1.588 มีจำนวนเชื้อ 1.46×10^9 CFU/ml

ถ้ามีจำนวนเชื้อ 1.46×10^9 CFU/ml ในปริมาณ 1000 ไมโครลิตร

ถ้าจำนวน 2×10^7 CFU/ml จะต้องมียุติปริมาณ $\frac{2 \times 10^7 \times 1000}{1.46 \times 10^9}$
 เท่ากับ 13.7 ไมโครลิตร

จากนั้นทำการเจือจางดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-1 ขั้นตอนการเจือจางและการเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *Enterobacter aerogenes*

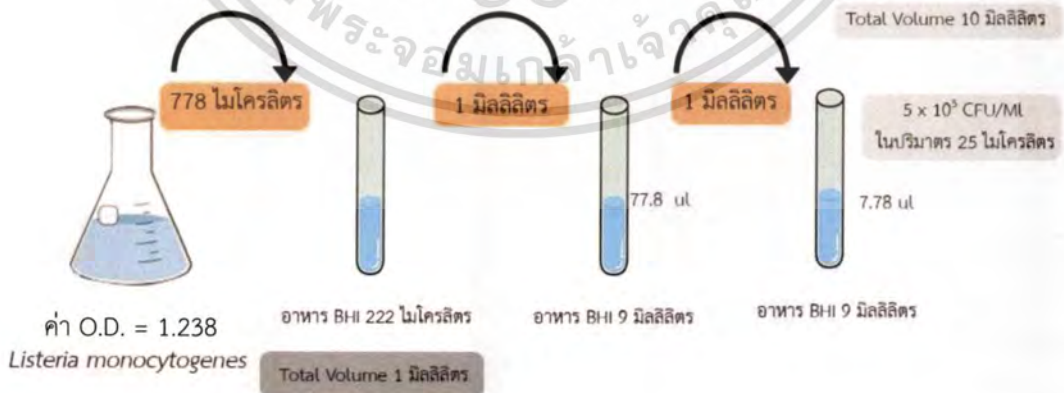
Listeria monocytogenes ที่ค่าการดูดกลืนแสง 1.238 มีจำนวนเชื้อ 2.57×10^9 CFU/ml

ถ้ามีจำนวนเชื้อ 2.57×10^9 CFU/ml ในปริมาณ 1000 ไมโครลิตร

ถ้าจำนวนเชื้อ 2×10^7 CFU/ml จะต้องมีปริมาณ $\frac{2 \times 10^7 \times 1000}{2.57 \times 10^9}$

เท่ากับ 7.78 ไมโครลิตร

จากนั้นทำการเจือจางดังต่อไปนี้



รูปที่ ข-2 ขั้นตอนการเจือจางและการเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *Listeria monocytogenes*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vibrio parahaemolyticus ค่าการดูดกลืนแสง 1.202 มีจำนวนเชื้อ 2.61×10^8 CFU/ml

ถ้ามีจำนวนเชื้อ 2.61×10^8 CFU/ml

ในปริมาณ 1000 ไมโครลิตร

ถ้าจำนวนเชื้อ 2×10^7 CFU/ml

จะต้องมีปริมาณ $\frac{2 \times 10^7 \times 1000}{2.61 \times 10^8}$

เท่ากับ 76.6 ไมโครลิตร

จากนั้นทำการเจือจางดังต่อไปนี้



รูปที่ ข-3 ขั้นตอนการเจือจางและการเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *Vibrio parahaemolyticus*

3. การคำนวณปริมาตรสารสกัดที่นำไปทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion

เตรียมสารละลายของสารสกัดเปลือกพะยอมปริมาตร 500 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางโดยใช้เอทานอล 3% เป็นตัวทำละลาย จากความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไปเป็น 5 10 25 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อปริมาตร 2 มิลลิลิตร

โดยใช้สูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ในการทดสอบ

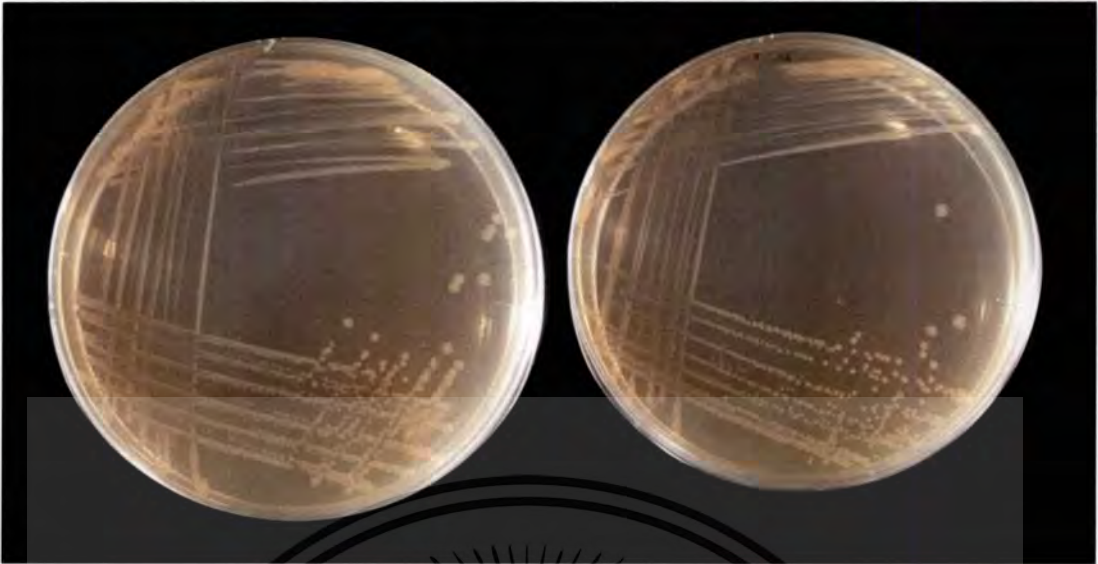
1. การทำให้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Streak plate



รูปที่ ค-1 ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Enterobacter aerogenes*



รูปที่ ค-2 ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Listeria monocytogenes*
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น มิใช่เอกสารที่เผยแพร่โดยบริษัทเอกชนด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



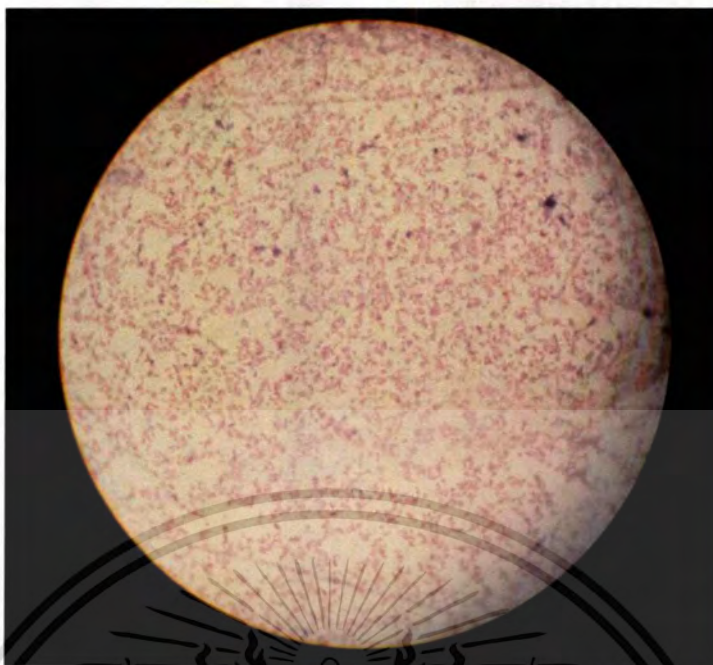
รูปที่ ค-3 ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธีการย้อมแกรม (Gram's stain) ตามวิธีการดังนี้

- 1) ทำความสะอาดสไลด์ให้ปราศจากไขมัน ทดสอบว่าสไลด์นั้นไม่มีไขมันติดอยู่ โดยการหยดน้ำลงบนสไลด์ น้ำจะแผ่กระจาย
- 2) ใช้ลวดเขี่ยเชื้อจุ่มน้ำและแตะลงบนสไลด์ 1-2 ลูป และใช้ลูปที่เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้ออื่นแล้วเขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งให้ติดลวดเขี่ยเชื้อเล็กน้อย แตะเชื้อลงบนหยดน้ำ สเมียร์ให้เชื้อกระจายเป็นวงเล็กๆ ที่รอยสเมียร์ให้แห้งและตรึงเซลล์ด้วยการผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง
- 3) หยดสีกคริสตัลไวโอเลตลงบนรอยสเมียร์ให้ท่วม ทิ้งไว้นาน 1 นาที
- 4) เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ทิ้งและชะด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์ทิ้งไว้นาน 1 นาที
- 5) เทสารละลายไอโอดีนทิ้งและชะล้างด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา (ไม่ควรเกิน 20 วินาที) ล้างน้ำทันทีโดยให้น้ำผ่านเบาๆ
- 6) ชับด้วยกระดาษแล้วย้อมทับด้วยสีซาฟรานินโอหัดให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างน้ำและทิ้งไว้ให้แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ 7) นำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

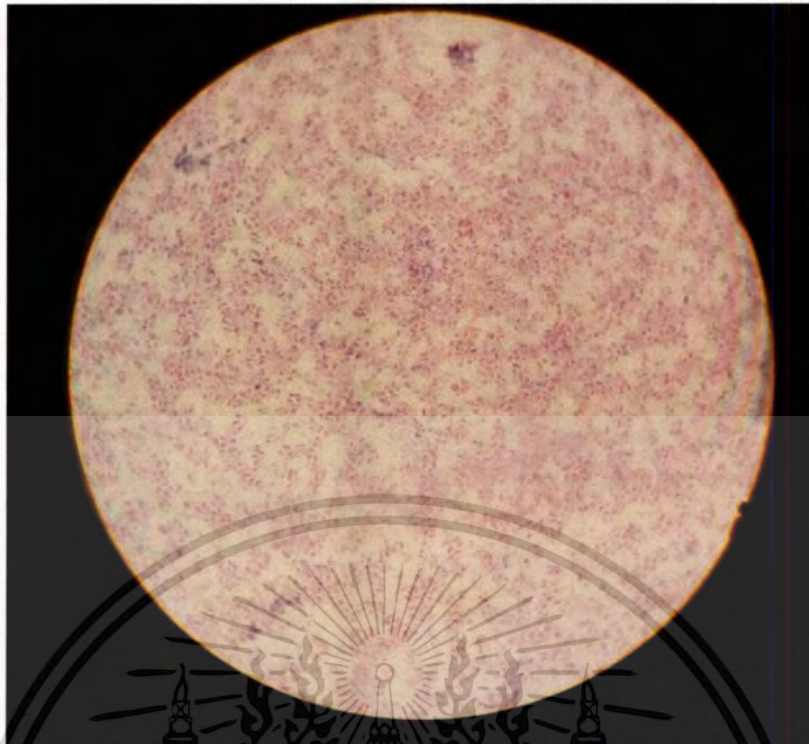


รูปที่ ค-4 ลักษณะของ *Enterobacter aerogenes* : ย้อมติดสีแดงของ Safranin O ซึ่งบ่งบอก
ได้ว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และมีรูปร่างท่อน



รูปที่ ค-5 ลักษณะของ *Listeria monocytogenes* : ย้อมติดสีน้ำเงินของ Crystal violet ซึ่งบ่ง
บอกได้ว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และมีรูปร่างท่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-6 ลักษณะของ *Vibrio parahaemolyticus* : ย้อมติดสีแดงของ Safranin O ซึ่งบ่งบอกได้ว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และมีรูปร่างท่อน

3. การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

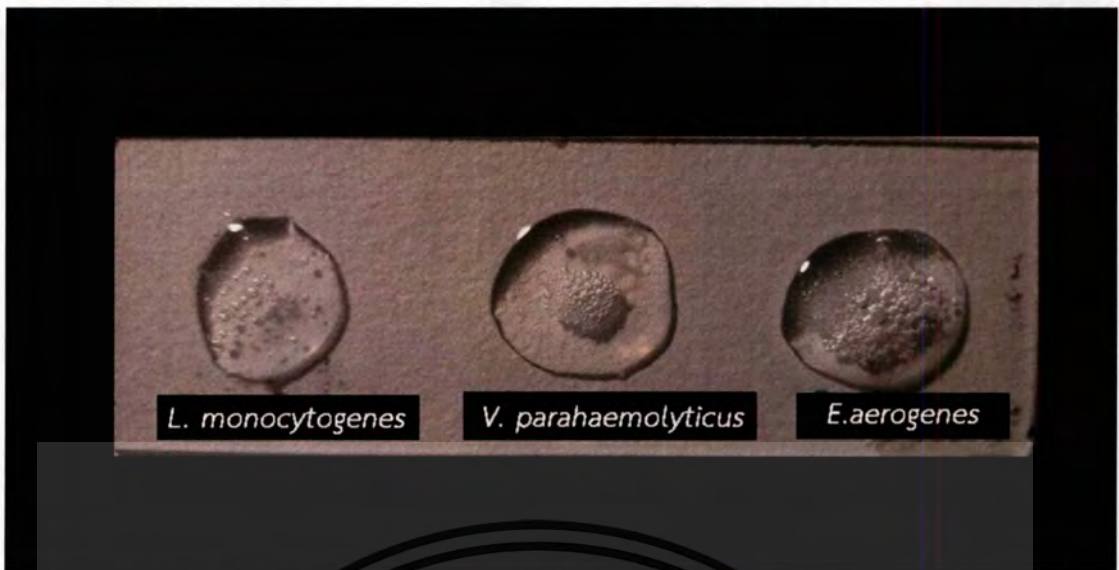
ทดสอบว่า แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสหรือไม่ โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์ มาแตะบนสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยด 3% H₂O₂ สังเกตว่ามีฟองอากาศหรือไม่ ต้องสังเกตผลทันที

catalase



ถ้ามีการสร้างฟอง O₂ แสดงว่า แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (ผลเป็นบวก) ในการทดสอบต้องใช้เชื้อที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง เพราะเอนไซม์คะตะเลส จะมีอยู่ในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-7 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์

การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้ผลคะตะเลสเป็นบวก เนื่องจาก Aerobic bacteria และ Facultative bacteria ส่วนใหญ่จะสร้างเอนไซม์คะตะเลส และเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase : SOD) ส่วน Obligate anaerobe จะไม่มีเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ส่วนแบคทีเรีย aerobe อื่นๆ จะสร้างเอนไซม์ Peroxidase ดังนั้นการทดสอบการสร้างเอนไซม์จะสามารถแยกแบคทีเรียที่เป็น aerobe ออกจากแบคทีเรียที่เป็น anaerobe ได้

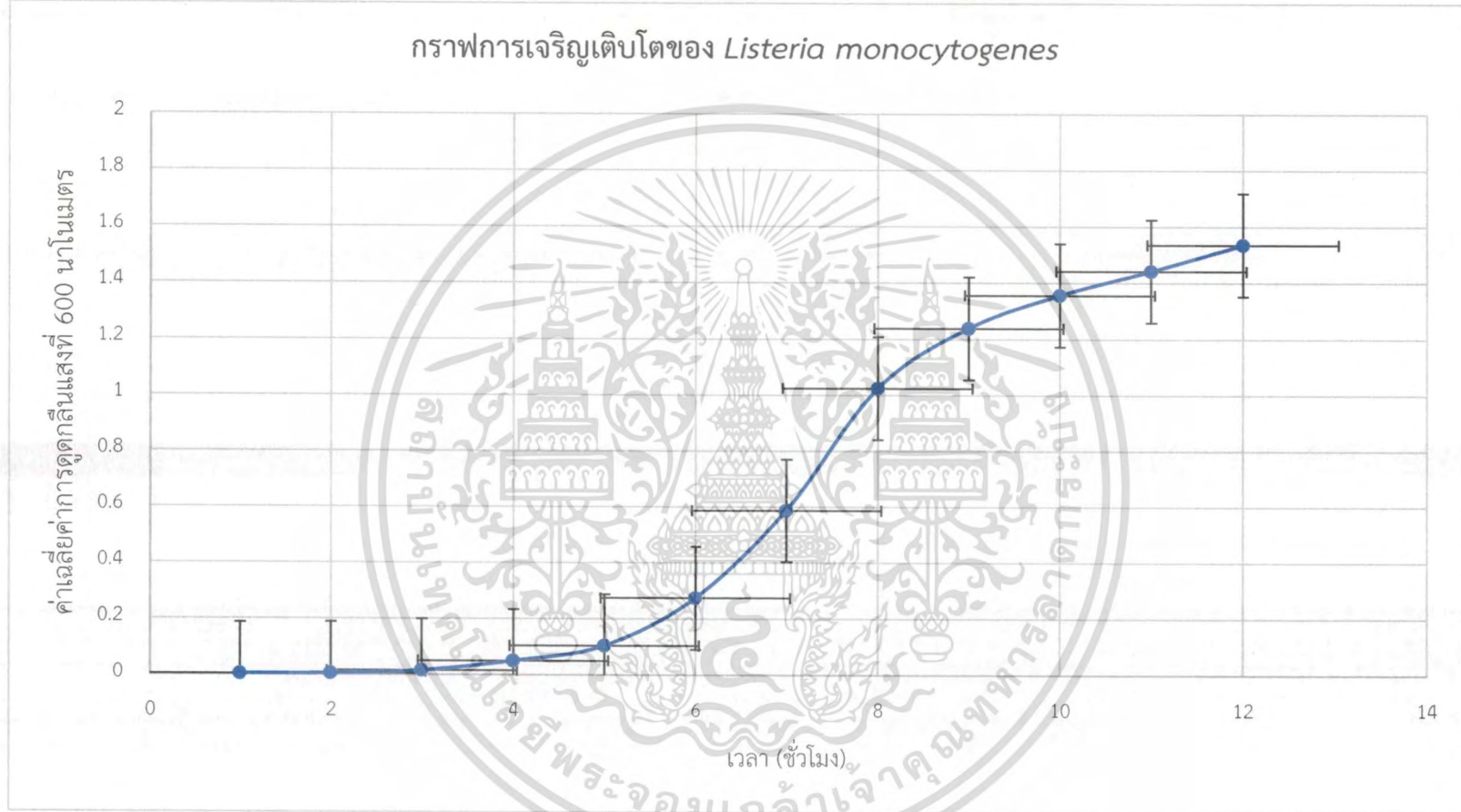
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



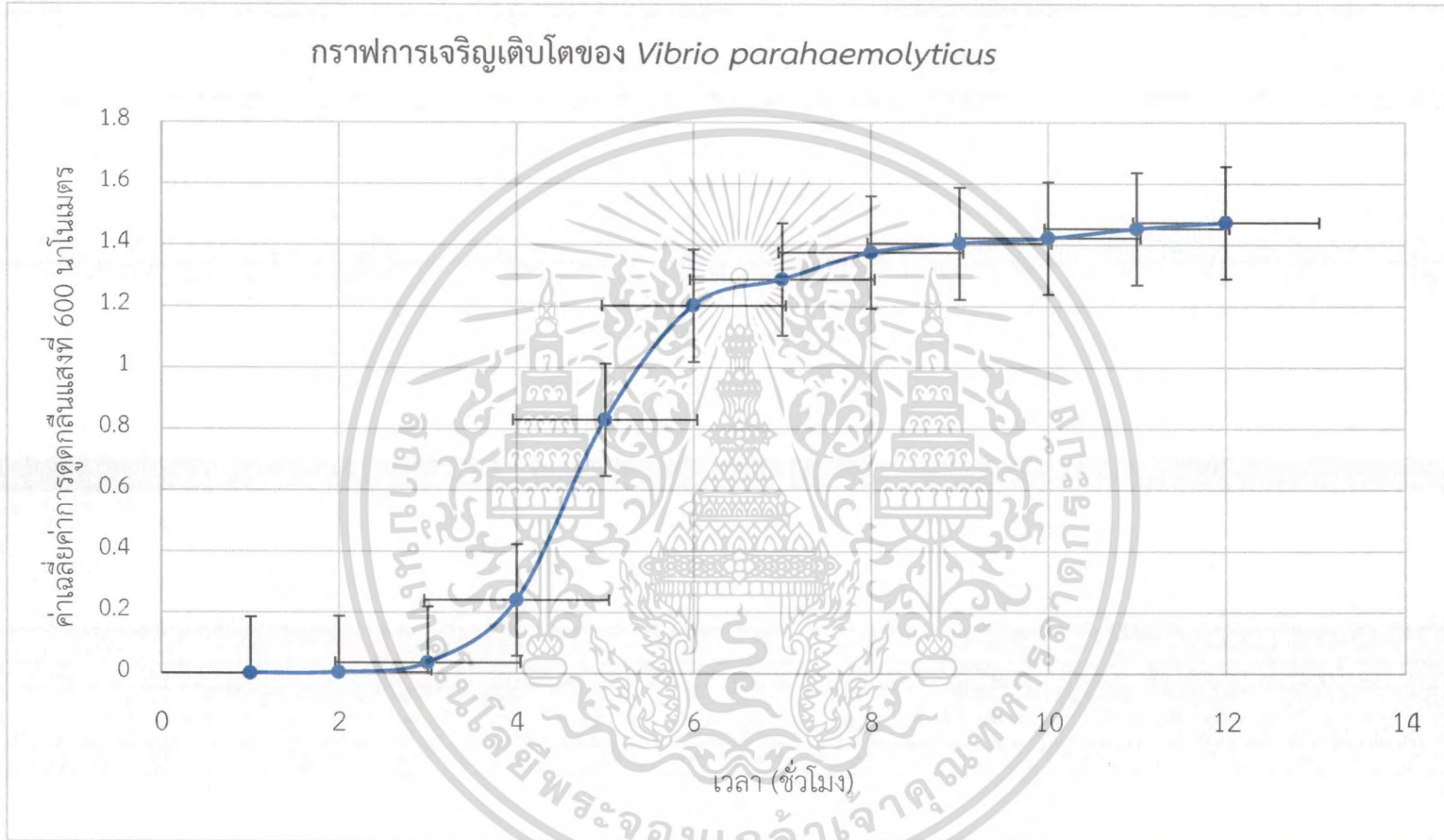
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง-1 กราฟการเจริญเติบโตของ *Enterobacter aerogenes* ที่สภาวะ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
จุดที่เป็น Late log คือชั่วโมงที่ 6 มีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.588



รูปที่ ง-2 กราฟการเจริญเติบโตของ *Listeria monocytogenes* ที่สภาวะ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จุดที่เป็น Late log คือชั่วโมงที่ 9 มีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.238



รูปที่ ๓-3 กราฟการเจริญเติบโตของ *Vibrio parahaemolyticus* ที่สภาวะ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จุดที่เป็น Late log คือชั่วโมงที่ 6 มีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.202



ภาคผนวก จ

ขนาดของบริเวณไฟที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-1 แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรีย โดยสารสกัดเปลือกพะยอบ โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งของสารสกัดเปลือกพะยอบ (มิลลิเมตร)																	
	0.125			0.25			0.625			1.25			2.5			5		
<i>E. aerogenes</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.39	5.77	5.65	5.68	6.17	6.74	8.92	8.33	7.83
<i>L. monocytogenes</i>	NA	NA	NA	8.03	8.37	7.17	10.37	9.90	9.23	10.44	9.76	10.08	12.92	12.08	13.74	14.67	14.89	13.89
<i>V. parahaemolyticus</i>	NA	NA	NA	5.08	5.10	5.10	6.67	6.26	6.20	7.93	6.25	7.02	10.00	8.68	8.08	11.61	10.41	10.75

หมายเหตุ NA ไม่เกิดการยับยั้ง

ตารางที่ จ-2 แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรีย โดยสารสกัดเปลือกพะยอบ โดยใช้เมทานอล เป็นตัวทำละลาย

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งของสารสกัดเปลือกพะยอบ เป็นตัวสกัด (มิลลิเมตร)																	
	0.125			0.25			0.625			1.25			2.5			5		
<i>E. aerogenes</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.89	6.23	5.66	7.08	7.40	7.14
<i>L. monocytogenes</i>	NA	NA	NA	7.50	7.01	7.06	9.12	7.71	9.03	10.59	9.80	10.68	11.77	10.82	11.66	13.12	13.72	13.87
<i>V. parahaemolyticus</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.83	6.66	6.04	6.58	7.11	8.44	8.20	7.71	13.87	9.05	10.92	12.47

หมายเหตุ NA ไม่เกิดการยับยั้ง

ตารางที่ จ-3 แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรีย โดยสารสกัดเปลือกพะยอบ โดยใช้เฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ขนาดของบริเวณใสที่เกิดการยับยั้งของสารสกัดเปลือกพะยอบ (มิลลิเมตร)																	
	0.125			0.25			0.625			1.25			2.5			5		
<i>E. aerogenes</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.19	5.1	5.45	5.89	6.34	6.34	7.88	6.96	6.88
<i>L. monocytogenes</i>	7.05	7.11	7.12	7.69	7.72	12.27	9.04	9.39	9.97	10.75	9.66	10.99	13.05	11.98	13.90	14.35	14.92	14.37
<i>V. parahaemolyticus</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.53	7.13	5.12	8.16	7.67	7.36	9.08	8.77	8.92	10.28	10.08	10.23

หมายเหตุ NA ไม่เกิดการยับยั้ง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ-1 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดการยับยั้ง โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ในระดับความเข้มข้น

0.125 - 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Zone_Eth 0.125	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	9	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Zone_Eth 0.25	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	7.8567	.61849	.35709	6.3202	9.3931	7.17	8.37
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	5.0933	.01155	.00667	5.0646	5.1220	5.08	5.10
	Total	9	4.3167	3.46538	1.15513	1.6529	6.9804	.00	8.37
Zone_Eth 0.625	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	9.8333	.57292	.33077	8.4101	11.2565	9.23	10.37
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	6.3767	.25580	.14769	5.7412	7.0121	6.20	6.67
	Total	9	5.4033	4.33146	1.44382	2.0739	8.7328	.00	10.37

ตารางที่ ฉ-1.1 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ในระดับความเข้มข้น

1.25 - 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Zone_Eth 1.25	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	5.6033	.19425	.11215	5.1208	6.0859	5.39	5.77
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	10.0933	.34020	.19641	9.2482	10.9384	9.76	10.44
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	7.0667	.84097	.48554	4.9776	9.1558	6.25	7.93
	Total	9	7.5878	2.03665	.67888	6.0223	9.1533	5.39	10.44
Zone_Eth 2.5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	6.1967	.53050	.30629	4.8788	7.5145	5.68	6.74
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	12.2467	.60740	.35068	10.7378	13.7555	11.74	12.92
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	8.9200	.98224	.56710	6.4800	11.3600	8.08	10.00
	Total	9	9.1211	2.69991	.89997	7.0458	11.1964	5.68	12.92
Zone_Eth 5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	8.3600	.54562	.31501	7.0046	9.7154	7.83	8.92
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	14.4833	.52548	.30339	13.1780	15.7887	13.89	14.89
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	10.9233	.61849	.35709	9.3869	12.4598	10.41	11.61
	Total	9	11.2556	2.70768	.90256	9.1742	13.3369	7.83	14.89

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Zone_Eth 0.125					
Between Groups	.000	2	.000		
Within Groups	.000	6	.000		
Total	.000	8			
Zone_Eth 0.25					
Between Groups	95.305	2	47.653	373.583	.000
Within Groups	.765	6	.128		
Total	96.071	8			
Zone_Eth 0.625					
Between Groups	149.305	2	74.652	568.901	.000
Within Groups	.787	6	.131		
Total	150.092	8			
Zone_Eth 1.25					
Between Groups	31.462	2	15.731	54.831	.000
Within Groups	1.721	6	.287		
Total	33.184	8			
Zone_Eth 2.5					
Between Groups	55.086	2	27.543	51.158	.000
Within Groups	3.230	6	.538		
Total	58.316	8			
Zone_Eth 5					
Between Groups	56.739	2	28.370	88.992	.000
Within Groups	1.913	6	.319		
Total	58.652	8			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zone_Eth 0.25

Bacteria	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a <i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3		5.0933	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3			7.8567
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Zone_Eth 0.625

Bacteria	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a <i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3		6.3767	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3			9.8333
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Zone_Eth 1.25

Bacteria	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a <i>Enterobacter aerogenes</i>	3	5.6033		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3		7.0667	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3			10.0933
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่าในรูปแบบใดก็ตาม และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zone_Eth 2.5

Bacteria		N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	6.1967		
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3		8.9200	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3			12.2467
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Zone_Eth 5

Bacteria		N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	8.3600		
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3		10.9233	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3			14.4833
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ-2 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดการยับยั้ง โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ในระดับความเข้มข้น

0.125 – 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Zone_Met 0.125	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	9	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Zone_Met 0.25	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	7.1900	.26963	.15567	6.5202	7.8598	7.01	7.50
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	9	2.3967	3.59753	1.19918	-.3686	5.1620	.00	7.50
Zone_Met 0.625	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	8.6200	.78937	.45574	6.6591	10.5809	7.71	9.12
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	6.1767	.43155	.24915	5.1046	7.2487	5.83	6.66
	Total	9	4.9322	3.87370	1.29123	1.9546	7.9098	.00	9.12

ตารางที่ ฉ-2.1 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณสีที่เกิดการยับยั้ง โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ในระดับความเข้มข้น

1.25 - 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Zone_Met 1.25	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	10.3567	.48418	.27954	9.1539	11.5594	9.80	10.68
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	7.3767	.95824	.55324	4.9963	9.7571	6.58	8.44
	Total	9	5.9111	4.64841	1.54947	2.3380	9.4842	.00	10.68
Zone_Met 2.5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	5.9267	.28676	.16556	5.2143	6.6390	5.66	6.23
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	11.4167	.51965	.30002	10.1258	12.7075	10.82	11.77
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	9.9467	3.40450	1.96559	1.4894	18.4039	7.77	13.87
	Total	9	9.0967	3.00722	1.00241	6.7851	11.4082	5.66	13.87
Zone_Met 5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	7.2067	.17010	.09821	6.7841	7.6292	7.08	7.40
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	13.5700	.39686	.22913	12.5841	14.5559	13.12	13.87
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	10.8133	1.71249	.98871	6.5593	15.0674	9.05	12.47
	Total	9	10.5300	2.90124	.96708	8.2999	12.7601	7.08	13.87

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Zone_Met 0.125	Between Groups	.000	2	.000		
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
Zone_Met 0.25	Between Groups	103.392	2	51.696	2133.264	.000
	Within Groups	.145	6	.024		
	Total	103.538	8			
Zone_Met 0.625	Between Groups	118.425	2	59.213	219.487	.000
	Within Groups	1.619	6	.270		
	Total	120.044	8			
Zone_Met 1.25	Between Groups	170.556	2	85.278	221.950	.000
	Within Groups	2.305	6	.384		
	Total	172.861	8			
Zone_Met 2.5	Between Groups	48.461	2	24.231	6.087	.036
	Within Groups	23.886	6	3.981		
	Total	72.347	8			
Zone_Met 5	Between Groups	61.099	2	30.550	29.383	.001
	Within Groups	6.238	6	1.040		
	Total	67.337	8			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zone_Met 0.25

Bacteria	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Duncan ^a <i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	.0000	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3		7.1900
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Zone_Met 0.625

Bacteria	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a <i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3		6.1767	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3			8.6200
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Zone_Met 1.25

Bacteria	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a <i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3		7.3767	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3			10.3567
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000. และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zone_Met 2.5

Bacteria	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Duncan ^a <i>Enterobacter aerogenes</i>	3	5.9267	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3		9.9467
<i>Listeria monocytogenes</i>	3		11.4167
Sig.		1.000	.402

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Zone_Met 5

Bacteria	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a <i>Enterobacter aerogenes</i>	3	7.2067		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3		10.8133	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3			13.5700
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ-3 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดการยับยั้ง โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ในระดับความเข้มข้น 0.125 – 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้เฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
						Zone_Hex 0.125	<i>Enterobacter aerogenes</i>		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	9	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Zone_Hex 0.25	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	7.5600	.25159	.14526	6.9350	8.1850	7.27	7.72
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	9	2.5200	3.78209	1.26070	-.3872	5.4272	.00	7.72
Zone_Hex 0.625	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	9.4667	.46972	.27119	8.2998	10.6335	9.04	9.97
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	5.9233	1.06397	.61428	3.2803	8.5664	5.12	7.13
	Total	9	5.1300	4.18277	1.39426	1.9148	8.3452	.00	9.97

ตารางที่ ฉ-3.1 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณสีที่เกิดการยับยั้ง โดยสารสกัดจากเปลือกพะยอม ในระดับความเข้มข้น

1.25 - 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้เฮกเซน 70% เป็นตัวทำละลาย

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
						Zone_Hex 1.25	<i>Enterobacter aerogenes</i>		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	10.4667	.70883	.40924	8.7058	12.2275	9.66	10.99
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	7.7300	.40336	.23288	6.7280	8.7320	7.36	8.16
	Total	9	7.8144	2.29948	.76649	6.0469	9.5820	5.10	10.99
Zone_Hex 2.5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	6.1900	.25981	.15000	5.5446	6.8354	5.89	6.34
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	12.9767	.96210	.55547	10.5867	15.3667	11.98	13.90
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	8.9233	.15503	.08950	8.5382	9.3084	8.77	9.08
	Total	9	9.3633	2.99987	.99996	7.0574	11.6692	5.89	13.90
Zone_Hex 5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	7.2400	.55570	.32083	5.8596	8.6204	6.88	7.88
	<i>Listeria monocytogenes</i>	3	14.5467	.32347	.18676	13.7431	15.3502	14.35	14.92
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	10.2267	.12858	.07424	9.9073	10.5461	10.08	10.32
	Total	9	10.6711	3.19824	1.06608	8.2127	13.1295	6.88	14.92

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Zone_Hex 0.125	Between Groups	.000	2	.000		
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
Zone_Hex 0.25	Between Groups	114.307	2	57.154	2708.701	.000
	Within Groups	.127	6	.021		
	Total	114.434	8			
Zone_Hex 0.625	Between Groups	137.259	2	68.629	152.209	.000
	Within Groups	2.705	6	.451		
	Total	139.964	8			
Zone_Hex 1.25	Between Groups	40.905	2	20.452	87.883	.000
	Within Groups	1.396	6	.233		
	Total	42.301	8			
Zone_Hex 2.5	Between Groups	69.959	2	34.980	103.168	.000
	Within Groups	2.034	6	.339		
	Total	71.994	8			
Zone_Hex 5	Between Groups	80.970	2	40.485	282.475	.000
	Within Groups	.860	6	.143		
	Total	81.830	8			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zone_Hex 0.25

Bacteria	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Duncan ^a <i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	.0000	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3		7.5600
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Zone_Hex 0.625

Bacteria	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a <i>Enterobacter aerogenes</i>	3	.0000		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3		5.9233	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3			9.4667
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Zone_Hex 1.25

Bacteria	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a <i>Enterobacter aerogenes</i>	3	5.2467		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3		7.7300	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3			10.4667
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Zone_Hex 2.5

Bacteria	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a <i>Enterobacter aerogenes</i>	3	6.1900		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3		8.9233	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3			12.9767
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Zone_Hex 5

Bacteria	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a <i>Enterobacter aerogenes</i>	3	7.2400		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3		10.2267	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3			14.5467
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้