

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งผลผลิตสุดท้ายแอตวานซ์ไกลเคชั่นและ
การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว

Study on anti-advanced glycation end products
(AGEs) activity and Antimicrobial by using
Thai garden plants.



นาย น้อยหิรัญ
นุสรุา หรัมย์ณี

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study on anti-advanced glycation end products
(AGEs) activity and Antimicrobial by using
Thai garden plants.



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

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ACADEMIC YEAR 2023
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งผลผลิตสุดท้ายแอดวานซ์ไกลเคชันและ การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว
Study on anti-advanced glycation end products (AGEs) activity and Antimicrobial by using Thai garden plants.

ชื่อนักศึกษา นางสาวนทยา น้อยหิรัญ รหัสนักศึกษา 63050493
นางสาวนุสรุรา หรัมย์ณี รหัสนักศึกษา 63050494

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
ปีการศึกษา 2566
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา
อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2566

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.กานต์ วงศาธิยะ กรรมการ	
ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งผลผลิตสุดท้ายแอดวานซ์ไกลเคชันและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว
ชื่อนักศึกษา	นางสาวนาดยา น้อยหิรัญ รหัสนักศึกษา 63050493 นางสาวนุสรา หรัมย์ณี รหัสนักศึกษา 63050494
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วิภาวี เตชติศักดิ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของ AGEs 2 ชนิด ได้แก่ N^E - (carboxymethyl) lysine (CML) และ N^ω - (carboxymethyl) arginine (CMA) และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว 10 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40 % และ 80 % ชั้นแรกทำการเตรียมสารสกัดเอทานอล 40% และ 80% โดยการผสมพืชแต่ละชนิดกับตัวละลายแต่ละชนิด และทดสอบการก่อตัวของ CMA และ CML ด้วยวิธี ELISA จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า สารสกัดที่ดีที่สุด ในการยับยั้งการก่อตัวของ CMA และ CML คือ สารสกัดพริกชี้หนู ตามด้วย สารสกัดใบแมงลัก ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง 18% และ 16% ตามลำดับ จากนั้นนำมาแยกสารสกัดพริกชี้หนู และสารสกัดใบแมงลัก ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยน้ำกลั่น เอทานอล ความเข้มข้น 25 ถึง 100% และ อะซิโตน 100% และนำมาทดสอบ ELISA อีกครั้ง พบว่า สารสกัดจากใบแมงลัก 40% ที่ชะล้างด้วยเอทานอล 75% มีฤทธิ์ยับยั้ง CML สูงสุดถึง 28% ตามด้วย สารสกัดพริกชี้หนู 80% ที่ชะล้างด้วยน้ำกลั่น มีฤทธิ์ยับยั้ง CML เท่ากับ 14% และสารสกัดจากใบแมงลัก ที่ชะล้างด้วยเอทานอล 75% มีฤทธิ์ยับยั้ง CMA สูงสุดถึง 15% ตามด้วย สารสกัดพริกชี้หนูที่ชะล้างด้วยน้ำกลั่น มีฤทธิ์ยับยั้ง CMA เท่ากับ 5% จากนั้นทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยสารสกัดจากพริกและใบแมงลัก พบว่า สารสกัดพริกชี้หนู 40 % ที่ชะล้างด้วยเอทานอล 50 % สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้ สารสกัดพริกชี้หนู 80 % ที่ชะล้างด้วยเอทานอล 50 % สามารถยับยั้ง *B. subtilis* และ

P. aeruginosa
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดจากใบแมงลักและพริกขี้หนูมีฤทธิ์ในการยับยั้งการก่อตัวของ CMA และ CML ได้ รวมถึงแบคทีเรียแกรมบวก อาจนำสารสกัดจากใบแมงลักและพริกขี้หนูไปศึกษาสารบริสุทธิ์ที่สำคัญ และทำการทดสอบการยับยั้งการก่อตัวของ CMA และ CML และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคอีกครั้ง

คำสำคัญ : N^E- (Carboxymethyl) lysine (CML), N^W- (Carboxymethyl) arginine (CMA), ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค, คอลัมน์โครมาโทกราฟี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study on anti-advanced glycation end products (AGEs) activity and Antimicrobial by using Thai garden plants.
Students	Miss Nattaya Noihipun Student ID 63050493 Miss Nootsara Raimanee Student ID 63050494
Degree	Bachelor of Science (industrial microbiology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2023
Advisor	Asst.Prof.Dr.Wipawee Dejtsakdi

Abstract

The objective for this study is to test anti-CML (N^{ϵ} - (carboxymethyl) lysine), anti-CMA (N^{ω} - (carboxymethyl) arginine), and antimicrobial activity of ten-Thai plants where were extracted by 40% and 80% ethanol. We first prepared 40% and 80% ethanolic extract by blending each plant with each solvent and tested CMA and CML formation by using ELISA. We preliminary found that the best extract to inhibit CMA and CML formation was chili extract follows by sweet basil with 18% and 16% inhibition, respectively. We then fractionated both chili and sweet basil extracts by using C18 column chromatography with water, 25% to 100% ethanol, and 100% acetone solvent elution and redone ELISA. We found that 75% ethanolic fractionated extract of sweet basil showed the highest CML inhibition rate up to 28% followed by 80% ethanolic fractionated extract of chili (14%). We found that 75% ethanolic fractionated extract of sweet basil showed the highest CMA inhibition rate up to 15% followed by 80% water fractionated extract of chili (5%). We next tested antimicrobial activity against with 4 types of pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa*) of all fractionated extracts of chili and sweet basil We found that 50% fractionated ethanolic extract of chili (40%) could slightly inhibit *S. aureus* and *B. subtilis* and 50% fractionated ethanolic extract of chili (80% ethanol) could inhibit *B. subtilis* and *P. aeruginosa*.

These preliminary findings suggested that both chili and sweet basil ethanolic extract could fairly inhibit CMA and CML including gram positive bacteria. We proposed to purify the significant compound and retest anti-CMA, anti-CML, and antimicrobial from those extracts.

Keywords: N^ε- (Carboxymethyl) lysine (CML), N^ω- (Carboxymethyl) arginine (CMA), ELISA, Antimicrobial activity, C18 column chromatography



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเรื่อง การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งผลผลิตสุดท้ายแอดวานซ์ไกลเคชั่นและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากผู้มีพระคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิภาวี เดชดีศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาและเสนอแนวทางในการแก้ไขข้อบกพร่องระหว่างการดำเนินงาน ด้วยความเอาใจใส่ในทุกขั้นตอนอย่างดียิ่ง และให้ความรู้ในการเขียนโครงการพิเศษ และตรวจสอบแก้ไขให้โครงการพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากขึ้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ ประธานกรรมการโครงการพิเศษที่ให้ความอนุเคราะห์สำหรับสารเคมีต่างๆ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ความรู้ เพื่อให้โครงการพิเศษนี้มีความสมบูรณ์มากที่สุด และขอขอบพระคุณ Prof.Dr.Ryoji Nagai จาก Graduate School of agriculture, Tokai University (Kumamoto campus) ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ Aminoguanidine (AG), anti - CMA, anti - CML และ 2nd- antibody (IgG-HRP) เพื่อให้ใช้ในการศึกษาค้างนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.กานต์ วงศาธิยะ กรรมการโครงการพิเศษที่กรุณามอบเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ให้ใช้ในการศึกษาค้างนี้ พร้อมทั้งให้คำแนะนำความรู้ เพื่อให้โครงการพิเศษนี้ออกมาสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาคชีววิทยา ประจำอาคารพระจอมเกล้า ที่มอบเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ให้ใช้ในการศึกษาค้างนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาคชีววิทยา ประจำอาคารวิทยาศาสตร์อาคารเก่า ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเบิกยืมอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ รวมทั้งให้คำแนะนำวิธีการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ต่างๆในการศึกษาค้างนี้

ขอขอบพระคุณบิดา และมารดาที่ให้การสนับสนุน อบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจในการทำโครงการพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

คณะผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของผู้มีพระคุณทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ทำให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี หากมีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ โอกาสนี้

นัตยา น้อยศิริณู

นุสรรา หรัมย์ณี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง	ฉม
สารบัญรูป.....	ฉญ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 พืชที่ใช้ในการศึกษา	4
2.1.1 กระชาย (Finger root).....	4
2.1.2 ข่า (Galangal).....	4
2.1.3 จิง (Ginger).....	4
2.1.4 ถั่วพู (Winged bean).....	5
2.1.5 พริกชี้หนู (Bird's Eye Chili or Bird Chili).....	5
2.1.6 พริกหวานสีแดง (Sweet pepper).....	5
2.1.7 ใบมะกรูด (Bergamot leaves).....	6
2.1.8 ใบแมงลัก (Hairy Basil).....	6
2.1.9 มะระขี้นก (Bitter gourd).....	7
2.1.10 มะเขือพวง (Pea eggplant or Turkey berry).....	7
2.2 กระบวนการไกลโคเซชัน	7
2.2.1 N ^E - (carboxymethyl) lysine (CML).....	8
2.2.2 N ^ω - (Carboxymethyl) arginine (CMA).....	9

เอกสารนี้ 2.3 การวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay)..... 9

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 ELISA.....	9
2.3.1.1 Indirect ELISA.....	9
2.4 โครมาโทกราฟี (Chromatography).....	10
2.4.1 โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	10
2.5 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการศึกษา.....	11
2.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.5.2 <i>Escherichia coli</i>	12
2.5.3 <i>Bacillus subtilis</i>	13
2.5.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค.....	15
2.6.1 วิธี Agar disc diffusion	15
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	18
3.1 พีช.....	18
3.2 สารเคมี.....	18
3.2.1 สารเคมีสำหรับการสกัดพีช.....	18
3.2.2 สารเคมีสำหรับการทำปฏิกิริยา AGEs.....	18
3.2.3 สารเคมีสำหรับทดสอบ Enzyme-linked immunosorbent assay.....	18
3.2.4 สารเคมีสำหรับการแยกคอลัมน์.....	19
3.2.5 สารเคมีสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค.....	19
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	19
3.3.1 อุปกรณ์.....	19
3.3.2 เครื่องมือ.....	20
3.4 วิธีการทดลอง.....	21
3.4.1 การเตรียม 10% ของสารสกัดจากพีชสวนครัว.....	21
3.4.2 การเตรียมปฏิกิริยาจำลองการก่อตัวของ AGEs.....	21
3.4.3 การตรวจสอบการก่อตัวของ AGEs ด้วยวิธี ELISA.....	21
3.4.4 การแยกสารสกัดโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	22
3.4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคด้วยวิธี Disc diffusion	23
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	24
4.1 ผลของการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ N ^ω - (Carboxymethyl) arginine.....	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.1	ผลของการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CMA ด้วยสารสกัดพืชสวนครัว ทั้ง 10 ชนิด.....	24
4.1.2	ผลของการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CMA ด้วยสารสกัดพริกชี้หนูและ ใบแมงลัก 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟี	25
4.2	ผลของการยับยั้งการก่อตัวของ N ^E - (carboxymethyl) lysine หรือ CML.....	26
4.2.1	ผลของการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CML ด้วยสารสกัดพืชสวนครัว ทั้ง 10 ชนิด.....	26
4.2.2	ผลของการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CML ด้วยสารสกัดพริกชี้หนูและ ใบแมงลัก 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟี	27
4.3	ผลทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคของสารสกัดพริกชี้หนูที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอล 40% และ 80% ที่นำมาแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วยวิธี Disc diffusion	29
4.3.1	ผลทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคด้วยสารสกัดพริกชี้หนูเอทานอล 40% ซึ่งมี 4 Fractions.....	29
4.3.2	ผลทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคด้วยสารสกัดพริกชี้หนูเอทานอล 80% ซึ่งมี 4 Fractions.....	30
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ		33
5.1	สรุปผลการวิจัย.....	33
5.2	ข้อเสนอแนะ.....	33
เอกสารอ้างอิง.....		34
ภาคผนวก		42
ภาคผนวก ก.....		43
ภาคผนวก ข.....		44
ภาคผนวก ค.....		47
ภาคผนวก ง		48
ภาคผนวก จ.....		55
ภาคผนวก ฉ.....		67
ภาคผนวก ช.....		72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคด้วยสารสกัดพริกขี้หนูเอทานอล 40%	30
4.2 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคด้วยสารสกัดพริกขี้หนูเอทานอล 80%	32
ก.1 การเตรียมตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80%	43
ข.1 การเตรียมสารในขั้นตอนการก่อตัวของ AGEs (Advanced glycation end product).....	44
ข.2 การเตรียม Solution A	44
ข.4 การเตรียม 1X PBS.....	45
ค.1 การเตรียมตัวทำละลาย.....	47
ง.1 แสดงผลของการก่อตัว CMA ในตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร.....	48
ง.2 แสดงผลของการยับยั้งการก่อตัวของ CMA ด้วยสารสกัดพริกขี้หนูทั้ง 10 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80%.....	49
ง.3 แสดงผลของการก่อตัว CML ในตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบ.....	49
ง.4 แสดงผลของการยับยั้งการก่อตัวของ CML ด้วยสารสกัดพริกขี้หนูทั้ง 10 ชนิด สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80%.....	50
ง.5 แสดงผลของการก่อตัว CMA ในตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้ง CMA ของสารสกัดใบแมงลัก 40% และ 80%.....	51
ง.6 แสดงผลของการยับยั้งการก่อตัวของ CMA ด้วยสารสกัดใบแมงลัก ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	51
ง.7 แสดงผลของการก่อตัว CML ในตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบ เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้ง CML ของสารสกัดใบแมงลัก 40% และ 80%.....	52
ง.8 แสดงผลของการยับยั้งการก่อตัวของ CML ด้วยสารสกัดใบแมงลัก ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	52
ง.9 แสดงผลของการก่อตัว CMA ในตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบ เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้ง CMA ของสารสกัดพริกขี้หนู 40% และ 80%.....	53
ง.10 แสดงผลของการยับยั้งการก่อตัวของ CMA ด้วยสารสกัดพริกขี้หนู ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	53
ง.11 แสดงผลของการก่อตัว CML ในตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบ เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้ง CML ของสารสกัดพริกขี้หนู 40% และ 80%.....	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
จ.1 แสดงผลข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CMA โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว 10 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40%.....	55
จ.2 แสดงผลข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CMA โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว 10 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80%.....	56
จ.3 แสดงผลข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CML โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว 10 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40%.....	57
จ.4 แสดงผลข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CML โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว 10 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80%.....	58
จ.5 แสดงผลข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CMA โดยใช้สารสกัดจากใบแมงลัก เอทานอล 40% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	59
จ.6 แสดงผลข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CMA โดยใช้สารสกัดจากใบแมงลัก เอทานอล 80% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	60
จ.7 แสดงผลข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CML โดยใช้สารสกัดจากใบแมงลัก เอทานอล 40% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	61
จ.8 แสดงผลข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CML โดยใช้สารสกัดจากใบแมงลัก เอทานอล 80% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	62
จ.9 แสดงผลข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CMA โดยใช้สารสกัดจากพริกขี้หนู เอทานอล 40% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	63
จ.10 แสดงผลข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CMA โดยใช้สารสกัดจากพริกขี้หนู เอทานอล 80% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	64
จ.11 แสดงผลข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CML โดยใช้สารสกัดจากพริกขี้หนู เอทานอล 40% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	65
จ.12 แสดงผลข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CML โดยใช้สารสกัดจากพริกขี้หนู เอทานอล 80% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	66
ฉ.1 แสดงผลทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคด้วยยาปฏิชีวนะและตัวควบคุม.....	67
ฉ.2 สูตรอาหาร Nutrient agar (NA)	68
ฉ.3 สูตรอาหาร Mueller Hinton Agar.....	68
ฉ.4 ส่วนประกอบ Normal saline 0.85%.....	69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ฉ.5 ส่วนประกอบ McFarland Standard No.0.5.....	69
ฉ.6 ส่วนประกอบของ สารละลายกลีเซอรอล 20%.....	69



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงปฏิกิริยาไกลเคชั่นระหว่างอัลดีไฮด์กับแอมมีนและการเกิดสาร AGEs	8
2.2 แสดงลักษณะของ Indirect ELISA.....	10
2.3 แสดงลักษณะของโรมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	11
2.4 แสดงลักษณะการติดสีย้อมแกรมของ <i>S. aureus</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	12
2.5 แสดงลักษณะการติดสีย้อมแกรมของ <i>E. coli</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	13
2.6 แสดงลักษณะการติดสีย้อมแกรมของ <i>B. subtilis</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	14
2.7 แสดงลักษณะการติดสีย้อมแกรมของ <i>P. aeruginosa</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	15
4.1 แสดงอัตราการการก่อตัวของ CMA ด้วยชุดควบคุมและสารสกัดพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิด สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40 % และ 80 %	25
4.2 แสดงอัตราการการก่อตัวของ CMA ด้วยชุดควบคุมและสารสกัดพริกชี้หนู 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	26
4.3 แสดงอัตราการการก่อตัวของ CMA ด้วยชุดควบคุมและสารสกัดใบแมงลัก 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	27
4.4 แสดงอัตราการการก่อตัวของ CML ด้วยชุดควบคุมและสารสกัดพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิด สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40 % และ 80 %.....	28
4.5 แสดงอัตราการการก่อตัวของ CML ด้วยชุดควบคุมและสารสกัดพริกชี้หนู 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	29
4.6 แสดงอัตราการการก่อตัวของ CML ด้วยชุดควบคุมและสารสกัดใบแมงลัก 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	29
4.7 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดพริกชี้หนู 40% ต่อเชื้อก่อโรค.....	31
4.7 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดพริกชี้หนู 80% ต่อเชื้อก่อโรค.....	32
ฉ.1 แสดงบริเวณการยับยั้งของยาปฏิชีวนะและตัวควบคุม.....	67
ฉ.7 แสดงลักษณะวิธีการ Cross streak.....	70
ฉ.8 แสดงขั้นตอนการย้อมแกรม.....	71
ข.1 แสดงลักษณะพืชสวนครัว 10 ชนิด.....	72
ข.2 แสดงลักษณะพืชสวนครัวขณะปั่นด้วยเครื่องปั่น.....	72
ข.3 แสดงลักษณะสารสกัดเมื่อป่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง.....	73
ข.4 แสดงลักษณะเครื่องทำสุญญากาศ และชุดกรองบูชเนอร์.....	73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ข.5 แสดงลักษณะการทำงานของเครื่องทำสุญญากาศ และชุดกรองบูชเนอร์.....	74
ข.6 แสดงลักษณะการกรองของเครื่องกรองสุญญากาศ.....	74
ข.7 แสดงลักษณะขั้นตอนการเตรียมชุดจำลองปฏิกิริยา.....	75
ข.8 แสดงลักษณะขั้นตอนการเตรียมชุดทำปฏิกิริยา.....	75
ข.9 แสดงลักษณะขั้นตอนการทำ ELISA.....	76
ข.10 แสดงลักษณะการเกิดสีของปฏิกิริยาการเรืองแสง.....	76
ข.11 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดพีชสวนครัว 10 ชนิด เอทานอล 40% และ 80 ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CMA.....	77
ข.12 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดพีชสวนครัว 10 ชนิด เอทานอล 40% และ 80 ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CML.....	77
ข.13 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดใบแมงลัก 40% ที่นำมา แยกคอลัมน์ ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของCMA.....	78
ข.14 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดใบแมงลัก 40% ที่นำมา แยกคอลัมน์ ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CML.....	78
ข.15 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดใบแมงลัก 80% ที่นำมา แยกคอลัมน์ ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CMA.....	79
ข.16 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดใบแมงลัก 80% ที่นำมา แยกคอลัมน์ ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CML.....	79
ข.17 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดพริกขี้หนู 40% ที่นำมา แยกคอลัมน์ ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CMA.....	80
ข.18 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดพริกขี้หนู 40% ที่นำมา แยกคอลัมน์ ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของCML.....	80
ข.19 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดพริกขี้หนู 80% ที่นำมา แยกคอลัมน์ ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CMA.....	81
ข.20 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดพริกขี้หนู 80% ที่นำมา แยกคอลัมน์ ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CML.....	81
ข.21 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>S. aureus</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า.....	82
ข.22 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>E. coli</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า.....	82
ข.23 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>B. subtilis</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า.....	83
ข.24 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า.....	83

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
AGEs	Advanced Glycation End Products
CML	N ^E - (Carboxymethyl) lysine
CMA	N ^ω - (Carboxymethyl) arginine
AG	Aminoguanidine
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
μm	micrometer หรือ ไมครอน
μg	ไมโครกรัม
μL	ไมโครลิตร
g	กรัม
°C	องศาเซลเซียส
mg	มิลลิกรัม
mL	มิลลิลิตร
nm	นาโนเมตร
L	ลิตร
Eth	Ethanol
Dw 37°C	บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน
Dw -20°C	บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน
BL	Bergamot leaves (ใบมะกรูด)
G	Ginger (ขิง)
SP	Sweet pepper (พริกหวานแดง)
WB	Winged bean (ถั่วพู)
BG	Bitter gourd (มะระขี้นก)
PE	Pea eggplant (ถั่วพู)
SB	Sweet basil (ใบแมงลัก)
BC	Bird chili (พริกขี้หนู)
GG	Galangal (ข่า)
FR	Finger (กระชาย)
Amp	Ampicillin
Dw	Distilled water (น้ำกลั่น)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ผู้ที่มิได้ขออนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NA	Nutrient agar
MHA	Mueller Hinton Agar
ชม.	ชั่วโมง
ชม.	เซนติเมตร
มม.	มิลลิเมตร
ม.	เมตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการ

ในปัจจุบันพบว่าผู้คนส่วนมากเริ่มเห็นถึงความสำคัญในเรื่องการดูแลสุขภาพของตนเองมากขึ้น ด้วยวิธีการที่แตกต่างกันหลากหลายวิธี เช่น การออกกำลังกาย การเลือกรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ หรือการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการใช้ชีวิตประจำวัน เป็นต้น เพื่อให้ได้มาซึ่งการมีสุขภาพที่แข็งแรง อย่างไรก็ตามสิ่งที่สำคัญที่สุดคือการเลือกรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ เนื่องจากในอาหารเป็นแหล่งที่มีสารอาหารต่างๆ มากมาย อีกทั้งยังเป็นแหล่งที่มักพบ AGEs อยู่ในอาหารนั้นด้วย โดยเฉพาะอาหารประเภททอด คั่ว หรืออาหารที่ใช้ความร้อนสูง (Zhang *et al.*, 2020) หากได้รับประทานอาหารดังกล่าวในปริมาณที่มากเกินไป จะทำให้เกิดการสะสมของสาร AGEs ภายในร่างกายและอาจก่อให้เกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น โรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคไต โรคอัลไซเมอร์ (Reddy and Beyaz, 2006) หรือเกิดริ้วรอยบริเวณใบหน้า เป็นต้นเหตุที่จะนำไปสู่สภาวะความแก่ก่อนวัย เป็นต้น (Unoki *et al.*, 2007) AGEs เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยไม่ใช้เอนไซม์ ระหว่างกลุ่มคาร์บอนิล (Carbonyl group) ของน้ำตาลรีดิวซ์ และกลุ่มเอมีน (Amine group) ของกรดนิวคลีอิก โปรตีน หรือไขมัน และทำการจัดเรียงเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายที่เสถียรและไม่สามารถย้อนกลับได้ (Clapa *et al.*, 2022) ซึ่งผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายของไกลเคชั่นขั้นสูง (AGEs) ถูกสร้างขึ้นในช่วงปลายของปฏิกิริยา Maillard ในอาหารและระบบชีวภาพ ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ส่วนใหญ่เกิดจากปฏิกิริยาของการลดน้ำตาลหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดแอสคอร์บิก (Chuyen, 2006) AGEs จะถูกกระตุ้นเมื่อมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง และเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ร่วมด้วย (Giacco and Brownlee, 2011) กลุ่มหลักของ AGEs ที่มีอยู่ในร่างกายคือ

N^{ϵ} - (carboxymethyl) lysine หรือ CML (Lander *et al.*, 1997) CML เป็นผลิตภัณฑ์ที่สำคัญของโปรตีนไกลเคชั่นหรือการก่อตัวของสารประกอบคาร์บอนิลในการแปรรูปอาหาร (Alaei *et al.*, 2019) นอกจาก CML แล้ว ใน AGEs ยังมีอีกกลุ่มหนึ่งคือ N^{ω} - (Carboxymethyl) arginine หรือ CMA ซึ่งเป็นโครงสร้าง AGEs ที่พบอยู่ในเอนไซม์ไฮโดรไลสของไกลโคเทคคอลลลาเจน (Biehaus *et al.*, 1998) มีการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยเบาหวานมีระดับซีรัมสูงกว่าผู้ป่วยปกติ (Stitt, 2005) ด้วยสาเหตุดังกล่าวจึงทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการ AGEs อย่างแพร่หลาย

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำสารสกัดสมุนไพรมาใช้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของ AGEs เช่น งานวิจัยของ (Zhang *et al.*, 2023) ได้สกัดสารจากใบบัวเพื่อใช้ทดสอบการยับยั้งการก่อตัวของ AGEs ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจากใบบัวสามารถยับยั้งการก่อตัวของ AGEs ได้ โดยสาร Hyperoside และ Isoquercitrin สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด (Anwar *et al.*, 2023) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง AGEs ของสารสกัด

จากเมล็ดพื้กรีก หรือ ลูกชืด พบว่าสามารถลดอัตราการก่อตัวของ AGEs จึงถือว่าเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ ที่มีแนวโน้มชะลอโรคที่เกี่ยวข้องกับความชราได้ (Zhang *et al.*, 2023) พบว่าสารสกัดจากขึ้นฉ่าย สามารถยับยั้ง AGEs ระหว่างการแปรรูปอาหารด้วยความร้อน (ขนาด และไมตรี, 2560) การรับประทาน มะระขี้นก ตำลึง และผักเชียงดา สามารถช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และไกลเคชันได้ และ (Prasanna and saraswathi, 2017) พบว่า หากมีการใช้ Aminoguanidine (AG) เพื่อยับยั้งการสร้าง AGEs ในระยะยาวนั้นจะก่อให้เกิดผลข้างเคียง ดังนั้นพืชจึงเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ และเมื่อเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาสารสกัดจากพืชสามารถแสดงการยับยั้งการก่อตัวของ AGEs ได้ดี

ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง AGEs 2 ชนิด คือ CML และ CMA โดยใช้สารสกัดจากพืช สวนคร้ว 10 ชนิด ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้แก่ กระชาย, ข่า, ขิง, ถั่วพู, พริกขี้หนู, พริก หวานสีแดง, ใบมะกรูด, ใบแมงลัก, มะระขี้นก และมะเขือพวง เนื่องจากเป็นพืชที่สามารถรับประทานได้ ในชีวิตประจำวันโดยใช้การทดสอบด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ทดสอบ 2 ความเข้มข้น คือ สารสกัดจากพืชสวนคร้วที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 40% และ 80% ซึ่งผลที่ได้ นำไปวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น, เอทานอลความเข้มข้น 25%, 50% และ 75% เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง CML และ CMA ของสารประกอบภายในสารสกัดที่ได้ จากตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ ใช้สารสกัดจากพืชชนิดที่ดีที่สุดจากการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟีในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อก่อโรคด้วยวิธี Agar disc diffusion

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง CMA และ CML เบื้องต้นโดยใช้สารสกัดเอทานอล 40% และ 80% จากพืชสวนคร้ว 10 ชนิด
2. เพื่อคัดแยกสารสกัดจากพืชสวนคร้วด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น เอทานอลความเข้มข้น 25%, 50% และ 75% ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง CMA และ CML
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคโดยใช้สารสกัดที่ดีที่สุดที่ได้จากการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการก่อตัวของ CML และ CMA ของสารสกัดจากพืชสวนคร้วทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ กระชาย, ข่า, ขิง, ถั่วพู, พริกขี้หนู, พริกหวานแดง, ใบมะกรูด, ใบแมงลัก, มะระขี้นก และ มะเขือพวง ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40 % และเอทานอล 80 % จำลอง CML และ CMA ด้วยน้ำตาล ไรโบสและกรดอะมิโนที่ได้จากเจลาตินของสัตว์ ทดสอบด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อดูการยับยั้งการก่อตัวของ CML และ CMA จากการวัดผลของสีที่เกิดขึ้นโดยอ่านค่า

ดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท และแยกส่วนสารสกัดด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มี 6 Fractions ได้แก่ น้ำกลั่น, เอทานอล 25%, เอทานอล 50% และเอทานอล 75% เพื่อดูผลของการยับยั้ง ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การก่อ CML และ CMA ของสารสกัดพืชสวนครัวที่ดีที่สุด และนำสารสกัดที่ดีที่สุดที่ได้จากการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟีไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยตรวจวัดเคลียร์โซนด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบว่าสารสกัดจากพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิด มีชนิดใดบ้าง มีฤทธิ์ยับยั้ง CMA และ CML
2. ได้สารสกัดที่ยับยั้ง CMA และ CML ที่ดีที่สุดจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี เพื่อใช้ในการหาสารบริสุทธิ์ต่อไป
3. ทราบว่าสารสกัดจากพืชสวนครัวที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟี มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พืชที่ใช้ในการศึกษา

2.1.1 กระชาย (Finger root)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.

ชื่อสามัญ: Kaempfer

วงศ์: *Zingiberaceae*

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: เป็นพืชล้มลุก เหง้าสั้น แตกกิ่งกอได้ รากอวบ ทรงกระบอกหรือรูปไข่ ค่อนข้างยาว ปลายเรียว ขนาดกว้าง 1 - 2 ซม. ยาว 4 - 10 ซม. ออกเป็นกระจุก ผิวสีน้ำตาลอ่อน เนื้อในสีเหลือง มีกลิ่นเฉพาะตัว (โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 2566)

ประโยชน์: ศุภชัย (2551) สารฟิโนสโตรบินในกระชายสามารถลดจำนวนไมโครนิวเคลียสในตับหนูซึ่งมีผลในการลดระดับเอนไซม์ที่กระตุ้นการออกฤทธิ์ก่อมะเร็งได้ (แพรวพรรณ และคณะ, 2564) พบว่าในสารสกัดกระชายขามีสารฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1.2 ข่า (Galangal)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Alpinia galanga* (L.) Willd.

ชื่อสามัญ: Galangal และ Greater Galangal.

วงศ์: *Zingeraeae*

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าอยู่ใต้ดิน สีน้ำตาลอมแดง ข้อปล้องสั้น องค์ประกอบทางเคมี เช่น eugenol, cineol, camphor, methyl cinnamate, pinene, galangin และ chavicol เป็นต้น สรรพคุณของข่าตามตำรายาไทย เหง้าแก่ มีฤทธิ์เป็นยาขับลม ยาระบายอ่อน ๆ แก้ไอ ช่วยย่อยอาหาร แก้บิด แก้ปวดท้องจุกเสียด (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2553)

ประโยชน์: Malik *et al.* (2016) ศึกษาศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเบาหวานของข่า พบว่าสามารถใช้เพื่อรักษาโรคเบาหวานได้ ยับยั้งความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (นพวัฒน์ และคณะ, 2554) พบว่าสารสกัดจากเหง้าข่าลิงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี

2.1.3 ขิง (Ginger)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Zingiber officinale* Roscoe.

ชื่อสามัญ: Ginger

วงศ์ : *Zingiberaceae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับวารสารงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าอยู่ใต้ดิน นิยมเรียกกันว่า “แงงขิง” หรือ “หัวขิง”
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะเป็นแท่งสั้นแตกแขนงออกเป็นแง่งย่อย ๆ รูปร่างเหมือนฝามือ และมีแง่งเล็กๆ คล้ายนิ้วมือ รสชาติหวาน เผ็ดร้อน (กองการแพทย์ทางเลือกฯ, 2566)

ประโยชน์: Akullo *et al.* (2023) สารสกัดขิงสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดกระเทียม (Imani *et al.*, 2015) ซึ่งมีส่วนช่วยลดกลูโคสในเลือด ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ไขมันในเลือดสูง พังผืดเยื่อหุ้มช่องท้อง และโรคหัวใจและหลอดเลือดในผู้ป่วย PD ได้ (วาริรัตน์, 2557) สารสกัดจากขิงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้ดี

2.1.4 ถั่วพู (Winged bean)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Psophocarpus tetragonolobus* L.

ชื่อสามัญ: Winged bean, Goa bean, Asparagus pea, Four-angled bean และ Winged pea.

วงศ์: *Fabaceae* หรือ *Leguminosae*

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: ฝักมีลักษณะเป็นรูปขอบขนานถึงรูปแถบ มีหน้าตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยม แต่ละมุมของฝักมีปีกตามยาว 4 ปีก ลักษณะเป็นหยักคล้ายฟันเลื่อย สีของฝักมีทั้งสีเขียว สีม่วง และสีเหลือง ในฝักจะมีเมล็ดอยู่ประมาณ 8 - 20 เมล็ด (สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดสุรินทร์, 2563)

ประโยชน์: Bassal *et al.* (2021) สารสกัดถั่วพูมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ (Latha *et al.*, 2007) สารสกัดถั่วพูมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* โดยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งต่ำที่สุด (MIC) อยู่ที่ 2.55 มก./มล.

2.1.5 พริกขี้หนู (Bird Chili or Bird's Eye Chili)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Capsicum annuum* L.

ชื่อสามัญ: Bird pepper, Chili pepper, Cayenne Pepper และ Tabasco pepper.

วงศ์: *Solanaceae*.

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ผลมีลักษณะยาวรี ปลายแหลมที่มลง ขนาดกว้าง 3 - 5 มม. ยาว 2 - 3 ซม. ผลสดมีสีเขียว ผลสุกสีส้มแดงหรือสีแดงปนสีน้ำตาล พื้นผิวลื่น ภายในมีแกนกลาง ซึ่งรอบๆแกนจะมีเมล็ดอยู่มาก เมล็ดแบนมีสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ขนาดประมาณ 3 มม. รสชาติเผ็ดร้อน (โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม, 2565)

ประโยชน์: Otunola and Afolayan (2013) สารสกัดจากพริกมีโพลีฟีนอลและสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ (โสภาก และธนุสราร, 2550) พบว่าในพริกขี้หนูมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารฟลาโวนอยด์สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี (ฮาซัน และคณะ, 2560)

2.1.6 พริกหวานสีแดง (Sweet pepper)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Capsicum annuum* var *annuum* L. Grossum Group

ชื่อสามัญ: Sweet pepper และ Bell pepper.

วงศ์: *Solanaceae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: ลักษณะผล มีความกลม ยาว และค่อนข้างใหญ่ รสชาติเฝื่อนน้อยมาก เป็นที่ต้องการของตลาดสูง เมื่อปล่อยให้แก่บนต้นผลจะมีสีแดง สายพันธุ์สีแดงที่มีอายุการเก็บเกี่ยวเร็ว ผลขนาดใหญ่ เปลือกหนา ค่อนข้างหยาบ หากปลูกในอุณหภูมิต่ำ จะส่งผลต่อความสม่ำเสมอของเมล็ด (นิพนธ์, 2546)

ประโยชน์: วิทยวรรณ (2536) พบว่าในพริกหวานมีปริมาณ carotenoids 0.06 - 0.55 % ต่อ น้ำหนักแห้ง (Sun *et al.*, 2007) ในพริกหวานสีแดงมีปริมาณฟีนอลิกสูงกว่าพริกหวานสีเขียว และสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี และ (Saidu and Garba, 2011) พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลและอัตราการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงกว่าพริกหวานสีเขียว

2.1.7 ใบมะกรูด (Bergamot leaves)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Citrus hystrix* DC.

ชื่อสามัญ: Leech lime และ Mauritius papeda.

วงศ์: *Rutaceae*

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: เป็นใบประกอบ แต่ลดรูปเหลือใบย่อยหนึ่งใบซึ่งคล้ายกับมีสองใบต่อกัน มีสีเขียว ด้านหลังใบมีความมัน ผิวใบเรียบ ลักษณะเหมือนรูปไข่ ขนาดกว้าง 3.5 - 5 ซม. ยาว 4 - 7 ซม. ปลายใบและโคนใบมน ใบหนาและแข็งมีต่อมน้ำมันทั่วใบ (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2553)

ประโยชน์: Abirami *et al.* (2015) สารสกัดใบมะกรูดช่วยให้ระดับเอนไซม์ในตับ และเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระของตับอยู่ในระดับปกติได้ (Anuchapreeda *et al.*, 2020) สารสกัดจากใบมะกรูดมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ซึ่งยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (ชนิพรรณ, 2551) สารสกัดใบมะกรูดทอดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดใบมะกรูดสด และสารสกัดใบมะกรูดต้ม

2.1.8 ใบแมงลัก (Sweet basil)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Ocimum basilicum* L.f. var. *citratum* Back.

ชื่อสามัญ: Sweet basil และ Hairy Basil

วงศ์: *Apiaceae* หรือ *Labiatae*

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: เป็นพืชล้มลุก กิ่งก้าน ทุกส่วนมีกลิ่นหอม เป็นใบเดี่ยว สีเขียวทึบ มีขนอ่อนๆ ใบเรียงตรงข้ามเป็นคู่ ๆ ดอก ช่อ ออกที่ปลายยอด ช่ออาจเป็นช่อเดี่ยว หรือแตกออกเป็นช่อย่อย ๆ ดอกตรงกลางบานก่อน ช่อดอกย่อยที่อยู่ชั้นล่างสุดจะบานก่อน ใน 1 ดอก มี 4 ผล ขนาดเล็ก รูปทรงรี และมีสีดำ (โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 2566)

ประโยชน์: Yaldiz and Camila (2022) ใบแมงลักเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและเภสัชกรรม (สุวรรณ, 2556) สารสกัดใบแมงลักมีสารฟีนอลิกสูง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (สุวรรณ, 2552) สารสกัดใบแมงลักมีฤทธิ์ต้านไวรัส HSV-1 และสารนั้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.9 มะระขี้นก (bitter gourd)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Momordica charantia* L.

ชื่อสามัญ: Balsam Apple, Balsam Pear, Bitter Cucumber, Bitter Gourd, Bitter Melon และ Carilla Fruit

วงศ์: *Cucurbitaceae*

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: ผลโตเต็มที่ มีรูปร่างคล้ายกระสวยสั้น ๆ ผิวขรุขระ มีปุ่มยื่นออกมาทั้งผล ขนาดยาว 5 - 7 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 - 4 ซม. ผลอ่อนสีเขียวและสีเข้มขึ้นเรื่อย ๆ ผลแก่มีสีเหลืองอมแดง เมื่อผลแก่จัดปลายผลจะแตกออกเป็นแฉก ๆ และมีเมล็ดแก่อยู่ภายใน

ประโยชน์: ปีติ (2554) มะระขี้นกมีสารซาแรนติน และโปรตีนคล้ายอินซูลิน จึงมีผลทำให้น้ำตาลในเลือดลดลงอยู่ในระดับที่ไม่อันตราย ส่งผลให้ร่างกายสามารถควบคุมการใช้น้ำตาลได้ดี (Trakoon *et al.*, 2013) พบว่ามะระขี้นกช่วยลดการเกิดไกลเคชัน และลดระดับ AGEs ในเลือด จึงเป็นผลดีในการป้องกันโรคแทรกซ้อนในผู้ที่ป่วยเป็นโรคเบาหวานได้

2.1.10 มะเขือพวง (Pea eggplant or Turkey berry)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Solanum torvum* Swartz.

ชื่อสามัญ: Common Asiatic weed, Turkey berry, Devil's fig, Prickly nightshade, Shoo-shoo bush และ Pea eggplant

วงศ์: *Solanaceae*

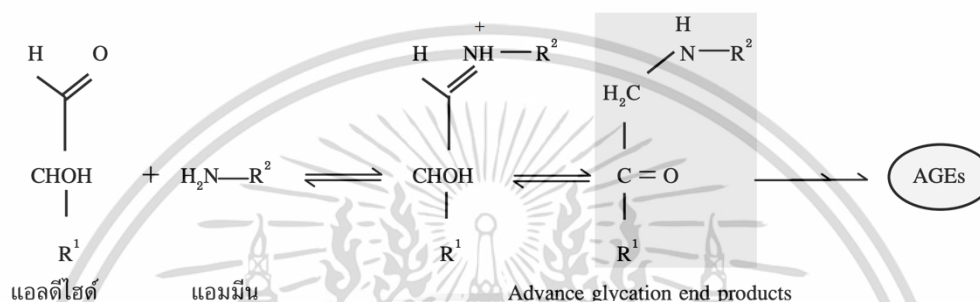
ลักษณะทั่วไป: เป็นไม้พุ่มเตี้ย สูง 1 - 2 ม. ใบแน่น ทรงพุ่มไม่มีรูปแบบที่แน่นอน ลำต้นตั้งตรงและแข็งแรง มีขนนุ่มขึ้นปกคลุม ลำต้นและใบมีหนามเล็กๆ ผลมีทรงกลม ขนาดเล็ก มีสีเขียวจนถึงสีเขียวเข้ม ผิวเรียบ มีเมล็ดอยู่ภายในผล มีรสชาติเผ็ดและขม

ประโยชน์: ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง (2566) มะเขือพวงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันสภาวะแก่ก่อนวัย มีฤทธิ์ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยโรคเบาหวาน อีกทั้งยังมีสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิด (Gandhi *et al.*, 2011) มะเขือพวงมีสารประกอบฟีนอลที่สามารถใช้เป็นแหล่งยาด้านเบาหวานและสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติได้

2.2 กระบวนการไกลเคชัน

กระบวนการไกลเคชันหรือไกลโคซิเลชันเป็นปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่ไม่ใช้เอนไซม์ (non-enzymatic glycosylation) (Saraswat *et al.*, 2009) ที่เกิดจากการยึดติดทางเคมีของ โมเลกุลน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น กลูโคส และฟรุคโตส อะตอมของรีดิวซ์ซิงค์คาร์บอน (C) ตำแหน่งที่ 1 ในน้ำตาลจะจับ กับ อะตอมไนโตรเจน (N) ของหมู่เปปไทด์ของโปรตีน เป็นปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิลในโครงสร้างของน้ำตาลรีดิวซ์ (น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตส) และหมู่อะมิโนในโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งมักเกิดกับหมู่อะมิโนของไลซีนและหมู่กวานิดีนของอาร์จินีน จึงเรียกปฏิกิริยาไกลเคชันนี้ได้อีกชื่อหนึ่งว่า “ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction)” หรือปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (Browning reaction) (Baynes *et al.*, 1989) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการเชื่อมข้ามสายโมเลกุล (cross-linking) เป็น Schiff base, Amadori product, และ 3-deoxyglucosone-derived (GO- AGEs) ตามลำดับ จนให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยานี้ ในรูปของสาร advanced glycation end products (AGEs) (รูปที่ 2.1) ซึ่งถือว่าเป็นสารพิษที่เรียกว่า ไกลโคท็อกซิน (glycotoxins) ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ ส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของอวัยวะนั้นให้ทำงานน้อยลงจนเกิดโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวานและอาจนำไปสู่การเสียชีวิตได้ ดังนั้น กระบวนการเกิดไกลเคชัน จึงมีความสำคัญต่อโรคเบาหวาน หากสามารถป้องกันภาวะดังกล่าวในผู้ป่วยเบาหวานได้ ก็จะสามารถชะลอ หรือป้องกันการเกิดโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ได้เช่นกัน



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาไกลเคชันระหว่างอัลดีไฮด์กับแอมมีนและการเกิดสาร

Advanced glycation end products (AGEs)

แหล่งที่มา : <https://www.journal.nu.ac.th/NUJST/article/view/1890/1121>

ซึ่งผลผลิตสุดท้ายแอนวานซ์ไกลเคชัน มีมากกว่า 20 กลุ่ม ซึ่งพบได้ใน เลือดมนุษย์ เนื้อเยื่อ และในอาหาร โดย AGEs สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ AGEs แบบเรืองแสงและ AGEs แบบไม่เรืองแสง ได้แก่ Carboxymethyl-lysine (CML), Carboxyethyl-lysine (CEL), Pyrraline (nonfluorescent AGEs), pentosidine และ methylglyoxal-lysine dimer (MOLD) (Luevano and Chapman, 2010) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ เบื้องต้นได้ศึกษาเพียง 2 ชนิดเท่านั้น คือ CML และ CMA

2.2.1 N^E- (Carboxymethyl) lysine (CML)

CML เป็นที่รู้จักกันทั่วไปว่าเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและความเสียหายของโปรตีนในระยะยาว (Reddy *et al.*, 1995) ซึ่งการก่อตัว CML ขึ้นอยู่กับส่วนผสมของอาหารและขั้นตอนการแปรรูปอาหาร เช่น อุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อน (Lund and Ray, 2017) อาหารที่พบ CML ได้แก่ เนื้อย่าง ซีเรียล มันฝรั่งทอด และชีสหลายประเภทที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน (Hull *et al.*, 2012) CML ในอาหารอาจมีความเสี่ยงต่อสุขภาพ เนื่องจากจะช่วยเพิ่มความเครียดของปฏิกิริยาออกซิเดชัน และตอบสนองต่อการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเบาหวานและความผิดปกติของการเผาผลาญ (Uribarri *et al.*, 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 N^ω - (Carboxymethyl) arginine (CMA)

CMA เป็นโครงสร้าง AGEs ที่มีความเป็นกรดซึ่งถูกพบในเอนไซม์ไฮโดรไลสของไกลโคคอลลาเจน (Iijima *et al.*, 2000) ต่อมา CMA ยังถูกตรวจพบในซีรัมของมนุษย์โดยวิธี liquid chromatography-tandem Mass spectrometry (LC-MS/MS) และพบว่าระดับซีรัมในผู้ป่วยเบาหวานสูงกว่าในคนปกติ (Odani *et al.*, 2001) และมีส่วนช่วยต่อคุณสมบัติเชิงกลและกระบวนการสร้างและสลายของกระดูก (Saito and Marumo, 2010)

2.3 การวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA (Enzyme – linked Immunosorbent Assay)

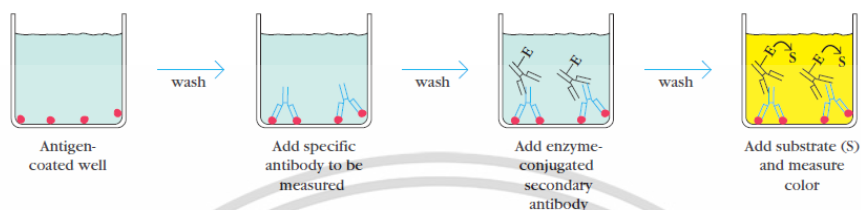
2.3.1 ELISA

เป็นวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้แทนการใช้สารกัมมันตรังสีหรือสารเรืองแสง วิธีนี้สามารถใช้ตรวจหาแอนติบอดีและแอนติเจนได้อย่างจำเพาะเจาะจง มีความไวสูง ทำได้ง่าย และรวดเร็ว การตรวจสอบโดยทั่วไปมักใช้วัสดุประเภท Solid phase เป็นตัวดูดซับแอนติเจนหรือแอนติบอดีไว้ก่อนและเมื่อปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนเกิดขึ้นแล้ว ล้างส่วนของแอนติบอดีหรือแอนติเจนส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกจึงทำได้สะดวกเพราะแอนติบอดีและแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากันจะติดอยู่กับวัสดุ จากนั้นจึงเติมแอนติบอดีที่จำเพาะที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไปซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการเปลี่ยนแปลงของซับสเตรตที่นำมาใส่ลงไปภายหลัง ทำให้เกิดสารที่มีสีขึ้นจึงเรียกการทดสอบนี้ว่า Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยหลักการของ ELISA หรือ Enzyme immunoassay (EIA) โดยการใช้เอนไซม์เชื่อมต่อกับแอนติบอดี เอนไซม์จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนซับสเตรตที่ไม่มีสีเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี (Chromomeric substrate) โดยเอนไซม์ต่างๆที่ใช้ในวิธี ELISA ได้แก่ Alkaline phosphatase, Horseradish peroxidase, β -galactosidase เป็นต้น การพัฒนา ELISA รูปแบบต่างๆทำให้สามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีในแง่คุณภาพหรือปริมาณได้ วิธีการทดสอบอาจทำได้ 4 แบบคือ Direct ELISA, Indirect ELISA, Competitive ELISA และ Sandwich ELISA (ไพศาล, 2548) ซึ่งวิธีที่เราทำการศึกษาในการทดลองนี้ คือ Indirect ELISA

2.3.1.1 Indirect ELISA

วิธีการนี้เป็นการทดสอบที่ดัดแปลงจากวิธี Direct ELISA ให้มีความสะดวกในการปฏิบัติมากขึ้นโดยใช้แอนติบอดีตัวที่สองที่ไม่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินติดฉลากด้วยเอนไซม์ เป็นตัวกระทำเพิ่มเติมในการทดสอบ เพื่อวัดปริมาณของแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งจับกับแอนติเจนที่ต้องการตรวจหา ซึ่งจะเป็นการวัดปริมาณของแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจโดยทางอ้อม การทดสอบนี้อาจเรียกว่า “Double antibody sandwich antiglobulin ELISA” ในการตรวจสอบวิธีนี้ แอนติบอดีจำเพาะตัวแรกและแอนติบอดีจำเพาะตัวที่สอง จะต้องเป็นอิมมูโนโกลบูลินของสัตว์ต่างชนิดกัน ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการทำปฏิกิริยาโดยตรงระหว่าง conjugate ชนิดเดียวสำหรับการตรวจหาแอนติเจนได้หลายชนิด โดยมีข้อแม้ว่าแอนติเจนจำเพาะตัวที่สองในแต่ละระบบนั้นจะต้องได้มาจากสัตว์ชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ Indirect ELISA ไม่มีการฉีกใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะมีความไวมากกว่า direct ELISA ในการตรวจหาแอนติเจนชนิดเดียวกัน ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากแอนติบอดีตัวที่สองจำนวนหนึ่งโมเลกุลสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินที่ใช้ทำ conjugate นั้นได้หลายโมเลกุล จึงเป็นการช่วยเพิ่มปริมาณโมเลกุลของแอนติเจนหนึ่งโมเลกุล ทำให้การทดสอบไวมากขึ้น (ไพศาล, 2548)



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะของ Indirect ELISA

แหล่งที่มา: <https://www.toppr.com/ask/question/discuss-briefly-the-process-of-indirect-elisa/>

2.4 โครมาโทกราฟี (Chromatography)

โครมาโทกราฟี เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติในการละลาย ขนาดและประจุของโมเลกุลสาร ในองค์ประกอบสองส่วน ส่วนคงที่ (Stationary phase) อาจเป็นของแข็ง หรือของเหลวที่ฉาบอยู่บนตัวค้ำจุน (supporting medium) ส่วนนี้จะอยู่กับที่ โดยโมเลกุลสารที่จะแยกจะต้องผ่านส่วนนี้ไปยังอีกส่วนหนึ่งซึ่งเป็นส่วนเคลื่อนที่ (mobile phase) อาจเป็นของเหลวหรือก๊าซที่จะพาโมเลกุลสารที่จะแยกออกไปจากส่วนคงที่

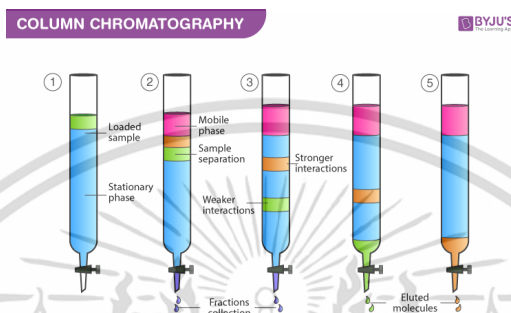
การศึกษาทางชีวเคมีนั้นมีความจำเป็นที่ต้องแยกสารชีวโมเลกุลแต่ละชนิดที่ผสมกันอยู่ออกจากกัน เทคนิคโครมาโทกราฟีเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการแยกหรือวิเคราะห์สารชีวโมเลกุล ทั้งนี้โครมาโทกราฟีมีอยู่ 3 ประเภทได้แก่ โครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (Paper chromatography), โครมาโทกราฟีแบบผิบบาง (Thin layer chromatography) และโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (Column chromatography) สามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับคุณสมบัติของสารชีวโมเลกุลแต่ละชนิด ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ เบื้องต้นเลือกใช้วิธี โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (Column chromatography)

2.4.1 โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์เป็นการแยกสารโดยที่ส่วนคงที่คือตัวกลางหรือตัวดูดซับซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ในขณะที่ส่วนเคลื่อนที่คือตัวทำละลายหรือตัวชะที่ไหลผ่านคอลัมน์ ดังรูปที่ 2.3 สารต่างๆจะแยกออกจากกันตามความสามารถในการยึดกับตัวกลางและการละลายในตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์ แบ่งชนิดของโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ตามประเภทของตัวกลางที่บรรจุในคอลัมน์ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2.4.1.1) โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน (Gel filtration chromatography)
- 2.4.1.2) โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุไอออน (Ion exchange chromatography)
- 2.4.1.3) โครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี (Affinity chromatography)
- 2.4.1.4) โครมาโทกราฟีแบบก๊าซ-ของเหลว (Gas-liquid chromatography: GLC)
- 2.4.1.5) โครมาโทกราฟีแบบของเหลวประสิทธิภาพสูง (High performance liquid chromatography: HPLC)



รูปที่ 2.3 โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

แหล่งที่มา: <https://byjus.com/chemistry/column-chromatography>

2.5 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการศึกษา

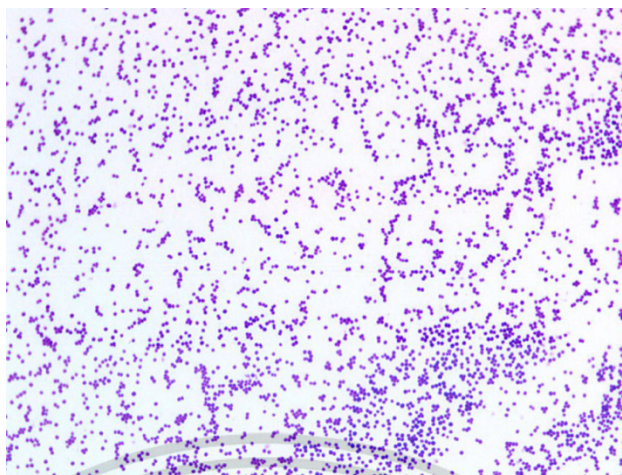
2.5.1 *Staphylococcus aureus*

ลักษณะสัณฐานวิทยา: เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์เท่ากับ 0.5 – 1.5 ไมครอน ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ บางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูลทำให้โคโลนีเป็นเมือก (slime) ช่วยให้เชื้อมีความทนทานต่อการทำลายของยาปฏิชีวนะ และภูมิคุ้มกันของร่างกาย เชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป เช่น Nutrient agar (NA), Tryptic soy agar (TSA) และ Brain heart infusion agar (BHI) เป็นต้น และเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเล็กน้อย (microaerophilic) ที่อุณหภูมิ 37 °C โคโลนีบนอาหารแข็งมีลักษณะกลม เรียบ ชุ่ม และนุ่มเล็กน้อย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 - 4 มม. สีเหลืองทอง สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี การย้อมสีแกรม ติดสีแกรมบวก (นิติพงษ์ และเอกชัย, 2552)

การก่อโรค: ทำให้เกิดการติดเชื้อที่บริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน โดยส่วนมากมักจะพบฝีที่มีขนาดใหญ่ หรือ carbuncles และรูขุมขนอักเสบ (Miller *et al.*, 2009) ทำให้เกิดการติดเชื้อของกล้ามเนื้อและกระดูก ที่พบได้บ่อยคือ โรคกระดูกอักเสบจากเม็ดเลือดแดง และบริเวณที่เกิดการติดเชื้อบ่อยที่สุดคือ กระดูกสันหลัง (Lew *et al.*, 2004) สารพิษเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) จาก *S. aureus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ อาจถึงขั้นร้ายแรงจนเกิดการหมดสติได้ (Brewer *et al.*, 2008) และยังเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบอีกด้วย (Fowler *et al.*, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะการย้อมแกรมของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า

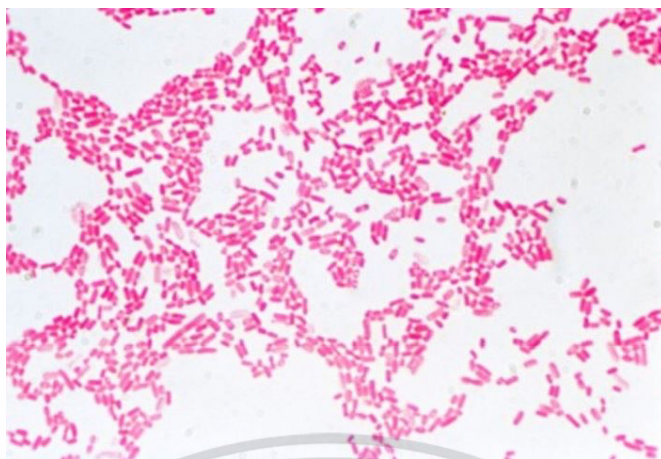
แหล่งที่มา: https://www.researchgate.net/figure/Staphylococcus-aureus-morphology-visualised-using-Gram-staining-10-magnification_fig2_266028804

2.5.2 *Escherichia coli*

ลักษณะสัณฐานวิทยา: เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ขนาด 1.1 - 1.5 x 2.0 - 2.6 ไมครอน เรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว หรือเชลล์คู่ เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่พบได้บ่อยในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นพบมากในอุจจาระประมาณ $10^6 - 10^9$ CFU/g (ภฤติกา, 2558) สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญคือ 35 - 37 °C สามารถก่อโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) ประเภท fecal coliform จึงใช้เป็นดัชนีบ่งชี้สุขลักษณะของอาหารและน้ำ ค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity) อยู่ที่ 0.96 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับแยกเชื้อ *E. Coli* ได้แก่ Mac Conkey agar (MCA) และ Eosin methylene blue agar (EMB) โดยลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MCA มีสีชมพู และโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB มีสีดำ แววาว เรียกว่า “metallic sheen” (มนต์ชนก, 2558)

การก่อโรค: *Escherichia coli* O157 เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบที่พบไม่บ่อยแต่มีความร้ายแรง (Pennington., 2010) *E. coli* หลายสายพันธุ์เป็นสาเหตุของอาการท้องร่วง (Robins and Hartland, 2002) นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ กระเพาะปัสสาวะอักเสบ กรวยไตอักเสบ หากมีอาการรุนแรงเชื้ออาจลุกลามเข้าสู่กระแสเลือด เกิดเป็น septicemia และอาจเสียชีวิตได้ (ภฤติกา, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะการย้อมแกรมของเชื้อ *Escherichia coli*

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

แหล่งที่มา: <https://www.msmanuals.com/professional/multimedia/image/gram-stain-escherichia-coli->

2.5.3 *Bacillus subtilis*

ลักษณะสัณฐานวิทยา: เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ อากาศ อาหาร และซากพืช (ผาสุก, 2548) เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนทรงกระบอก (rod-shaped) อาจเป็นท่อนเดี่ยวหรือต่อกันเป็นสาย ขนาดเซลล์ 0.5 - 0.25 x 1.2 - 10 ไมครอน หรือ 0.3 - 2.2 x 0.7- 1.2 ไมครอน (ดวงพร, 2537) ติดสีแกรมบวก เมื่ออายุการเจริญยังน้อย แต่เมื่ออายุการเจริญมากขึ้นเชื้อจะติดสีแกรมลบ สร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์สามารถทนทานต่อสภาวะการเจริญที่ไม่เหมาะสมได้ เจริญได้ในอาหารหลายชนิด ลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง มีรูปร่างกลม ผิวด้าน สีครีมถึงน้ำตาล เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวทำให้อาหารมีสีเข้มขึ้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 55 °C สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น เอนไซม์โปรติเอส (protease), อะไมเลส (amylase) และไลเปส (lipase) (พรพรรณ, 2550)

การก่อโรค: ทำให้เกิดฝีในสมอง เป็นกรณีที่เกิดขึ้นได้ยาก ซึ่งเกิดในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง *B. subtilis* แยกได้จากหนองของฝีในสมองที่ถูกผ่าตัดออก ฟันที่ผุอย่างรุนแรง และโรคปริทันต์อักเสบที่เป็น การติดเชื้อเท่านั้น (tsonis et al., 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะการย้อมแกรมของเชื้อ *Bacillus subtilis*

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

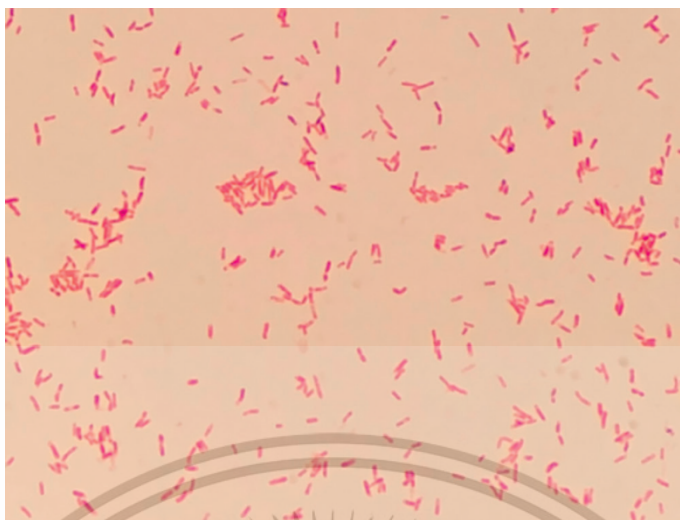
แหล่งที่มา: <https://algaebank.com.mx/tienda/bacillus-subtilis/?v=0b98720dcb2c>

2.5.4 *Pseudomonas aeruginosa*

ลักษณะสัณฐานวิทยา: เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ พบทั่วไปในสิ่งแวดล้อม สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว และในหลากหลายสภาวะ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 37 °C และสามารถเจริญได้โดยไม่ใช้ออกซิเจน สามารถสร้างรงควัตถุสีเขียวอมน้ำเงิน มีกลิ่นคล้ายองุ่นหมักดอง เรียกว่า “ไพโอไซยานิน (pyocyanin)” ซึ่งรงควัตถุนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ได้ เช่น *Salmonella typhi* และ *Proteus mirabilis* (สุจิตรา และคณะ, 2561)

การก่อโรค: ทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ ทางเดินปัสสาวะ และระบบไหลเวียนโลหิต (ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ, 2555) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อชนิดนี้จะมีความเสี่ยงในการเสียชีวิตเพิ่มสูง โดยเฉพาะการติดเชื้อในกระแสเลือด (เกรียงไกร และคณะ, 2560) นอกจากนี้ยังสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้หลายรูปแบบ เช่น รุขุมขนอักเสบ, บาดแผลจากการเจาะ กระตุกอักเสบ โรคปอดบวม โรคหูน้ำหนวก ภายนอก และอื่นๆ อีกมากมาย (Mulcahy *et al.*, 2015) *P. aeruginosa* มีกลไกการดื้อยาปฏิชีวนะและมีปัจจัยความรุนแรงหลายประการ ซึ่งรวมเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในวงกว้าง (Wilson *et al.*, 2023)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะการย้อมแกรมของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

แหล่งที่มา: https://aemip.fr/?page_id=3653

2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค

ในปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคมามากมาย เช่น การใช้สารสกัดจากพืช หรือการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อก่อโรค เป็นต้น โดยใช้วิธีการทดสอบด้วยวิธีที่แตกต่างกันไป ตามความเหมาะสมตามชนิดของเชื้อก่อโรค และสารที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคที่นิยมได้แก่ วิธีการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (Minimum inhibition concentration; MIC), Agar disc diffusion, Agar well diffusion และ Agar plug diffusion ซึ่งการศึกษารั้งนี้ ในเบื้องต้นเลือกใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค วิธี Agar disc diffusion โดยมีหลักการดังต่อไปนี้

2.6.1 วิธี Agar disc diffusion

เป็นวิธีการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกได้ว่า เชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ แต่จะไม่สามารถหาค่า MIC หรือ MLC ได้ ไม่เหมาะสำหรับใช้ในการทดสอบเชื้อเจริญช้า และเชื้อที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ

หลักการทั่วไป คือ การทำให้สารสกัดที่มีในแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ที่เตรียมไว้ซึมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณที่เหมาะสม แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (inhibitions zone) ซึ่งจะเห็นเป็นวงใส ไม่มีโคโลนีของเชื้อรอบๆแผ่นกระดาษกรอง ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแปรตามขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้ จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบแล้ว แต่อย่างไรก็ตามอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารสกัด ความสามารถในการละลายหรือซึมไปในอาหาร

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงเชื้อ อัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรด-ด่าง และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ (ประสาทร และคณะ, 2552)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Mesías *et al.* (2013) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดจากผักและผลไม้ 8 ชนิด โดยใช้สารสกัดจากเมล็ดทั้งหมด (3.6 mg/mL) พบว่า สารสกัดจากพริกเขียวมีฤทธิ์ต้าน AGEs สูงที่สุด อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลกับฤทธิ์ต้านน้ำตาลในเลือดของสารสกัดจากผักและผลไม้ ทั้ง 8 ชนิด

Gutierrez and Velazquez (2020) พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบผักโขมที่ผ่านการแยกส่วนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้วิธีทางชีวภาพ มีการแยกสารฟลาโวนอยด์ กลูโคปราโนไซด์ไลน์จำนวน 10 ชนิด ซึ่งสารประกอบที่แยกได้ ได้แก่ patuletin-3-O-(2"-coumaroylglucosyl)-(1→6)-[apiosyl-(1→2)]-β-d-glucopyranoside, patuletin 3-O-(2"-feruloyl glucosyl)-(1→6)-[apiosyl-(1→2)]-β-d-glucopyranoside สารประกอบดังกล่าวสามารถยับยั้งการก่อตัวของ AGEs ได้ดีกว่าตัวควบคุมเชิงบวกที่ใช้ในการทดลอง จึงสรุปได้ว่า กลูโคปราโนไซด์ และฟลาโวนอยด์ที่พบในใบผักโขม อาจมีความสามารถในการลดโปรตีนไกลเคชั่น และภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานได้

Ishioaka *et al.* (2015) ตรวจสอบฤทธิ์การต้านน้ำตาลในเลือดของผักเศรษฐกิจหลายชนิดโดยเปรียบเทียบในแบบจำลองปฏิกิริยาไกลเคชั่นในหลอดทดลอง โดยใช้ผัก 187 ชนิด ในรูปแบบแห้ง และแบบผง โดยใช้อะมิโนกัวนิติน (AG) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ใช้กลูโคส/ซีรัมอัลบูมินของมนุษย์ (HSA) เป็นแบบจำลองปฏิกิริยาไกลเคชั่นในหลอดทดลอง และตรวจสอบการก่อตัวของ AGEs โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 nm และความเข้มข้นในการยับยั้ง 50 % (IC50) จากการทดลองพบว่า พืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านน้ำตาลในเลือดสูงที่สุด รองลงมาคือ พืชจำพวกใบ และพืชที่เป็นเมล็ด ตามลำดับ และพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AGEs ได้ดีที่สุด คือ พืชในวงศ์ Asteraceae รองลงมาคือพืชในวงศ์ Lamiaceae, Basellaceae, Polygonaceae และวงศ์ Apiaceae ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์เทียบเท่าหรือดีกว่าการใช้ AG

Latha *et al.* (2007) ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค *P. aeruginosa* โดยใช้สารสกัดเมทานอลจากถั่วพู ทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่าสารสกัดถั่วพูมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* โดยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งต่ำที่สุด (MIC) อยู่ที่ 2.55 mg/mL และเมื่อทำการถ่ายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของเชื้อ พบว่า เซลล์แบคทีเรียตายโดยสมบูรณ์ นอกจากนี้สารสกัดของถั่วพูยังสามารถเปลี่ยนรูปแบบการเจริญของเชื้อได้ ซึ่งเป็นการยืนยันว่า สารสกัดถั่วพูสามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ได้

วัชรินทร์ (2559) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ได้แก่ ขมิ้นชัน, ชุมเห็ดเทศ, จันทน์แดง, จันทน์แปดกลีบ, ฝรั่ง, พริกไทยดำ, ฟ้าทะเลลายโจร, ยี่หระ, สมอไทย และอบเชย ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 95% ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* ATCC 25922 โดยวิธี agar well diffusion พบว่า สารสกัดสมุนไพรไทยทุก

ไม่ว่ากรรมใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุผลและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ได้ สารสกัดสมุนไพรไทย 7 ชนิด ยับยั้ง *B. cereus* ได้ สารสกัดสมุนไพรไทย 5 ชนิดยับยั้งเชื้อได้ทุกชนิด โดยสารสกัดจากผงแสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด เมื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้ (MBC) โดยวิธี broth dilution พบว่าสารสกัดผงมีค่า MIC เท่ากับ MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* และ *E. coli* ATCC 25922 คือ 8, 2 และ 1 mg/mL ตามลำดับ

ฤทธิ์ยับยั้ง และเนวาร์ตัน (2565) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค 4 ชนิด คือ *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* และ *Klebsiella pneumonia subsp. Pneumoniae* ด้วยวิธี micro dilution พบว่าสารสกัดจึงสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *E. coli* และ *S. typhimurium* ได้ดีที่สุด มีค่าความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 1.40, 1.40 และ 5.63 mg/mL ตามลำดับ สารสกัดกระชายสามารถยับยั้งเชื้อ *K. pneumonia subsp. Pneumoniae* ได้ดีที่สุด มีค่าความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 0.70 mg/mL จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าพืชสวนครัวบางชนิด สามารถใช้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ สารยับยั้งเชื้อก่อโรค และสารต้านการอักเสบได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 พืช

1. กระชาย
2. ช่า
3. ชิง
4. ถั่วพู
5. พริกชี้หนู
6. พริกหวานแดง
7. ใบมะกรูด
8. ใบแมงลัก
9. มะระขี้นก
10. มะเขือพวง

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับการสกัดพืช

- 3.2.1.1) Ethyl Alcohol Absolute

3.2.2 สารเคมีสำหรับการทำปฏิกิริยา AGEs

- 3.2.2.1) Aminoguanidine (AG)
- 3.2.2.2) Ethyl Alcohol Absolute
- 3.2.2.3) Gelatin
- 3.2.2.4) Potassium Dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
- 3.2.2.5) Potassium Hydroxide (KOH)
- 3.2.2.6) Ribose

3.2.3 สารเคมีสำหรับทดสอบ Enzyme-linked immunosorbent assay

- 3.2.3.1) Anti-CMA
- 3.2.3.2) Anti-CML
- 3.2.3.3) Citric acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)
- 3.2.3.4) Di-Sodium Hydrogen phosphate dodecahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
- 3.2.3.5) Hydrogen peroxide (H_2O_2)
- 3.2.3.6) Hydrolyzed casein

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นหากมีเหตุเห็นสมควร และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.3.7) Potassium Chloride (KCl)

- 3.2.3.8) Potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4)
- 3.2.3.9) Sodium Chloride (NaCl)
- 3.2.3.10) Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)
- 3.2.3.11) o-Phenylenediamine Dihydrochloride ($\text{OPD}\cdot 2\text{HCl}$)
- 3.2.3.12) Sulfuric acid (H_2SO_4)
- 3.2.3.13) Tween 20
- 3.2.3.14) 5,000 folds dilution 2^{nd} -antibody (IgG-HRP)

3.2.4 สารเคมีสำหรับการแยกคอลัมน์

- 3.2.4.1) Acetone
- 3.2.4.2) Diaion HP-20 (Supelco code 13606)
- 3.2.4.3) Ethanol

3.2.5 สารเคมีสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค

- 3.2.5.1) Ampicillin
- 3.2.5.2) Barium Chloride Dihydrate ($\text{BaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 3.2.5.3) Glycerol
- 3.2.5.4) Sodium Chloride (NaCl)
- 3.2.5.5) Sulfuric acid (H_2SO_4)
- 3.2.5.6) 0.5 McFarland Standard
- 3.2.5.7) Mueller Hinton Agar
- 3.2.5.8) Nutrient agar

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.3.1 อุปกรณ์

- 3.3.1.1) ปีกเกอร์ ขนาด 100, 250, 600 และ 1,000 mL (Beaker)
- 3.3.1.2) ฟลาสก์ ขนาด 250 และ 500 mL (Flask)
- 3.3.1.3) กระจกบอขวด (Cylinder)
- 3.3.1.4) สำลี (Cotton)
- 3.3.1.5) ผ้าก๊อซ (Gauze)
- 3.3.1.6) หนังสยาง (Rubber band)
- 3.3.1.7) ฟอยล์อลูมิเนียม (Aluminum foil)
- 3.3.1.8) หลอดทดลอง (Test tube)

3.3.1.9) จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

3.3.1.10) ไม้พันสำลี (Cotton swab)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นกรณีที่มีเหตุข้อยกเว้น และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.1.11) ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
- 3.3.1.12) ไมโครปิเปตต์ (Micropipettes)
- 3.3.1.13) ปิเปตทิป (Pipette tip)
- 3.3.1.14) หลอดเซนติฟิวก์พลาสติก ขนาด 50 mL (Centrifuge tube)
- 3.3.1.15) หลอดไมโครเซนติฟิวก์ (Micro centrifuge tube)
- 3.3.1.16) กระบอกฉีดยาพลาสติก (Plastic syringe)
- 3.3.1.17) ไมโครเพลท (96-well plate)
- 3.3.1.19) เพลทสำหรับเทคนิค ELISA (ELISA plate)
- 3.3.1.20) คอลัมน์แก้ว (Glass Chromatography column)
- 3.3.1.21) กระดาษกรองปลอดเชื้อ (Filter paper)
- 3.3.1.22) ห่วงเชี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.3.1.23) กระจบอกใส่จานเพาะเชื้อ (Petri Dish Box)
- 3.3.1.24) ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test Tube Rack)
- 3.3.1.25) ปากคีบ (Forceps)
- 3.3.1.26) กระดาษกรอง (Filter paper disc)
- 3.3.1.27) กระจกปิดสไลด์ (Microscopic slide)
- 3.3.1.28) กระจกสไลด์ (Coverslips)

3.3.2 เครื่องมือ

- 3.3.2.1) เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo)
- 3.3.2.2) เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)
- 3.3.2.3) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- 3.3.2.4) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar)
- 3.3.2.5) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 3.3.2.6) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.3.2.7) เครื่องปั่นเหวี่ยงสารละลายปริมาตรน้อย (Micro centrifuge)
- 3.3.2.8) ตู้เย็น (Refrigerator)
- 3.3.2.9) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- 3.3.2.10) เครื่องไมโครเพลททรีดเดอร์ (Microplate reader)
- 3.3.2.11) เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum Pump)
- 3.3.2.12) เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)
- 3.3.2.13) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Compound light microscope)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียม 10% ของสารสกัดจากพืชสวนครัว (รัตติยา และพิทยา, 2544)

นำตัวอย่างพืชสวนครัว 10 ชนิด มาชั่งตัวอย่างละ 5 กรัม นำมาล้างทำความสะอาด แล้วปั่นด้วยตัวทำละลาย เอทานอล 40% และเอทานอล 80% เมื่อปั่นเสร็จแล้ว ปิดฝา นำไปปั่นในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลานำไปกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 4 จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

3.4.2 การเตรียมปฏิกิริยาจำลองการก่อตัวของ AGEs

3.4.2.1 เตรียมสารสำหรับทำปฏิกิริยา

3.4.2.1.1) เตรียมบัฟเฟอร์ 200 mM Potassium Phosphate buffer pH 7.2 ปริมาณ 500 mL จากนั้นเตรียม 0.4 % gelatin ปริมาตร 25 mL และ 60 mM Ribose ปริมาตร 25 แล้วผสม 0.4 % gelatin และ 60 mM Ribose เข้าด้วยกัน กรองส่วนผสมด้วย membrane 0.45 ไมครอน ได้เป็น Solution A ปริมาณ 50 mL

3.4.2.1.2) เตรียม Aminoguanidine (AG) 100 mg/mL สำหรับ Positive control ทำเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 mg/mL และ 1 mg/mL

3.4.2.2 การทำปฏิกิริยาใช้หลอดไมโครเซนติพิวค์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อผสมปฏิกิริยาดังนี้

3.4.2.2.1) ชุดควบคุม: Solution A 495 μL + Ethanol 40 % (บ่ม -20°C) 5 μL

Solution A 495 μL + Ethanol 40 % (บ่ม 37°C) 5 μL

Solution A 495 μL + Ethanol 80 % (บ่ม -20°C) 5 μL

Solution A 495 μL + Ethanol 80 % (บ่ม 37°C) 5 μL

Solution A 495 μL + AG 10 mg/mL 5 μL

Solution A 495 μL + AG 1 mg/mL 5 μL

Solution A 495 μL + AG 10 mg/mL 5 μL

Solution A 495 μL + AG 1 mg/mL 5 μL

3.4.2.2.2) ชุดทดสอบ: Solution A 495 μL + ตัวอย่าง 10 ชนิดที่ต้องการทดสอบ 5 μL

โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ชุดผสมสารละลายแต่ละหลอดให้เข้ากันเครื่องผสมสาร (Vortex) และนำมาปั่นตก (Spin down) ที่ 12,000 rpm 5 นาที เก็บ Negative control 1 ชุด ที่ -20°C และหลอดอื่นๆ เก็บไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การตรวจสอบการก่อดำของ AGEs ด้วยวิธี ELISA

- 1) ทำการเจือจางตัวอย่าง โดยใช้ความเข้มข้นสำหรับ CMA 20 เท่า และสำหรับ CML 200 เท่า โดยการเจือจาง 20 เท่าสำหรับ CMA นำ 1XPBS ปริมาตร 190 μL แล้วเติมตัวอย่าง ปริมาตร 10 μL แล้วผสมให้เข้ากันในเพลทเจือจาง และการเจือจาง 200 เท่าสำหรับ CML นำ 1XPBS ปริมาตร 180 μL แล้วเติมตัวอย่างจากการเจือจาง CMA ปริมาตร 20 μL แล้วผสมให้เข้ากันในเพลทเจือจาง
- 2) นำตัวอย่างที่เจือจาง 20 เท่า สำหรับทดสอบ CMA และ ตัวอย่างที่เจือจาง 200 เท่า สำหรับทดสอบ CML ที่เจือจางแล้วปริมาตร 100 μL ลงในเพลท ELISA บ่ม 1 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิห้องและเทส่วนเกินทิ้ง
- 3) เติม 0.5 % hydrolyzed casein หลุมละ 200 μL บ่ม 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เท ส่วนเกินทิ้ง ล้างด้วย washing buffer หลุมละ 200 μL ซ้ำ 3 ครั้ง
- 4) เติม anti-CMA หรือ anti-CML หลุมละ 100 μL บ่ม 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนเกิน ทิ้ง ล้างด้วย washing buffer หลุมละ 200 μL ซ้ำ 3 ครั้ง
- 5) เติม 2nd-antibody เจือจาง 5,000 เท่า (IgG-HRP) หลุมละ 100 μL บ่ม 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนเกินทิ้ง ล้างด้วย washing buffer หลุมละ 200 μL ซ้ำ 3 ครั้ง
- 6) เติม substrate solution นหลุมละ 100 μL บ่ม 3-5 นาที
- 7) หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1M H₂SO₄ หลุมละ 100 μL วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Microplate reader ที่ค่าความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟ แท่งและวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

3.4.4 การแยกสารสกัดโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

การเตรียมตัวอย่างสำหรับลงคอลัมน์โครมาโทกราฟี นำสารสกัดพืชสวนครัวที่ยับยั้ง การก่อดำของ CMA และ CML ที่ดีที่สุดมาทำการระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุน จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้

3.4.4.1 การเตรียมตัวทำละลายและการชะล้างคอลัมน์

3.4.4.2.1) เตรียมน้ำที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อประมาณ 10 column volume (CV)

เอทานอลที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 75% สำหรับ 3 CV สำหรับ 3 CV.

3.4.4.2.2) นำไปกำจัดแก๊สด้วยแรงดันต่ำเป็นที่นิยมมากกว่าโซนิเคชัน เนื่องจากโซ นิเคชันจะทำให้เกิดความร้อนซึ่งจะทำให้ตัวทำละลายระเหย

3.4.4.2.3) วางสารละลายที่ไล่แก๊สทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้งาน

3.4.4.2 การบรรจุคอลัมน์และจุดสมดุล

3.4.4.3.1) ใช้ C18 Diaion HP-20 (Supelco code 13606) เป็น Stationary phase แบบไม่มีขั้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.4.3.2) เติมน้ำที่กรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน (ปริมาตร 9 mL)
- 3.4.4.3.3) เทเรซินตามลงไปจากนั้นล้างให้สะอาดโดยการเติมน้ำลงไป 3 Column volume หยุดบรรจุเมื่อผิวเรซินอยู่ต่ำกว่าด้านบนของคอลัมน์อยู่ประมาณ 3-5 ซม. ตรวจสอบให้แน่ใจว่าการไหลเป็นหยดต่อหยด
- 3.4.4.3.4) ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำที่ผ่านการไล่แก๊สแล้ว 3-5 Column volume คอลัมน์พร้อมสำหรับตัวอย่างแล้ว

3.4.4.3 การไหลตัวอย่างสารสกัดและการเก็บสารละลายแต่ละ Fraction

- 3.4.4.4.1) โหลดตัวอย่างที่พื้นเรซินอย่างระมัดระวัง พยายามอย่าให้พื้นผิวเมทริกซ์ไม่เรียบ
- 3.4.4.4.2) ใช้ขวดสำหรับเก็บตัวอย่างรองไว้ด้านล่าง เปิดวาล์วให้ตัวอย่างค่อยๆ หยดลงไปพร้อม ทั้งล้างคอลัมน์ด้วย น้ำกลั่น, เอทานอล 25, 50, 75% อย่างละ 54 mL
- 3.4.4.4.3) จากนั้นนำแต่ละ Fraction ไประเหยแห้งและทำการทดสอบ AEGs อีกครั้ง ทำการฟื้นฟูคอลัมน์โดยล้างคอลัมน์ด้วยน้ำ 3 Column volume ปริมาตร 54 mL เรซินพร้อมสำหรับการคัดแยกในรอบถัดไป หรือล้างคอลัมน์ด้วยเอทานอล 20% 3 Column volume เพื่อเก็บเรซินในระยะยาว

3.4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคด้วยวิธี Agar disc diffusion (พัทวัฒน์ และคณะ, 2563)

3.4.5.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

นำหัวเชื้อจากอาหารร่วนเอียง ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* TISTR746 และ *Bacillus subtilis* TISTR1248, แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* TISTR074 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR2370 มาขีดเชื้อ (Streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-20 ชม.

3.4.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคด้วยวิธี Agar disc diffusion

3.4.5.2.1) นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ได้แก่ *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* มาทำการเชยเชื้อ 2-3 โคโลนีเดี่ยว ลงในอาหาร NB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-20 ชม.

3.4.5.2.2) นำเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ผสมกับ 0.85% NaCl แล้วนำไปเทียบกับ 0.5 McFarland Standard จากนั้นนำเชื้อไป swab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA)

3.4.5.2.3) นำแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ไปวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ swab เชื้อไว้แล้ว แล้วปิเปตสารลงบนแผ่น disc ปริมาตร 10 μ L โดยยาปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ampicillin 50 mg/mL เป็น Positive control และสารสกัดใบแมงลักและ
พริกชี้หนู ความเข้มข้น 50 mg/mL

3.4.5.2.4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-20 ชม. ทำการตรวจวัดเคลียร์โซนด้วย
เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์

3.4.5.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ด้วยกลีเซอรอล ด้วยการแช่เย็นจัด

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-20 ชม.
จากนั้นตัดชิ้นวุ้นที่มีโคโลนีของแบคทีเรีย ใส่ในหลอดไมโครเซนติพิวก์ที่มีสารละลาย
กลีเซอรอล 20% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ผสมให้เข้ากัน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อ
การเก็บรักษาระยะยาว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

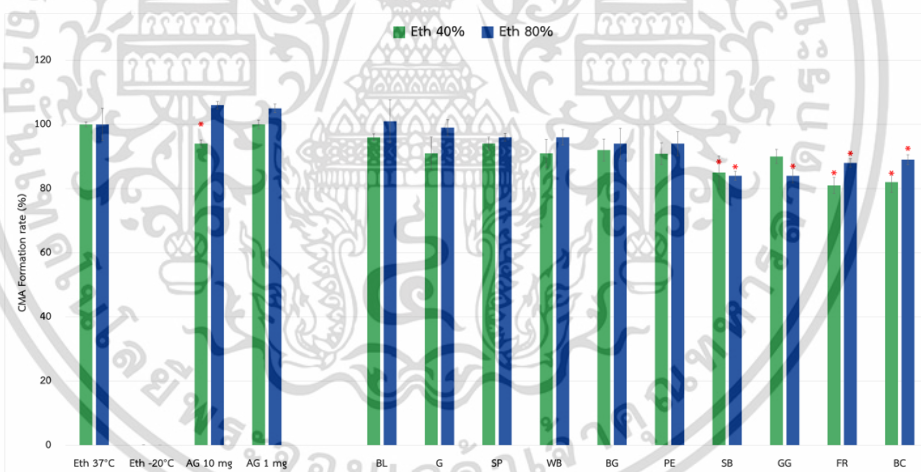
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลของการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ N^ω- (Carboxymethyl) arginine หรือ CMA

4.1.1 ผลของการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CMA ด้วยสารสกัดพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิด

จากการทดลองการยับยั้งการก่อตัวของ CMA ด้วยสารสกัดพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40 และ 80 % พบว่า สารสกัดพริกขี้หนูมีฤทธิ์ยับยั้ง CMA ดีที่สุด มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.808 และ 0.811 มีอัตราการก่อตัวของ CMA เท่ากับ 82 และ 89% ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง CMA เท่ากับ 18 และ 11% ตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดใบแมงลัก โดยมีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.832 และ 0.765 มีการก่อตัวของ CMA เท่ากับ 85 และ 84% ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง CMA เท่ากับ 15 และ 16% ตามลำดับ รองลงมาคือ สารสกัดกระชาย มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.799 และ 0.803 มีอัตราการก่อตัวของ CMA เท่ากับ 81 และ 88% ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง CMA เท่ากับ 19 และ 12% ตามลำดับ สารสกัดพืชอีก 7 ชนิด ที่เหลือ มีอัตราการก่อตัวของ CMA มากกว่า 90% ซึ่งแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์การยับยั้งที่เท่ากับหรือน้อยกว่า 10% ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงอัตราการการก่อตัวของ CMA ด้วยชุดควบคุมและสารสกัดพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิด

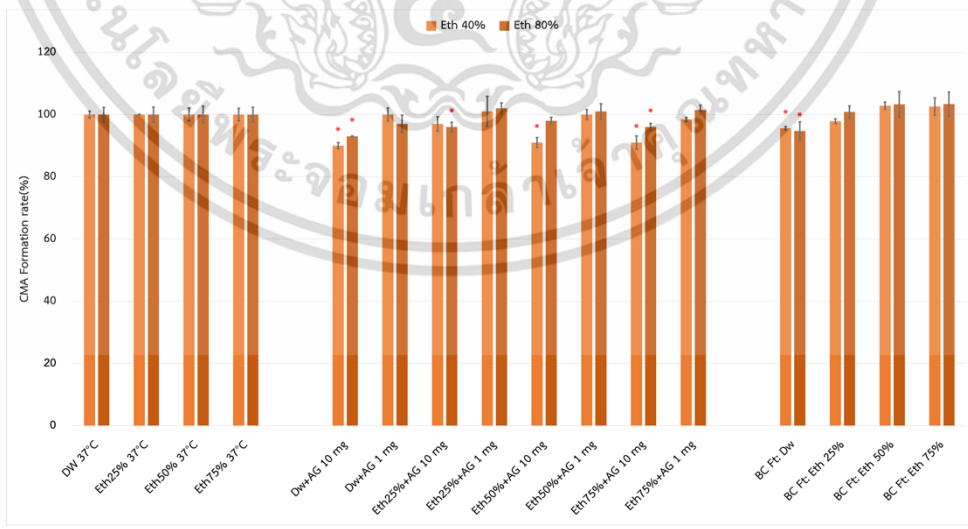
สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40 % และ 80 %

ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ (สุวรรณ, 2556) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในผักพื้นบ้านไทย พบว่าสารสกัดหยาบของใบแมงลักมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 163.75 µg/mL และ (Dutta *et al.*, 2017) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพริกขี้หนู ด้วยวิธี diphenyl-2-proponic hydrazide (DPPH) พบว่า พริกขี้หนูมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง สามารถช่วยลดการเกิดกระบวนการออกซิเดชันในร่างกายได้ จึงทำให้สอดคล้องกับงานวิจัย (เจนจิรา และประสงค์, 2554) ที่พบว่า สารต้านอนุมูลอิสระไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกการต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ซึ่ง (Suantawee *et al.*, 2015) สารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งการสร้าง AGEs และโปรตีนไกลเคชันได้ จึงสรุปได้ว่าสารสกัดใบแมงลัก และพริกชี้หนู มีฤทธิ์ในการยับยั้งการก่อตัวของ AGEs ได้ เนื่องจากพืชทั้งสองชนิดอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดพริกชี้หนู และใบแมงลักไปทำการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง CMA อีกครั้ง

4.1.2 ผลของการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CMA ด้วยสารสกัดพริกชี้หนู และใบแมงลัก 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟี

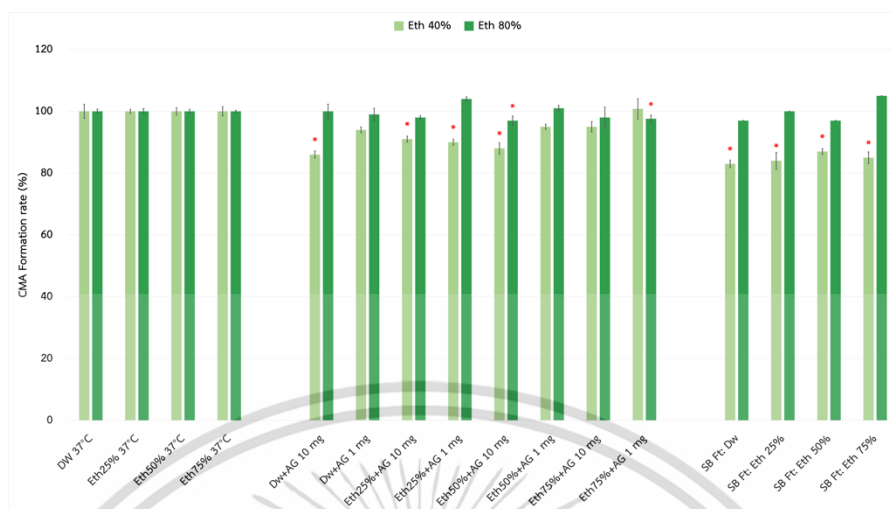
จากการทดลองพบว่า สารสกัดพริกชี้หนู 40 และ 80% fraction น้ำกลั่น มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของ CMA ดีที่สุด มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.907 และ 1.281 มีอัตราการก่อตัวของ CMA เท่ากับ 96 และ 95% ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง CMA เท่ากับ 4 และ 5% ตามลำดับ โดยสารสกัดพริกชี้หนูทั้ง 2 ความเข้มข้น fraction ที่เหลือมีอัตราการก่อตัวของ CMA มากกว่า 98 และ 96% ซึ่งแสดงให้เห็นฤทธิ์การยับยั้งที่เท่ากับหรือน้อยกว่า 2 และ 4% ตามลำดับ (ดังรูปที่ 4.2) สารสกัดใบแมงลัก 40% fraction เอทานอล 75% มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของ CMA ดีที่สุด มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.511 มีอัตราการก่อตัวของ CMA เท่ากับ 85% ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง CMA เท่ากับ 15% และสารสกัดใบแมงลัก 80% fraction น้ำกลั่น มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของ CMA ดีที่สุด มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.788 มีอัตราการก่อตัวของ CMA เท่ากับ 97% ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง CMA เท่ากับ 3% โดยสารสกัดใบแมงลักทั้ง 2 ความเข้มข้น fraction ที่เหลือ มีอัตราการก่อตัวของ CMA มากกว่า 86 และ 97% ซึ่งแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์การยับยั้งที่เท่ากับหรือน้อยกว่า 14 และ 3% ตามลำดับ (ดังรูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.2 แสดงอัตราการการก่อตัวของ CMA ด้วยชุดควบคุมและสารสกัดพริกชี้หนู 40% และ 80%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับก... ที่ผ่านการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟี อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



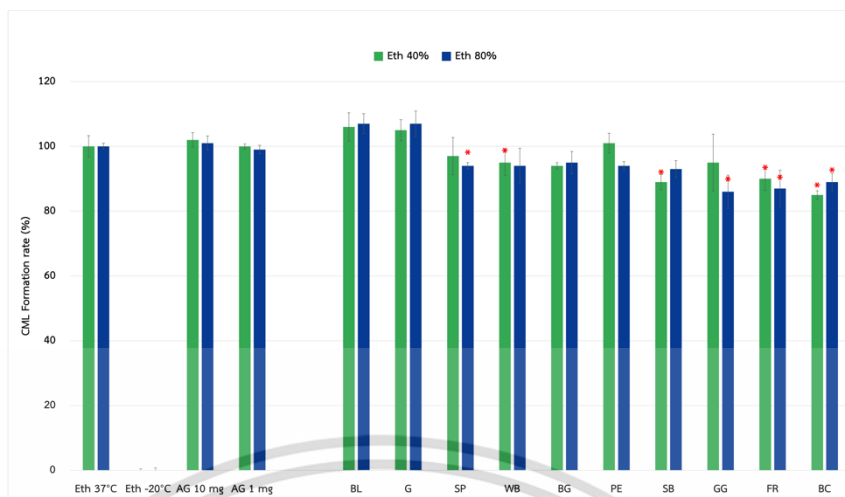
รูปที่ 4.3 แสดงอัตราการการก่อตัวของ CMA ด้วยชุดควบคุมและสารสกัดใบแมงลัก 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟี

4.2 ผลของการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ N^E- (Carboxymethyl) lysine หรือ CML

4.2.1 ผลของการยับยั้งการก่อตัวของ CML ด้วยสารสกัดพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิด

จากการทดลองการยับยั้งการก่อตัวของ CML ด้วยสารสกัดพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40 และ 80 % พบว่า สารสกัดพริกชี้หนุมิฤทธิ์ยับยั้ง CML ดีที่สุด มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 1.151 และ 1.178 มีอัตราการก่อตัวของ CML เท่ากับ 85 และ 89% ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง CML เท่ากับ 15 และ 11% ตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดใบแมงลัก มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 1.201 และ 1.230 มีอัตราการก่อตัวของ CML เท่ากับ 89 และ 93% ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง CML เท่ากับ 11 และ 7% ตามลำดับ รองลงมาคือ สารสกัดกระชาย มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 1.212 และ 1.153 มีอัตราการก่อตัวของ CML เท่ากับ 90 และ 87% ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง CML เท่ากับ 10 และ 13% ตามลำดับ สารสกัดพืชอีก 7 ชนิด ที่เหลือ มีอัตราการก่อตัวของ CML มากกว่า 94% ซึ่งแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์การยับยั้งที่เท่ากับหรือน้อยกว่า 6% จากผลการทดลองที่ได้ จึงเลือกสารสกัดพริกชี้หนุมิและใบแมงลักไปทำการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง CML อีกครั้ง (ดังรูปที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

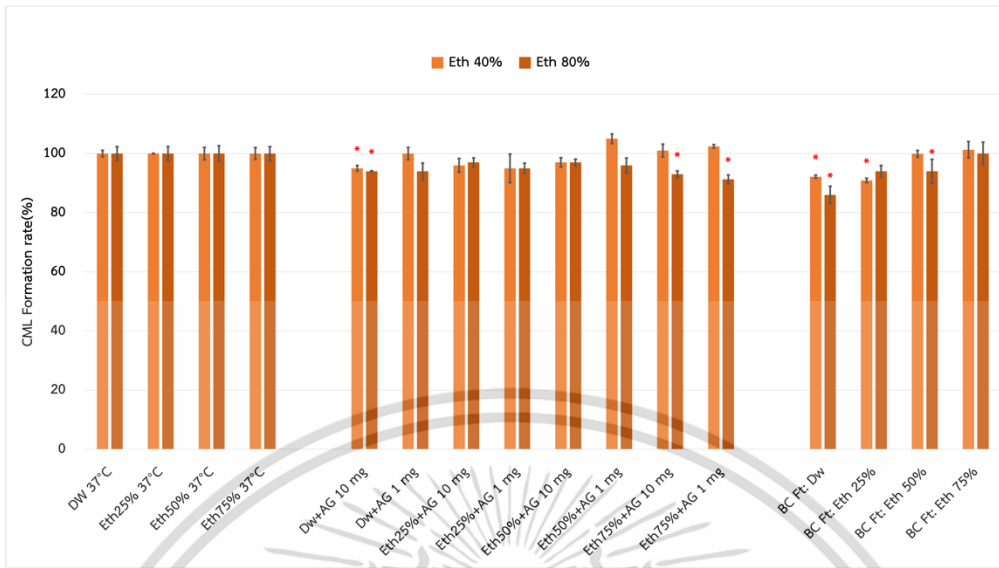


รูปที่ 4.4 แสดงอัตราการการก่อตัวของ CML ด้วยชุดควบคุมและสารสกัดพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิด สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40 % และ 80 %

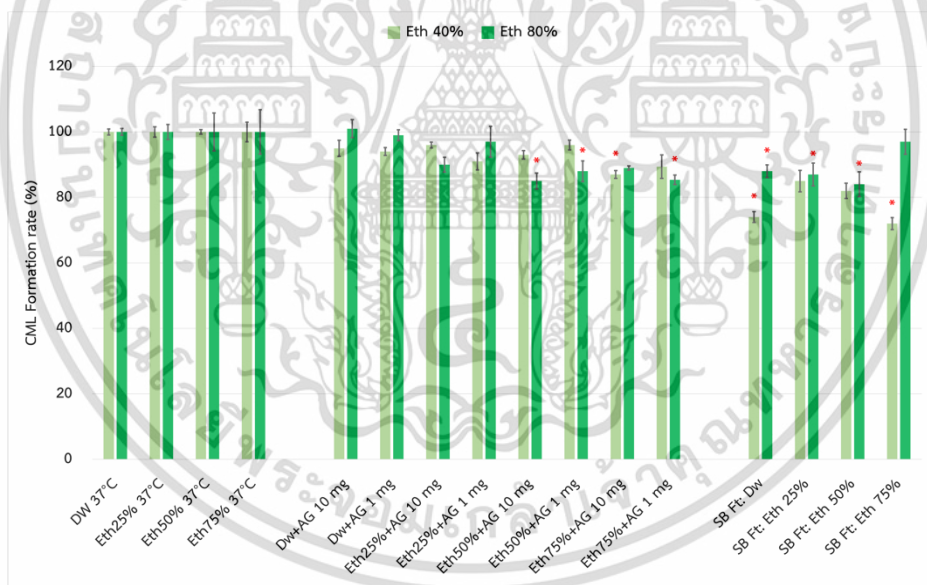
4.2.2 ผลของการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CML ด้วยสารสกัดพริกชี้หนู และใบแมงลัก 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟี

จากการทดลองพบว่า สารสกัดพริกชี้หนู 40% fraction เอทานอล 25% มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของ CML ดีที่สุด มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.655 มีอัตราการก่อตัวของ CML เท่ากับ 91% ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง CML เท่ากับ 9% และสารสกัดพริกชี้หนู 80% fraction น้ำกลั่น มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของ CML ดีที่สุด มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.894 มีอัตราการก่อตัวของ CML เท่ากับ 86% ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง CML เท่ากับ 14% โดยสารสกัดพริกชี้หนูทั้ง 2 ความเข้มข้น fraction ที่เหลือมีอัตราการก่อตัวของ CML มากกว่า 92 และ 94% ซึ่งแสดงให้เห็นฤทธิ์การยับยั้งที่เท่ากับหรือน้อยกว่า 8 และ 6% ตามลำดับ (ดังรูปที่ 4.5) สารสกัดใบแมงลัก 40% fraction เอทานอล 75% มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของ CML ดีที่สุด มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.372 มีอัตราการก่อตัวของ CML เท่ากับ 72% ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง CML เท่ากับ 28% และสารสกัดใบแมงลัก 80% fraction เอทานอล 25% มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของ CML ดีที่สุด โดยมีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.534 มีอัตราการก่อตัวของ CML เท่ากับ 87% ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง CML เท่ากับ 13% สารสกัดใบแมงลักทั้ง 2 ความเข้มข้น fraction ที่เหลือมีการก่อตัวของ CML มากกว่า 74 และ 88% ซึ่งแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์การยับยั้งที่เท่ากับหรือน้อยกว่า 26 และ 12% ตามลำดับ (ดังรูปที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงอัตราการการก่อตัวของ CML ด้วยชุดควบคุมและสารสกัดพริกขี้หนู 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟี



รูปที่ 4.6 แสดงอัตราการการก่อตัวของ CML ด้วยชุดควบคุมและสารสกัดใบแมงลัก 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกคอลัมน์โครมาโทกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคของสารสกัดพริกขี้หนูที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80% ที่นำมาแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วยวิธี Agar disc diffusion

4.2.1 ผลทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคด้วยสารสกัดพริกขี้หนูเอทานอล 40%

จากการทดลอง การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 4 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* TISTR746, *Bacillus subtilis* TISTR1248, *Escherichia coli* TISTR074 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR2370 โดยยาปฏิชีวนะที่ใช้คือ Ampicillin 50 mg/mL และสารสกัดพริกขี้หนูที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80% ที่นำมาแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งมี 4 Fractions ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล 25% เอทานอล 50% และเอทานอล 75% ความเข้มข้น 50 mg/mL จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดพริกขี้หนู 40% Fraction เอทานอล 50% สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดซึ่งวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งมีค่าเท่ากับ 3 และ 3 มม. ตามลำดับ ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.7

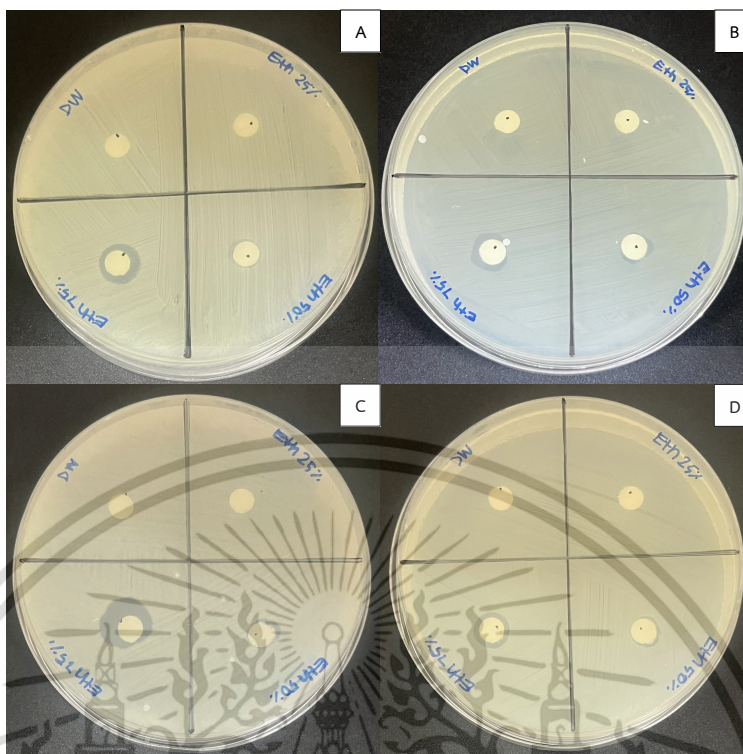
ตารางที่ 4.1 ผลทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคด้วยสารสกัดพริกขี้หนูเอทานอล 40%

สารสกัด	เชื้อทดสอบ	บริเวณที่ยับยั้งได้ (มม.)				
		Amp	Dw	Eth 25 %	Eth 50 %	Eth 75 %
พริกขี้หนู 40%	<i>S. aureus</i>	23	-	-	3	-
	<i>B. subtilis</i>	6	-	-	3	-
	<i>E. coli</i>	14	-	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

- เส้นผ่านศูนย์กลางของกระดาษกรอง มีขนาด 6 มม.
- เครื่องหมาย “-” ไม่มีการยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดพริกขี้หนู 40% ซึ่งมี 4 Fractions ต่อเชื้อก่อโรค

A) *S. aureus*, B) *P. aeruginosa*, C) *B. subtilis* และ D) *E. coli*

4.4.2 ผลทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคด้วยสารสกัดพริกขี้หนูเอทานอล 80%

จากการทดลองฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น พบว่าสารสกัดพริกขี้หนู 80% ซึ่งมี 4 Fraction คือน้ำกลั่น เอทานอล 25% เอทานอล 50% และเอทานอล 75% โดยใช้ความเข้มข้น 50 mg/mL ทดสอบกับเชื้อก่อโรค 4 สายพันธุ์ คือ *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดพริกขี้หนู 80% Fraction เอทานอล 50% สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุดซึ่งวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งมีค่าเท่ากับ 4.5 และ 1 มม. ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.8

ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ โสภา และธนุสร (2550) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากพริกขี้หนู พบว่า สารสกัดของพริกขี้หนูที่ผ่านการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล โดยส่วนสกัดย่อย MH52 (สารผสมกลุ่มเทอร์ปีนอยด์และฟลาโวนอยด์) ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ได้สูงสุด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยบริเวณยับยั้งได้ 14.3 มม. รองลงมาได้แก่เชื้อ *Sarina sp.*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ตามลำดับ

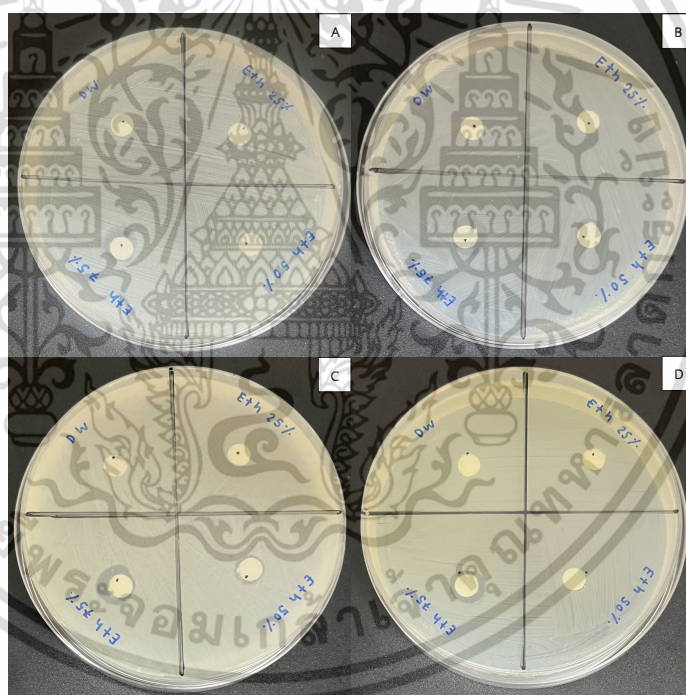
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยสารสกัดพริกชี้หนูด้วยเอทานอล 80%

สารสกัด	เชื้อทดสอบ	บริเวณที่ยับยั้งได้ (มม.)				
		Amp	Dw	Eth 25 %	Eth 50 %	Eth 75 %
พริกชี้หนู 80%	<i>S. aureus</i>	23	-	-	-	-
	<i>B. subtilis</i>	6	-	-	4.5	-
	<i>E. coli</i>	14	-	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	1	-

หมายเหตุ

- เส้นผ่านศูนย์กลางของกระดาษกรอง มีขนาด 6 มม.
- เครื่องหมาย “-” ไม่มีการยับยั้ง



รูปที่ 4.8 แสดงบริเวณการยับยั้งของสารสกัดพริกชี้หนู 80% ต่อเชื้อก่อโรค

A) *S. aureus*, B) *P. aeruginosa*, C) *B. subtilis* และ D) *E. coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสกัดสารสกัดจากพืชสวนครัว 10 ชนิด ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80% เพื่อทดสอบการยับยั้งการก่อตัวของ CMA และ CML ด้วยวิธี ELISA ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากใบแมงลักและพริกชี้หนูทั้ง 2 ความเข้มข้น มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของ CMA และ CML ได้ดีที่สุดจากพืชสวนครัวทั้งหมด 10 ชนิด โดยผลของฤทธิ์ยับยั้ง CMA มีดังนี้ สารสกัดใบแมงลักและพริกชี้หนูความเข้มข้น 40% สามารถยับยั้ง CMA ได้ 15 และ 18% ความเข้มข้น 80% สามารถยับยั้ง CMA ได้ 16 และ 11% ตามลำดับ ผลของฤทธิ์ยับยั้ง CML มีดังนี้ สารสกัดใบแมงลักและพริกชี้หนูความเข้มข้น 40% สามารถยับยั้ง CML ได้ 11 และ 15% ความเข้มข้น 80% สามารถยับยั้ง CML ได้ 7 และ 11% ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดใบแมงลักและพริกชี้หนูทั้ง 2 ความเข้มข้นไปแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของ CMA และ CML อีกครั้ง ด้วยวิธี ELISA พบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้ง CMA ดีที่สุด ได้แก่ สารสกัดใบแมงลัก 40% fraction เอทานอล 75%, สารสกัดใบแมงลัก 80% fraction น้ำกลั่น, สารสกัดพริกชี้หนู 40 และ 80% fraction น้ำกลั่น ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง CMA ได้ 15, 3, 4 และ 5% ตามลำดับ และสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้ง CML ดีที่สุด ได้แก่ สารสกัดใบแมงลัก 40% fraction เอทานอล 75% , สารสกัดใบแมงลัก 80% fraction เอทานอล 25% , สารสกัดพริกชี้หนู 40% fraction เอทานอล 25% และสารสกัดพริกชี้หนู 80% fraction น้ำกลั่น ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง CML ได้ 28, 13, 9 และ 14% ตามลำดับ จากผลการทดลอง สารสกัดใบแมงลักที่ผ่านการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถยับยั้ง CMA และ CML ได้ดีกว่าสารสกัดพริกชี้หนู และได้นำสารสกัดพริกชี้หนูไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค 4 ชนิด พบว่า สารสกัดพริกชี้หนู 40% fraction เอทานอล 50% สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้ สารสกัดพริกชี้หนู 80% fraction เอทานอล 50% สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *P. aeruginosa* ได้

จากผลการทดลองที่ได้นี้ สามารถนำไปหาสารสำคัญของใบแมงลักและพริกชี้หนูที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AGEs โดยวิธี HPLC ต่อไป และอาจนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการวิเคราะห์สารสกัดจากพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิดด้วย HPLC เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ที่น่าสนใจ
2. ศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการนำไปยับยั้งการก่อตัวของ CMA และ CML

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กองการแพทย์ทางเลือก และกรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข. 2566.

ชิง. [Online]. เข้าถึงได้จาก. <https://www.scribd.com/document/587460403/3>.

กฤติกา คำภุณี. 2558. ลักษณะของเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะในเชื้อ *Escherichia coli* ที่แยกได้จากเด็กที่เป็นมะเร็ง ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์. วิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เกรียงไกร โกวิทางกูร, ณรงค์ชัย สังขา, จุฬาลักษณ์ แก้วมะไฟ, นันทิพัฒน์ พัฒนโชติ และ พงษ์เดช สารการ.

2560. ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในกระแสเลือด ในผู้ป่วย ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจังหวัดร้อยเอ็ด. วารสารการแพทย์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ.

2: 11-22.

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2553. ฐานข้อมูลสมุนไพร ข้า. [Online]. เข้าถึงได้จาก.

<https://apps.phar.ubu.ac.th/phargarden/main.php?action=viewpage&pid=22>.

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2553. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร มะกรูด. [Online]. เข้าถึงได้

จาก. <https://apps.phar.ubu.ac.th/thaicrudedrug/main.php?action=viewpage&pid=98>.

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ. 2566. กระชาย. [Online]. เข้าถึงได้จาก.

http://www.rspg.or.th/plants_data/herbs/herbs_07_1.htm.

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ. 2566. ใบแมงลัก. [Online]. เข้าถึงได้จาก.

http://www.rspg.or.th/plants_data/herbs/herbs_05_8.htm.

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม. 2566. พริก

ขี้หนู. [Online]. เข้าถึงได้จาก. https://rspg.psu.ac.th/candy/view_herb.php?HID=33.

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. 2554. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการ

เกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์. 1: 59-70.

ชนิพรรณ บุตรยี่. 2551. การศึกษาชีวภาพความพร้อมและคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของปลาโวนอยด์จากใบ

มะกรูดในหลอดทดลองและศักยภาพในการป้องกันการแตกหักของโครโมโซมในหนูเม้าส์โดยวิธีการ

ตรวจไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดง. มหาวิทยาลัยมหิดล.

ชมนาด สิงห์หันทต์ และไมตรี สุทนต์จิตต์. 2560. การยับยั้งออกซิเดชันและไกลเคชันในโรคเบาหวานโดยผัก

พื้นบ้านไทย. วิทยาศาสตร์การแพทย์. มหาวิทยาลัยพะเยา.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรียและปฏิบัติการ. 1. กรุงเทพมหานคร. โอเดียนสโตร์.

นพวัฒน์ เฟื่องคำศรี, จัตุพล กันทะมูล, ภัทรารักษ์ ไต้วัฒนกิจ, วชิรวิทย์ วงศ์ชารัฐ, วนิดา ใจหมั่น, นิภาพร เมือง

จันทร์ และสุภารัตน์ จันทร์เหลือง. 2554. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้าข่าลิง. เภสัชศาสตร์.

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์. 2552. การดื้อยาปฏิชีวนะของ *Staphylococcus aureus* และ

ไม่ว่ากัน แนวทางการควบคุม. สงขลานครินทร์เวชสาร. 4: 347-358. ถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิพนธ์ ไชยมงคล. 2546. พริกหวาน/พริกยักษ์. [Online]. เข้าถึงได้จาก. http://www.agric-prod.mju.ac.th/vegetable/File_link/pepper.pdf.

ประสาทร บิริสุทธิเพ็ชร, พิทัย กาญจนบุตร และสาทร พรตระกูลพิพัฒน์. 2552. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ. 91-101. ในงานประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น

ปิติ พูนไชยศรี. 2544. มะระขึ้นกพีชสมุนไพรไทย ไกล่ท่าน. [Online]. เข้าถึงได้จาก. <https://www.stou.ac.th/Schools/Shs/booklet/book541/health.html>.

ผาสุก เปี่ยมสุวรรณมาศ. 2548. สารยับยั้งสปอร์ *P. larvae* จากแบคทีเรียและแนวโนมการประยุกต์ใช้ควบคุมโรคอเมริกันฟาล์วบรูต. วิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยศิลปากร.

พัทวัฒน์ สีขาว, เรณูกา เชื้อบุญมี, ปณิธาน สุระยศ, สาธิต ฉัตรพันธุ์ และนฤมล เกื้อนกุล. 2563. การประเมินสารพิษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านจุลชีพจากสารสกัดเอทานอลของผลตะขบป่า. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี. 19: 1686-2420.

พรพรรณ อู่สุวรรณ. 2550. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น. วิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

แพรวพรรณ บุญนวม, นุรมา กาแบ, รัยมี หะยิมะสาและ, วิทวัส หมาดอี, ปิยะนุช สุวรรณรัตน์ และกุสมาลย์ น้อยผา. 2564. การศึกษาสารพิษเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ สารสกัดกระชายขาว เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สบู่นักกีฬา. วิทยาศาสตร์สุขภาพและการกีฬา. มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง.

ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548. ภูมิคุ้มกันสำหรับการเรียนการสอน. กรุงเทพมหานคร. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

มนต์ชนก เต็มภาชนะ. 2558. การศึกษาลักษณะของ *Escherichia coli* O157 และ uropathogenic *Escherichia coli* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย. วิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

รัตติยา นวลหล้า และพิทยา สรวมศิริ. 2544. ฤทธิ์ควบคุมหนองกระทุ้ฝักของสารสกัดหยาบจากค้างคาวดำ. เกษตร. 17: 176-184.

วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์. 2559. ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* ATCC 25922. วารสารมจร.วิชาการ. 19: 35-48.

วัยวรรณ บุญยมานพ. 2536. การศึกษาปริมาณแคปไซซินและแคโรทีนอยด์ในผลของพริกปลูกในประเทศไทย. เกษตรศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วาริรัตน์ หนูทิต. 2557. การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนบนผิวสัมผัสโดยใช้สารสกัดจากพืชตระกูลขิง. วิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศุภชัย เจริญสิน. 2551. กลไกการยับยั้งการเกิดมะเร็งระยะเริ่มต้นในตับหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไดเอทิลไนโตรซามีนของสารฟีนอลิกสกัดจากกระชาย. วิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรนำมาใช้

ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง. 2566. มะเขือพวง. [Online]. เข้าถึงได้จาก.

<http://clgc.agri.kps.ku.ac.th/resources/herb/solanum.html>.

ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ. 2555. สถานการณ์เชื้อดื้อยาในประเทศไทย. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

สุจิตรา ยาหอม, จิตรสุดา กุลวัฒน์ และสุทธิวรรณ ธรรมวัตร. 2561. การเก็บและรักษาสภาพของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 1: 1-7.

สุวรรณมา จันคนา. 2552. การสกัดและการศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัส HSV-1 ฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม และความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของใบแมงลัก. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์. 1: 78-83

สุวรรณมา จันคนา. 2556. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในผักพื้นบ้านไทย. วารสารนเรศวรพะเยา. 3: 188-193.

สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดสุรินทร์. 2563. ถั่วพูสรรพคุณและประโยชน์ของถั่วพู. [Online]. เข้าถึงได้จาก. https://www.opsmoac.go.th/surin-local_wisdom-preview-422891791859.

โสภา เขียวชาวนวุฒิมังค และธนุสรา เหล่าเจริญสุข. 2550. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากพริกขี้หนู. วิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ฮาซัน ดอปอ, อิสมะแอ เจ๊ะหลง และอัสมาน อาแด. 2560. การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์จากพรอพอลิสของชันโรง. วิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

ฤทัยภักดี ชาญศรี และเนาวรัตน์ กองคำ. 2565. ฤทธิ์ของสารสกัดยับยั้งการอักเสบจากสมุนไพรในครัวเรือนในการต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งจุลินทรีย์ และต้านการอักเสบ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 5: 145-154.

Aalaei, K., Rayner, M. and Sjolholm, I. 2019. Chemical methods and techniques to monitor early Maillard reaction in milk products. Department of Food Technology, Engineering & Nutrition. Lund University.

Abirami, A., Nagarani, G. and Siddhuraju, P. 2015. Hepatoprotective effect of leaf extracts from *Citrus hystrix* and *C. maxima* against paracetamol induced liver injury in rats. 1: 35-41.

Akullo, J.O., Moku, B.N.K., Nakimbugwe, D., Ng'ang'a, J. and Kinyuru, J. 2023. Phytochemical profile and antioxidant activity of various solvent extracts of two varieties of ginger and garlic. *Heliyon*. 9: 18806.

Anuchapreeda, S., Chueahongthong, F., Viriyaadhammaa, N., Panyajai, P., Anzawa, R., Tima, S., Ampasavate, C., Saiai, A., Rungrojsakul, M., Usuki, T. and Okonogi, S. 2020. Antileukemic Cell Proliferation of Active Compounds from Kaffir Lime (*Citrus hystrix*) Leaves.

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Molecules. 25: 1300.

Anwar, L., Ali, S.A., Khan, S., Uzairullah, M.M., Mustafa, N., Ali, U.A., Siddiqui, F., Bhatti, H.A., Rehmani, S.J. and Abbas, G. 2023. Fenugreek seed ethanolic extract inhibited formation of advanced glycation end products via scavenging reactive carbonyl intermediates. *Heliyon*. 9: e16866.

Bassal, H., Hijazi, A., Farhan, H., Trabolsi, C., Ahmad, B.S., Khalil, A., Maresca, M. and Omar, F.E. 2021. Study of the Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Biological Extracts of *Psophocarpus tetragonolobus* Using Two Extraction Methods. *Molecules*. 26: 4435.

Baynes, J.W., Watkins, N.G., Fisher, C.I., Hull, C.J., Patrick, J.S., Ahmed, M.U., Dunn, J.A. and Thorpe, S.R. 1989. The Amadori product on protein: structure and reactions. *Prog Clin Biol Research*. 304: 43-67.

Bierhaus, A., Hofmann, M.A., Ziegler, R. and Nawroth, P.P. 1998. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovascular Research*. 3: 586-600.

Brewer, J.D., Hundley, M.D., Meves, A., Hargreaves, J., McEvoy, M.T. and Pittelkow, M.R. 2008. Staphylococcal scalded skin syndrome and toxic shock syndrome after tooth extraction. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 59: 342-346.

Chuyen, N.V. 2006. Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. *Molecular Nutrition & Food Research*. 12: 1140-1149.

Clapa, A.T., Olczak, A., Bialkowska, A. and Koziolkiewicz, M. 2022. Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs. *Cells*. 8: 1312.

Dutta, S.K., Singh, S.B., Saha, S., Akoijam, R.S., Boopathi, T., Banerjee, A., Lungmuana., Vanlalmangaiha. and Roy, S. 2017. Diversity in Bird's Eye Chilli (*Capsicum frutescens* L.) Landraces of North-East India in Terms of Antioxidant Activities. *Proceeding of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 87: 1317-1326.

Fowler, V.G., Miro, J.M., Hoen, B., Cabell, C.H., Abrutyn, E., Rubinstein, E., Corey, G.R., Spelman, D., Bradley, S.F., Barsic, B., Pappas, P.A., Anstrom, K.J., wray, D., Fortes, C.Q., Anguera, I., Athan, E., Jones, P., Meer, J.T.M.V.D., Elliot, T.S.J., Levine, D.P. and Bayer, A.S. 2005.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
Staphylococcus aureus endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA*. 293:
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3012-3021.

- Gandhi, G.R., Ignacimuthu, S. and Paulraj, M.G. 2011. Solanum torvum Swartz. fruit containing phenolic compounds shows antidiabetic and antioxidant effects in streptozotocin induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*. 11: 2725-2733.
- Giacco, O. and Brownlee, M. 2011. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*. 107(9): 1058-1070.
- Imani, H., Tabibi, H., Najafi, I., Atabak, S., Hedayati, M. and Rahmani, L. 2015. Effects of ginger on serum glucose, advanced glycation end products, and inflammation in peritoneal dialysis patients. *Nutrition*. 5: 703-707.
- Gutierrez, R.M.P. and Velazquez, E.G. 2020. Glucopyranoside flavonoids isolated from leaves of *Spinacia oleracea* L (spinach) inhibit the formation of advanced glycation end products (AGEs) and aldose reductase activity (RLAR). *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 128: 110299.
- Hull, G.L.J., Woodside, J.V., Ames, J.M. and Cuskelly, G.J. 2012. N^ε- (carboxymethyl) lysine content of foods commonly consumed in a Western style diet. *Food Chemistry*. 131: 170–174.
- Iijima, K., Murata, M., Takahara, H. and Fujimoto, D. 2000. Identification of N(omega)-carboxymethylarginine as a novel acid-labile advanced glycation end product in collagen. *Biochemical Journal*. 1: 23-27.
- Imani, H., Tabibi, H., Najafi, I., Atabak, S., Hedayati, M. and Rahmani, L. 2015. Effects of ginger On serum glucose, advanced glycation end products, and inflammation in peritoneal dialysis patients. *Nutrition*. 5: 703-707.
- Ishioka, Y., Yagi, M., Ogura, M. and Yonei, Y. 2015. Antiglycation effect of various vegetables: Inhibition of advanced glycation end product formation in glucose and human serum albumin reaction system. *Glycative Stress Research*. 2: 22-34.
- Lander, H.M., Tauras, J.M., Ogiste, J.S., Hori, O., Moss, R.A. and Schmidt, A.M. 1997. Activation of the Receptor for Advanced Glycation End Products Triggers a p21^{ras}-dependent Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Regulated by Oxidant Stress. *Cell Biology and Metabolism*. 28: 17810-17814.
- Latha, L.Y., Sasidharan, S., Zuraini, Z., Suryani, S., Shirley, L. and Sangetha, S. 2007. Antibacterial Activity and Toxicity of *Psophocarpus tetragonolobus*. *Pharmaceutical Biology*. 1: 31-36.
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lew, D.P. and Waldvogel F.A. 2004. Osteomyelitis. *The Lancet*. 364: 369-379.
- Luevano, C.C. and Chapman, N.K. 2010. Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients*. 12: 1247–1265.
- Lund, M.N. and Ray, C.A. 2017. Control of Maillard reactions in foods: strategies and chemical mechanisms. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 65: 4537–4552.
- Malik, T., Pandey, D.K., Roy, P. and Okram A. 2016. Evaluation of Phytochemicals, Antioxidant, Antibacterial and Antidiabetic Potential of *Alpinia galanga* and *Eryngium foetidum* Plants of Manipur (India). A multifaceted peer reviewed journal in the field of Pharmacognosy and Natural Products. 8(5): 459-464.
- Mesias M, Navarro M, Gokmen, V. and Morales, F.J. 2013. Antiglycative effect of fruit and vegetable seed extracts: inhibition of AGE formation and carbonyl-trapping abilities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93: 2037-2044.
- Miller, L.G. and Kaplan L. 2009. *Staphylococcus aureus*: A Community Pathogen. *Clinicalkey*. 23: 35-52.
- Mulcahy, L.R., Isabella, V.M. and Lewis, K. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol*. 1: 1-12.
- Odani, H., Iijima, K., Nakata, M., Miyata, S., Kusunoki, H., Yasuda, Y., Hiki, Y., Irie, S., Maeda, K. and Fujimoto, D. 2001. Identification of N(omega)-carboxymethyl arginine, a new advanced glycation end product in serum proteins of diabetic patients: possibility of a new marker of aging and diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 5: 1232-1236.
- Otunola, G.A. and Afolayan, A.J. 2013. Evaluation of the polyphenolic contents and some antioxidant properties of aqueous extracts of Garlic, Ginger, Cayenne Pepper and their mixture. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 86: 66-70.
- Pennington, P.H. 2010. *Escherichia coli* O157. *The Lancet*. 376: 1428-1435.
- Prasanna, G. and Saraswathi, N.T. 2017. Linolenic acid prevents early and advanced glycation end-products (AGEs) modification of albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 95: 121-125.
- Reddy, V.P. and Beyaz, A. 2006. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discovery Today*. 13-14: 646-654.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Reddy, S., Bichler, J., Wells, K.K.J., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. 1995. N^ε- (Carboxymethyl) lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry*. 34: 10852–10878.

Robins-Browne, R.M. and Hartland, E.L. 2002. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 17: 467-475.

Saidu, A.N. and Garba, R. 2011. Antioxidant activity and phytochemical screening of five species of capsicum fruits. *Journal of Biochemistry and Bioinformatics*. 1: 237-241.

Saito, M. and Marumo, K. 2010. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporosis International*. 21: 195–214.

Saraswat, M., Reddy, P.Y., Muthenna, P. and Reddy, G.B. 2009. Prevention of Non-Enzymic Glycation of proteins by Dietary Agents: Prospects for Alleviating Diabetic Complications. *British Journal of Nutrition*. 11: 1714-1721.

Stitt, A.W. 2005. The Maillard Reaction in Eye Diseases. *Annals of the New York Academy of Science*. 1: 582-597.

Suantawee, T., Wesarachanon, K., Anantsuphasak, K., Daenphetploy, T., Thien-Ngern, S., Thilavech, T., Pasukamonset, P., Ngamukote, S. and Adisakwattana, S. 2015. Protein glycation inhibitory activity and antioxidant capacity of clove extract. *Journal Food Science Technology*. 6: 3843-3850.

Sun, T., Xu, Z., Wu, C.T., Janes, M., Prinyawiwatkul, W. and No, H.K. 2007. Antioxidant Activities of Different Colored Sweet Bell Peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Science*. 2: S98-S102.

Trakoon, O.W., Sotanaphun, U., Phanachet, P., Porasuphatana, S., Udomsubpayakul, U. and Komindr, S. 2013. Hypoglycemic and antiglycation activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) in type 2 diabetic patients. *Journal of Pharmacy Research*. 6: 859-864.

Tsonis, I., Karamani, L., Xaplanteri, P., Kolonitsiou, F., Zampakis, P., Gatzounis, G., Markos, M. and Assimakopoulos. 2018. Spontaneous cerebral abscess due to *Bacillus subtilis* in an immunocompetent male patient: A case report and review of literature. *World Journal of Clinical Cases*. 6: 1169-1174.

Unoki, H., Bujo, H., Yamagishi, S.I., Takeuchi, M., Imaizumi, T. and Saion, Y. 2007. Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2: 236-244.
- Uribarri, J., Castillo, M.D., Maza, M.P., Filip, R., Gugliucci, A., Luevano, C.C., Macias, C.M.H., Markowicz B.D.H., Medrano, A., Menini, T., Portero, O.M., Rojas, A., Sampaio, G.R., Wrobel, K. and Garay, S.M.E. 2015. Dietary advanced glycation end products and their role in health and disease. *Nutrition*. 6: 461–473.
- Wilson, M.G. and Pandey, S. 2023. *Pseudomonas aeruginosa*. Statpearl Publishing LLC. NBK557831.
- Yaldiz, G. and Camlica, M. 2022. Essential oils content, composition and antioxidant activity of selected basil (*Ocimum basilicum* L.) genotypes. *South African journal of Botany*. 151 Part A: 675-694.
- Zhang, L., Xu, L., Tu, Z.c., Wang, H.h., Luo, J. and Ma, T.x. 2020. Mechanisms of isoquercitrin attenuates ovalbumin glycation: Investigation by spectroscopy, spectrometry and molecular docking. *Food Chemistry*. 309: 125667.
- Zhang, L., Zhou, Q.M., Xu, L., Xie, L., Xie, X., Wang, P.X., Xie, Z.H., Li, J.L. and Tu, Z.C. 2023. Extraction optimization and identification of four advanced glycation-end products inhibitors from lotus leaves and interaction mechanism analysis. *Food Chemistry*. 414: 135712.
- Zhang, S., Wang, R., Chu, J., Sun, C. and Lin, S. 2023. Vegetable extracts: Effective inhibitors of heterocyclic aromatic amines and advanced glycation end products in roasted Mackerel. *Food Chemistry*. 412: 135559.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารสกัด

ก-1 การสกัดพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิด

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง (0.5 g สำหรับตัวอย่างแห้ง หรือ 1 g สำหรับตัวอย่างเปียก)
2. เติมน้ำกลั่นลงไป 10 mL

ตารางที่ ก.1 การเตรียมตัวทำละลายเอทานอล 40 % และ 80 %

ความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอล (%)	ตัวทำละลายเอทานอล (mL)	น้ำกลั่น (mL)
40	40	60
80	80	20

3. ปิดฝาด้วยฟรอยด์ บ่มในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิในขวดที่ปิดฝา
4. กรองและเก็บส่วนเหนือตะกอน เก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -20°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งก่อตัวของ CMA และ CML

ตารางที่ ข.1 การเตรียมสารในขั้นตอนการก่อตัวของ AGEs (Advanced glycation end products)

สารเคมี	ปริมาณ
200mM K-PO ₄ buffer pH 7.2	500 mL
ประกอบด้วย	
- Potassium Dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄) หรือ	13.61 g/400 mL
- Dipotassium phosphate (K ₂ HPO ₄)	17.42 g/400 mL

ชั่งสาร KH₂PO₄ 13.61 g เติมน้ำกลั่น 400 mL ละลายให้เข้ากัน ปรับค่า pH ให้ได้ 7.2 ด้วย 2M KOH แล้วทำการปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 500 mL และนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121° C ความดัน 15 ปอนด์ต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ ข.2 การเตรียม Solution A

สารเคมี	ปริมาณ
0.4 % Gelatin	0.1 g/25 mL
60mM Ribose	0.225 g/25 mL

ชั่ง Gelatin 0.1 g ละลายใน 200 mM K-PO₄ buffer ปริมาตร 25 mL แล้วกรองด้วยเมมเบรน 0.45 ไมครอน ชั่ง Ribose 0.225 g ละลายใน 200 mM K-PO₄ buffer ปริมาตร 25 mL แล้วกรองด้วยเมมเบรน 0.45 ไมครอน ผสม 0.4% Gelatin 25 mL และ 60mM Ribose 25 mL จะได้เป็น Solution A

ข-3 เตรียม 1 mL ของ 100 mg/mL Aminoguanidine (AG) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก

1. ชั่ง AG 100 mg เติมน้ำกลั่น 1 mL ผสมให้เข้ากัน
2. เจือจาง 10 และ 100 เท่า ให้เป็น 10 mg/mL และ 1 mg/mL ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-4 การเตรียมสารละลายสำหรับการใช้ในการตรวจหา AGEs โดยวิธี ELISA

ตาราง ข.4 การเตรียม 1X PBS (1 L.) pH 7.4

สารเคมี	ปริมาณ
Sodium Chloride (NaCl)	8 g/1 L
Potassium Chloride (KCl)	0.2 g/1 L
Disodium Hydrogen Phosphate (Na ₂ HPO ₄)	1.44 g/ 1 L
Potassium Dihydrogen Phosphate (KH ₂ PO ₄)	0.245 g/ 1 L

ซึ่งสารเคมีดังตาราง ข.4 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 L ละลายให้เข้ากัน ปรับค่า pH ให้ได้ 7.4 โดยใช้ NaOH นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันที่ 121° C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บที่ 4° C

ข-4.2 การเตรียม Substrate buffer

Solution 1: ชั่ง Citric acid (C₆H₈O₇) 2.1 g เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL ละลายให้เข้ากัน

Solution 2: ชั่ง Sodium phosphate dibasic dodecahydrate (Na₂HPO₄·12H₂O) 7.16 g เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 mL ละลายให้เข้ากัน

ไทเทรต Solution 1 ให้ได้ pH 5.0 โดยใช้ Solution 2 จะได้เป็น Substrate buffer ที่เก็บที่ 4° C

ข-4.3 การเตรียม Washing buffer

นำ 1X PBS 1 L ผสมกับ 0.05% Tween20 ปริมาตร 500 µL จะได้เป็น Washing buffer

ข-4.4 การเตรียม 0.5 % Hydrolyzed casein

ชั่ง Hydrolyzed casein 0.1 g ละลายด้วย 1X PBS 20 mL (สำหรับ 1 เพลท) ละลายให้เข้ากัน

ข-4.5 การเตรียม Primary antibody

ข.4.5.1 anti-CMA

ปิเปต anti-CMA 16.23 µL ใส่ใน Washing buffer 11 mL ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ (สำหรับ 1 เพลท)

ข.4.5.2 anti-CML

ปิเปต anti-CML 1.27 µL ใส่ใน Washing buffer 11 mL ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ (สำหรับ 1 เพลท)

ข-4.6 การเตรียม Secondary antibody

ปิเปต IgG-HRP 2.2 µL ใส่ใน Washing buffer 11 mL ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ (สำหรับ 1 เพลท)
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-4.7 การเตรียมสารทำปฏิกิริยา**ข.4.7.1 Start the reaction**

ชั่ง OPD•2HCl 5.5 mg ละลายด้วย Substrate buffer 11 mL แล้วเติม Hydrogen peroxide (H₂O₂) 6.6 μ L ผสมให้เข้ากัน

ข.4.7.2 Stop the reaction

1M H₂SO₄



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การแยกสารด้วยวิธี Column Chromatography

ตาราง ค.1 การเตรียมตัวทำละลายเอทานอล

ความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอล (%)	ตัวทำละลายเอทานอล (mL)	น้ำกลั่น (mL)
25	25	75
50	50	50
75	75	25
99.9	100	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสง และอัตราการก่อตัวของ CMA และ CML

ตารางที่ ง.1 แสดงผลของการก่อตัว CMA ในตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

ตัวควบคุม	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร	อัตราการก่อตัวของ CMA
Dw 37° C	0.964	100
Dw -20° C	0.105	0
Eth 40% 37° C	0.981	100
Eth 40% -20° C	0.099	0
Eth 80% 37° C	0.909	100
Eth 80% -20° C	0.104	0
Dw + AG 1 mg	0.969	100
Dw + AG 10 mg	0.919	95
Eth 40%+ AG 1 mg	0.927	94
Eth 40%+ AG 10 mg	0.918	94
Eth 80%+ AG 1 mg	0.959	105
Eth 80%+ AG 10 mg	0.968	106

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.2 แสดงผลของการยับยั้งการก่อตัวของ CMA ด้วยสารสกัดพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80% และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

สารสกัด	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร		อัตราการก่อตัวของ CMA	
	เอทานอล 40%	เอทานอล 80%	เอทานอล 40%	เอทานอล 80%
ใบมะกรูด	0.941	0.921	96	101
ข่า	0.891	0.897	91	99
พริกหวานแดง	0.921	0.876	94	96
ถั่วพู	0.889	0.872	91	96
มะระขี้นก	0.904	0.856	92	94
มะเขือพวง	0.891	0.854	91	94
ใบแมงลัก	0.832	0.765	85	84
ขิง	0.885	0.762	90	84
กระชาย	0.799	0.803	81	88
พริกขี้หนู	0.808	0.811	82	89

ตารางที่ ง.3 แสดงผลของการก่อตัว CML ในตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

ตัวควบคุม	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร	อัตราการก่อตัวของ CML
Dw 37° C	1.382	100
Dw -20° C	0.122	0
Eth 40% 37° C	1.348	100
Eth 40% -20° C	0.118	0
Eth 80% 37° C	1.323	100
Eth 80% -20° C	0.125	0
Dw + AG 1 mg	1.440	104
Dw + AG 10 mg	1.454	105
Eth 40%+ AG 1 mg	1.344	100
Eth 40%+ AG 10 mg	1.380	102
Eth 80%+ AG 1 mg	1.313	99
Eth 80%+ AG 10 mg	1.331	101

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการดำเนินงานที่ 1.331 ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ 101 โยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.4 แสดงผลของการยับยั้งการก่อตัวของ CML ด้วยสารสกัดพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80% และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

สารสกัด	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร		อัตราการก่อตัวของ CML	
	เอทานอล 40%	เอทานอล 80%	เอทานอล 40%	เอทานอล 80%
ใบมะกรูด	1.428	1.420	106	107
ข่า	1.414	1.412	105	107
พริกหวานแดง	1.308	1.240	97	94
ถั่วพู	1.279	1.240	95	94
มะระขี้นก	1.272	1.261	94	95
มะเขือพวง	1.358	1.240	101	94
ใบแมงลัก	1.201	1.230	89	93
ขิง	1.284	1.134	95	86
กระชาย	1.212	1.153	90	87
พริกขี้หนู	1.151	1.178	85	89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.5 แสดงผลของการก่อตัว CMA ในตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้ง CMA ของสารสกัดใบแมงลัก 40% และ 80%

ตัวควบคุม	ค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร		อัตราการก่อตัวของ CMA	
	Eth 40%	Eth 80%	Eth 40%	Eth 80%
Dw 37° C	0.674	0.815	100	100
Dw -20° C	0.128	0.120	0	0
Eth 25% 37° C	0.663	0.776	100	100
Eth 25% -20° C	0.110	0.105	0	0
Eth 50% 37° C	0.627	0.791	100	100
Eth 50% -20° C	0.106	0.110	0	0
Eth 75% 37° C	0.603	0.783	100	100
Eth 75% -20° C	0.117	0.105	0	0
Dw+ AG 1 mg	0.634	0.804	94	99
Dw+ AG 10 mg	0.580	0.813	86	100
Eth 25% + AG 1 mg	0.596	0.810	90	104
Eth 25% + AG 10 mg	0.606	0.764	91	98
Eth 50% + AG 1 mg	0.599	0.795	95	101
Eth 50% + AG 10 mg	0.551	0.765	88	97
Eth 75% + AG 1 mg	0.608	0.764	100.8	97.6
Eth 75% + AG 10 mg	0.575	0.764	95	98

ตารางที่ ง.6 แสดงผลของการยับยั้งการก่อตัวของ CMA ด้วยสารสกัดใบแมงลัก ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

สารสกัด	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร				อัตราการก่อตัวของ CMA			
	Dw	Eth 25%	Eth 50%	Eth 75%	Dw	Eth 25%	Eth 50%	Eth 75%
ใบแมงลัก 40%	0.560	0.556	0.547	0.511	83	84	87	85
ใบแมงลัก 80%	0.788	0.773	0.768	0.822	97	100	97	105

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.7 แสดงผลของการก่อตัว CML ในตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้ง CML ของสารสกัดใบแมงลัก 40% และ 80%

ตัวควบคุม	ค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร		อัตราการก่อตัวของ CML	
	Eth 40%	Eth 80%	Eth 40%	Eth 80%
Dw 37° C	0.722	0.620	100	100
Dw -20° C	0.110	0.113	0	0
Eth 25% 37° C	0.580	0.617	100	100
Eth 25% -20° C	0.100	0.103	0	0
Eth 50% 37° C	0.501	0.673	100	100
Eth 50% -20° C	0.105	0.122	0	0
Eth 75% 37° C	0.620	0.619	100	100
Eth 75% -20° C	0.096	0.114	0	0
Dw + AG 1 mg	0.727	0.614	101	99
Dw + AG 10 mg	0.710	0.629	98	101
Eth 25% + AG 1 mg	0.706	0.602	122	97
Eth 25% + AG 10 mg	0.648	0.557	112	90
Eth 50% + AG 1 mg	0.708	0.591	141	88
Eth 50% + AG 10 mg	0.664	0.569	133	85
Eth 75% + AG 1 mg	0.614	0.529	133.6	85.4
Eth 75% + AG 10 mg	0.641	0.551	139	89

ตารางที่ ง.8 แสดงผลของการยับยั้งการก่อตัวของ CML ด้วยสารสกัดใบแมงลัก ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

สารสกัด	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร				อัตราการก่อตัวของ CML			
	Dw	Eth 25%	Eth 50%	Eth 75%	Dw	Eth 25%	Eth 50%	Eth 75%
ใบแมงลัก 40%	0.644	0.651	0.633	0.688	89	112	126	150
ใบแมงลัก 80%	0.547	0.534	0.562	0.602	88	87	84	97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.9 แสดงผลของการก่อตัว CMA ในตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้ง CMA ของสารสกัดพริกชี้หนู 40% และ 80%

ตัวควบคุม	ค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร		อัตราการก่อตัวของ CMA	
	Eth 40%	Eth 80%	Eth 40%	Eth 80%
Dw 37° C	0.949	1.353	100	100
Dw -20° C	0.108	0.125	0	0
Eth 25% 37° C	0.900	1.276	100	100
Eth 25% -20° C	0.102	0.118	0	0
Eth 50% 37° C	0.905	1.258	100	100
Eth 50% -20° C	0.108	0.118	0	0
Eth 75% 37° C	0.888	1.270	100	100
Eth 75% -20° C	0.100	0.116	0	0
Dw+ AG 1 mg	0.950	1.308	100	97
Dw+ AG 10 mg	0.859	1.264	90	93
Eth 25% + AG 1 mg	0.912	1.297	101	102
Eth 25% + AG 10 mg	0.871	1.226	97	96
Eth 50% + AG 1 mg	0.909	1.271	100	101
Eth 50% + AG 10 mg	0.820	1.237	91	98
Eth 75% + AG 1 mg	0.874	1.289	98.4	101.5
Eth 75% + AG 10 mg	0.811	1.223	91	96

ตารางที่ ง.10 แสดงผลของการยับยั้งการก่อตัวของ CMA ด้วยสารสกัดพริกชี้หนู ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

สารสกัด	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร				อัตราการก่อตัวของ CMA			
	Dw	Eth 25%	Eth 50%	Eth 75%	Dw	Eth 25%	Eth 50%	Eth 75%
พริกชี้หนู 40%	0.907	0.881	0.931	0.911	96	98	103	103
พริกชี้หนู 80%	1.281	1.287	1.299	1.313	95	101	103	103

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.11 แสดงผลของการก่อตัว CML ในตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้ง CML ของสารสกัดพริกชี้หนู 40% และ 80%

ตัวควบคุม	ค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร		อัตราการก่อตัวของ CML	
	Eth 40%	Eth 80%	Eth 40%	Eth 80%
Dw 37° C	0.738	1.041	100	100
Dw -20° C	0.095	0.124	0	0
Eth 25% 37° C	0.721	0.964	100	100
Eth 25% -20° C	0.093	0.116	0	0
Eth 50% 37° C	0.646	0.941	100	100
Eth 50% -20° C	0.097	0.120	0	0
Eth 75% 37° C	0.651	0.960	100	100
Eth 75% -20° C	0.090	0.110	0	0
Dw+ AG 1 mg	0.735	0.978	100	94
Dw+ AG 10 mg	0.700	0.976	95	94
Eth 25% + AG 1 mg	0.685	0.918	95	95
Eth 25% + AG 10 mg	0.689	0.934	96	97
Eth 50% + AG 1 mg	0.679	0.908	105	96
Eth 50% + AG 10 mg	0.627	0.912	97	97
Eth 75% + AG 1 mg	0.666	0.877	102.4	91.3
Eth 75% + AG 10 mg	0.655	0.894	101	93

ตารางที่ ง.12 แสดงผลของการยับยั้งการก่อตัวของ CML ด้วยสารสกัดพริกชี้หนู ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80% ที่ผ่านการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

สารสกัด	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 492 นาโนเมตร				อัตราการก่อตัวของ CML			
	Dw	Eth 25%	Eth 50%	Eth 75%	Dw	Eth 25%	Eth 50%	Eth 75%
พริกชี้หนู 40%	0.680	0.655	0.645	0.659	92	91	100	101
พริกชี้หนู 80%	0.894	0.907	0.882	0.961	86	94	94	100

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ One-way ANOVA

การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ IBM SPSS Statistics version วิเคราะห์ผลความแปรปรวนทางสถิติการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง CMA และ CML โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัวทั้ง 10 ชนิดด้วยเทคนิค ELISA ด้วย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's multiple range test

ตารางที่ จ.1 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CMA โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว 10 ชนิด คือ กระชาย, ข่า, ขิง, ถั่วพู, พริกขี้หนู, พริกหวานแดง, ใบมะกรูด, ใบแมงลัก, มะระขี้นก และมะเขือพวง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

Duncan ^a		Subset for alpha = 0.05			
Sample	N	1	2	3	
Eth40% -20C	3	.0987			
DW-20C	3	.1053			
มะเขือพวง40%	3		.6200		
กระชาย40%	3		.7987	.7987	
พริกขี้หนู40%	3		.8080	.8080	
ใบแมงลัก40%	3			.8657	
ขิง40%	3			.8853	
ถั่วพู40%	3			.8887	
ข่า40%	3			.8907	
มะระขี้นก40%	3			.9043	
Eth40%+AG 10 mg	3			.9177	
AG 10 mg	3			.9193	
พริกหวานแดง40%	3			.9210	
Eth40%+AG 1 mg	3			.9267	
ใบมะกรูด 40%	3			.9407	
DW37C	3			.9643	
AG 1 mg	3			.9690	
Eth40% 37C	3			.9807	
Sig.		.945	.070	.121	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารทสงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.2 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CMA โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว 10 ชนิด คือ กระชาย, ข่า, ขิง, ถั่วพู, พริกขี้หนู, พริกหวานแดง, ใบมะกรูด, ใบแมงลัก, มะระขี้นก และมะเขือพวง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80% โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

Duncan^a

Subset for alpha = 0.05

Sample	N	1	2	3	4	5	6	7
Eth80% -20C	3	.1037						
DW-20C	3	.1053						
ขิง80%	3		.7623					
ใบแมงลัก80%	3		.7653					
กระชาย80%	3		.8033					
พริกขี้หนู80%	3		.8107	.8107				
มะเขือพวง80%	3			.8543	.8543			
มะระขี้นก80%	3			.8563	.8563			
ถั่วพู80%	3				.8717	.8717		
พริกหวานแดง80%	3				.8763	.8763		
ข่า80%	3				.8967	.8967		
Eth80% 37C	3					.9093	.9093	
AG 10 mg	3					.9193	.9193	.9193
ใบมะกรูด 80%	3					.9207	.9207	.9207
Eth80%+AG 1 mg	3						.9587	.9587
DW37C	3							.9643
Eth80%+AG 10 mg	3							.9683
AG 1 mg	3							.9690
Sig.		.944	.067	.073	.116	.074	.061	.070

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.3 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CML โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว 10 ชนิด คือ กระชาย, ข่า, ขิง, ถั่วพู, พริกขี้หนู, พริกหวานแดง, ใบมะกรูด, ใบแมงลัก, มะระขี้นก และมะเขือพวง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

Duncan^a

Sample	N	Subset for alpha = 0.05											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Eth 40% -20C	3	.1180											
DW -20C	3	.1223											
พริกขี้หนู40%	3		1.1513										
ใบแมงลัก40%	3		1.2013										
กระชาย40%	3		1.2123	1.2123									
มะระขี้นก40%	3			1.2717	1.2717								
ถั่วพู40%	3				1.2787								
ขิง40%	3				1.2837	1.2837							
พริกหวานแดง40%	3				1.3077	1.3077	1.3077						
Eth40%+AG 1 mg	3					1.3440	1.3440	1.3440					
Eth 40% 37C	3					1.3477	1.3477	1.3477	1.3477				
มะเขือพวง40%	3						1.3583	1.3583	1.3583				
Eth40%+AG 10 mg	3							1.3800	1.3800	1.3800			
DW 37C	3							1.3820	1.3820	1.3820			
ข่า40%	3								1.4137	1.4137	1.4137		
ใบมะกรูด40%	3										1.4280	1.4280	
AG 1 mg	3											1.4397	1.4397
AG 10 mg	3												1.4543
Sig.		.884	.058	.052	.275	.054	.126	.261	.052	.078	.218		

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.4 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CML โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว 10 ชนิด คือ กระชาย, ข่า, ขิง, ถั่วพู, พริกขี้หนู, พริกหวานแดง, ใบมะกรูด, ใบแมงลัก, มะระขี้นก และมะเขือพวง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80% โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

Duncan^a

Sample	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
DW -20C	3	.1223							
Eth 80% -20C	3	.1253							
ขิง80%	3		1.1340						
กระชาย80%	3		1.1533						
พริกขี้หนู80%	3		1.1783						
พริกหวานแดง80%	3			1.2397					
ถั่วพู80%	3			1.2397					
มะเขือพวง80%	3			1.2400					
ใบแมงลัก80%	3			1.2403					
มะระขี้นก80%	3			1.2607	1.2607				
Eth80%+AG 1 mg	3				1.3133	1.3133			
Eth 80% 37C	3					1.3230			
Eth80%+AG 10 mg	3					1.3313	1.3313		
DW 37C	3						1.3820	1.3820	
ข่า80%	3							1.4017	1.4017
ใบมะกรูด80%	3							1.4203	1.4203
AG 1 mg	3							1.4397	1.4397
AG 10 mg	3								1.4543
Sig.		.910	.120	.486	.053	.526	.063	.051	.075

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.5 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CMA โดยใช้สารสกัดจากใบแมงลัก ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

Duncan^a

Sample	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Eth25% -20C	3	.1010							
Eth75% -20C	3	.1043							
Eth50% -20C	3	.1107							
DW -20C	3	.1160							
ใบแมงลัก40%+ Eth50%	3		.6330						
ใบแมงลัก40%+ Eth75%	3		.6413	.6413					
ใบแมงลัก40% +Eth25%	3		.6463	.6463	.6463				
Eth50%+ AG 10 mg	3		.6467	.6467	.6467				
Eth25%+ AG 10 mg	3		.6507	.6507	.6507	.6507			
Eth75%+ AG 1 mg	3		.6563	.6563	.6563	.6563			
ใบแมงลัก40% +DW	3			.6677	.6677	.6677			
Eth75%+ AG 10 mg	3				.6737	.6737	.6737		
Dw+AG 10 mg	3				.6747	.6747	.6747		
Eth75% 37C	3				.6750	.6750	.6750		
Eth50%+ AG 1 mg	3					.6767	.6767		
Eth25% +AG 1 mg	3						.6987	.6987	
Eth25% 37C	3							.7050	
Eth50% 37C	3							.7077	
DW +AG 1 mg	3							.7127	
DW 37C	3								.7570
Sig.		.294	.118	.077	.060	.085	.088	.328	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.6 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CMA โดยใช้สารสกัดจากใบแมงลัก ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

Duncan^a

Sample	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Eth25% -20C	3	.1063						
Eth75% -20C	3	.1100						
Eth50% -20C	3	.1113						
DW -20C	3	.1263						
Eth50%+ AG 10 mg	3		.7740					
Eth75%+ AG 10 mg	3		.7917	.7917				
Eth25%+ AG 10 mg	3		.7943	.7943	.7943			
Eth75% 37C	3		.7983	.7983	.7983			
Eth50%+ AG 1 mg	3		.8007	.8007	.8007	.8007		
Eth75%+ AG 1 mg	3		.8030	.8030	.8030	.8030		
Dw + AG 10 mg	3		.8037	.8037	.8037	.8037		
ใบแมงลัก80%+ Eth50%	3		.8080	.8080	.8080	.8080	.8080	
Eth50% 37C	3			.8093	.8093	.8093	.8093	
ใบแมงลัก80% +DW	3			.8167	.8167	.8167	.8167	.8167
ใบแมงลัก80% + Eth25%	3			.8223	.8223	.8223	.8223	.8223
Eth25% 37C	3				.8287	.8287	.8287	.8287
Eth25% +AG 1 mg	3				.8293	.8293	.8293	.8293
ใบแมงลัก80%+ Eth75%	3					.8340	.8340	.8340
DW +AG 1 mg	3						.8390	.8390
DW 37C	3							.8490
Sig.		.223	.052	.084	.050	.061	.076	.062

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.7 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CML โดยใช้สารสกัดจากใบแมงลัก ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

Duncan^a

Sample	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Eth25% -20C	3	.1063								
Eth75% -20C	3	.1067								
Eth50% -20C	3	.1130								
DW -20C	3	.1150								
ใบแมงลัก40%+ Eth50%	3		.5950							
ใบแมงลัก40%+ Eth75%	3		.6137	.6137						
ใบแมงลัก40% +Eth25%	3		.6407	.6407	.6407					
ใบแมงลัก40% +DW	3			.6547	.6547	.6547				
Eth50% 37C	3			.6673	.6673	.6673				
Eth75%+ AG 1 mg	3			.6697	.6697	.6697	.6697			
Eth75%+ AG 10 mg	3				.6767	.6767	.6767	.6767		
Eth50%+ AG 1 mg	3				.6790	.6790	.6790	.6790		
Eth25% +AG 1 mg	3				.6870	.6870	.6870	.6870		
Eth50%+ AG 10 mg	3				.6913	.6913	.6913	.6913		
Eth25%+ AG 10 mg	3					.7133	.7133	.7133	.7133	
Eth75% 37C	3						.7293	.7293	.7293	.7293
Dw+AG 10 mg	3							.7340	.7340	.7340
DW +AG 1 mg	3							.7363	.7363	.7363
Eth25% 37C	3								.7513	.7513
DW 37C	3									.7813
Sig.		.767	.106	.061	.104	.060	.053	.055	.204	.082

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.8 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CML โดยใช้สารสกัดจากใบแมงลัก ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

Sample	N	Duncan ^a	
		Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Eth75% -20C	3	.0957	
Eth25% -20C	3	.0997	
Eth50% -20C	3	.1023	
DW -20C	3	.1097	
Eth75% 37C	3		.4700
Eth50% 37C	3		.5010
DW +AG 1 mg	3		.5153
Eth25% 37C	3		.5803
Eth75%+ AG 1 mg	3		.6143
ใบแมงลัก80%+ Eth50%	3		.6330
Eth75%+ AG 10 mg	3		.6410
ใบแมงลัก80% +DW	3		.6437
Eth25%+ AG 10 mg	3		.6477
ใบแมงลัก80% +Eth25%	3		.6507
Eth50%+ AG 10 mg	3		.6643
ใบแมงลัก80%+ Eth75%	3		.6883
Eth25% +AG 1 mg	3		.7063
Eth50%+ AG 1 mg	3		.7077
Dw+AG 10 mg	3		.7097
DW 37C	3		.7220
Sig.		.912	.072

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.9 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CMA โดยใช้สารสกัดจากพริกขี้หนู ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

Duncan^a

Sample	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Eth75% -20C	3	.1003						
Eth25% -20C	3	.1017						
DW -20C	3	.1077						
Eth50% -20C	3	.1077						
Eth75%+ AG 10 mg	3		.8113					
Eth50%+ AG 10 mg	3		.8197					
Dw+AG 10 mg	3			.8587				
Eth25%+ AG 10 mg	3			.8610				
Eth75%+ AG 1 mg	3			.8740	.8740			
พริกขี้หนู40% +Eth25%	3			.8807	.8807	.8807		
Eth75% 37C	3			.8883	.8883	.8883		
Eth25% 37C	3				.9000	.9000	.9000	
Eth50% 37C	3					.9053	.9053	
พริกขี้หนู40% +DW	3					.9073	.9073	
Eth50%+ AG 1 mg	3					.9087	.9087	
พริกขี้หนู40%+ Eth75%	3					.9113	.9113	
Eth25% +AG 1 mg	3					.9120	.9120	
พริกขี้หนู40%+ Eth50%	3						.9313	.9313
DW 37C	3							.9493
DW +AG 1 mg	3							.9497
Sig.		.629	.544	.057	.087	.053	.051	.211

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.10 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CMA โดยใช้สารสกัดจากพริกขี้หนู ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

Duncan^a

Sample	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Eth75% -20C	3	.1157								
Eth25% -20C	3	.1183								
Eth50% -20C	3	.1183								
DW -20C	3	.1253								
Eth75%+ AG 10 mg	3		1.2233							
Eth25%+ AG 10 mg	3		1.2263	1.2263						
Eth50%+ AG 10 mg	3		1.2367	1.2367	1.2367					
Eth50% 37C	3			1.2580	1.2580	1.2580				
Dw+AG 10 mg	3				1.2640	1.2640	1.2640			
Eth75% 37C	3				1.2703	1.2703	1.2703			
Eth50%+ AG 1 mg	3				1.2710	1.2710	1.2710			
Eth25% 37C	3					1.2760	1.2760	1.2760		
พริกขี้หนู80% +DW	3						1.2810	1.2810	1.2810	1.2810
พริกขี้หนู80% +Eth25%	3							1.2867	1.2867	1.2867
Eth75%+ AG 1 mg	3								1.2893	1.2893
Eth25% +AG 1 mg	3									1.2967
พริกขี้หนู80%+ Eth50%	3									1.2990
DW +AG 1 mg	3									1.3077
พริกขี้หนู80%+ Eth75%	3									1.3130
DW 37C	3									1.3527
Sig.		.577	.425	.060	.053	.090	.061	.084	.080	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.11 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CML โดยใช้สารสกัดจากพริกขี้หนู ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

Duncan^a

Sample	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Eth75% -20C	3	.0897								
Eth25% -20C	3	.0927								
DW -20C	3	.0950								
Eth50% -20C	3	.0973								
Eth50%+ AG 10 mg	3		.6273							
พริกขี้หนู40%+ Eth50%	3		.6450	.6450						
Eth50% 37C	3		.6457	.6457						
Eth75% 37C	3		.6510	.6510	.6510					
พริกขี้หนู40% +Eth25%	3		.6553	.6553	.6553	.6553				
Eth75%+ AG 10 mg	3		.6553	.6553	.6553	.6553				
พริกขี้หนู40%+ Eth75%	3		.6593	.6593	.6593	.6593				
Eth75%+ AG 1 mg	3			.6663	.6663	.6663				
Eth50%+ AG 1 mg	3			.6790	.6790	.6790	.6790			
พริกขี้หนู40% +DW	3				.6800	.6800	.6800			
Eth25% +AG 1 mg	3				.6847	.6847	.6847			
Eth25%+ AG 10 mg	3					.6893	.6893			
Dw+AG 10 mg	3						.7003	.7003		
Eth25% 37C	3							.7210	.7210	
DW +AG 1 mg	3								.7353	
DW 37C	3									.7377
Sig.		.638	.063	.050	.053	.050	.201	.165	.289	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.12 การทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการก่อตัวของ CML โดยใช้สารสกัดจากพริกขี้หนู ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 80% หลังจากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

Duncan^a

Sample	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Eth75% -20C	3	.1100						
Eth25% -20C	3	.1157						
Eth50% -20C	3	.1203						
DW -20C	3	.1243						
Eth75%+ AG 1 mg	3		.8767					
พริกขี้หนู80%+ Eth50%	3		.8820	.8820				
Eth75%+ AG 10 mg	3		.8940	.8940				
พริกขี้หนู80% +DW	3		.8943	.8943				
พริกขี้หนู80% +Eth25%	3		.9067	.9067	.9067			
Eth50%+ AG 1 mg	3		.9083	.9083	.9083			
Eth50%+ AG 10 mg	3		.9120	.9120	.9120			
Eth25% +AG 1 mg	3			.9180	.9180			
Eth25%+ AG 10 mg	3				.9343	.9343		
Eth50% 37C	3				.9413	.9413	.9413	
Eth75% 37C	3				.9603	.9603	.9603	
พริกขี้หนู80%+ Eth75%	3				.9607	.9607	.9607	
Eth25% 37C	3				.9640	.9640	.9640	
Dw+AG 10 mg	3						.9763	
DW +AG 1 mg	3						.9780	
DW 37C	3							1.0407
Sig.		.460	.085	.079	.087	.136	.070	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

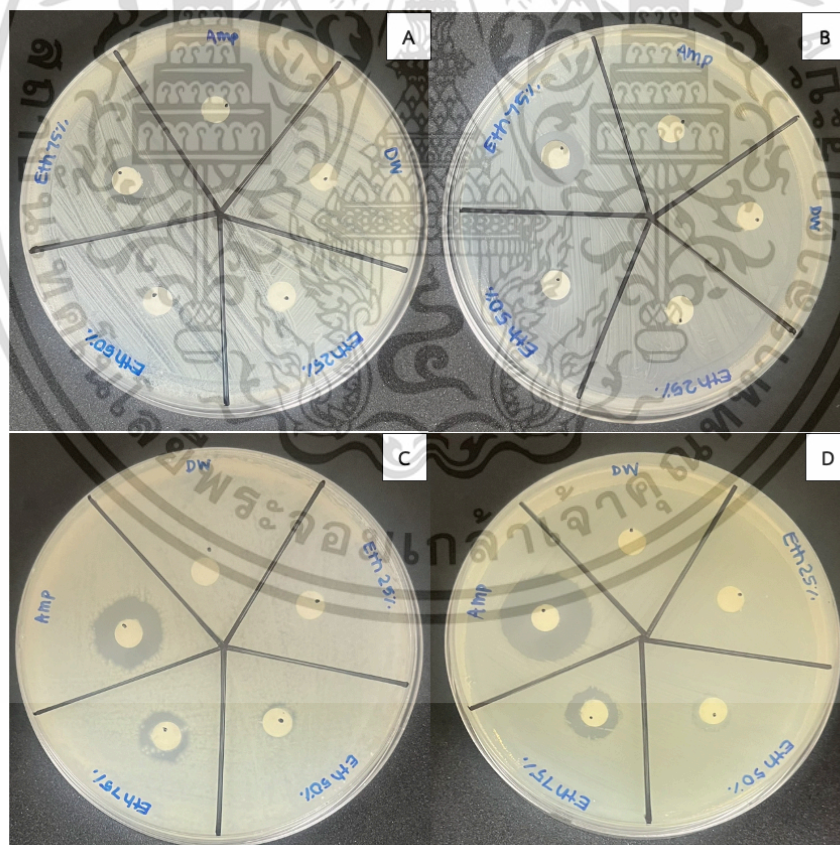
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคด้วยวิธี Agar disc diffusion

ตารางที่ ฉ.1 ผลทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคด้วยยาปฏิชีวนะและตัวควบคุม

เชื้อทดสอบ	บริเวณที่ยับยั้งได้ (มม.)				
	Ampicillin	Dw	Eth 25 %	Eth 50 %	Eth 75 %
<i>S. aureus</i>	23	-	-	-	6
<i>B. subtilis</i>	6	-	-	-	4
<i>E. coli</i>	14	-	-	3	4
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	2	7

หมายเหตุ

- เส้นผ่านศูนย์กลางของกระดาษกรอง มีขนาด 6 มม.
- เครื่องหมาย “-” ไม่มีการยับยั้ง



รูปที่ ฉ.1 แสดงบริเวณการยับยั้งของยาปฏิชีวนะและตัวควบคุม

A) *S. aureus*, B) *P. aeruginosa*, C) *B. subtilis* และ D) *E. coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ ๑.2 สูตรอาหาร Nutrient agar (NA)

สารเคมี	ปริมาณ
อาหาร Nutrient Agar	1 L
ประกอบด้วย	
- Nutrient broth	8 g/L
- ผงวุ้น	15 g/L
- น้ำกลั่น	1,000 mL

ชั่งอาหาร Nutrient broth 8 g และชั่งผงวุ้น 15 g เติมน้ำกลั่นปริมาณ 1 L ละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน ที่อุณหภูมิ 121° C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ

ตารางที่ ๑.3 สูตรอาหาร Mueller Hinton Agar

สารเคมี	ปริมาณ
อาหาร Mueller Hinton สำเร็จรูป	21 g/L
ประกอบด้วย	
- Beef Extract Powder	2 g/L
- Acid Digest of Casein	17.5 g/L
- Soluble Starch	1.5 g/L
Agar	15 g/L

ชั่งอาหาร 21 g เติมน้ำกลั่นปริมาณ 1 L ละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน ที่อุณหภูมิ 121° C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลาย Normal saline 0.85%

ตารางที่ ๑.4 ส่วนประกอบ Normal saline 0.85%

สารเคมี	ปริมาณ
Sodium Chloride (NaCl)	8.5 g/L

ชั่ง NaCl 8.5 g เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 L. ละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน ที่อุณหภูมิ 121° C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลาย McFarland Standard No.0.5

ตารางที่ ๑.5 ส่วนประกอบ McFarland Standard No.0.5

สารเคมี	ปริมาณ
Conc. H ₂ SO ₄ 1%	8.5 g/L
Barium Chloride Dihydrate (BaCl ₂ ·2H ₂ O)	995 mL

การเตรียมสารละลาย

เตรียม Conc. H₂SO₄ ปริมาตร 10 mL เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 L และเตรียม BaCl₂·2H₂O 1 g ละลายให้น้ำกลั่น 100 mL จากนั้นนำสารละลาย Conc. H₂SO₄ ปริมาตร 995 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย BaCl₂·2H₂O ปริมาตร 5 mL คนให้เข้ากัน และนำมาบรรจุใส่หลอดทดลองปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ในที่มืดที่ อุณหภูมิ 2-30 °C เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนใช้งาน และตรวจสอบความขุ่นทุกเดือน

การเตรียมสารละลายกลีเซอรอล 20%

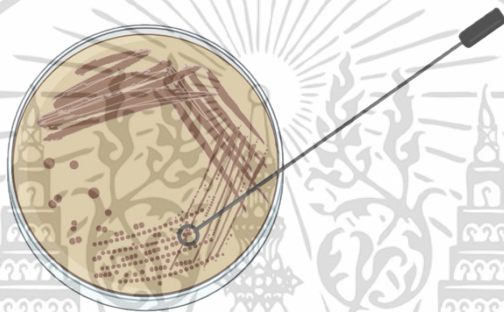
ตารางที่ ๑.6 ส่วนประกอบของ สารละลายกลีเซอรอล 20%

สารเคมี	ปริมาณ
Glycerol	20 mL/100 mL
น้ำกลั่น	80 mL

ทำการตวง Glycerol 20 mL เติมน้ำกลั่น 80 mL คนส่วนผสมให้เข้ากัน และนำมาบรรจุใส่หลอด ไมโครเซนติพิวก์ปิดฝาให้สนิท นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน ที่อุณหภูมิ 121° C ความดัน 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ-7 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ Cross streak

1. เตรียมอาหาร Mueller Hinton Agar สำหรับเลี้ยงเชื้อ
2. ใช้ลูปเขี่ยเชื้อเผาไฟให้ร้อนแดง พักทิ้งไว้ประมาณ 10-15 วินาที รอให้เย็น
3. ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากจานเพาะเลี้ยงมา 1-2 โคโลนี จากนั้นลากเส้นเป็นระนาบเดียวกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4-5 เส้น
4. เผาลูปเพื่อฆ่าเชื้อทุกครั้ง จากนั้นลากเชื้อจากรอยขีดแรกมายังรอยขีดที่สอง ให้ตั้งฉากกับรอยขีดแรกโดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับกับเส้นแรก ทำเช่นเดียวกันประมาณ 3-4 ระนาบ
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญ เป็นเวลา 24-48 ชม.
6. จากนั้นนำเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวไปศึกษารูปร่างลักษณะ



รูปที่ ฉ.7 แสดงลักษณะวิธีการ Cross streak

แหล่งที่มา: <https://app.biorender.com/illustrations/66223d89230ed99da0226c7b>

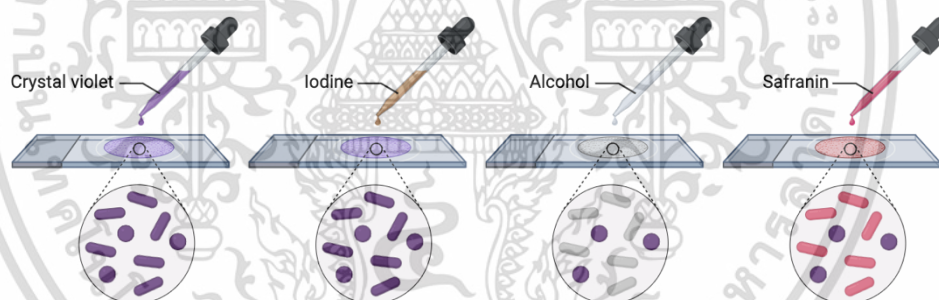
ฉ-8 การย้อมสีแกรม (Gram staining)

การย้อมแกรม (Gram staining) เป็นเทคนิคหนึ่งในการย้อมสีเซลล์ของแบคทีเรีย เพื่อศึกษารูปร่างลักษณะ และจัดจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) และแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) เนื่องจากโครงสร้างผนังเซลล์ (Cell wall) มีความแตกต่างกัน จึงทำให้การติดสีเซลล์มีความต่างกัน ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวก จะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) และแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของซาฟรานิน (Safranin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการย้อมแกรม มีดังนี้

1. เตรียมสไลด์สำหรับการย้อมแกรม โดยทำการล้างสไลด์ด้วยน้ำยาซักล้าง และล้างด้วยน้ำสะอาด เช็ดให้แห้ง เพื่อไม่ให้มีฝุ่นหรือคราบไขมันเกาะบนสไลด์
2. หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนสไลด์ประมาณ 1 หยด จากนั้นใช้ลูบเชี่ยเชื้อลงบนสไลด์ที่เตรียมไว้ และเกลี่ยเชื้อให้กระจาย (Smear) จนเกิดเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ พักทิ้งไว้ให้แห้ง
3. ทำการตรึงเชื้อ (Fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ โดยการนำสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อทิ้งไว้จนแห้ง แล้วนำไปผ่านไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง เพื่อให้เชื้อไม่หลุดออกขณะย้อมสี
4. หยดสีคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเททิ้ง
5. หยดสารละลายไอโอดีน (Iodine) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที เติสารละลายที่สารละลายไอโอดีนจะทำหน้าที่เป็น มอแดนต์ (mordant) ช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมให้ดีขึ้น
6. ล้างสีออกด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 95% (Ethyl alcohol) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อเป็นเวลาประมาณ 15 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น
7. หยดสีซาฟรานิน (Safranin) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 15-30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์



รูปที่ ๘.8 แสดงขั้นตอนการย้อมแกรม

แหล่งที่มา: <https://app.biorender.com/illustrations/66223d89230ed99da0226c7b>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

รูปการทดลอง



รูปที่ ข.1 แสดงลักษณะพืชสวนครัว 10 ชนิด

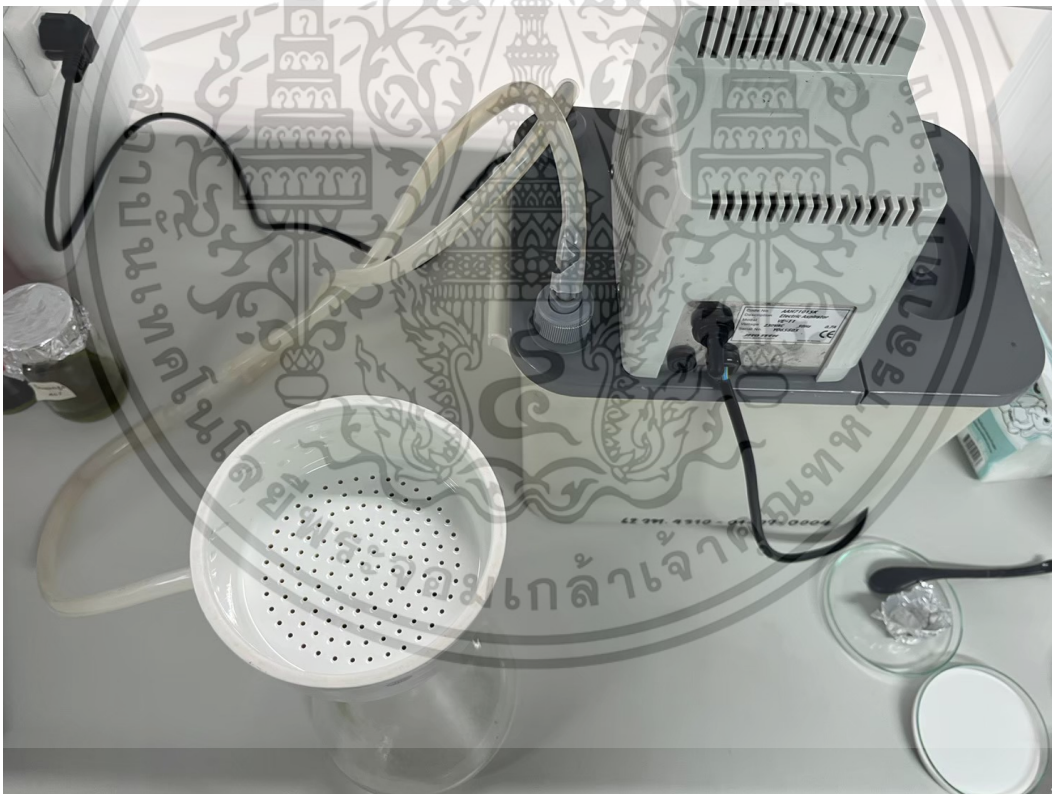


รูปที่ ข.2 แสดงลักษณะพืชสวนครัวขณะปั่นด้วยเครื่องปั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.3 แสดงลักษณะสารสกัดเมื่อบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง



รูปที่ ข.4 แสดงลักษณะเครื่องทำสุญญากาศ และชุดกรองบุชเนอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.5 แสดงลักษณะการทำงานของเครื่องทำสุญญากาศ และชุดกรองบูชเนอร์

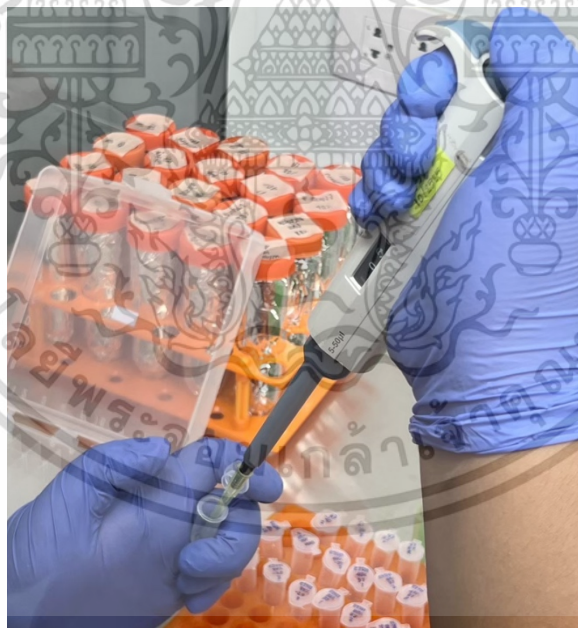


รูปที่ ข.6 แสดงลักษณะการกรองของเครื่องกรองสุญญากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

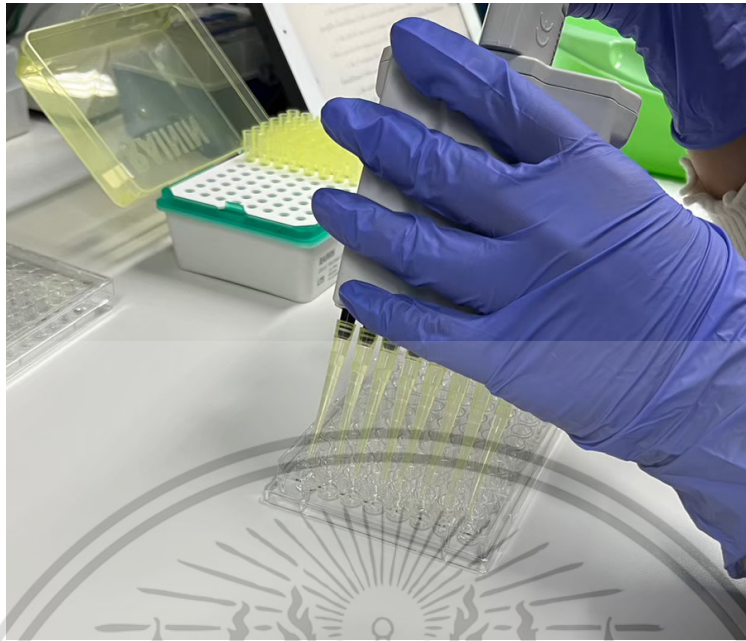


รูปที่ ข.7 แสดงลักษณะขั้นตอนการเตรียมชุดจำลองปฏิบัติการ



รูปที่ ข.8 แสดงลักษณะขั้นตอนการเตรียมชุดทำปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

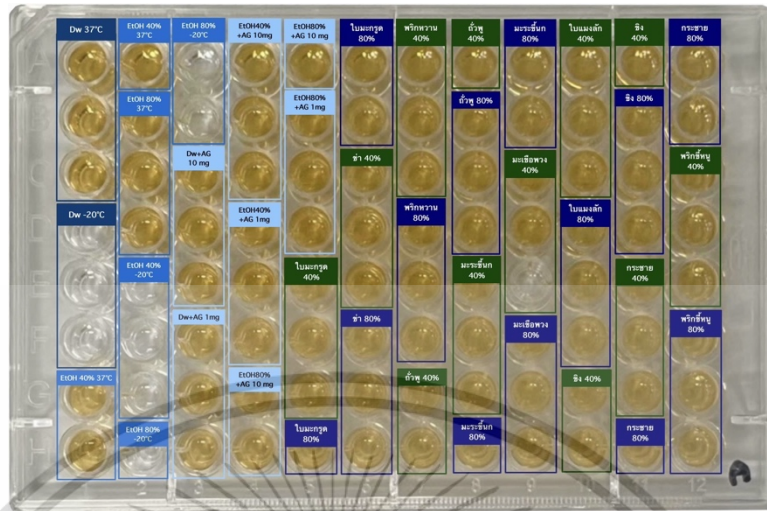


รูปที่ ข.9 แสดงลักษณะขั้นตอนการทำ ELISA

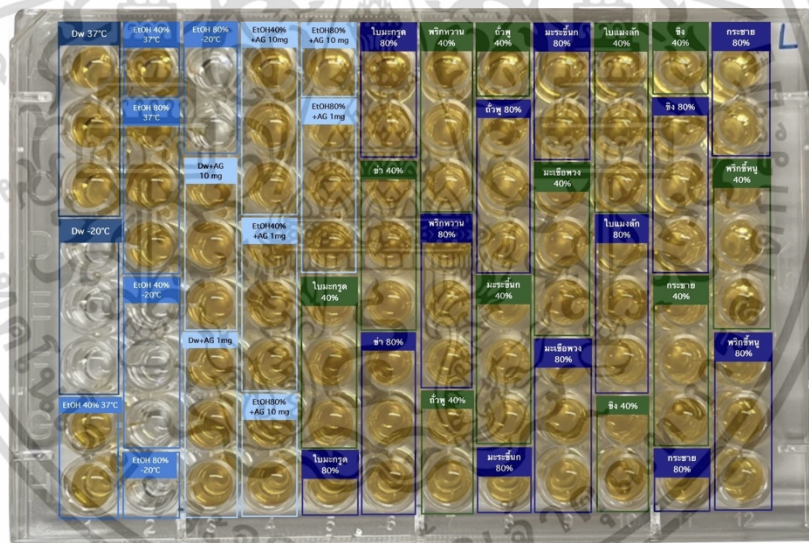


รูปที่ ข.10 แสดงลักษณะการเกิดสีของปฏิกิริยาการเรืองแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

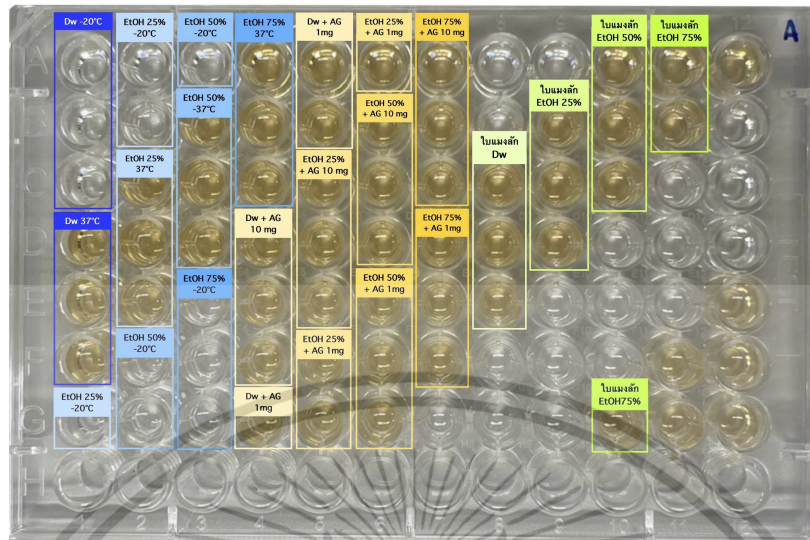


รูปที่ ข.11 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดพืชสวนครัว 10 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80 ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CMA

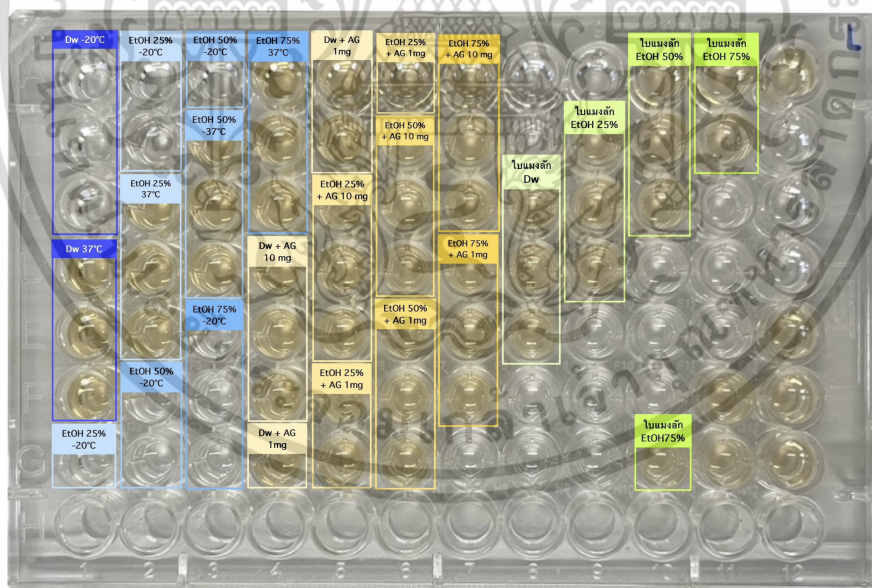


รูปที่ ข.12 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดพืชสวนครัว 10 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 40% และ 80 ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CML

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

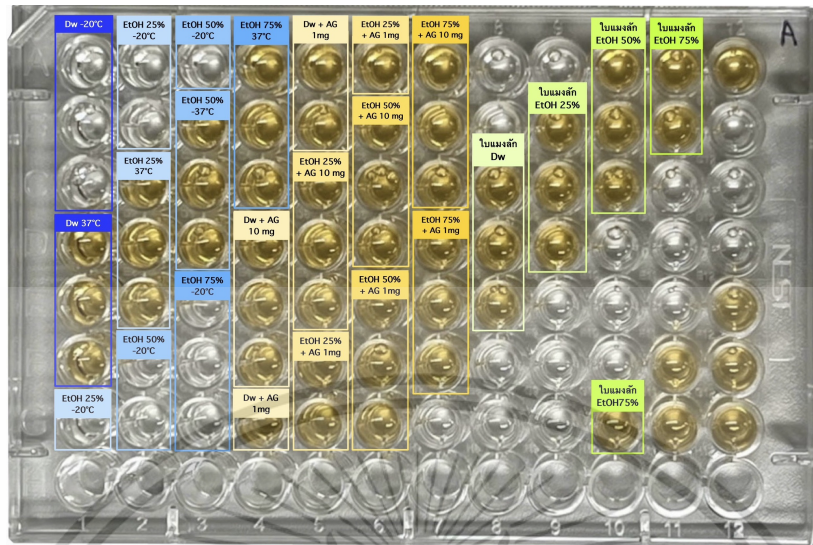


รูปที่ ข.13 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดใบแมงลัก 40% ที่นำมาแยกคอลัมน์ ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CMA

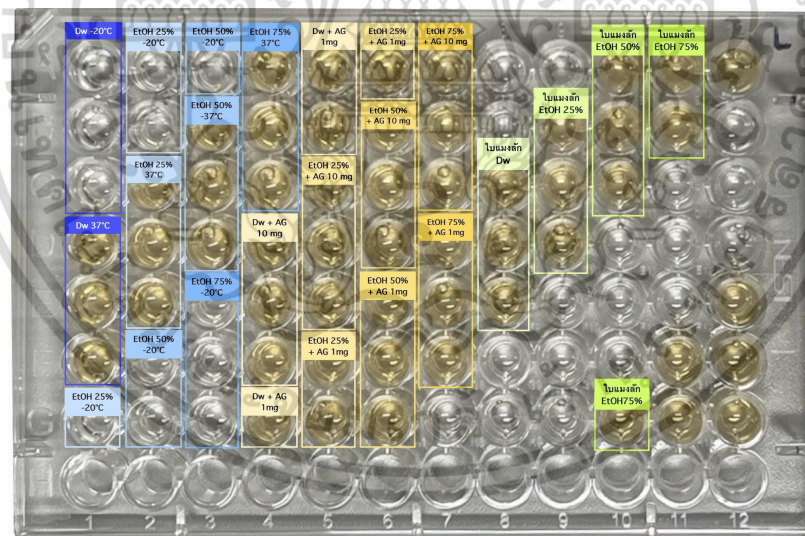


รูปที่ ข.14 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดใบแมงลัก 40% ที่นำมาแยกคอลัมน์ ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CML

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

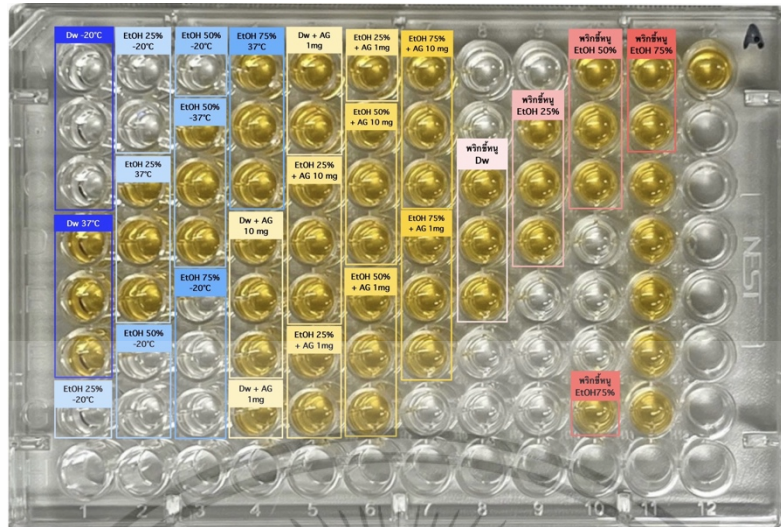


รูปที่ ข.15 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดใบแมงลัก 80% ที่นำมาแยกคอลัมน์ ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CMA

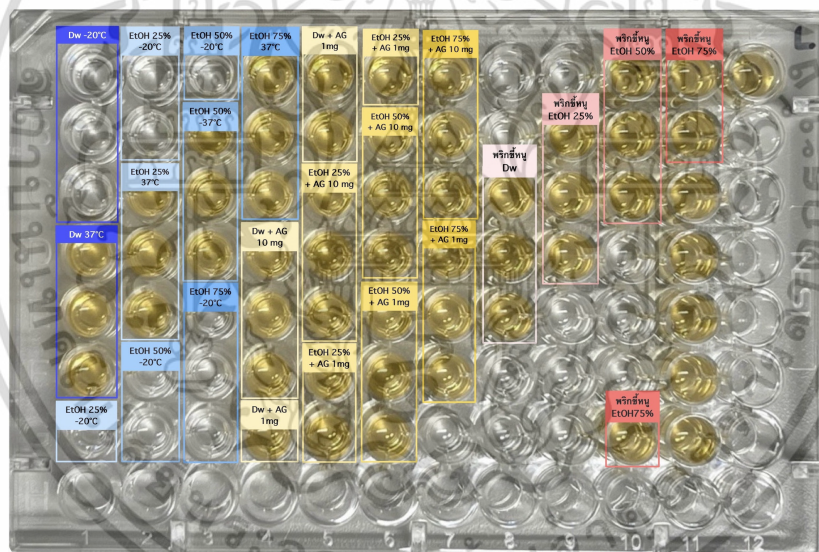


รูปที่ ข.16 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดใบแมงลัก 80% ที่นำมาแยกคอลัมน์ ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CML

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

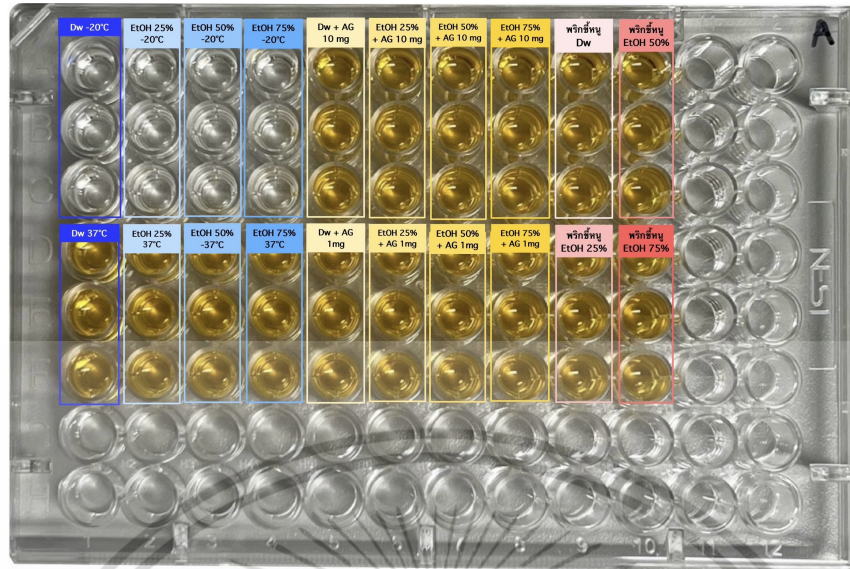


รูปที่ ข.17 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดพริกชี้หนู 40% ที่นำมาแยกคอลลิมน ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CMA

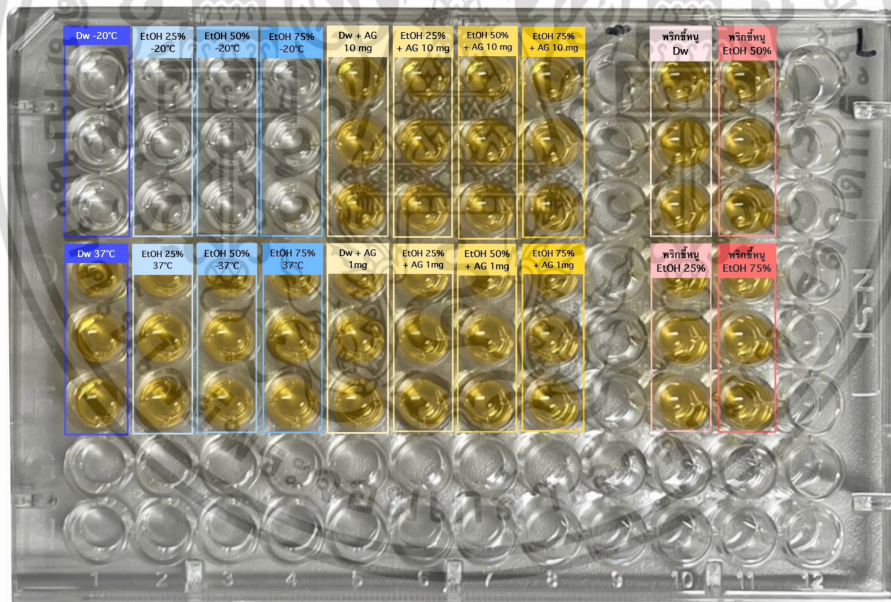


รูปที่ ข.18 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดพริกชี้หนู 40% ที่นำมาแยกคอลลิมน ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CML

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

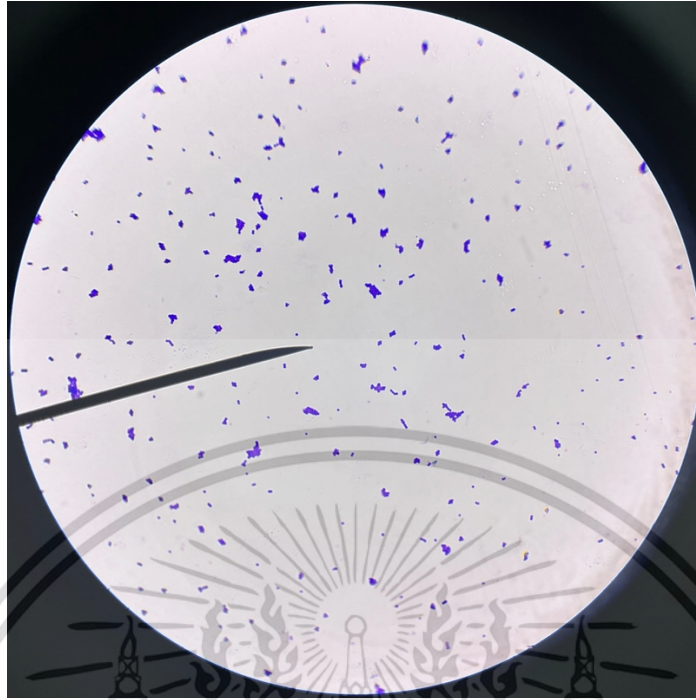


รูปที่ ข.19 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดพริกชี้หนู 80% ที่นำมาแยกคอลัมน์ ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CMA



รูปที่ ข.20 ELISA Plate แสดงผลการเกิดสีของกลุ่มควบคุมและสารสกัดพริกชี้หนู 80% ที่นำมาแยกคอลัมน์ ต่อผลการยับยั้งอัตราการก่อตัวของ CML

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

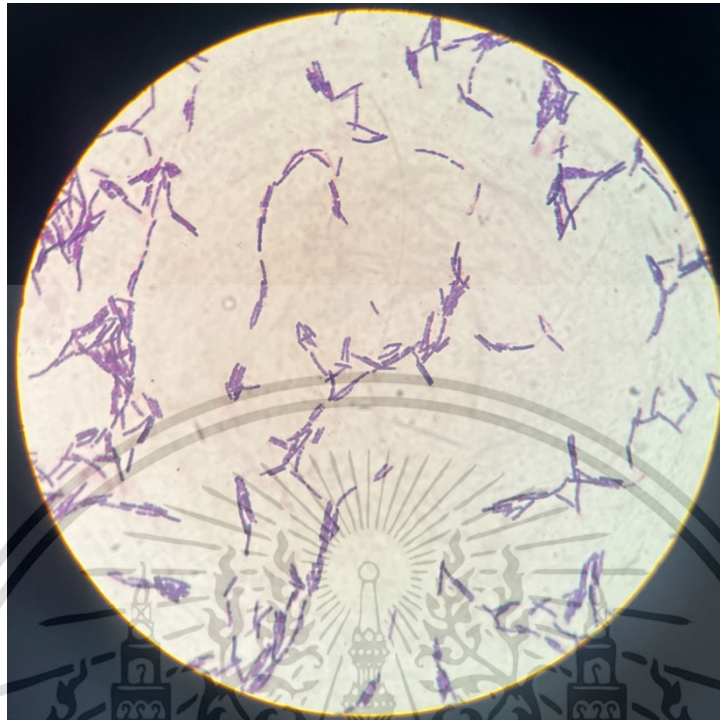


รูปที่ ข.21 แสดงลักษณะของเชื้อ *S. aureus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ ข.22 แสดงลักษณะของเชื้อ *E. coli* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.23 แสดงลักษณะของเชื้อ *B. subtilis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



เอกสารรูปที่ ข.24 แสดงลักษณะของเชื้อ *P. aeruginosa* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 13 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2567

ข้าพเจ้า นางสาว นาดยา น้อยหิรัญ รหัสประจำตัว 63050493
นางสาว นุสรุา หรัมย์ณี รหัสประจำตัว 63050494

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่า
โครงการพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแอดวานซ์ไกลเคชันและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค
โดยใช้สารสกัดจากพืชสวนครัว

ชื่อภาษาอังกฤษ

Study on anti-advanced glycation end products (AGEs) activity
and Antimicrobial by using Thai garden plants.

ปีการศึกษา

2566

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว
และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษฉบับ
สมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ 0.14%

ลงชื่อ.....

(นางสาว นาดยา น้อยหิรัญ)

นักศึกษา

ลงชื่อ.....

(นางสาว นุสรุา หรัมย์ณี)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.วิภาวี เดชตติศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษของนักศึกษา
ข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....

(ผศ.ดร.วิภาวี เดชตติศักดิ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้