รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสการเป็นพิษต่อเซลล์จากต้นยูคาลิปตัส

Antivirus and Cytotoxicity Effect of *Eucalyptus tereticornis*

นางสาวธนาวดี ก่ออานันต์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย (เงินรายได้) ประจำปี 2559

b00264204
RC00007

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสการเป็นพิษต่อเซลล์จากต้นยูคาลิปตัส

Antivirus and Cytotoxicity Effect of *Eucalyptus tereticornis*

นางสาวธนาวดี ก่ออานันต์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย (เงินรายได้) ประจำปี 2559

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสการเป็นพิษต่อเซลล์จากต้น *Eucalyptus tereticornis*

แหล่งเงินทุน : ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภท เงินอุดหนุนทั่วไป(เงินรายได้)

ประจำปี 2559 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2560

บทคัดย่อภาษาไทย

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และการเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากใบยูคาลิปตัส สายพันธุ์ *Eucalyptus tereticornis* ที่สกัดด้วยตัวละลาย เฮกเซน อะซิโตน และเมทานอล ด้วยเครื่องอัลตราโซนิก ระยะเวลาสกัด 30 นาที อุณหภูมิ 40°C พบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย สารสกัดจากใบยูคาลิปตัสที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน อะซิโตน และเมทานอล ทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วยวิธี broth microdilution สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์ได้ เช่น *Bacillus subtilis* ได้ดีกว่าการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonell typhimurium* และ *Vibrio parahaemolyticus*, สามารถยับยั้งการเจริญของรา *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus* และ *A. phoenicis*, สามารถยับยั้งการเจริญของไวรัส HSV-1 ได้ มีค่าการยับยั้ง 24.42 % เมื่อใช้สารสกัดเข้มข้น 5.56 μg/mL และสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามินิเดสจากไวรัส H5N1 ได้ดีเมื่อสกัดสารด้วยเมทานอล มีค่าการยับยั้ง 35.78 % เมื่อใช้สารสกัดเข้มข้น 100 μg/mL สารสกัดจากต้นยูคาลิปตัสยังเป็นพิษต่อเซลล์ไต (Vero), เซลล์มะเร็งตับ (HepG-2) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (HT-29) มี จะมีค่าการยับยั้งการเจริญของ Vero cell สูงเมื่อสกัดด้วนตัวทำละลายไม่มีขั้ว สารสกัดจากใบยูคาลิปตัสที่สกัดด้วยเฮกเซน มีค่า IC_{50} ± SE ประมาณ 37.29 ± 1.67 μg/mL นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากใบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากเมทานอลจะมีสารฟีนอลิกสูงสุด มีค่าประมาณ 44.80 ± 0.13 mg GAE/g และความสามารถในการดับจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนจะมีค่ามากที่สุดโดยมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ 91.45 % เมื่อสารสกัดมีความเข้มข้น 750 μg/mL

คำสำคัญ: *Eucalyptus tereticornis*, ฤทธิ์ต้านไวรัส, การยับยั้งเอนไซม์นิวรามินิเดส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title : Antivirus and Cytotoxicity Effect of *Eucalyptus* sp.

Researcher : Miss Thanavadee Korarnan

Department : Biology

Faculty : Science

Abstract

The study of antimicrobial activity and cytotoxicity of hexane, acetone and methanol extract of *Eucalyptus tereticornis* leaves with ultrasonic at 40°C for 30 min was found that, *extracts of E. tereticornis* leaves can inhibit spore-forming bacteria growth such as *Bacillus subtilis* higher inhibited *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio parahaemolyticus growth and* extracts was o evaluated inhibition of *A. flavus, A. versicolor, A. fumigatus, A. ochraceus and A. phoenicis growth.* Extracts also inhibited, HSV-1 growth, approximately 24.42 % at 5.56 μg/mL and inhibited neuraminidase activity of virus H5N1, approximately 35.78 % at 100 μg/mL. Extracts of *E. tereticornis* leaves was evaluated the cytotoxicity against Vero cell, HepG-2 cell, MCF-7 cell and HT-29 cell and extract of non-polar hexane was evaluated higher cytotoxicity against Vero cell (IC_{50} ± SE = 37.29 ± 1.67 μg/mL). Moreover, methanol extracts of leaves was evaluated higher total phenolic content (44.80 ± 0.13 mg GAE/g) and DPPH scavenging of acetone extract of leaves was 91.45 % at 750 μg/mL

keywords: *Eucalyptus tereticornis*, antivirus activity, neuraminidase inhibitor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัย เรื่อง ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสการเป็นพิษต่อเซลล์จากต้นยูคาลิปตัส ขอขอบคุณเยาวภรณ์ ภู่ทองคำ และ เอกลักษณ์ พันธ์ชำนาญ นักศึกษาปัญหาพิเศษ ที่ได้ศึกษาเบื้องต้น ในปัญหาพิเศษ เรื่อง "ฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบของต้น *Eucalyptus tereticornis*" ขอขอบพระคุณ ผศ. มงคล เพ็ญสายใจ และ ดร. คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา ที่เสียสละเวลาเพื่อมาเป็นประธานกรรมการและกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ตึกวิทยาศาสตร์ ชั้น 4 และ ตึกจุฬาภรณ์วลัยลักษณ์ 1 ชั้น 4 ทุกท่าน สำหรับความช่วยเหลือ เอื้ออำนวยสารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือ สถานที่ในการปฏิบัติการ รวมถึงความรู้ เทคนิค ในการใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ ทำให้การทำปฏิบัติการเป็นไปได้อย่างราบรื่นกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ผศ.วราพร เหลือสินทรัพย์ ที่เสียสละเวลาให้คำปรึกษาการเลือกสถิติเพื่อใช้จัดการข้อมูลของงานวิจัย

ขอกราบคุณท่านคณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกท่าน ที่คอยให้ความรู้ตลอดสี่ปีเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้

ธนาวดี ก่ออานันต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ค
สารบัญ.....ฆ
สารบัญตาราง.....จ
สารบัญภาพ.....ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาพิเศษ.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....8
3.1 การเก็บตัวอย่างใบจากต้นยูคาลิปตัส.....8
3.2 การสกัดสารสกัดหยาบยูคาลิปตัส.....8
3.3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียความเข้มข้นต่ำสุด ที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย (MBC) ตามวิธีการของ NCCLS M27-A2.....8
3.4 ความเข้มข้นต่ำสุดที่เกิดการยับยั้งเชื้อรา (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อรา (MFC) ตามวิธีการของ NCCLS M27-A2.....9
3.5 การยับยั้งการเจริญของไวรัส Anti-herpes simplex virus type-1 (HSV-ด้วยวิธี Green fluorescent protein (GFP).....9
3.6 การทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ด้วยวิธี MTT assay.....10
3.7 การทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ด้วยวิธี Green fluorescent protein (GFP) detection.....10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

3.8 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ....11
3.8.1 วิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu....11
3.8.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging assay....11
3.9 การยับยั้งไวรัส....12
3.9.1 การยับยั้งการเจริญของไวรัส HSV-1....12
3.9.2 การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามิดิเนสจากไวรัส H5N1....12
3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)....12
บทที่ 4 ผลการวิจัย....13
4.1 การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย....13
4.2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา....14
4.3 การยับยั้งการเจริญของไวรัส....16
4.3.1 ยับยั้งการเจริญของไวรัส HSV-1....16
4.3.2 การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามินิเดสจากไวรัส H5N1....17
4.4 ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Antiproliferation Activity)....18
4.5 การเป็นพิษต่อเซลล์ไต (Vero)....23
4.6 การต้านอนุมูลอิสระ....24
4.6.1 สารประกอบฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocaltue....24
4.6.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging....24
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ....26
5.1 สรุปผลและข้อเสนอแนะ....26
บทที่ 6 สรุปผลผลิตการวิจัย....27
บรรณานุกรม....28
ภาคผนวก ก ผลวิเคราะห์ทางสถิติการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์นิวรามินิเดส....31
ภาคผนวก ข ผลวิเคราะห์ทางสถิติการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส HSV-1....34
ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์การเป็นพิษต่อ Vero cell....36
สรุปการใช้จ่ายเงิน....46
ประวัติผู้เขียน....47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีของใบ *E. tereticornis*.....4

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของไวรัส HSV-1 ± SE สารสกัดจากใบยูคาลิปตัส ที่สกัดจากตัวทำละลายเฮกเซน, อะซิโตนและเมทานอล.....17

ตารางที่ 4.2 การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามินิเดสจากไวรัส H5N1 ของสารสกัดหยาบยูคาลิปตัสที่สกัดจากตัวทำละลาย Acetone, Hexane และ Methanol.....18

ตารางที่ 4.3 การเป็นพิษต่อเซลล์ Vero cell ของสารสกัดจากใบ *E. tereticonis* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน อะซิโตนและเมทานอล.....23

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ทดสอบโดยวิธี Folin-Ciocaltue.....24

ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Scavenging แสดงค่า %EC ของสารสกัดหยาบยูคาลิปตัสที่สกัดจากตัวทำละลายต่าง ๆ ในแต่ละความเข้มข้น.....25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 ลักษณะของต้น *E. tereticornis*.....5

รูปที่ 4.1 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) (mg/ml) ของเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์.....13

รูปที่ 4.2 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย (MBC) (mg/ml) 5 สายพันธุ์.....13

รูปที่ 4.3 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) ของเชื้อรา 5 สายพันธุ์.....15

รูปที่ 4.4 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อรา (MFC) 5 สายพันธุ์.....15

รูปที่ 4.5 การยับยั้งการเจริญของไวรัสที่ทำให้เกิดโรคเริม เช่น HSV-1 ของสารสกัดจากใบ *E. tereticornis* ทดสอบด้วยวิธี GFP-based assay.....16

รูปที่ 4.6 ลักษณะของเซลล์ Vero ที่ถ่ายภาพด้วยกล้องเฟสคอนทราสต์ ทดสอบด้วยสารสกัดจากใบยูคาลิปตัสที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ; (A) เซลล์ Vero ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดด้วยเฮกเซน (B) เซลล์ Vero ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดด้วยอะซิโตน (c) เซลล์ Vero ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดด้วยสารสกัดด้วยดเมทานอล (D) เซลล์ Vero ที่ถูกทดสอบด้วย DMSO (คอนโทรล) (E) เซลล์ Vero ปกติ.....19

รูปที่ 4.7 ลักษณะของเซลล์ HepG2 ที่ถ่ายภาพด้วยกล้องเฟสคอนทราสต์ ทดสอบด้วยสารสกัดทั้งสามชนิด (A) เซลล์ HepG2 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน (B)เซลล์HepG2 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดอะซิโตน (c) เซลล์ HepG2 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล (D) เซลล์ HepG2 ที่ถูกทดสอบด้วย DMSO (คอนโทรล) (E) เซลล์ HepG2 ปกติ 20

รูปที่ 4.8 ลักษณะของเซลล์ HT29 ที่ถ่ายภาพด้วยกล้องเฟสคอนทราสต์ ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดทั้งสามชนิด (A) เซลล์ HT-29 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน (B)เซลล์ HT-29 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดอะซิโตน (c) เซลล์ HT-29 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล (D) เซลล์ HT-29 ที่ถูกทดสอบด้วย DMSO (control) (E) เซลล์ HT-29 ปกติ.....22

รูปที่ 4.9 ลักษณะของเซลล์ MCF7 ที่ถ่ายภาพด้วยกล้องเฟสคอนทราสต์ (A) เซลล์ MCF-7 ทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน (B) เซลล์ MCF-7 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดอะซิโตน (c) เซลล์ MCF-7 ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล (D) เซลล์ MCF-7 ทดสอบด้วย DMSO (คอนโทรล) (E) เซลล์ MCF-7 ปกติ.....22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาพิเศษ

ต้นยูคาลิปตัสเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศออสเตรเลียมีลักษณะสูงและมีใบเขียวชอุ่มตลอดปี สามารถพบได้ทั่วโลกปัจจุบันมีการเพาะปลูกอย่างแพร่หลายในหลายๆประเทศ ยูคาลิปตัสเป็นพืชในวงศ์ *Myrtaceae* ซึ่งมีมากกว่า 900 สปีชีส์ ในอดีตยูคาลิปตัสถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์ของจีน เช่น ใบแห้งของ *Eucalyptus citriodola* สกัดด้วยน้ำร้อนใช้รักษาอาการอักเสบ บรรเทาอาการปวด การติดเชื้อทางระบบหายใจ เช่น ไข้ หวัด ไซนัส มีการใช้น้ำมันหอมระเหยของ *E. citriodala*ทางการแพทย์และเภสัชกรรม ปัจจุบันมีหลายงานวิจัยได้ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยจากยูคาลิปตัสพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์ เช่น *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Bacillus* และมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์ เช่น มะเร็งลำไส้ ปอด ต่อมลูกหมาก รังไข่ ปากมดลูก ตับ และ เม็ดเลือดขาว เป็นต้น

สายพันธุ์ยูคาลิปตัสที่สนใจและนำมาทำการศึกษานี้ คือ *Eucalyptus tereticornis* ซึ่งพบว่าสารสกัดจากใบมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบยูคาลิปตัสสายพันธุ์อื่น จากงานวิจัยการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบของ *E. tereticornis* ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันคือ Ethanol และ Methanol พบว่า ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ (Ethanol) มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่า ตัวทำละลายที่มีขั้วสูง (Methanol) นอกจากนี้ *E.tereticornis* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทดสอบด้วยวิธี DPPH scavenging activity งานวิจัยนี้จึงเห็นความสำคัญของการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นยูคาลิปตัสที่ปลูกได้ในประเทศไทย ซึ่งไม่มีการศึกษากันมากนัก เพื่อช่วยส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากใบยูคาลิปตัสทางเภสัชวิทยา และเป็นการเพิ่มมูลค่าต้นยูคาลิปตัสที่ปลูกในประเทศไทยอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากต้นยูคาลิปตัสที่ปลูกได้ในประเทศไทย

1.2.2 เพื่อส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรไทยเพื่อการยับยั้งการเจริญของไวรัสที่ก่อโรคร้ายแรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

คัดเลือกสายพันธุ์ของต้นยูคาลิปตัสที่ปลูกในประเทศไทย เพื่อใช้ในการสกัดสารสำคัญด้วยตัวทำละลายเฮกเซน อะซิโตนและเมทานอล และนำมาสกัดก่อนที่จะนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเริมและฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์นิวรามินิเดสของไวรัสไข้หวัดนก รวมถึงศึกษาการเจริญของเซลล์มะเร็งต่าง ๆ ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งตับและมะเร็งลำไส้ใหญ่ เป็นต้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ส่งเสริมการใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยาของใบยูคาลิปตัสในการยับยั้งจุลชีพก่อโรคร้ายแรงได้

1.4.2 ส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากต้นยูคาลิปตัสฤทธิ์เพื่อยับยั้งเซลล์มะเร็งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ต้นยูคาลิปตัส (*Eucalyptus* sp.) เป็นพืชในวงศ์ Myrtaceae มีกำเนิดบริเวณออสเตรเลียและมีการกระจายพันธุ์ไปทั่วโลก ปัจจุบันต้นยูคาลิปตัสมีมากถึง 900 สปีชีส์ ต้นยูคาลิปตัสเป็นแหล่งของน้ำมันหอมระเหย Essential oils, EOs) องค์ประกอบส่วนใหญ่ของน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ สารประกอบโมโนเทอร์ปีนหลายชนิด เช่น monoterpenes hydrocarbon และ oxygenated monoterpenes และประกอบด้วยสารประกอบ sesquiterpenes หลายชนิด ได้แก่ sesquiterpenes hydrocarbon และ oxygenated sesquiterpenes น้ำมันหอมระเหยนี้สามารถช่วยรักษาอาการอักเสบ, โรคทางเดินหายใจ, ยับยั้งการเจริญของจุลชีพและช่วยบรรเทาอาการไอและอาการหวัด น้ำมันหอมระเหยนี้สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้อย่างรวดเร็ว การใช้น้ำมันหอมระเหยระดับความเข้มข้น 100% ควรระมัดระวังการใช้ไม่ควรสูงเกินปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร อาจทำให้หมดสติได้ (depression of consciousness) (Tibballs, 1995, Patel & Wiggins, 1980, Flaman *et al.*, 2001).

ในประเทศไทยมีการปลูกต้นยูคาลิปตัสอย่างแพร่หลาย เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมกระดาษ ชนิดของต้นยูคาลิปตัสในประเทศมีประมาณ 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus tereticornis, Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus brassiana, Eucalyptus pellita, Eucalyptus degupta* และ *Eucalyptus grandis* องค์ประกอบที่พบว่ามีฤทธิ์ทางชีวรูปที่ดี ได้แก่ pinene ซึ่งเป็นสารประกอบ bicyclic-monoterpene ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (Rivas da Silva *et al.*, 2012), สามารถควบคุมการส่งผ่านโปรตอน (pumping protons) และควบคุมการส่งผ่านโปตัสเซียมอิออน (K^+ transport) ในเมมเบรนของไมโตคอนเดรียได้ (Uribe *et al.*, 1985) นอกจากนี้ 1,8-cineole เป็นสารสำคัญอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นสารประกอบ cyclic-monoterpens ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (Vilela *et al.*, 2009), เป็นสารต้านแผลเปื่อย (antiulcer activity) (Rocha Caldas GF, 2015) นอกจากนี้การเสริมฤทธิ์ของ 1,8-cinediol กับ aromadendrene จะช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Mulyaningsih *et al.*, 2010).

ต้น *E. tereticornis* เป็นต้นยูคาลิปตัสที่มีการกระจายพันธุ์สูงในประเทศไทย มีความสูงของลำต้นประมาณ 15 เมตร ลำต้นตรง เปลือกของลำต้นมีสีเทาและลอกออกได้ ความยาวของใบมีค่าประมาณ 10 - 25 เซนติเมตร ดอกมีสีขาวมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 เซนติเมตร ขนาดของผลมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8 มิลลิเมตร ผลมีลักษณะรูปไข่ องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยมีหลายชนิด ได้แก่ α-pinene (32.50 %), 1,8-cineole or eucalyptol (22.40 %), β-pinene (10.03 %), β-eudesmol (5.89 %), limonene (3.38 %) และ α-terpineol (3.09 %) (Kaur *et al.*, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องค์ประกอบทางเคมีของใบ *E. tereticornis* ในน้ำมันหอมระเหย ส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารสำคัญมากกว่า 34 ชนิด จะพบ α-Pinene มากที่สุด มีค่าประมาณ 32.5 % พบ 1,8-Cineole ประมาณ 22.4 % และพบสาร β-Pinene ประมาณ 10.13 % ตามลำดับ แสดงได้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีของใบ *E. tereticornis* (Kaur *et al.*, 2011)

ลำดับที่	สารเคมี	ปริมาณ (%)
1	α-Pinene	32.5
2	α-Thujene	0.07
3	Camphene	0.15
4	β-Pinene	10.13
5	Sabinene	0.05
6	β-Myrcene	0.36
7	α-Phyllandrene	1.31
8	α-Terpinene	0.1
9	Limonene	3.38
10	1,8-Cineole	22.4
11	γ-Terpinene	2.8
12	Cymene	1.12
13	Terpinolene	0.62
14	β-Citronellal	1.4
15	Isopulegol-I	0.42
16	Isopulegol-II	0.32
17	endo-Fenchol	0.34
18	trans-β-Caryophyllene	0.42
19	Aromadendrene	0.34
20	Terpinen-4-ol	0.61
21	trans-Pinocarveol	1.42
22	Citronellyl acetate	0.16
23	α-Terpineyl acetate	0.47
24	α-Terpineol	3.09
25	β-Citronellol (R)	0.52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

26	Myrtenol	0.41
27	trans-ρ-mentha-1(7),8-dien-2-ol	0.09
28	Globulol	0.41
29	γ-Eudesmol	1.85
30	Guaiol	1.09
31	Aristolene	0.32
32	Hinesol	0.42
33	α-Eudesmol	3.45
34	β-Eudesmol	5.89

รูปที่ 2.1 ลักษณะของต้น *E. tereticornis*

อนุกรมวิธานของต้น *E. tereticornis*

Kingdom: Plantae

Phylum: Angiosperms

Class: Eudicots

Subclass: Rosids

Order: Myrtales

Family: Myrtaceae

Genus: Eucalyptus

Species: E. tereticornis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้น *E. tereticornis*

ต้นยูคาลิปตัส *E. tereticornis* มีชื่อสามัญว่า Forest red gum, Blue gum, grey gum, Queensland blue gum ยูคาลิปตัสเป็นพืชยืนต้นความสูงประมาณ 20-50 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 เมตร ลำต้นตรง ไม่มีการแตกแขนงกิ่งก้านในช่วงครึ่งแรกของความยาวต้น กิ่งก้านจะมีความชันมากกว่ายูคาลิปตัสสายพันธุ์อื่นๆ ส่วนเปลือกนั้นจะมีลักษณะเป็นแผ่นเรียบมันที่ไม่มีระเบียบและมีสีขาว เทา ฟ้า ดอกของต้นยูคาลิปตัสมีลักษณะเป็นช่อเกิดขึ้นระหว่างกิ่งและใบ แตกแขนงออกไปอีก 7-11 ดอก มีก้านดอกที่เรียว และดอกเป็นสีขาว ยูคาลิปตัสจะออกดอก 7-8 เดือนต่อปี ผลของยูคาลิปตัสนั้นมีลักษณะครึ่งวงกลม สีเขียว แต่เมื่อผลแก่จะมีสีน้ำตาล และปลายผลจะแยกออกจากกันทำให้เมล็ดที่อยู่ด้วยในหล่นออกมา

สรรพคุณทางยา

ยูคาลิปตัสมีสรรพคุณในการรักษาอาการอักเสบ บรรเทาอาการปวด การติดเชื้อทางระบบหายใจ เช่น ไข้ หวัด ไซนัส ใช้ในการสารต้านอนุมูลอิสระต้านการเจริญของเชื้อรา และต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารในลำไส้และเชื้อที่ไม่ต้องการออกซิเจน ทั้งนี้น้ำมันหอมระเหยยังสามารถนำมาใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชได้อีกด้วย เป็นต้น

ความหลายของชนิดต้นยูคาลิปตัสทำให้ต้นไม้ชนิดนี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ได้เกือบทุกส่วน เช่น ใบ ลำต้น ดอก และเป็นพืชพลังงานได้ด้วย จากการศึกษาของ Fadel และคณะ (1999) *E. camaldulensis* var. *brevirostris* มีสารสำคัญมากถึง 90 ชนิด ประกอบด้วย β - phellandrene (4.09 %), pycmene (10.61 %), cryptone (9.82 %) และ spathulenol (13.14 %) (Fadel *et al.*, 1999) พบว่าส่วนของผลประกอบด้วยสาระสำคัญกว่า 38 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นสาร aromadendrene (17.99 %), α-pinene (12.68 %), ρ-pycmene (5.39 %), α-gurjunene (6.65 %), cubenol (9.23 %), thymol (1.62 %), ρ-pycmen-7-ol (0.73 %) สารที่ระเหยได้ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย monoterpenes (20.6 %), sesquiterpenes (33.8 %), light-oxygenated (8.1 %) และ heavy-oxygenated (37.6 %)

สารสกัดจากต้นยูคาลิปตัสยังสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด เช่น สารสกัดจากต้น *E. robusta* สามารถยับยั้งมะเร็งตับ มะเร็งตับ มะเร็งสมองและมะเร็งผิวหนังและมะเร็งรังไข่ได้ (Vuong *et al.*, 2015) สารสกัดจาก *E. globulus* สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้ (Mota *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากต้นยูคาลิปตัสสามารถยับยั้งการเจริญของไวรัสก่อโรคได้ เช่น ส่วนของใบ *E. citriodora* ประกอบด้วยสารฟลาโวนอยด์และไกลโคไซด์ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของไวรัส syncytial ได้ มีค่า IC_{50} ประมาณ 1.9 μg/ml (Vankar *et al.*, 2007) สารบริสุทธิ์ globoidnan A ที่แยกได้จากต้น *E. globoidea* สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ HIV integrase ได้ (Sugimoto *et al.*, 2009)

การติดเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดอาจส่งผลกระทบทำให้เกิดโรคร้ายแรงอื่น ๆ ตามมา โดยไวรัสเป็นปรสิตเมื่อโฮสต์ได้รับเซลล์ไวรัสเข้าไป ไวรัสสามารถอินติเกรต RNA หรือ DNA ของตัวเองเข้าไปใน DNA ของโฮสต์ได้ อาจจะทำให้เกิดการยั้บยั้ง (suppression) การแสดงออกของยีนในโฮสต์ได้ เช่น การรับเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายอาจทำให้เป็นโรคมะเร็งตามมา เช่น การติดเชื้อไวรัส hepatitis B (HBV)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และการติดเชื้อไวรัส hepatitis C (HCV) จะทำให้ผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งตับในเวลาต่อมา (Paterlini-Brechot *et al.*, 2003, De Mitri *et al.*, 1995, Pattle & Farrell, 2006) การได้รับเชื้อไวรัส HBV แล้วทำให้เกิดมะเร็งตับตามมา อาจมีสาเหตุมาจากไวรัสจะเข้าไปรบกวนการส่งสัญญาณของเซลล์ (cell signaling) และไวรัสจะเข้าไปรวมตัวกับยีน inositol-1,4,5-triphosphate และไวรัสจะเข้าไปรวมตัวกับยีน telomerase (Paterlini-Brechot *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่า การติดเชื้อไวรัส Epsteun-Barr virus (EBV) ที่ทำให้เกิดโรค mononucleosis หรือ glandular fever ไวรัสชนิดนี้จะไป suppresses ออนโคยีน protein P53 (p53arg และ p53pro) ในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งตับ (Storey *et al.*, 1998) การเกิดมิวเตชันของยีน p53 อาจทำให้เกิดการ suppress กระบวนการควบคุมกระบวนการอะพอพโตซิส (apoptosis regulation) (Perez *et al.*, 2016, Stracquadanio *et al.*, 2016)

จากเหตุผลดังกล่าว การศึกษานี้จึงสนใจที่ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไวรัสที่พบมาก เช่น HSV-1 และความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กัน ของต้นยูคาลิปตัส สายพันธุ์ *E. tereticornis* ที่มีการเพาะปลูกแพร่หลายในประเทศไทย ที่อาจจะช่วยส่งเสริมและสนับสนุนการใช้ประโยชน์จากยูคิลิปตัสได้หลากหลายมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างใบจากต้นยูคาลิปตัส

ตัวอย่างพืชคือ *E. tereticornis* ได้จากบริเวณคันนา ตำบลบ้านนา อำเภอกบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี ใบต้นยูคาลิปตัสได้รับการพิสูจน์สายพันธุ์และทำ voucher specimen Herbarium number A 015317 (BCU)

3.2 การสกัดสารสกัดหยาบยูคาลิปตัส

สกัดใบ *E. tereticornis* ตากแห้ง น้ำหนักประมาณ 1.5 กิโลกรัม โดยวิธี Maceration โดยในใบสดของยูคาลิปตัสให้แห้งหรืออบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน จากนั้นทำการบดใบยูคาลิปตัสแห้งให้เป็นผงโดยใช้เครื่องปั่น แล้วนำผงยูคาลิปตัสที่ได้ห่อด้วยผ้าขาวบางมัดให้แน่น นำไปแช่ในตัวทำละลายเริ่มตั้งแต่ขั้วต่ำไปสูงคือ เฮกเซน อะซิโตน และ เมทานอล ตามลำดับ นาน 2-3 วัน หลังการแช่นำสารสกัดของเหลวที่ได้ไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ โดยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) แล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวที่ได้หลังจากการกรองไปทำให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นโดยการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Heidolph, Germany) ในการระเหยตัวทำละลายจะทำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 40 รอบต่อนาที ในการระเหยตัวทำละลายเฮกเซน อะซิโตน และเมทานอล จะใช้ความดัน 556, 335 และ 337 มิลลิบาร์ ตามลำดับ

3.3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียความเข้มข้นต่ำสุดที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย (MBC) ตามวิธีการของ NCCLS M27-A2

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) โดยวิธี cross streak จนได้โคโลนีเดี่ยว โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เตรียมเซลล์แบคทีเรียแขวนใน Mueller Hinton broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-6 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเซลล์แขวนลอยให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5

การประมาณค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เกิดการยับยั้ง (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย (MBC) ซึ่งใช้ความเข้มข้นของสารสกัดอยู่ระหว่าง 0.03125-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.27-36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No 0.5 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารสกัดยูคาลิปตัสความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังการบ่มทำการประเมินค่า MBC โดยลากเชื้อลงบนอาหาร Mueller Hinton Agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลายเรซาซูรินเพื่อเป็นรีดอกซ์อินดิเคเตอร์ ใช้ทดสอบการมีชีวิตของแบคทีเรีย เข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มต่ออีกครั้ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที โดยมีการเจริญของแบคทีเรียในอาหาร Mueller Hinton broth เป็นตัวควบคุมเชิงลบที่ไม่มีการเติมสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ความเข้มข้นต่ำสุดที่เกิดการยับยั้งเชื้อรา (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อรา (MFC) ตามวิธีการของ NCCLS M27-A2

เพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร Sabouraud dextrose Agar (SDA) Slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติม tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงไปเพื่อทำสารแขวนลอยของสปอร์ เจือจางเซลล์สปอร์แขวนลอยด้วย Normal saline ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ นับสปอร์ราให้ได้ 2,000 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ Haemacytometer เพื่อใช้ทดสอบ

การประมาณค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เกิดการยับยั้งเชื้อรา (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อรา (MFC) ความเข้มข้นของสารสกัดระหว่าง 0.03125-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.27-36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบการยับยั้งการเจริญได้โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารวุ้นเอียงแล้ว เตรียมสารแขวนลอยของเชื้อราดูดสารแขวนลอยของสปอร์ของเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เจริญบนอาหารวุ้นเอียง (SDA) และเติมสารสกัดยูคาลิปตัสความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม นำไมโครเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หลังการบ่มทำการประเมินค่า MFC โดยขีดสารในแต่ละหลุมลงบนอาหาร SDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หลังการบ่มเติมสารละลายเรซาซูรินความเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในไมโครเพลท เพื่อทดสอบการมีชีวิตของเชื้อราในแต่ละหลุม นำไมโครเพลทไปบ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ใช้การเจริญของเชื้อราในอาหาร SDA ในหลุมสุดท้ายของไมโครเพลทเป็นตัวควบคุมเชิงลบคือไม่มีการเติมสารสกัด

3.5 การยับยั้งการเจริญของไวรัส Anti-herpes simplex virus type-1 (HSV-ด้วยวิธี Green fluorescent protein (GFP) (Hunt *et al.*, 1999)

เพาะเลี้ยงไวรัส Herpes simplex virus type-1 (ATCC VR260) ในอาหาร complete media ที่เจริญใน GFP-vero เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำมาเจือจางให้ได้ระดับความเจือจางที่มีการ killing infection ประมาณ 19,000 infected ต่อเซลล์ เพื่อนำมาใช้ทดสอบ

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของไวรัสด้วยไมโครเพลท 96-well โดยเติมตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเติมสารแขวนลอยของไวรัสที่จำนวนเซลล์ประมาณ $1.5x10^5$ PFU/ml (หรือมีปริมาณ infection ประมาณ 19,000 เซลล์) ปริมาตร 190 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37oC ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 5 % เป็นเวลา 4 วัน วัดค่าปริมาณแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่นถูกกระตุ้น 485 nm และความยาวคลื่นเปล่งแสง 535 nm คำนวณค่าการยับยั้งการเจริญของไวรัส ตามสมการ

$$\% \text{ viral inhibition} = \{1- [(FU_C - FU_{VT})/ (FU_C - FU_{VT})]\} \times 100$$

เมื่อ FU_C = ค่าการดูดกลืนแสงฟลูออกเรสเซนต์ของ non-infected cells

FU_{VT} = ค่าการดูดกลืนแสงฟลูออกเรสเซนต์ของ virus-infected cells ทดสอบด้วยสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FU_{VC} = ค่าการดูดกลืนแสงฟลูออกเรสเซนต์ของ virus-infected cells ทดสอบด้วยสารสกัด DMSO ความเข้มข้น 0.5%

3.6 การทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ด้วยวิธี MTT assay (Theera Srisawat *et al.*, 2013, GERAN R.I., 1972)

เซลล์ที่ใช้ทดสอบได้แก่ Vero, HT-29, MCF-7 และ HepG-2 ในการหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ จะทำการทดสอบขั้นต้น (primary screening) ด้วยวิธี MTT Assay เริ่มจากการละลายสารสกัดโดยชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 0.1 กรัม แล้วละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นประมาณ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นตัวทำละลายจากนั้นเติมสารละลาย PBS (Phosphate buffer saline, pH 7.4)ให้มีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของ DMSO ประมาณร้อยละ 1 หลังจากนั้นกรองสารละลายตัวอย่างด้วยแผ่นกรองสารขนาด 0.45 ไมโครเมตร เพื่อใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเซลล์ Vero ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเซลล์ HT-29, MCF-7 และ HepG-2 ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 1×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดสารแขวนลอยของเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม บ่มเซลล์ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาดูดอาหารออกจากแต่ละหลุม เติมสารสกัดจากยูคาลิปตัสที่มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วดูดสารละลาย MTT ทิ้ง เติมสารที่ละลาย Formazan ใช้ DMSO ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 100 : SDS ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 ในอัตราส่วน 9:1 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ตั้งโปรแกรมเขย่า 5 นาทีก่อนวัดค่าดูดกลืนแสง คำนวณค่าร้อยละ Cytotoxicity ของสารแต่ละชนิด โดยใช้สูตร ต่อไปนี้

$$\% \text{ Cytotoxicity} = (A-B)/A \times 100$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ในสารละลายตัวอย่างแต่ละชนิด ความเข้มข้น 1,000 µg/ml

** โดยค่า A และ B จะต้องนำค่าการดูดกลืนแสงของ Blank (ในที่นี้ คือหลุมที่เติมสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ100 และสารละลาย SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10) มาหักลบออกก่อนจากนั้นจึงนำไปคำนวณจากสูตรข้างต้น

3.7 การทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ด้วยวิธี Green fluorescent protein (GFP) detection (Hunt et al., 1999)

เซลล์ African green monkey kidney cell line (Vero, ATCC CCL-81) ที่ทดสอบมีการเก็บรักษาไว้ใน minimal essential medium (MEM) ที่เติม heat-inactivated fetal bovine serum

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 10%, sodium pyruvate ความเข้มข้น 1 mM, sodium bicarbonate ความเข้มข้น 2.2 g/L และ geneticin ความเข้มข้น 0.8 mg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซ CO_2 ความเข้มข้น 5% เตรียมเซลล์ Vero ให้มีความเข้มข้น $3.3x10^4$ cells/ml ในอาหาร complete medium ที่ไม่มี geneticin ทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์โดยการเติมสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 5 µl เติมเซลล์ Vero ปริมาตร 45 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซ CO_2 ความเข้มข้น 5% เป็นเวลา 4 วัน นำไปวัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่นแสงกระตุ้นและความยาวคลื่นแสงเปล่งออกมีค่า 485 nm และ 535 nm ตามลำดับ ทดลอง 3 ซ้ำ นำมาคำนวณค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรม SOFTMax Pro software (Molecular Devices, USA) ดังสมการ

$$\% \text{ Cytotoxicity} = [1-(FU_T/ FU_C)] \times 100$$

เมื่อ FU_T คือ ค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของตัวอย่าง

FU_C คือ ค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของ DMSO ความเข้มข้น0.5 %

3.8 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.8.1 วิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu (Singleton. *et al.*, 1999)

เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบทำโดยชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 0.1 กรัมละลายในเมทานอล 100 มิลลิลิตร ทำการทดสอบโดยเริ่มจากการเติมสารละลายของสารสกัดหยาบปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสาร Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติมโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 100 มิลลิลิตรกรัมต่อมิลลิลิตร (เติมหลังจากเติม Folin-Ciocalteu เป็นเวลา 2 นาที) และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยทำในที่มืด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจะแสดงในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิคต่อกรัมของสารสกัด

3.8.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging assay

เตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาบเฮกเซน อะซิโตน และเมทานอล ความเข้มข้น 0.1 0.25 0.50 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.8 เตรียมสารละลายแอสคอร์บิก (วิตามิน ซี) ความเข้มข้นเดียวกันเพื่อเป็นตัวควบคุมเชิงบวก จากนั้นเตรียมสารละลาย 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง DPPH 0.007 กรัม ละลายลงในเมทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 99.8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการทดสอบ เริ่มจากเติมสารละลายสารสกัดหยาบลงในขวดทดลองทึบแสงปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 950 ไมโครลิตรลงไป ปิดฝา และบ่มที่ทึบแสงนาน 30 นาที หลังการบ่มนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยมีกรดแอสคอร์บิกเป็นตัวควบคุมเชิงบวก และสารละลาย DPPH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ที่ไม่มีการเติมสารละลายสารสกัดหยาบเป็นสารควบคุมเชิงลบ ทำการคำนวณ % Inhibition concentration ได้จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition concentration} = (A-B)/A \times 100$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

B = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

3.9 การยับยั้งไวรัส

3.9.1 การยับยั้งการเจริญของไวรัส HSV-1 ทดสอบตามวิธีการของ (*Hunt et al.* 1999)

3.9.2 การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามิดิเนสจากไวรัส H5N1 ทดสอบตามวิธีการของ (Potier *et al.*, 1979)

3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

ผลการทดลองวิเคราะห์โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย DMRT จะได้ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ในการทดลองทั้งหมดทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 17

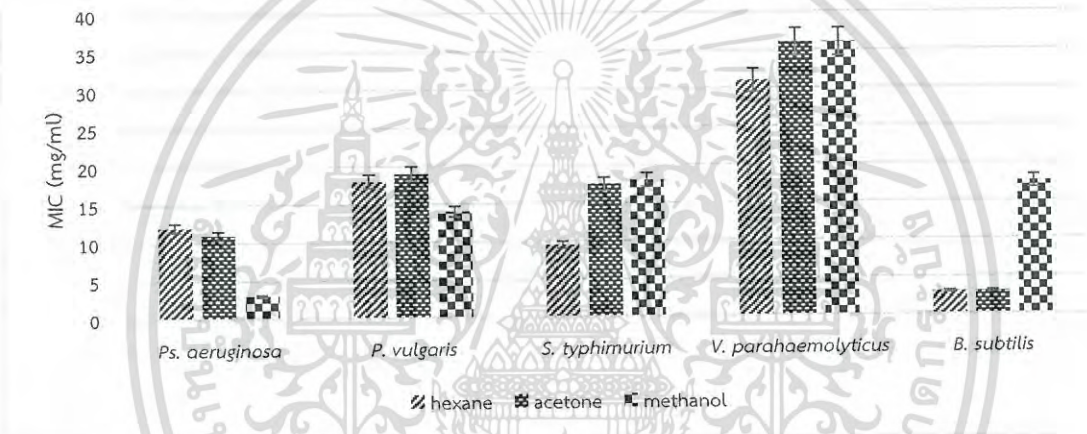
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

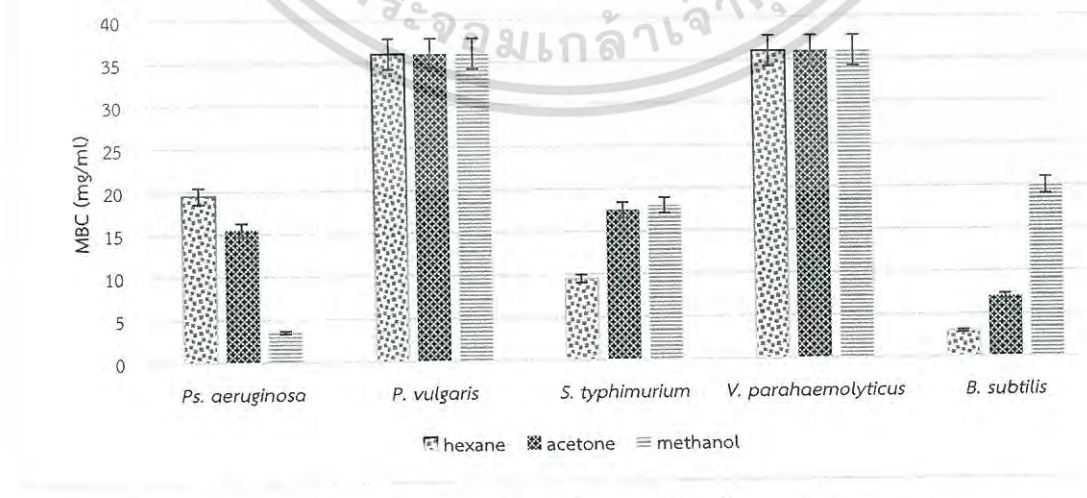
ผลการวิจัย

4.1 การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

สารสกัดจากใบยูคาลิปตัสที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน อะซิโตน และเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonell typhimurium* และ *Vibrio parahaemolyticus* และสมารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus subtilis* ได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี broth microdilution ตามวิธีการของ NCCLS-27A และวัดการเจริญของเชื้อด้วย Resazurin (Hussian. *et al.*, 2011) ผลการทดลองแสดงได้ในรูปที่ 4.1 และรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.1 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) (mg/ml) ของเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์



รูปที่ 4.2 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย (MBC) (mg/ml) 5 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

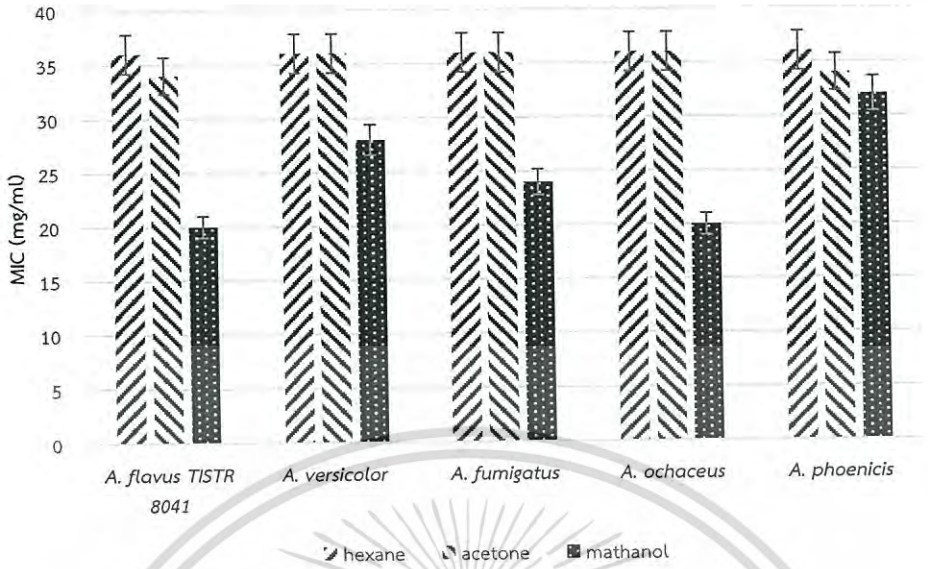
จากผลการทดลองพบว่า ค่า MIC ของสารสกัดจากใบยูคาลิปตัสด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและอะซิโตน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้ เช่น *B. subtilis* ได้ดี มีค่า MIC ประมาณ 3.0 ± 0.0 mg/mL แต่การสกัดด้วยตัวทำละลายที่ขั้วสูงกว่านี้เช่นเมทานอลจะยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้ลดลง มีค่า MIC ประมาณ 17.50 ± 0.50 mg/mL แต่จะยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeroginasa* ได้ดี ซึ่งสอดคล้องการศึกษาของ Badrunnisa และคณะ (2011) พบว่าสารสกัดจากใบของ *E. tereticornis* ด้วยตัวเมทานอลสามารถยับยั้ง *Bacillus cereus* และ *Bacillus thuringiensis* ได้ดีกว่าการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeroginasa* เมื่อใช้สารสกัดความเข้มข้น 5.0 mg/mL ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus cereus* มีค่า 11.50 ± 0.00 mm เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus thuringiensis* มีค่า 10.38 ± 0.18 mm แต่เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeroginasa* จะมีค่ามากกว่าซึ่งมีค่าประมาณ 11.25 ± 0.35 mm (Badrunnisa & Pai, 2017) และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Pereira และคณะ (2014) ที่พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 100 % และสารสกัดด้วยอะซิโตนสามารถยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeroginasa* MJH15 ได้มากกว่าการใช้ Oil ทดสอบ ด้วยเมทานอลเข้มข้น 100 % มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ประมาณ 10.67 ± 0.33 mm สารสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ประมาณ 9.33 ± 0.33 mm ขณะที่ Oil มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ได้ลดลง มีค่าประมาณ 8.33 ± 0.33 mm (Pereira *et al.*, 2014)

นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงมักจะลดค่าการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น สารสกัดด้วยน้ำ, เอทานอลและเฮกเซนของใบ *E. olida* และ *E. straigerana* สารสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนจะยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeroginasa* ได้ดีกว่าการสกัดด้วยเอทานอลและน้ำตามลำดับ สารสกัดด้วยเฮกเซนมีค่า MIC ของการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeroginasa* ประมาณ 62.5 μg/mL ขณะที่ สารสกัดด้วยเอทานอลมีค่า MIC ของการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeroginasa* ประมาณ 250 μg/mL (Dupont *et al.*, 2006)

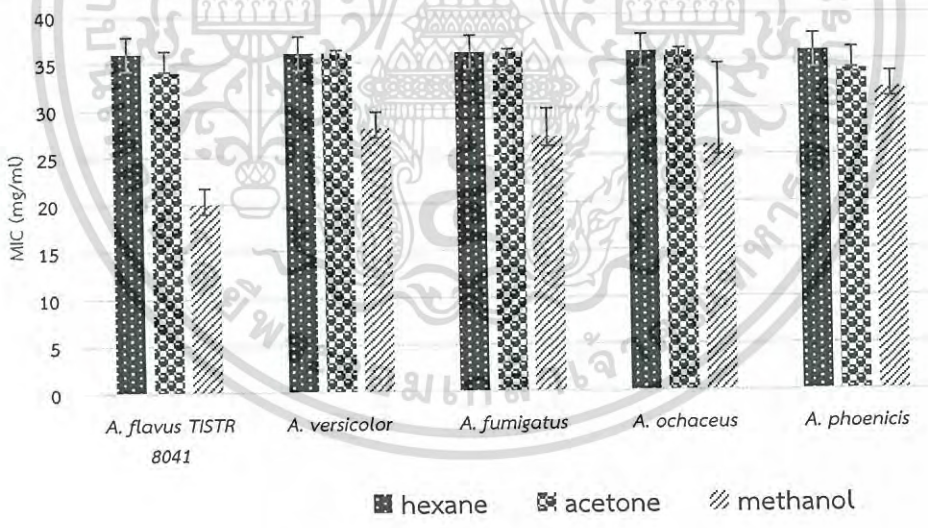
4.2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

สารสกัดจากใบยูคาลิปตัส ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย คือ เฮกเซน, อะซิโตน และเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญของรา *A. flavus* TISTR 8041, *A. versicolor, A. fumigatus, A. ochraceus* และ *A. phoenicis* เมื่อทดสอบด้วยวิธี broth microdilution ตามวิธีการของ NCCLS-27A และวัดการเจริญของเชื้อด้วยวิธี Resazurin (Hussian. *et al.*, 2011) และเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ ตามวิธีการของ NCCLS-38A2 แสดงได้ในรูปที่ 4.3 และรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) ของเชื้อรา 5 สายพันธุ์



รูปที่ 4.4 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อรา (MFC) 5 สายพันธุ์

จากผลการทดลอง พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดที่ใช้ยับยั้งเชื้อราพบว่าสารสกัดยูคาลิปตัสจากด้วยเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญของรา *A. flavus* TISTR 8041 และ *A. ochraceus* ได้ดี มีค่า MIC ประมาณ 20.0 ± 1.00 mg/mL ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Safaei-Ghomi และ Abbasi (2010) ที่พบว่าสารสกัดจากใบของ *E. largiflorens* ที่สกัดด้วยน้ำมีค่า MIC ของการยับยั้งการเจริญของ *A. niger* ได้ดีกว่าสารสกัดด้วย $CHCl_3$ สารสกัดด้วยน้ำมีค่า MIC ของ

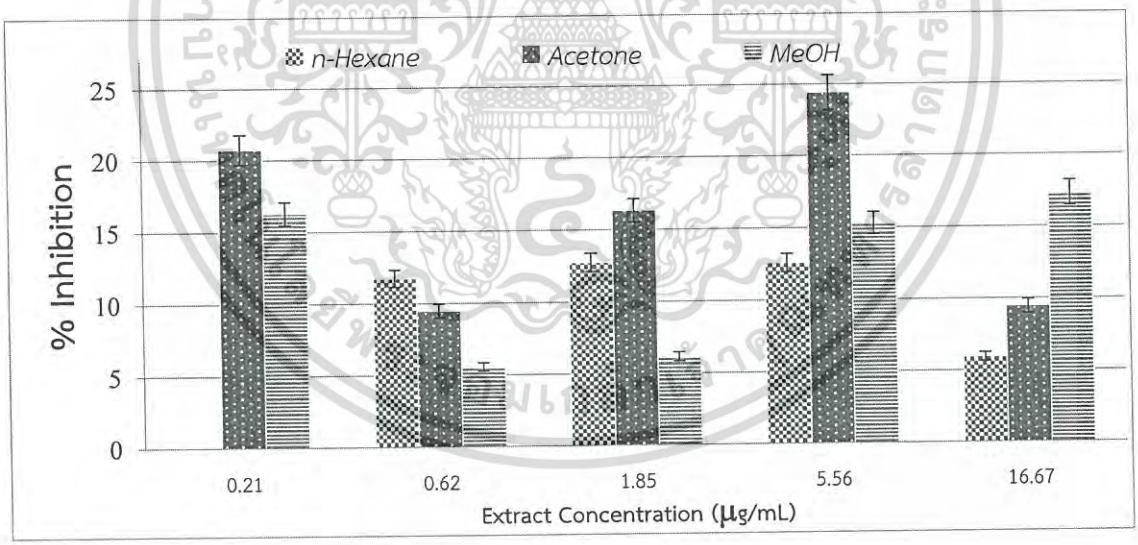
เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การยับยั้งการเจริญของ *A. niger* ประมาณ 31.2 μg/mL ขณะที่สกัดด้วย $CHCl_3$ มีค่า MIC ของการยับยั้งการเจริญของ *A. niger* มากกว่า มีค่าประมาณ 125 μg/mL (Safaei-Ghomi & Ahd, 2010) น้ำมันหอมระเหย (essential oil, EOs) จากต้น *Eucalyptus globulus* มีความเป็นพิษต่อยีนของรา *Aspergillus nidulans* ความเข้มข้นของ EOs ประมาณ 0.12 μL/mL และ 0.25 μL/mL จะทำให้เกิดกระบวนการ mitotic crossing over ทำให้โครโมโซมผิดปกติได้ ส่วนประกอบส่วนใหญ่ของ EOs จาก *Eucalyptus globulus* ประกอบด้วย eucalyptol (49.0 %), α-pinene (8.9), β-pinene (1.5), globulol (6.9), α-eudesmol (1.12), spathulenol (1.42), γ-cadinene (1.45), trans-β-elemenone (1.23) และ aromandendrene (2.3) (Miyamoto *et al.*, 2009)

4.3 การยับยั้งการเจริญของไวรัส

4.3.1 ยับยั้งการเจริญของไวรัส HSV-1

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของไวรัสที่ทำให้เกิดโรคเริม เช่น HSV-1 พบว่าสารสกัดจากใบของต้น *E. tereticornis* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนสามารถยับยั้งการเจริญของ HSV-1 ได้ดี มีค่าการยับยั้งการเจริญของไวรัสชนิดนี้ 24.42 % เมื่อใช้สารสกัดเข้มข้น 5.56 ug/mL แสดงได้ในรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.5 การยับยั้งการเจริญของไวรัสที่ทำให้เกิดโรคเริม เช่น HSV-1 ของสารสกัดจากใบ *E. tereticornis* ทดสอบด้วยวิธี GFP-based assay

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของไวรัส HSV-1 ± SE สารสกัดจากใบยูคาลิปตัส ที่สกัดจากตัวทำละลายเฮกเซน, อะซิโตนและเมทานอล

ความเข้มข้น (µg/ml)	% การยับยั้งไวรัส HSV-1 ± SE		
	สกัดด้วยเฮกเซน	สกัดด้วยอะซิโตน	สกัดด้วยเมทานอล
0.21	0.00 ± 0.00[a]	20.74 ± 12.16[a]	16.28 ± 8.76[a]
0.62	11.74 ± 11.74[a]	9.47 ± 7.31[a]	5.57 ± 5.57[a]
1.85	12.74 ± 10.58[a]	16.33 ± 16.33[a]	6.16 ± 8.76[a]
5.56	12.58 ± 12.58[a]	24.42 ± 2.31[a]	15.32 ± 12.95[a]
16.67	5.95 ± 5.95[a]	9.45 ± 9.45[a]	17.31± 8.71[a]
50.00	ND	ND	10.82 ± 6.65[a]

*** ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

** ND คือ ไม่ได้ทดสอบ

จากผลการศึกษานี้ พบว่ามีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Schnitzler *et al.* (2001) ที่พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากยูคาลิปตัสสามารถยับยั้งการเจริญของ HSV-1 ได้มากถึง 50% เมื่อใช้น้ำมันหอมระเหยประมาณ 0.03% ทดสอบด้วยวิธี standard neutral red dye uptake assay กับ RC-37 cells มีค่า IC_{50} ของการยับยั้งการเจริญของ HSV-1 และ HSV-2 เมื่อทดสอบด้วย plaque reduction assay กับ RC-37 cells ซึ่งมีค่า IC_{50} ของการยับยั้งการเจริญของ HSV-1 ประมาณ 0.009 % และมีค่า IC_{50} ของการยับยั้งการเจริญของ HSV-2 ประมาณ 0.008 % (Schnitzler *et al.*, 2001) เมื่อทดสอบด้วยน้ำมันหอมระเหยของ *E. caesia* จะมีค่าการยับยั้งการเจริญของ HSV-1 ดีขึ้น มีค่า IC_{50} ประมาณ เมื่อทดสอบด้วยวิธี plaque reduction activity กับ Vero cells (Gavanji *et al.*, 2015).

4.3.2 การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามินิเดสจากไวรัส H5N1

สารสกัดจากใบของต้น *E. tereticornis* ที่ระดับความเข้มข้น 3.13 µg/mL – 100 µg/mL สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามินิเดสจากไวรัส H5N1 ได้ เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้น ความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามินิเดสจากไวรัส H5N1 มากขึ้น (ตารางที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามินิเดสจากไวรัส H5N1 ของสารสกัดหยาบยูคาลิปตัสที่สกัดจากตัวทำละลาย Acetone, Hexane และ Methanol

ความเข้มข้น	% การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามินิเดสจากไวรัส H5N1 ± SE		
(µg/ml)	สกัดด้วยเฮกเซน	สกัดด้วยอะซิโตน	สกัดด้วยเมทานอล
3.13	13.16 ± 3.56 ^{ab}	10.91 ± 1.72^{d}	6.77 ± 4.04^{b}
6.25	13.30 ± 4.92 ^{ab}	12.44 ± 1.43^{d}	12.60 ± 1.48^{b}
12.50	6.47 ± 0.70 ^{b}	17.08 ± 1.82^{cd}	14.76 ± 1.67^{b}
25.00	9.89 ± 6.38 ^{ab}	20.74 ± 0.56^{bc}	17.87 ± 1.45^{ab}
50.00	13.67 ± 3.93 ^{ab}	24.53 ± 0.81^{ab}	24.35 ± 7.69^{ab}
100.00	28.90 ± 0.13 ^{a}	31.39 ± 1.19^{a}	35.78 ± 0.83^{a}

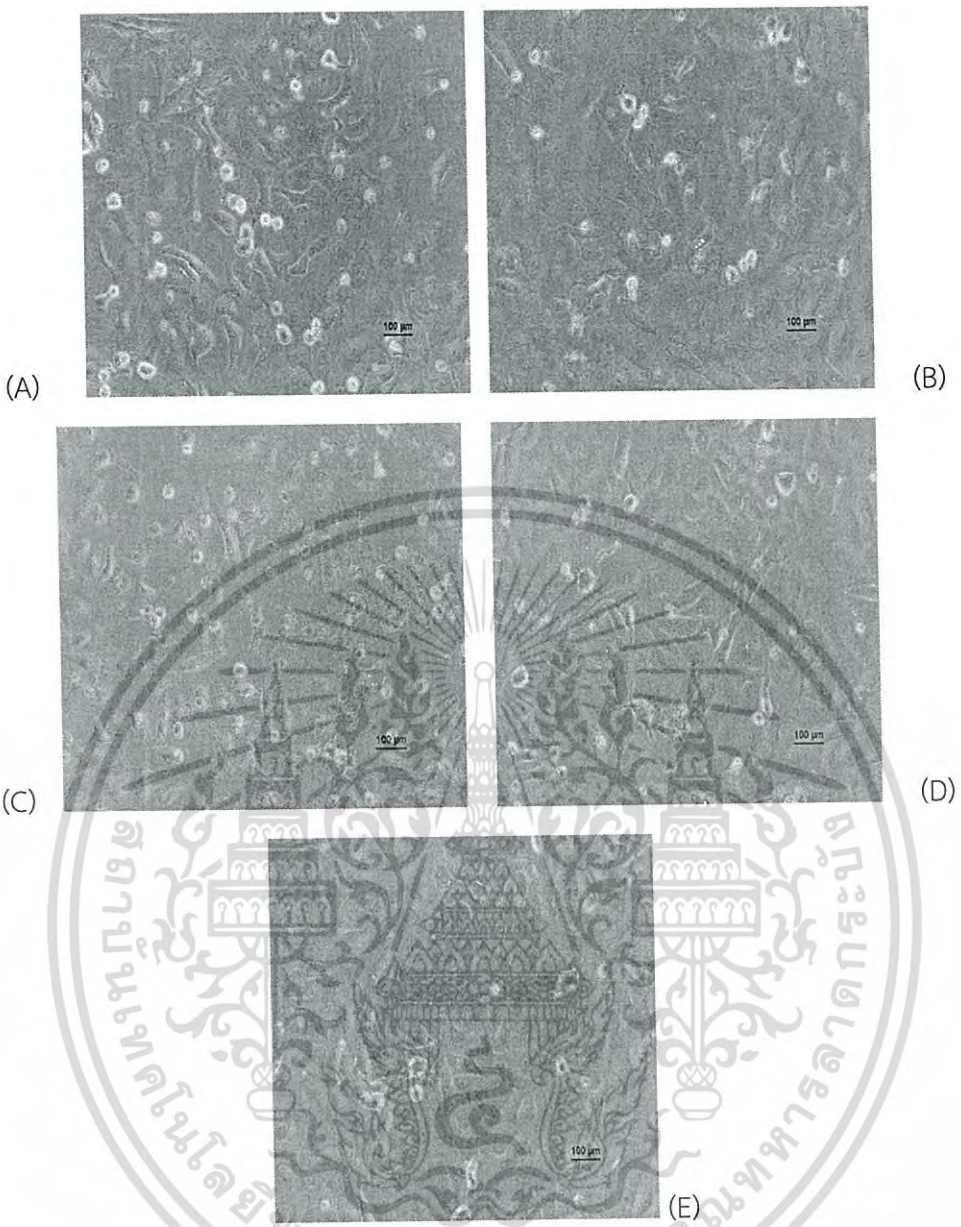
** ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

การทดสอบละอองลอย (aerosol) ของน้ำมันหอมระเหยจาก *E. polybratea* ระยะเวลา 5 -15 นาที จะพบการรอดชีวิตของไวรัส *Escherichia coli* M 13 phage สูงถึง 95 % เมื่อระยะเวลากการโหลดน้ำมันหอมระเหย 10 วินาที ระยะเวลาไวรัสสัมผัสกับน้ำมันหอมระเหย 15 นาที มีอัตราการรอดชีวตของไวรัส 0.72 % และเมื่อเพิ่มระยะเวลาสัมผัสน้ำมันหอมระเหยเป็น 30 นาที จะไม่พบการรอดชีวิตของไวรัส M 13 phage (Usachev *et al.*, 2013) การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Neuraminidase มีความสำคัญ การรักษาโรคไข้หวัดใหญ่จะรักษาได้ดีเมื่อรักษาด้วยยา Neuraminidase Inhibitor เช่น Tamiflu หรือ GPO-A Flu เนื่องจากเอนไซม์ Neuraminidase จะอยู่ที่ผิวไวรัสทำให้ไวรัส ไวรัสที่มีเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ที่ผิวของไวรัสจะก่อโรคได้มากกว่า การใช้ยาเพื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Neuraminidase จะทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์

4.4 ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Antiproliferation Activity)

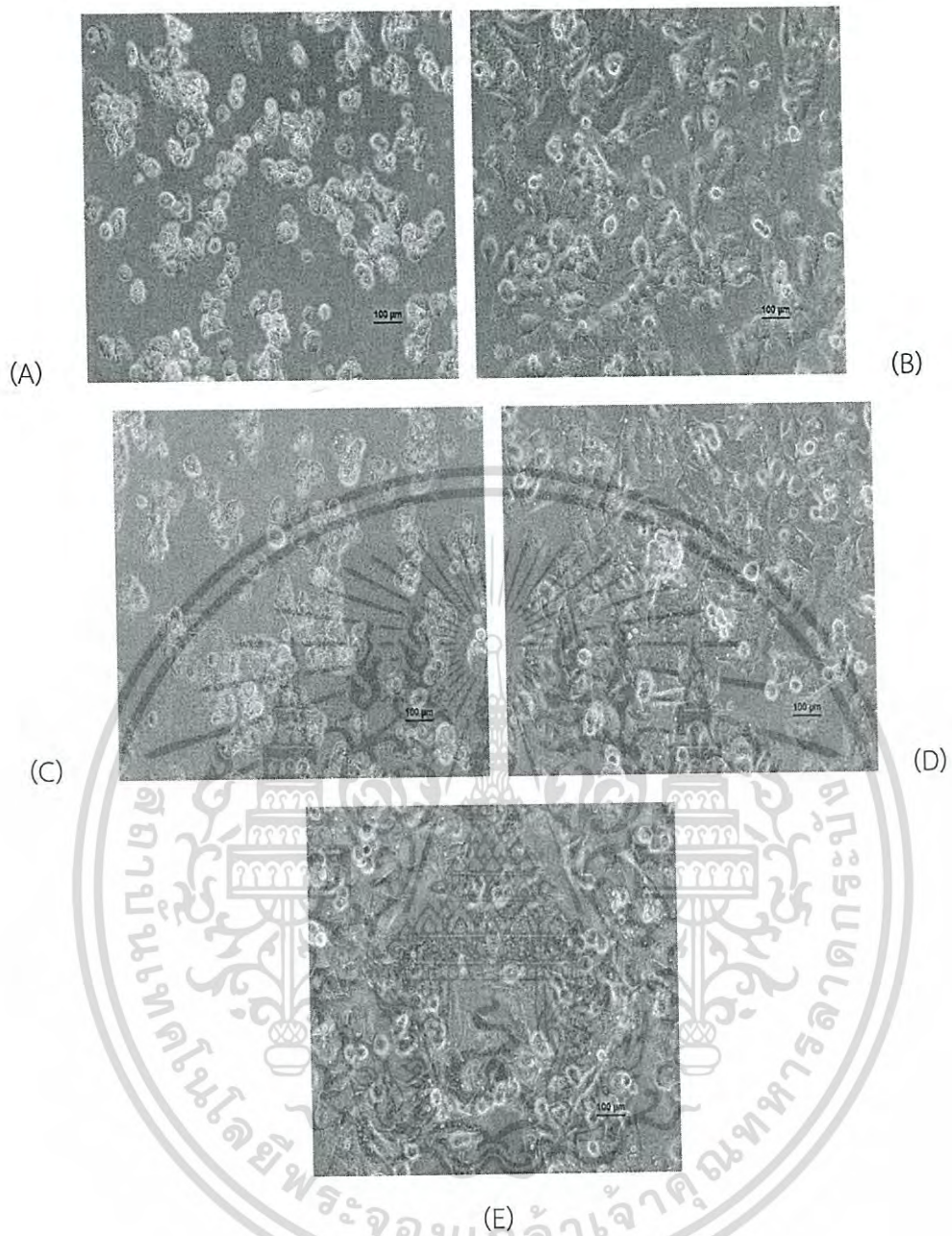
การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์ 5 ชนิดโดยเซลล์ปกติคือ เซลล์ไตลิงแอฟริกา (Vero) และเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งตับ (HepG-2) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (HT-29) ด้วยการหาการยับยั้งการเจริญของเซลล์แบบปฐมภูมิ ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบแต่ละชนิด 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการวัดเซลล์มีชีวิตด้วย MTT ลักษณะของเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดยูคาลิปตัส แสดงได้ในรูปที่ 4.6 – รูปที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



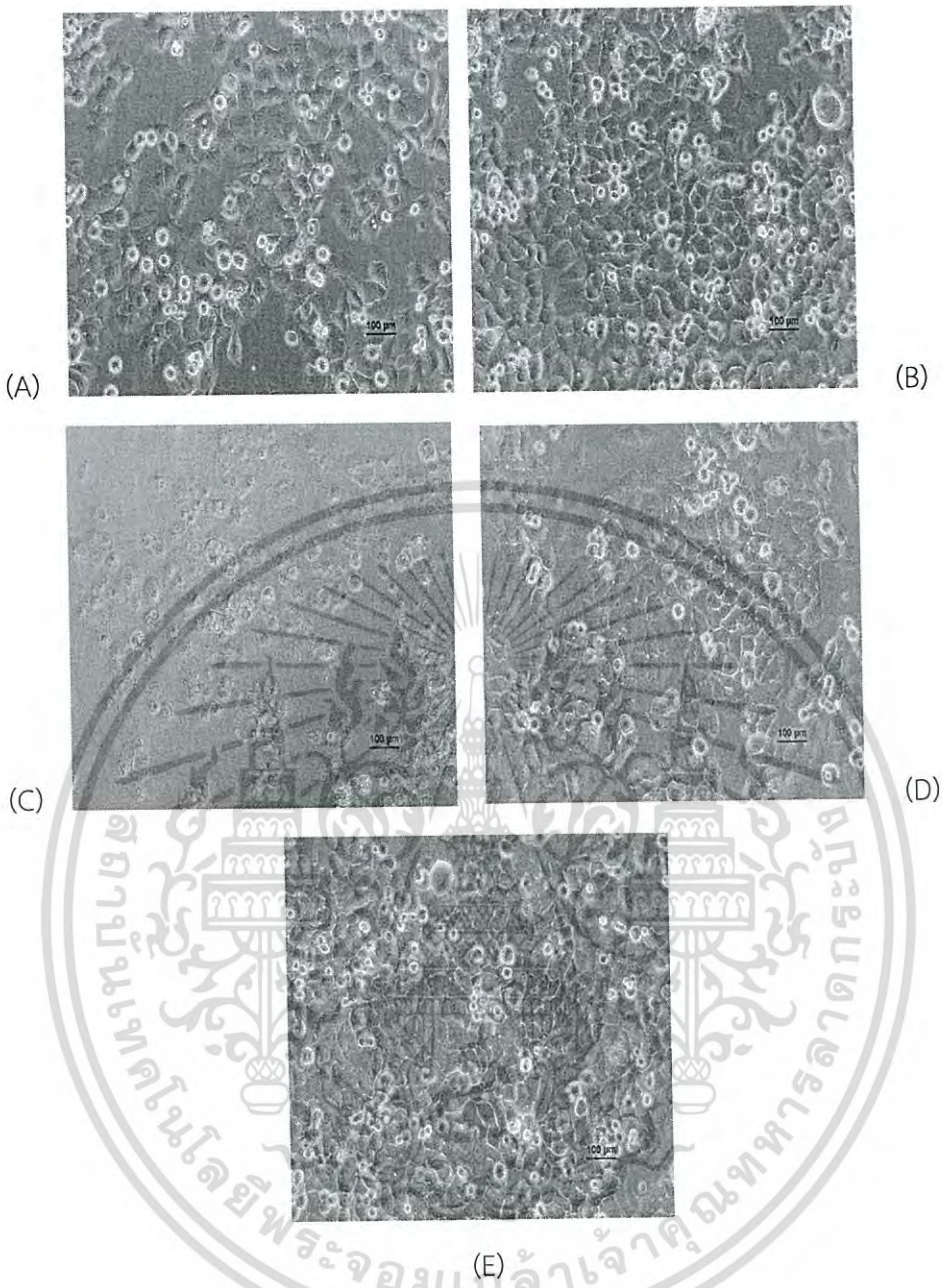
รูปที่ 4.6 ลักษณะของเซลล์ Vero ที่ถ่ายภาพด้วยกล้องเฟสคอนทราสต์ ทดสอบด้วยสารสกัดจากใบยูคาลิปตัสที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ; (A) เซลล์ Vero ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดด้วยเฮกเซน (B) เซลล์ Vero ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดด้วยอะซิโตน (c) เซลล์ Vero ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดด้วยสารสกัดด้วยดเมทานอล (D) เซลล์ Vero ที่ถูกทดสอบด้วย DMSO (คอนโทรล) (E) เซลล์ Vero ปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



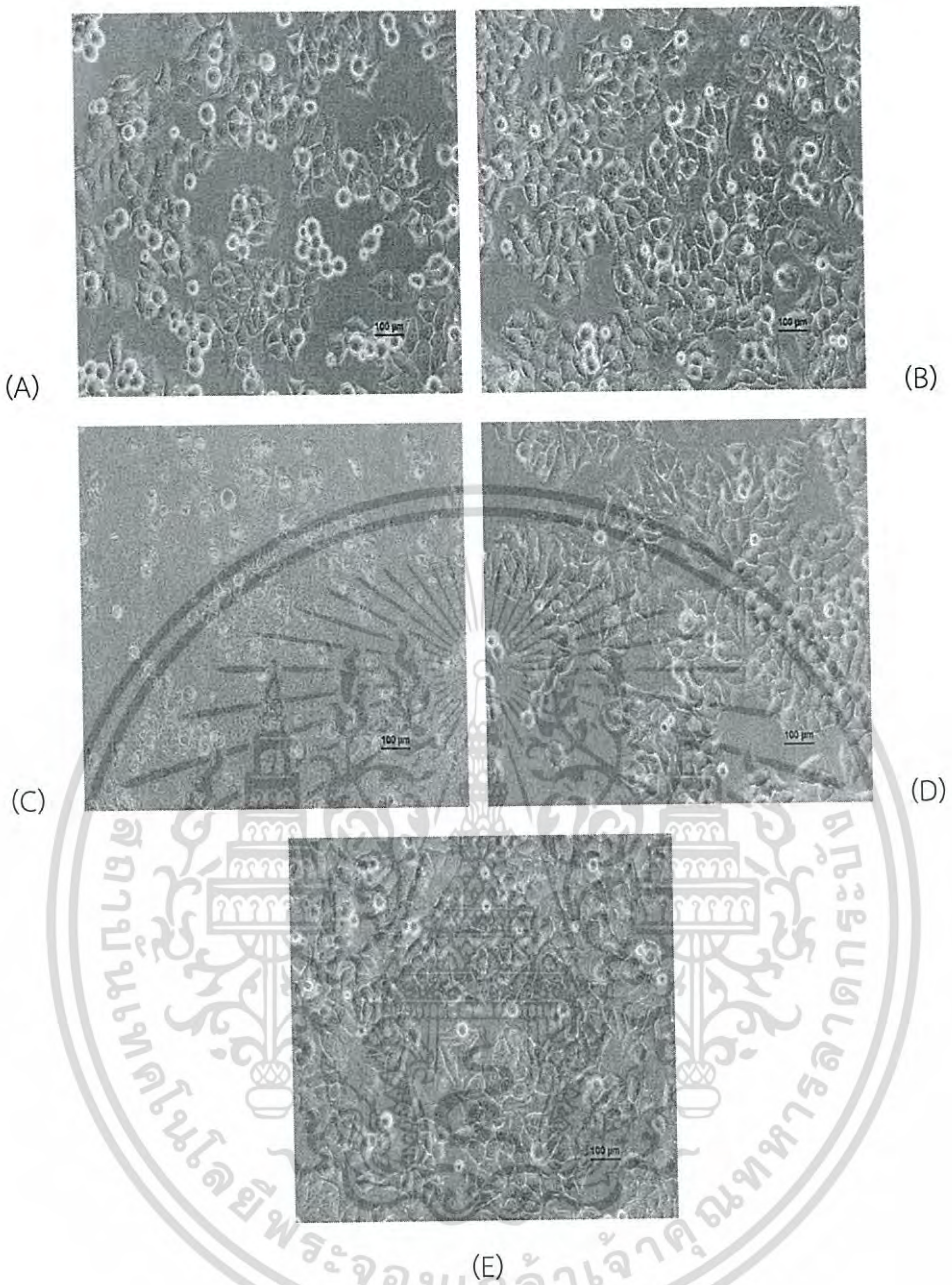
รูปที่ 4.7 ลักษณะของเซลล์ HepG2 ที่ถ่ายภาพด้วยกล้องเฟสคอนทราสต์ ทดสอบด้วยสารสกัดทั้งสามชนิด (A) เซลล์ HepG2 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน (B)เซลล์HepG2 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดอะซิโตน (c) เซลล์ HepG2 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล (D) เซลล์ HepG2 ที่ถูกทดสอบด้วย DMSO (คอนโทรล) (E) เซลล์ HepG2 ปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ลักษณะของเซลล์ HT29 ที่ถ่ายภาพด้วยกล้องเฟสคอนทราสต์ ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดทั้งสามชนิด (A) เซลล์ HT-29 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน (B)เซลล์ HT-29 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดอะซิโตน (c) เซลล์ HT-29 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล (D) เซลล์ HT-29 ที่ถูกทดสอบด้วย DMSO (control) (E) เซลล์ HT-29 ปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ลักษณะของเซลล์ MCF7 ที่ถ่ายภาพด้วยกล้องเฟสคอนทราสต์ (A) เซลล์ MCF-7 ทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน (B) เซลล์ MCF-7 ที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดอะซิโตน (c) เซลล์ MCF-7 ทดสอบด้วยสารสกัดเมทานอล (D) เซลล์ MCF-7 ทดสอบด้วย DMSO (คอนโทรล) (E) เซลล์ MCF-7 ปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การเป็นพิษต่อเซลล์ไต (Vero)

สารสกัดจากใบยูคาลิปตัสที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนจะมีค่าการยับยั้งการเจริญของ vero cell มากที่สุด มีค่า $IC_{50} \pm SE$ ประมาณ 37.29 ± 1.67 μg/mLเมื่อสกัดด้วยอะซิโตนจะลดความสามารถในการยับยั้ง vero cell ลง มีค่า $IC_{50} \pm SE$ ประมาณ 46.53 ± 0.56 μg/mL และสารสกัดจากใบด้วยเมทานอลไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไต ขณะที่การเป็นพิษต่อเซลล์ไตของ Ellipticine มีค่า $IC_{50} \pm SE$ ประมาณ 1.36 ± 0.12 μg/mL (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 การเป็นพิษต่อเซลล์ Vero cell ของสารสกัดจากใบ *E. tereticonis* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน อะซิโตนและเมทานอล

Solvent of Extraction	% Inhibition	$IC_{50} \pm SE$ (μg/mL)
n-Hexane	40.24 30.24 41.38	37.29±1.67
Acetone	44.54 48.62 46.43	46.53±0.56
MeOH	No cytotoxicity	-

*$IC_{50} \pm SE$ of Ellipticine = 1.36 ± 0.12 μg/mL

การสกัดด้วยตัวทำละลายขั้วสูง เช่น เมทานอลละจะทำให้เกิดการเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Elaissi และคณะ, 2012 ที่ได้กลั่น (hydrodistillation) น้ำมันหอมระเหยจากต้น *E. maidenii*, *E. sideroxylon* and *E. cinerea* พบว่าเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดความเข้มข้นระหว่าง 204.5 ± 0.35 ถึง 253.5 ± 0.35 g/mL จะมีความเป็นพิษต่อ Vero cell ต่ำ เมื่อทดสอบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากต้นยูคาลิปตัสชนิดอื่น ๆ เช่น *E. odorata*, *E. leucoxylon*, *E. lehmannii*, *E. astringens* and *E. bicostata* จะมีความเป็นพิษต่อ Vero cell มากขึ้นเมื่อทดสอบด้วยน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้นประมา 6.2 ± 0.14 ถึง 16 ± 0.00 mg/mL (Elaissi *et al.*, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การต้านอนุมูลอิสระ

4.6.1 สารประกอบฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocaltue

การทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย กับรีเอเจนต์ Folin-Ciocalteu และโซเดียมคาร์บอเนตความเข้ม 100 มิลลิกรัมในเมทานอล 1 มิลลิลิตร วัดปฏิกิริยาด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร หาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิคความเข้ม 0, 20, 40, 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด ประมาณ 44.80 มิลลิกรัมของกรดแกลลิคต่อกรัมของสารสกัด รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากตัวทำลายอะซิโตนและเฮกเซน ประมาณ 25.08 และ 23.68 มิลลิกรัมของกรดแกลลิคต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Luis และคณะ (2014) โดยทำการศึกษาจากเนื้อไม้ของพืช *E. globulus* ที่นำมาจากบริเวณเมดิเตอร์เรเนียน ผลการทดลองพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดเมทานอล (251.00 ± 5.06 มิลลิกรัมของกรดแกลลิคต่อกรัมของสารสกัด) มีมากที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 75 (218.67 ± 4.52 มิลลิกรัมของกรดแกลลิคต่อกรัมของสารสกัด) และสารสกัดจากเฮกเซน (17.00 ± 2.55 มิลลิกรัมของกรดแกลลิคต่อกรัมของสารสกัด) (Luis *et al.*, 2014)

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ทดสอบโดยวิธี Folin-Ciocaltue

ตัวทำละลาย	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ± SE (mg GAE/g)
Hexane	23.68 ± 0.12
Acetone	25.08 ± 0.05
Methanol	44.80 ± 0.13

4.6.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging

สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดโดยใช้ 5 ความเข้มข้นคือ 0.1 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของเมทานอล กับ DPPH เข้มข้น 2 mM (ร้อยละ 0.007 กรัมในเมทานอล 100 มิลลิลิตร) โดยจะทำการทดสอบในที่มืดเนื่องจาก DPPH จะไม่เสถียรเมื่อถูกแสง การวัดปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (ตารางที่ 4.5) พบว่าสารสกัดจากอะซิโตนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากเฮกเซนและเมทานอล เทียบเท่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ Ascorbic acid ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Luis และคณะ (2014) โดยทำการสกัด เนื้อไม้จาก *E. globulus* ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เอทานอล เมทานอลและเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 75 พบว่า สารสกัดเอทานอลซึ่งมีขั้วต่ำกว่าเมทานอลและสูงกว่าเฮกเซนเช่นเดียวกับอะซิโตนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.33 ± 0.61 มิลลิกรัมต่อลิตร สารสกัดจากเฮกเซนและเมทานอลให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 369.29±23.62 และ 10.84 ± 0.23 ตามลำดับ (Luis *et al.*, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Scavenging แสดงค่า %EC ของสารสกัดหยาบยูคาลิปตัสที่สกัดจากตัวทำละลายต่างๆในแต่ละความเข้มข้น

ความเข้มข้นของสารสกัด (μg/ml)	% Effective Concentration			
	Hexane	Acetone	Methanol	Ascorbic acid
100	43.67 ±1.28	75.15 ±2.3	70.1 ±1.25	94.47 ±0.35
250	44.46 ±1.12	91.71 ±0.31	77.8 ±0.65	95.14 ±0.1
500	51.7 ±2.93	90.78 ±0.35	85.45 ±0.57	95.18 ±0.11
750	55.66 ±2.51	91.14 ±0.4	88.11 ±3.50	96.52 ±0.3

* แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

อักษรที่แสดงแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การคัดเลือกสายพันธุ์ของต้นยูคาลิปตัส สายพันธุ์ *E. tereticornis* ที่มีการปลูกที่จังหวัดปราจีนบุรี นำตัวอย่างมาตากแห้งแล้วบดให้มีขนาดเล็กลง นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน อะซิโตน และเมทานอล ด้วยเครื่องอัลตราโซนิก ระยะเวลาสกัด 30 นาที อุณหภูมิ 40 °C พบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย สารสกัดจากใบยูคาลิปตัสที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน อะซิโตน และเมทานอล ทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีเมื่อทดสอบ ด้วยวิธี broth microdilution สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์ได้ เช่น *Bacillus subtilis* ได้ดีกว่าการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonell typhimurium* และ *Vibrio parahaemolyticus*, สามารถยับยั้งการเจริญของรา *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus* และ *A. phoenicis*, สามารถยับยั้งการเจริญของไวรัส HSV-1 ได้ มีค่าการยับยั้ง 24.42 % เมื่อใช้สารสกัดเข้มข้น 5.56 μg/mL และสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นิวรามินิเดสจากไวรัส H5N1 ได้ดีเมื่อสกัดสารด้วยเมทานอล มีค่าการยับยั้ง 35.78 % เมื่อใช้สารสกัดเข้มข้น 100 μg/mL สารสกัดจากต้นยูคาลิปตัสยังเป็นพิษต่อเซลล์ไต (Vero), เซลล์มะเร็งตับ (HepG-2) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (HT-29) มี จะมีค่าการยับยั้งการเจริญของ Vero cell สูงเมื่อสกัดด้วนตัวทำละลายไม่มีขั้ว สารสกัดจากใบยูคาลิปตัสที่สกัดด้วยเฮกเซน มีค่า IC_{50} ± SE ประมาณ 37.29 ± 1.67 μg/mL นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากใบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากเมทานอลจะมีสารฟีนอลิกสูงสุด มีค่าประมาณ 44.80 ± 0.13 mg GAE/g และความสามารถในการดับจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนจะมีค่ามากที่สุด โดยมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ 91.45 % เมื่อสารสกัดมีความเข้มข้น 750 μg/mL

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาการสกัดสารจากส่วนอื่น ๆ ของต้นยูคาลิปตัส เช่น ลำตัน หรือเปลือกของลำต้น และทดสอบการสกัดด้วยวิธีอื่นเช่น การกลั่น เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลผลิตการวิจัย

นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ งานประชุมวิชาการ Asian Conference on Engineering and Natural Science (ACENS) เรื่อง Antiproliferation and antioxidation activities of Eucalyptus tereticornis leaves (ACENS – 67443) ระหว่างวันที่ 19 – 21 มกราคม พ.ศ. 2561 ณ จังหวัดฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

1. Badrunnisa, S. Pai, V.R. Shantaram, M. 2011. Antibacterial activity of *Eucalyptus tereticornis* extracts for in use coolants of steel industry. International *Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2(4) : 1789-1794.
2. De Mitri, M. S., K. Poussin, P. Baccarini, P. Pontisso, A. D'Errico, N. Simon, W. Grigioni, A. Alberti, M. Beaugrand, E. Pisi and et al., 1995. HCV-associated liver cancer without cirrhosis. *Lancet (London, England)*, 345, 413-415.
3. Elaissi, A., Z. Rouis, N. A. B. Salem, S. Mabrouk, Y. ben Salem, K. B. H. Salah, M. Aouni, F. Farhat, R. Chemli, F. Harzallah-Skhiri and M. L. Khouja, 2012: Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 81.
4. Fadel, H., F. Marx, A. El-Sawy and A. El-Ghorab, 1999: Effect of extraction techniques on the chemical composition and antioxidant activity of Eucalyptus camaldulensis var. brevirostris leaf oils. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 208, 212-216.
5. Flaman, Z., S. Pellechia-Clarke, B. Bailey and M. McGuigan, 2001: Unintentional exposure of young children to camphor and eucalyptus oils. *Paediatrics & Child Health*, 6, 80-83.
6. Gavanji, S., S. S. Sayedipour, B. Larki and A. Bakhtari, 2015: Antiviral activity of some plant oils against herpes simplex virus type 1 in Vero cell culture. *Journal of Acute Medicine*, 5, 62-68.
7. Geran R.I., G. N. H., Mac Donal M.M., 1972: Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systemS CANCER *Chemotherapy Reports* 3, 1-103.
8. Hunt, L., M. Jordan, M. De Jesus and F. M. Wurm, 1999: GFP-expressing mammalian cells for fast, sensitive, noninvasive cell growth assessment in a kinetic mode. *Biotechnol Bioeng*, 65, 201-205.
9. Hussian, A.I. Anwar, F. Nigam, P.S. Sarker, S.D. Moore, J.E. Rao, J.R. Mazumdar, A. 2011. Antibacterial activity of some Lamiace ae essential oils using resazurin as anindicator of cell growth. *LWT - Food Science and Technology*. 44 : 1199-1206.
10. Kaur, S., Singh, H. P., Batish, D.R. Kohli, R.K. 2011. Chemical characterization, Anti-oxidant and antifungal activity of essential oil from *Eucalyptus tereticornis*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(19) : 4788-479.
11. Luis, A. Neiva, D. Pereira, H. Gominho, J. Domingues, F. Duarte, A.P. 2014. Stumps of *Eucalyptus globulus* as a Source of Antioxidant and Antimicrobial Polyphenols. *Molecules*. 19 : 16428-16446.
12. Mulyaningsih, S., F. Sporer, S. Zimmermann, J. Reichling and M. Wink, 2010. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of Eucalyptus globulus against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. Mota, I. S., P. C. Rodrigues Pinto, C. Novo, G. Sousa, O. Guerreiro, A. N. R. Guerra, M. F. Duarte and A. E. Rodrigues, 2012: Extraction of polyphenolic compounds from E*ucalyptus globulus* bark : Process optimization and screening for biological activity. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51, 6991-7000.

14. NCCLS. 2002. Reference Methode for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition. NCCLS document M27-A2. 22(15). USA : Clinical and Laboratory Standards Institute.

15. NCCLS. 2008. Reference Methode for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. NCCLS document M38-A2. 28(16).USA : Clinical and Laboratory Standards Institute.

16. Patel, S. and J. Wiggins, 1980: Eucalyptus oil poisoning. *Archives of Disease in Childhood*, 55, 405-406.

17. Paterlini-Brechot, P., K. Saigo, Y. Murakami, M. Chami, D. Gozuacik, C. Mugnier, D. Lagorce and C. Brechot, 2003: Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene*, 22, 3911-3916.

18. Pattle, S. B. and P. J. Farrell, 2006: The role of Epstein–Barr virus in cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 6, 1193-1205.

19. Pereira, V., C. Dias, M. C. Vasconcelos, E. Rosa and M. J. Saavedra, 2014 : Antibacterial activity and synergistic effects between Eucalyptus globulus leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (Pseudomonas aeruginosa). *Industrial Crops and Products*, 52, 1-7.

20. Perez, R. E., H. Shen, L. Duan, R. H. Kim, T. Kim, N. H. Park and C. G. Maki, 2016: Modeling the Etiology of p53-mutated Cancer Cells. *The Journal of biological chemistry*, 291, 10131-10147.

21. Rivas da Silva, A. C., P. M. Lopes, M. M. Barros de Azevedo, D. C. Costa, C. S. Alviano and D. S. Alviano, 2012: Biological activities of alpha-pinene and beta-pinene enantiomers. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17, 6305-6316.

22. Rocha Caldas GF, O. A., Araújo AV, Lafayette SSL, Albuquerque GS, Silva-Neto JDC, et al. , 2015: Gastroprotective Mechanisms of the Monoterpene 1,8-Cineole (Eucalyptol). *PLoS ONE*, 10, e0134558. doi:0134510.0131371/journal.pone.0134558

23. Schnitzler, P., K. Schon and J. Reichling, 2001: Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Pharmazie*, 56, 343-347.

24. Storey, A., M. Thomas, A. Kalita, C. Harwood, D. Gardiol, F. Mantovani, J. Breuer, I. M. Leigh, G. Matlashewski and L. Banks, 1998: Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated cancer. *Nature*, 393, 229-234.

25. Stracquadanio, G., X. Wang, M. D. Wallace, A. M. Grawenda, P. Zhang, J. Hewitt, J. Zeron-Medina, F. Castro-Giner, I. P. Tomlinson, C. R. Goding, K. J. Cygan, W. G. Fairbrother, L. F. Thomas, P. Saetrom, F. Gemignani, S. Landi, B. Schuster-Bockler, D. A. Bell and G. L. Bond, 2016: The importance of p53 pathway genetics in inherited and somatic cancer genomes. *Nat Rev Cancer*, 16, 251-265.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

26. Singleton, V.L. Orthofer, R. Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteureagent. *Methods of Enzymology*. 299 : 152–178.
27. Stracquadanio, G., X. Wang, M. D. Wallace, A. M. Grawenda, P. Zhang, J. Hewitt, J. Zeron-Medina, F. Castro-Giner, I. P. Tomlinson, C. R. Goding, K. J. Cygan, W. G. Fairbrother, L. F. Thomas, P. Saetrom, F. Gemignani, S. Landi, B. Schuster-Bockler, D. A. Bell and G. L. Bond, 2016: The importance of p53 pathway genetics in inherited and somatic cancer genomes. *Nat Rev Cancer*, 16, 251-265.
28. Sugimoto, K., K. Nakagawa, S. Hayashi, Y. Amakura, M. Yoshimura, T. Yoshida, R. Yamaji, Y. Nakano and H. Inui, 2009: Hydrolyzable Tannins as Antioxidants in the Leaf Extract of Eucalyptus globulus Possessing Tyrosinase and Hyaluronidase Inhibitory Activities. *Food Science and Technology Research*, 15, 331-336.
29. Theera Srisawat, P. C., W. H.-C. , Yaowapa Sukpondma and a. K. Kanokwiroon, 2013: Phytochemical Screening and Cytotoxicity of Crude Extracts of Vatica diospyroidesSymington Type LS. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 12 71-76.
30. Uribe, S., J. Ramirez and A. Peña, 1985: Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *Journal of Bacteriology*, 161, 1195-1200.
31. Usachev, E. V., O. V. Pyankov, O. V. Usacheva and I. E. Agranovski, 2013: Antiviral activity of tea tree and eucalyptus oil aerosol and vapour. *Journal of Aerosol Science*, 59, 22-30.
32. Vilela, G. R., G. S. de Almeida, M. A. B. R. D'Arce, M. H. D. Moraes, J. O. Brito, M. F. d. G. F. da Silva, S. C. Silva, S. M. de Stefano Piedade, M. A. Calori-Domingues and E. M. da Gloria, 2009: Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi Aspergillus flavus Link and Aspergillus parasiticus Speare. *Journal of Stored Products Research*, 45, 108-111.
33. Vuong, Q. V., S. Hirun, T. L. Chuen, C. D. Goldsmith, B. Munro, M. C. Bowyer, A. C. Chalmers, J. A. Sakoff, P. A. Phillips and C. J. Scarlett, 2015: Physicochemical, antioxidant and anti-cancer activity of a *Eucalyptus robusta* (Sm.) leaf aqueous extract. *Industrial Crops and Products*, 64, 167-174.
34. Vilela, G. R., G. S. de Almeida, M. A. B. R. D'Arce, M. H. D. Moraes, J. O. Brito, M. F. d. G. F. da Silva, S. C. Silva, S. M. de Stefano Piedade, M. A. Calori-Domingues and E. M. da Gloria, 2009 : Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from Eucalyptus globulus Labill., against the storage fungi Aspergillus flavus Link and Aspergillus parasiticus Speare. *Journal of Stored Products Research,* 45, 108-111.
35. Vuong, Q. V., S. Hirun, T. L. Chuen, C. D. Goldsmith, B. Munro, M. C. Bowyer, A. C. Chalmers, J. A. Sakoff, P. A. Phillips and C. J. Scarlett, 2015 : Physicochemical, antioxidant and anti-cancer activity of a Eucalyptus robusta (Sm.) leaf aqueous extract. *Industrial Crops and Products,* 64, 167-174.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
ผลวิเคราะห์ทางสถิติการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์นิวรามินิเดส

Oneway

[DataSet2] C:\Program Files (x86)\SPSS 15.0 for Windows\Neuraminidase eucalyptus - hex.sav

Descriptives

% Inhibition

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
3.13	2	13.1550	5.02753	3.55500	-32.0156	58.3256	9.60	16.71
6.25	2	13.2950	6.95086	4.91500	-49.1560	75.7460	8.38	18.21
12.50	2	6.4700	.98995	.70000	-2.4243	15.3643	5.77	7.17
25.00	2	9.8900	9.02268	6.38000	-71.1756	90.9556	3.51	16.27
50.00	2	13.6750	5.55079	3.92500	-36.1969	63.5469	9.75	17.60
100.00	2	28.9000	.18385	.13000	27.2482	30.5518	28.77	29.03
Total	12	14.2308	8.42088	2.43090	8.8805	19.5812	3.51	29.03

ANOVA

% Inhibition

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	593.200	5	118.640	3.810	.067
Within Groups	186.824	6	31.137		
Total	780.024	11			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

% Inhibition

	concentration	N	Subset for alpha = .01	
			1	2
Duncan[a]	12.50	2	6.4700	
	25.00	2	9.8900	9.8900
	3.13	2	13.1550	13.1550
	6.25	2	13.2950	13.2950
	50.00	2	13.6750	13.6750
	100.00	2		28.9000
	Sig.		.264	.019

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

[DataSet3] C:\Program Files (x86)\SPSS 15.0 for Windows\Neuraminidase eucalyptus - acetone.sav

Descriptives

% Inhibition

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
3.13	2	10.9100	2.43245	1.72000	-10.9447	32.7647	9.19	12.63
6.25	2	12.4400	2.02233	1.43000	-5.7299	30.6099	11.01	13.87
12.50	2	17.0750	2.58094	1.82500	-6.1138	40.2638	15.25	18.90
25.00	2	20.7350	.78489	.55500	13.6831	27.7869	20.18	21.29
50.00	2	24.5250	1.13844	.80500	14.2965	34.7535	23.72	25.33
100.00	2	31.3900	1.68291	1.19000	16.2696	46.5104	30.20	32.58
Total	12	19.5125	7.48775	2.16153	14.7550	24.2700	9.19	32.58

ANOVA

% Inhibition

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	595.319	5	119.064	33.363	.000
Within Groups	21.412	6	3.569		
Total	616.731	11			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

% Inhibition

	concentration	N	Subset for alpha = .01			
			1	2	3	4
Duncan[a]	3.13	2	10.9100			
	6.25	2	12.4400			
	12.50	2	17.0750	17.0750		
	25.00	2		20.7350	20.7350	
	50.00	2			24.5250	24.5250
	100.00	2				31.3900
	Sig.		.020	.101	.092	.011

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

[DataSet1] C:\Program Files (x86)\SPSS 15.0 for Windows\Neuraminidase eucalyptus - MeOH.sav

Descriptives

% Inhibition

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
3.13	2	6.7650	5.70635	4.03500	-44.5045	58.0345	2.73	10.80
6.25	2	12.5950	2.08597	1.47500	-6.1467	31.3367	11.12	14.07
12.50	2	14.7600	2.36174	1.67000	-6.4594	35.9794	13.09	16.43
25.00	2	17.8650	2.04354	1.44500	-.4955	36.2255	16.42	19.31
50.00	2	24.3500	10.87530	7.69000	-73.3607	122.0607	16.66	32.04
100.00	2	35.7800	1.17380	.83000	25.2339	46.3261	34.95	36.61
Total	12	18.6858	10.46850	3.02200	12.0345	25.3372	2.73	36.61

ANOVA

% Inhibition

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1039.168	5	207.834	7.498	.015
Within Groups	166.318	6	27.720		
Total	1205.485	11			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

% Inhibition

	concentration	N	Subset for alpha = .01	
			1	2
Duncan[a]	3.13	2	6.7650	
	6.25	2	12.5950	
	12.50	2	14.7600	
	25.00	2	17.8650	17.8650
	50.00	2	24.3500	24.3500
	100.00	2		35.7800
	Sig.		.020	.017

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ผลวิเคราะห์ทางสถิติการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส HSV-1

Oneway

[DataSet1] C:\Program Files (x86)\SPSS 15.0 for Windows\HSV 1 eucalyptus MeOH.sav (95 %)

Descriptives

% Inhibition

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
.21	3	16.2800	15.17402	8.76072	-21.4144	53.9744	.00	30.03
.62	3	5.5700	9.64752	5.57000	-18.3958	29.5358	.00	16.71
1.85	3	6.1633	7.97469	4.60419	-13.6469	25.9736	.00	15.17
5.56	3	15.3200	22.42573	12.94750	-40.3886	71.0286	.00	41.06
16.67	3	17.3133	15.09441	8.71476	-20.1833	54.8099	.00	27.71
50.00	3	10.8200	11.51349	6.64732	-17.7811	39.4211	.00	22.92
Total	18	11.9111	13.06873	3.08033	5.4122	18.4100	.00	41.06

ANOVA

% Inhibition

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	402.987	5	80.597	.387	.848
Within Groups	2500.472	12	208.373		
Total	2903.459	17			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

% Inhibition

	concentration	N	Subset for alpha = .05
			1
Duncan[a]	.62	3	5.5700
	1.85	3	6.1633
	50.00	3	10.8200
	5.56	3	15.3200
	.21	3	16.2800
	16.67	3	17.3133
	Sig.		.383

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

[DataSet1] C:\Program Files (x86)\SPSS 15.0 for Windows\HSV 1 eucalyptus Hex.sav (99 %)

Descriptives

% Inhibition

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
.21	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
.62	3	11.7367	20.32850	11.73667	-38.7621	62.2355	.00	35.21
1.85	3	12.7367	18.31823	10.57604	-32.7683	58.2417	.00	33.73
5.56	3	12.5800	21.78920	12.58000	-41.5474	66.7074	.00	37.74
16.67	3	5.9533	10.31148	5.95333	-19.6618	31.5685	.00	17.86
Total	15	8.6013	14.71411	3.79917	.4529	16.7497	.00	37.74

ANOVA

% Inhibition

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	371.268	4	92.817	.349	.839
Within Groups	2659.803	10	265.980		
Total	3031.071	14			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

% Inhibition

	concentration	N	Subset for alpha = .01
			1
Duncan[a]	.21	3	.0000
	16.67	3	5.9533
	.62	3	11.7367
	5.56	3	12.5800
	1.85	3	12.7367
	Sig.		.397

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

[DataSet1] C:\Program Files (x86)\SPSS 15.0 for Windows\HSV 1 eucalyptus Hex.sav (95 %)

Descriptives

% Inhibition

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
.21	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
.62	3	11.7367	20.32850	11.73667	-38.7621	62.2355	.00	35.21
1.85	3	12.7367	18.31823	10.57604	-32.7683	58.2417	.00	33.73
5.56	3	12.5800	21.78920	12.58000	-41.5474	66.7074	.00	37.74
16.67	3	5.9533	10.31148	5.95333	-19.6618	31.5685	.00	17.86
Total	15	8.6013	14.71411	3.79917	.4529	16.7497	.00	37.74

ANOVA

% Inhibition

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	371.268	4	92.817	.349	.839
Within Groups	2659.803	10	265.980		
Total	3031.071	14			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

% Inhibition

	concentration	N	Subset for alpha = .05
			1
Duncan[a]	.21	3	.0000
	16.67	3	5.9533
	.62	3	11.7367
	5.56	3	12.5800
	1.85	3	12.7367
	Sig.		.397

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

[DataSet1] C:\Program Files (x86)\SPSS 15.0 for Windows\HSV 1 eucalyptus Acetone.sav (99 %)

Descriptives

% Inhibition

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
.21	3	20.7400	21.05685	12.15718	-31.5681	73.0481	.00	42.10
.62	3	9.4700	12.65282	7.30511	-21.9614	40.9014	.00	23.84
1.85	3	16.3300	28.28439	16.33000	-53.9323	86.5923	.00	48.99
5.56	3	24.4167	21.31650	12.30709	-28.5365	77.3698	.00	39.32
16.67	3	9.4500	16.36788	9.45000	-31.2101	50.1101	.00	28.35
Total	15	16.0813	18.49395	4.77512	5.8397	26.3229	.00	48.99

ANOVA

% Inhibition

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	536.781	4	134.195	.316	.861
Within Groups	4251.584	10	425.158		
Total	4788.366	14			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

% Inhibition

	concentration	N	Subset for alpha = .01
			1
Duncan[a]	16.67	3	9.4500
	.62	3	9.4700
	1.85	3	16.3300
	.21	3	20.7400
	5.56	3	24.4167
	Sig.		.430

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

[DataSet1] C:\Program Files (x86)\SPSS 15.0 for Windows\HSV 1 eucalyptus Acetone.sav (95 %)

Descriptives

% Inhibition

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
.21	3	20.7400	21.05685	12.15718	-31.5681	73.0481	.00	42.10
.62	3	9.4700	12.65282	7.30511	-21.9614	40.9014	.00	23.84
1.85	3	16.3300	28.28439	16.33000	-53.9323	86.5923	.00	48.99
5.56	3	24.4167	21.31650	12.30709	-28.5365	77.3698	.00	39.32
16.67	3	9.4500	16.36788	9.45000	-31.2101	50.1101	.00	28.35
Total	15	16.0813	18.49395	4.77512	5.8397	26.3229	.00	48.99

ANOVA

% Inhibition

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	536.781	4	134.195	.316	.861
Within Groups	4251.584	10	425.158		
Total	4788.366	14			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

% Inhibition

	concentration	N	Subset for alpha = .05
			1
Duncan[a]	16.67	3	9.4500
	.62	3	9.4700
	1.85	3	16.3300
	.21	3	20.7400
	5.56	3	24.4167
	Sig.		.430

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

[DataSet1] C:\Program Files (x86)\SPSS 15.0 for Windows\HSV 1 eucalyptus MeOH.sav (99 %)

Descriptives

% Inhibition

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
.21	3	16.2800	15.17402	8.76072	-21.4144	53.9744	.00	30.03
.62	3	5.5700	9.64752	5.57000	-18.3958	29.5358	.00	16.71
1.85	3	6.1633	7.97469	4.60419	-13.6469	25.9736	.00	15.17
5.56	3	15.3200	22.42573	12.94750	-40.3886	71.0286	.00	41.06
16.67	3	17.3133	15.09441	8.71476	-20.1833	54.8099	.00	27.71
50.00	3	10.8200	11.51349	6.64732	-17.7811	39.4211	.00	22.92
Total	18	11.9111	13.06873	3.08033	5.4122	18.4100	.00	41.06

ANOVA

% Inhibition

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	402.987	5	80.597	.387	.848
Within Groups	2500.472	12	208.373		
Total	2903.459	17			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

% Inhibition

	concentration	N	Subset for alpha = .01
			1
Duncan[a]	.62	3	5.5700
	1.85	3	6.1633
	50.00	3	10.8200
	5.56	3	15.3200
	.21	3	16.2800
	16.67	3	17.3133
	Sig.		.383

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ผลการวิเคราะห์การเป็นพิษต่อ Vero cell

Oneway

[DataSet1] C:\Program Files (x86)\SPSS 15.0 for Windows\Vero eucalyptus Hex.sav

Descriptives

cytotoxicity

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
.21	3	1.4300	2.47683	1.43000	-4.7228	7.5828	.00	4.29
.62	3	1.7900	1.72867	.99805	-2.5043	6.0843	.00	3.45
1.85	3	1.6500	2.85788	1.65000	-5.4494	8.7494	.00	4.95
5.56	3	1.7377	2.85271	1.64701	-5.3489	8.8242	.00	5.03
16.67	3	6.4633	4.62593	2.67078	-5.0281	17.9548	1.56	10.75
50.00	3	87.9333	5.32235	3.07286	74.7119	101.1548	83.51	93.84
Total	18	16.8341	32.90314	7.75534	.4717	33.1964	.00	93.84

ANOVA

cytotoxicity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18254.173	5	3650.835	291.464	.000
Within Groups	150.310	12	12.526		
Total	18404.483	17			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

cytotoxicity

	concentration	N	Subset for alpha = .01	
			1	2
Duncan[a]	.21	3	1.4300	
	1.85	3	1.6500	
	5.56	3	1.7377	
	.62	3	1.7900	
	16.67	3	6.4633	
	50.00	3		87.9333
	Sig.		.138	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

[DataSet1] C:\Program Files (x86)\SPSS 15.0 for Windows\Vero eucalyptus Hex.sav

Descriptives

cytotoxicity

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
.21	3	1.4300	2.47683	1.43000	-4.7228	7.5828	.00	4.29
.62	3	1.7900	1.72867	.99805	-2.5043	6.0843	.00	3.45
1.85	3	1.6500	2.85788	1.65000	-5.4494	8.7494	.00	4.95
5.56	3	1.7377	2.85271	1.64701	-5.3489	8.8242	.00	5.03
16.67	3	6.4633	4.62593	2.67078	-5.0281	17.9548	1.56	10.75
50.00	3	87.9333	5.32235	3.07286	74.7119	101.1548	83.51	93.84
Total	18	16.8341	32.90314	7.75534	.4717	33.1964	.00	93.84

ANOVA

cytotoxicity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18254.173	5	3650.835	291.464	.000
Within Groups	150.310	12	12.526		
Total	18404.483	17			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

cytotoxicity

	concentration	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Duncan[a]	.21	3	1.4300	
	1.85	3	1.6500	
	5.56	3	1.7377	
	.62	3	1.7900	
	16.67	3	6.4633	
	50.00	3		87.9333
	Sig.		.138	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

[DataSet1] C:\Program Files (x86)\SPSS 15.0 for Windows\vero eucalyptus Acetone.sav

Descriptives

cytotoxicity

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
.21	3	3.6233	6.27580	3.62333	-11.9666	19.2133	.00	10.87
.62	3	3.7967	6.57602	3.79667	-12.5391	20.1324	.00	11.39
1.85	3	3.6133	4.40479	2.54310	-7.3288	14.5554	.00	8.52
5.56	3	4.1933	7.26307	4.19333	-13.8491	22.2358	.00	12.58
16.67	3	4.1860	7.08810	4.09232	-13.4218	21.7938	.01	12.37
50.00	3	59.4633	5.31690	3.06971	46.2554	72.6712	53.89	64.48
Total	18	13.1460	21.95002	5.17367	2.2305	24.0615	.00	64.48

ANOVA

cytotoxicity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7724.070	5	1544.814	39.730	.000
Within Groups	466.589	12	38.882		
Total	8190.659	17			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

cytotoxicity

	concentration	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Duncan[a]	1.85	3	3.6133	
	.21	3	3.6233	
	.62	3	3.7967	
	16.67	3	4.1860	
	5.56	3	4.1933	
	50.00	3		59.4633
	Sig.		.918	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

[DataSet1] C:\Program Files (x86)\SPSS 15.0 for Windows\vero eucalyptus Acetone.sav

Descriptives

cytotoxicity

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
.21	3	3.6233	6.27580	3.62333	-11.9666	19.2133	.00	10.87
.62	3	3.7967	6.57602	3.79667	-12.5391	20.1324	.00	11.39
1.85	3	3.6133	4.40479	2.54310	-7.3288	14.5554	.00	8.52
5.56	3	4.1933	7.26307	4.19333	-13.8491	22.2358	.00	12.58
16.67	3	4.1860	7.08810	4.09232	-13.4218	21.7938	.01	12.37
50.00	3	59.4633	5.31690	3.06971	46.2554	72.6712	53.89	64.48
Total	18	13.1460	21.95002	5.17367	2.2305	24.0615	.00	64.48

ANOVA

cytotoxicity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7724.070	5	1544.814	39.730	.000
Within Groups	466.589	12	38.882		
Total	8190.659	17			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

cytotoxicity

	concentration	N	Subset for alpha = .01	
			1	2
Duncan[a]	1.85	3	3.6133	
	.21	3	3.6233	
	.62	3	3.7967	
	16.67	3	4.1860	
	5.56	3	4.1933	
	50.00	3		59.4633
	Sig.		.918	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

[DataSet1] C:\Program Files (x86)\SPSS 15.0 for Windows\Vero eucalyptus MeOH.sav

Descriptives

cytotoxicity

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
.21	3	.8633	1.49534	.86333	-2.8513	4.5780	.00	2.59
.62	3	1.0333	1.78979	1.03333	-3.4127	5.4794	.00	3.10
1.85	3	.6933	1.20089	.69333	-2.2898	3.6765	.00	2.08
5.56	3	.1023	.17725	.10233	-.3380	.5426	.00	.31
16.67	3	.2363	.40934	.23633	-.7805	1.2532	.00	.71
50.00	3	8.8367	9.32859	5.38586	-14.3368	32.0102	2.51	19.55
Total	18	1.9609	4.60393	1.08516	-.3286	4.2504	.00	19.55

ANOVA

cytotoxicity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	172.129	5	34.426	2.195	.123
Within Groups	188.206	12	15.684		
Total	360.335	17			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

cytotoxicity

	concentration	N	Subset for alpha = .01
			1
Duncan[a]	5.56	3	.1023
	16.67	3	.2363
	1.85	3	.6933
	.21	3	.8633
	.62	3	1.0333
	50.00	3	8.8367
	Sig.		.031

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

[DataSet1] C:\Program Files (x86)\SPSS 15.0 for Windows\Vero eucalyptus MeOH.sav

Descriptives

cytotoxicity

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
.21	3	.8633	1.49534	.86333	-2.8513	4.5780	.00	2.59
.62	3	1.0333	1.78979	1.03333	-3.4127	5.4794	.00	3.10
1.85	3	.6933	1.20089	.69333	-2.2898	3.6765	.00	2.08
5.56	3	.1023	.17725	.10233	-.3380	.5426	.00	.31
16.67	3	.2363	.40934	.23633	-.7805	1.2532	.00	.71
50.00	3	8.8367	9.32859	5.38586	-14.3368	32.0102	2.51	19.55
Total	18	1.9609	4.60393	1.08516	-.3286	4.2504	.00	19.55

ANOVA

cytotoxicity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	172.129	5	34.426	2.195	.123
Within Groups	188.206	12	15.684		
Total	360.335	17			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

cytotoxicity

	concentration	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Duncan[a]	5.56	3	.1023	
	16.67	3	.2363	
	1.85	3	.6933	
	.21	3	.8633	
	.62	3	1.0333	
	50.00	3		8.8367
	Sig.		.796	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปการใช้จ่ายเงิน

	จำนวนเงิน (บาท)
- ค่าใช้สอย	
○ ค่าเบี้ยเลี้ยง	1,000
○ ค่าเดินทาง	1,000
○ ค่าจ้างวิเคราะห์	31,000
○ ค่าจ้างพิมพ์รายงาน	1,000
○ ค่าจัดทำรูปเล่มรายงาน	500
- ค่าวัสดุ	
○ ค่าวัสดุสำนักงาน	1,000
○ ค่าวัสดุการศึกษา	13,500
○ ค่าถ่ายเอกสาร	1,000
รวมทั้งสิ้น	50,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล (ภาษาไทย) นางสาว ธนาวดี ก่ออานันต์

ชื่อ – สกุล (ภาษาอังกฤษ) Thanavadee Korarnan

การศึกษา

คุณวุฒิ	**ปี พ.ศ. ที่จบ**	**ชื่อสถานที่ศึกษา**
มัธยมศึกษา	พ.ศ. 2534	โรงเรียนสิรินธร (จ. สุรินทร์)
วทบ. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	พ.ศ. 2539	สถาบันเทคโนโลยีเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (กรุงเทพ ฯ)
วศม. (เคมี)	พ.ศ. 2543	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
กำลังศึกษาระดับปริญญาเอก	พ.ศ. 2552 – ปัจจุบัน	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตำแหน่ง อาจารย์พนักงานมหาวิทยาลัย

หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพ ฯ 10520

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้