ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบของใบมะรุม

Antioxidant and Antimicrobial activities of crude extract from *Moringa Oleifera Lams* Leave

ชดดา สร้อยแสง

วสันต์ภัทร์ ดีขันแ

ปรางทิพย์ มณีสะอาด

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2552

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบของใบมะรุม

Antioxidant and Antimicrobial activities of crude extract from *Moringa Oleifera Lams* Leave

T115049

ชลดา สร้อยแสง
วลัยลักษณ์ ดีชื่น
ปรางทิพย์ มณีสะอาด

ปพ.
ช221ฤ
2552
สขหมู่.....
เลขทะเบียน...115049
วัน,เดือน,ปี...- 9 ก.ค. 2553
b.1291713A
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2552

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF CRUDE EXTRACT FROM *Moringa Oleifera Lams* Leave

CHOLLADA SOISAENG

WALAILUK DEECHUAN

PRANGTHIP MANEESAARD

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE IN APPLIED BIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบจากใบมะรุม

Antioxidant and antimicrobial activities of crude extract from *Moringa Oleifera Lams* leave

ชื่อนักศึกษา นางสาวชลดา สร้อยแสง

นางสาววลัยลักษณ์ ดีชื่น

นางสาวปรางทิพย์ มณีสะอาด

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2552

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์	วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์
ดร.จิดาภา ทิน้อย	
ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล	สุทธิจิต ศรีวัชรกุล

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบจากใบมะรุม
ชื่อนักศึกษา นางสาวชลดา สร้อยแสง
นางสาวลัยลักษณ์ ดีชื่น
นางสาวปรางทิพย์ มณีสะอาด
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2552
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล

บทคัดย่อ

ทำการสกัดใบมะรุม (*Moringa oleifera Lams*) ด้วยเอทานอล จากนั้นเจือจางสารสกัดหยาบจากใบมะรุมด้วย DMSO ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยให้มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น 6 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบของมะรุมมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ 3 ชนิด คือ *Micrococcus luteus* *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* จึงนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion โดยให้มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 6.25 12.5 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทดสอบด้วยวิธีการเจือจางความเข้มข้นโดยให้มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 512 256 128 64 32 16 8 4 2 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลปรากฏว่าจากการทดลองทั้งสองวิธีให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน โดยสารสกัดหยาบจากใบมะรุมมีความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญได้ดี คือความเข้มข้น 50 6.25 และ50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งเชื้อ *M.luteus* *S.aureus* และ *E.Coli* ตามลำดับ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมพบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมมีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์ DPPH ได้ดีคือ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด 89.57 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิคทั้งหมดเทียบกับปริมาณกรดแกลลิค พบว่าสารสกัดจากมะรุมมีปริมาณสารประกอบฟีโนลิคทั้งหมด 302.48 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม การศึกษาความเป็นพิษของเซลล์ในสารสกัดหยาบจากใบมะรุมโดยใช้ไรสีน้ำตาล พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมไม่มีความเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง

คำสำคัญ : มะรุม ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ความเป็นพิษต่อเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Antioxidant and Antimicrobial activities of crude extract from *Moringa Oleifera Lams* Leave
Students	Miss chollada Soisaeng
	Miss Walailuk Deechuan
	Miss Prangthip Maneesaard
Degree	Biotechnology
Academic Year	2009
Special Project Advisor	Dr.Sutijit Sriwacharakul

Abstract

Moringa oleifera Lams leave was extracted by ethanol. After that, dilute crude extract with 10% DMSO (v/v) at concentration 50 mg/ml for antimicrobial screening test with 6 bacteria species. There were *Micrococcus luteus Staphylococcus aureus Escherichia coli* that inhibit by *Moringa* crude extract, so prepare sequentially concentration of crude extract at 6.25, 12.5, 25 and 50 mg/ml. Antimicrobial activities of the extract was analyzed by disc diffusion and broth dilution methods 512 256 128 64 32 16 8 4 2 และ 1 µg/ml The results showed that both of the methods give the semilarity result, the most effective concentration of *Moringa* crude extract was 50 6.25 and 50 mg/ml to inhibit growth of *M.luteus S.aureus* and *E.Coli* , respectively. The Antioxidant activities tested with DPPH (radical scavenging assay) give good result that %DPPH scavenging is 89.57 % at 12 mg/ml and IC_{50} is 6.34 mg/ml of the *Moringa* crude extract. And the cytotoxicity test with *Artemia salina* of *Moringa* crude extract exhibit that there was non-toxic activity both acute and chronic.

Keywords : *Moringa oleifera Lams* , Antimicrobial , Antioxidant, Cytotoxic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานพิเศษในหัวข้อเรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบจากใบมะรุม ซึ่งโครงงานพิเศษฉบับนี้จะไม่สามารถสำเร็จบรรลุจุดประสงค์ไปได้ด้วยดี หากไม่ได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ และดร.จิดาภา ทิน้อย ที่ให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหาและความช่วยเหลือในทุกๆด้าน ซึ่งข้าพเจ้ามีความทราบซึ้งในความกรุณาที่ได้รับจากท่านอาจารย์ทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิก – คืน สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ และอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ในการทำการทดลอง รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการต่างๆ ในการทำการทดลองตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำในเรื่องต่างๆ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์สุขภาพแพทย์แผนไทยประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทาที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์เครื่องมือในการปฏิบัติโครงงานพิเศษทำให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่และญาติพี่น้อง ด้วยความเคารพยิ่งที่สนับสนุนและให้กำลังใจมาโดยตลอด ขอขอบคุณพี่ๆปริญญาโท เพื่อนๆ น้องๆ และทุกท่านที่มิได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้ ที่ให้กำลังใจ และมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจในงานเกี่ยวข้องทางด้านนี้ หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้จัดทำขออภัย ณ โอกาสนี้ด้วย

ชลดา สร้อยแสง
วลัยลักษณ์ ดีชื่น
ปรางทิพย์ มณีสะอาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 มะรุม	4
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	4
2.1.2 การปลูกมะรุม	5
2.1.3 ประโยชน์ทางยา	5
2.1.4 ประโยชน์ของมะรุม	5
2.1.5 คุณค่าทางอาหาร	6
2.1.6 การปรุงอาหาร	6
2.1.7 การสกัดสารจากพืช	6
2.2 อนุมูลอิสระ (Free radical) หรืออนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (Reactive oxygen species, ROS)	7
2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)	9
2.3.1 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ	10
2.3.2 หลักการหาขีดความสามารถในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ	11
2.3.3 การตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระ	12
2.4 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5 วิตามินอี (โทโคฟีรอล)	16
2.6 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ	17
2.7 ยาต้านจุลชีพ	25
2.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ	29
2. 9 ไมโครเพลท	33
2.10 การทดสอบความเป็นต่อเซลล์โดยใช้ไรน้ำสีน้ำตาล (Brine Shrimp Cytotoxicity Test)	34
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	36
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	36
3.2 พืชที่ใช้ในการทดสอบ	36
3.3 สารเคมี	36
3.4 อุปกรณ์	37
3.5 วิธีการทดลอง	38
3.5.1 การเตรียมตัวอย่างพืช	38
3.5.2 การสกัดสารสกัดหยาบ	38
3.5.3 การทำให้สารบริสุทธิ์	38
3.5.4 สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุม	38
3.5.5 ศึกษาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial)ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุม	40
3.5.6 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบมะรุมโดยใช้ไรสีน้ำตาล (Brine shrimp cytotoxicity test)	41
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	44
4.1 สารสกัดหยาบจากพืชที่ใช้ในการทดลอง	44
4.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพสารสกัดหยาบจากพืช	44
4.2.1 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบมะรุม	44
4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบจากใบมะรุม	47
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	56
เอกสารอ้างอิง	58
ภาคผนวก ก	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ข 63

ภาคผนวก ค 81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมและวิตามินอี (Positive control)	45
4.2 แสดงปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมดเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์	46
4.3 แสดงการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E.coli S. aureus M.luteus* โดยสารสกัดหยาบจากใบมะรุมโดยวิธี Disc diffusion	50
4.4 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเมื่อทดสอบกับสารสกัดหยาบจากใบมะรุม ก่อนหยด MTT และหลังหยด MTT ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร	53
4.5 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเมื่อทดสอบกับสารสกัดหยาบจากใบมะรุม ก่อนหยด MTT ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร	54
4.6 การศึกษาความเป็นพิษของมะรุมโดยใช้ไรสีน้ำตาล (Brine Shrime)	55
ข– 1 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าการยับยั้งการเจริญของ *E.coli*	63
ข – 2 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าการยับยั้งการเจริญของ *Straphylococcus aureus*	64
ข– 3 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าการยับยั้งการเจริญ ของ *Micrococcus luteus*	65
ข- 4 ตารางวิเคราะห์ทางสถิติที่แสดงจำนวนตายของไรสีน้ำตาล	66
ข– 5 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าการยับยั้งการเจริญของ *E.coli* ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร	75
ข-6 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติค่าการยับยั้งการเจริญของ *Straphylococcus aureus* ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร	77
ข-7 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าการยับยั้งการ เจริญของ *Micrococcus luteus* ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร	79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 ต้นมะรุม	4
2.2 โครงสร้างกรดลิโนลีอีค	14
2.3 โครงสร้างของสาร DPPH	15
2.4 การฟอกสี DPPH ทำให้เปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองอ่อน	16
2.5 ลักษณะเชื้อ *Staphylococcus aureus*	18
2.6 ลักษณะเชื้อ *Escherichia coli*	19
2.7 ลักษณะเชื้อ *Bacillus subtilis*	22
2.8 ลักษณะเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*	23
2.9 ลักษณะเชื้อ *Staphylococcus epidermis*	24
2.10 ลักษณะเชื้อ *Micrococcus luteus*	25
2.11 สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)	28
2.12 ก เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์	34
2.12 ข microplate ขนาด 96 well	34
3.1 แสดงภาชนะที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงไรสีน้ำตาล	41
4.1 ก สารสกัดหยาบจากใบมะรุมในชั้นตัวทำละลายเอทานอล	44
4.1 ข วิตามินอี (- tocopherol) ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control)	45
4.3 กราฟมาตรฐาน Gallic acid เพื่อคำนวณหาปริมาณ สารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด	47
4.4 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากใบมะรุมที่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	48
4.5 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะรุมที่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ	49
ก-1 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีDPPH	60
ก-2 รูปการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระตรวจหาปริมาณ สารประกอบฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu Singleton	60
ก-3 รูปผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วย เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่วัดค่าได้	61
ก-4 รูปการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบมะรุม	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันกระแสรักสุขภาพยังคงเดินหน้าอย่างต่อเนื่องทั้งในสังคมไทยและสังคมโลก ประชากรไม่น้อยหันมาใส่ใจสุขภาพกันมากขึ้นและคิดว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง พืชที่กำลังได้รับความนิยมจากคนส่วนใหญ่ซึ่งเป็น “สมุนไพรพื้นบ้าน” คือ "มะรุม"เป็นไม้ยืนต้นที่โตเร็ว ทนแล้ง ปลูกง่ายในเขตร้อน จึงเหมาะที่ปลูกที่ประเทศไทย นอกจากนี้ยังมีประโยชน์เอนกประสงค์ ทั้งทางด้านอาหาร ยาและอุตสาหกรรม ในตำรายาพื้นบ้านใช้ใบมะรุมพอกแผลช่วยห้ามเลือด ทำให้นอนหลับ เป็นยาระบาย ขับปัสสาวะ และช่วยแก้ไข้ ใช้ส่วนดอกและผลเป็นยาบำรุง ขับปัสสาวะ และแก้ไข้ ใช้ส่วนเมล็ดบดพอกแก้ปวดตามข้อและแก้ไข้

มะรุมเป็นพืชกำเนิดแถบใต้เชิงเขาหิมาลัย เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางที่ถูกปลูกไว้ในบริเวณบ้านไทยมาแต่โบราณ กินได้หลายส่วน ทั้งยอด ดอก และฝักเขียว แต่นิยมกินฝักมากกว่าส่วนอื่นๆ ต้นมะรุมพบได้ทุกภาคในประเทศไทย จึงนิยมนำมารับประทานเพราะช่วยรักษาโรคได้หลายชนิด ทางอีสานเรียก “ผักอีฮุม หรือผักอีฮึม” ภาคเหนือเรียก “มะค้อมก้อน” ชาวกะเหรี่ยงแถบกาญจนบุรีเรียก “กาแน้งเดิง” ส่วนแถบแม่ฮ่องสอนเรียก “ผักเนื้อไก่” คุณค่าทางอาหารคือมะรุมเป็นพืชมหัศจรรย์ มีคุณค่าทางโภชนาการสูงสุด เป็นพืชที่รักษาทุกโรค ใบมะรุมมีโปรตีนสูงกว่านมสด 2 เท่า การกินใบมะรุมตามชนบทของประเทศกำลังพัฒนาและประเทศโลกที่3 เป็นการเพิ่มโปรตีนคุณภาพสูงราคาถูกให้กับอาหารพื้นบ้าน สาเหตุที่มีคุณสมบัติ บำบัดโรคได้หลากหลาย เนื่องจากในมะรุมมีสารต้านอนุมูลอิสระปริมาณสูงมาก อีกทั้งมีคุณค่าทางอาหารสูง ช่วยบำบัดและป้องกันโรคต่างๆนอกจากนี้ มะรุมมีธาตุอาหารปริมาณสูงเป็นพิเศษที่ช่วยป้องกันโรค นั่นคือ วิตามินเอบำรุงสายตามีมากกว่าแครอท 3 เท่า วิตามินซีช่วยป้องกันหวัด 7 เท่าของส้ม แคลเซียมบำรุงกระดูกเกิน 3 เท่าของนมสด โพแทสเซียมบำรุงสมองและระบบประสาท 3 เท่าของกล้วย ใยอาหารและพลังงานไม่สูงมากเหมาะกับผู้ที่ควบคุมน้ำหนักอีกด้วย น้ำมันสกัดจากเมล็ดมะรุมมีองค์ประกอบคล้ายน้ำมันมะกอกดีต่อสุขภาพอย่างยิ่ง มะรุมมีสารฟลาโวนอยด์สำคัญคือ รูทิน และเควอเซทิน สารลูทีน และกรดแคฟฟีโอลิลควินิก ซึ่งต้านอนุมูลอิสระ ดูแลอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ จอประสาทตา ตับ และหลอดเลือดจากการเสื่อมตามอายุ การกินสารต้านอนุมูลอิสระ ชะลอการเสื่อมสภาพในเซลล์ร่างกาย ฆ่าจุลินทรีย์ ประโยชน์ของมะรุมมีมากมายหลายอย่างในการรักษาโรคช่วยควบคุมและสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกาย เช่น ใช้รักษาโรคขาดอาหารในเด็กแรกเกิดถึง 10 ขวบ และลดสถิติการเสียชีวิต พิการและตาบอดได้เป็นอย่างดี ใช้รักษาผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวานให้อยู่ในภาวะควบคุมได้ รักษาโรคความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดันโลหิตสูง ช่วยเพิ่มและเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกายหากทานผลิตผลจากมะรุมในระหว่างตั้งครรภ์เด็กที่เกิดมาจะไม่ติดเชื้อ HIV นอกจากนี้ถ้ารับประทานอย่างน้อยอาทิตย์ละ 3 ครั้งยังช่วยให้คนทั่วๆไปสามารถสร้างภูมิคุ้มกันให้กับตัวเอง ช่วยรักษาผู้ป่วยโรคเอดส์ให้อยู่ในภาวะควบคุมได้ การรักษาโรคเอดส์ที่ประสบผลสำเร็จในกลุ่มประเทศแอฟริกา ถ้ารับประทานสม่ำเสมอจะช่วยป้องกันไม่ให้เป็นโรคมะเร็ง แต่ถ้าหากเป็นก็จะช่วยให้การรักษาพยาบาลง่ายขึ้น ในบางกรณีสามารถหยุดการเจริญเติบโตของโรคร้ายได้ ถ้าใช้ควบคู่ไปกับยาแพทย์แผนปัจจุบัน สารเบนซิลไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์ชนิดหนึ่งและสารไนอาซิไมซิน (niazimicin) จากมะรุมสามารถต้านการเกิดมะเร็งที่ถูกกระตุ้นโดยสารฟอบอลเอสเทอร์ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ หากผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งได้รับการรักษาด้วยรังสี การดื่มน้ำมะรุมจะช่วยให้การแพ้รังสีฟื้นตัวเร็วขึ้นและมีร่างกายที่แข็งแรง ช่วยรักษาโรคไขข้ออักเสบ โรคเก๊าท์ โรคกระดูกอักเสบ โรคมะเร็งในกระดูก โรครูมาติซั่ม รักษาโรคตาเกือบทุกชนิด เช่น โรคตามืดตามัวเพราะขาดสารอาหารที่จำเป็น โรคตาต้อ เป็นต้น หากรับประทานสม่ำเสมอ จะทำให้ตามีสุขภาพที่สมบูรณ์ รักษาโรคลำไส้อักเสบ โรคเกี่ยวกับท้อง ท้องเสีย ท้องผูก โรคพยาธิในลำไส้ รักษาปอดให้แข็งแรง รักษาโรคทางเดินของลมหายใจ และโรคปอดอักเสบ และเป็นยาปฏิชีวนะ

จะเห็นได้ว่ามะรุมมีประโยชน์มากมาย ในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้จึงสนใจนำใบมะรุมมาศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์รวมถึงการต้านการขยายตัวของเซลล์มะเร็ง (Antiproliferative) เพื่อสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)จากพืชสมุนไพรมะรุม (*Moringa oleifera Lams*)โดยวิธี DPPH radical scavenging assay และ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteus reagent
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial) จากพืชสมุนไพรมะรุม (*Moringa oleifera Lams*) พร้อมทั้งหาปริมาณของสารสกัดจากใบมะรุมที่น้อยที่สุดในการควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของเซลล์โดยใช้ไรสีน้ำตาลทดสอบกับสารสกัดจากใบมะรุม (Brine shrimp cytotoxicity test)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการสกัดสารจากใบมะรุมโดยวิธีการสกัดด้วยเอทานอล นำมาทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial) จากพืชสมุนไพรใบมะรุมด้วย Paper Disc Diffusion method และวิธีทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant) จากใบมะรุมโดยวิธี DPPH radical scavenging assay และการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และทำการศึกษาความเป็นพิษของเซลล์โดยใช้ไรสีน้ำตาลทดสอบกับสารสกัดจากใบมะรุม (Brine shrimp cytotoxicity test)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์ของใบมะรุมสำหรับผู้สนใจใช้ในการศึกษา วิจัยและค้นคว้า
2. สามารถนำไปประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพหรือนำไปผลิตอาหารเสริมเพื่อสุขภาพได้
3. สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ร่วมกับยารักษาโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะรุม

รูปที่ 2.1 ต้นมะรุม

ที่มา : http://www.pamame.com/magazine (20 ก.ค 2552)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Moringa okeifera lamk.* หรือ *M pterygosperma Goertn*

ชื่อวงศ์ Moringaceae

ชื่อสามัญ hourseradish tree drumstick Ben oil tree Also cell "Mother is best friend"

ชื่อท้องถิ่น มะค้อนก้อม (ฝักของต้นมะรุม) ฝักอีฮุม (ยอดอ่อน)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มะรุมเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางเรือนยอดกลมและโปร่ง เจริญเติบโตเร็ว อาจจะเติบโตมีความสูงถึง 4 เมตร และออกดอกภายในปีแรกที่ปลูก ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ชนิดที่แตกใบย่อย 3 ชั้น ยาว 20 - 40 เซนติเมตร ออกเรียงแบบสลับ ใบย่อยยาว 1 - 3 เซนติเมตร รูปไข่ ปลายใบและฐานใบมน ผิวใบด้านล่างสีอ่อนกว่าและมีขนเล็กน้อยขณะที่ใบยังอ่อน ใบมีรสหวานมัน ออกดอกในฤดูหนาว บางพันธุ์ออกดอกหลายครั้งในรอบปี ดอกเป็นดอกช่อ สีขาว กลีบเรียง มี 5 กลีบ กลีบดอกมี 5 กลีบแยกกัน ดอกมีรสขม หวาน มันเล็กน้อย ผลเป็นฝักยาว เปลือกสีเขียวมีส่วนคอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และส่วนมน เป็นระยะ ๆ ตามยาวของฝัก ฝักยาว 20 - 50 เซนติเมตร ฝักมีรสหวาน เมล็ดเป็นรูปสามเหลี่ยม มีปีกบางหุ้ม 3 ปีก เส้นผ่าศูนย์กลางของเมล็ดประมาณ 1 เซนติเมตร

2.1.2 การปลูก

มะรุมเป็นไม้ที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศแถบเอเชีย เช่น อินเดีย ศรีลังกา เป็นต้น และยังมีในเขตเอเชียไมเนอร์และแอฟริกา เป็นไม้ปลูกง่าย เจริญได้ดีในดินทุกชนิด ต้องการน้ำและความชื้นในปริมาณปานกลาง ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ดและการปักชำกิ่ง งอกเร็ว ใช้เวลา 2 สัปดาห์ต้นกล้าสูงประมาณ 10 - 20 เซนติเมตร

2.1.3 ประโยชน์ทางยา

ใบ ใช้ถอนพิษไข้ แก้เลือดออกตามไรฟัน แก้อักเสบ แก้แผล ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ขับปัสสาวะ ป้องกันมะเร็ง ลดความดันโลหิต

ยอดอ่อน ใช้ถอนพิษไข้

ดอก ใช้แก้ไข้หัวลม เป็นยาบำรุง ขับปัสสาวะ ขับน้ำตา ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ป้องกันมะเร็ง

ฝัก แก้ไข้ ป้องกันมะเร็ง ลดความดันโลหิต

เมล็ด เมล็ดปรุงเป็นยาแก้ไข้ แก้บวม แก้ปวดตามข้อ ป้องกันมะเร็ง

ราก รสเผ็ด หวาน ขม สรรพคุณ แก้อาการบวม บำรุงไฟธาตุ รักษาโรคหัวใจ รักษาโรคไขข้อ (rheumatism)

เปลือกลำต้น รสร้อน สรรพคุณขับลมในลำไส้ ทำให้ผายหรือเรอ คุมธาตุอ่อน ๆ แก้ลมอัมพาต ป้องกันมะเร็ง คุมกำเนิด เคี้ยวกินช่วยย่อยอาหาร

ยาง (gum) ฆ่าเชื้อไทฟอยด์ ซิฟิลิส (syphilis) แก้ปวดฟัน earache, asthma

2.1.4 ประโยชน์ของมะรุม

1. ใช้บำบัดโรคขาดอาหารในเด็กแรกเกิดถึง 10 ขวบ และลดสถิติการเสียชีวิต พิการ และตาบอดได้เป็นอย่างดี

2. ใช้บำบัดผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวานให้อยู่ในภาวะควบคุมได้

3. ใช้บำบัดโรคความดันโลหิตสูง และ บำบัดภาวะไขมันในเส้นเลือดผิดปกติ

4. ช่วยเพิ่มและเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกาย ทานผลิตผลจากมะรุมในระหว่างตั้งครรภ์เด็กที่เกิด มาจะไม่ติด เชื้อ HIV นอกจากนี้ถ้ารับประทานอย่างน้อยอาทิตย์ละ 3 ครั้งยังช่วยให้คนทั่วๆไป สามารถสร้างภูมิคุ้มกันให้กับตัวเอง

5. ช่วยบำบัดผู้ป่วยโรคเอดส์ให้อยู่ในภาวะควบคุมได้ การบำบัดโรคเอดส์ที่ประสพผลสำเร็จในกลุ่มประเทศแอฟริกา

6. ถ้ารับประทานสม่ำเสมอจะช่วยป้องกันไม่ให้เป็นโรคมะเร็ง แต่ถ้าหากเป็นก็จะช่วยให้การ รักษาพยาบาลง่ายขึ้น ในบางกรณีสามารถหยุดการเจริญเติบโตของโรคร้ายได้ ถ้าใช้ควบคู่ไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับยาแพทย์แผนปัจจุบัน หากผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งได้รับการรักษาด้วยรังสี การดื่มน้ำมะรุมจะช่วยให้การแพ้รังสีฟื้นตัวเร็วขึ้นและมีร่างกายที่แข็งแรง

7. ช่วยบำบัดโรคไขข้ออักเสบ โรคเก๊าท์ โรคกระดูกอักเสบ โรคมะเร็งในกระดูก โรครูมาติซั่ม

8. บำบัดโรคตาเกือบทุกชนิด เช่น โรคตามืดตามัวเพราะขาดสารอาหารที่จำเป็น โรคตาต้อ เป็นต้น ถ้ารับประทานสม่ำเสมอ จะทำให้ตามีสุขภาพที่สมบูรณ์

9. บำบัดโรคลำไส้อักเสบ โรคเกี่ยวกับท้อง ท้องเสีย ท้องผูก โรคพยาธิในลำไส้

10. บำรุงปอดให้แข็งแรง บำบัดโรคทางเดินหายใจ โรคปอด และโรคภูมิแพ้

11. เป็นยาปฏิชีวนะ

2.1.5 คุณค่าทางอาหาร

ใบ ใบสดใช้กินเป็นอาหาร ใบแห้งที่ทำเป็นผงเก็บไว้ได้นานโดยยังมีคุณค่าทางอาหารสูง ใบมะรุมมีวิตามินเอสูงกว่าแครอท มีแคลเซียมสูงกว่านม มีเหล็กสูงกว่าผักขม มีวิตามินซีสูงกว่าส้ม และมีโปแตสเซียมสูงกว่ากล้วย

ดอก ฆ่าเชื้อแบคทีเรียแก้หวัด Helminths ป้องกันมะเร็ง

ฝัก ฝักมะรุม 100 กรัม ให้พลังงานต่อร่างกาย 32 กิโลแคลอรี่ ประกอบด้วย เส้นใย 1.2 กรัม แคลเซียม 9 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 26 มิลลิกรัม เหล็ก 1.5 มิลลิกรัม วิตามินเอ 532 IU วิตามินบีหนึ่ง 0.05 มิลลิกรัม ไนอาซิน 0.6 มิลลิกรัม วิตามินซี 262 มิลลิกรัม

เมล็ด น้ำมันที่ได้จากการคั้นเมล็ดสดใช้เป็นน้ำมันปรุงอาหาร

2.1.6 การปรุงอาหาร

ในประเทศไทย ฤดูหนาวจะมีมะรุมจำหน่ายทั่วไป ทั้งตลาดในเมืองและในท้องถิ่น คนไทยทุกภาครับประทานมะรุมเป็นผัก ชาวภาคกลางนิยมนักมะรุมอ่อนไปปรุงเป็นแกงส้ม และนำดอกมะรุมลวกให้สุกหรือดองรับประทานกับน้ำพริก สำหรับชาวอีสาน ยอดอ่อน ใบอ่อน ช่อดอกอ่อน นำไปลวกให้สุกหรือต้มให้สุก รับประทานเป็นผักร่วมกับปั่นแจ่ว ลาบ ก้อย หรือนำไปปรุงเป็นแกงอ่อม ส่วนฝักอ่อนหรือฝักที่ยังไม่แก่เต็มที่นำมาปอกเปลือก หั่นเป็นท่อนและนำไปปรุงเป็นแกงส้มหรือแกงลาวได้ นอกจากนี้ ที่จังหวัดชัยภูมิ ยังรับประทานฝักมะรุมอ่อนสด เป็นผักแกล้มร่วมกับส้มตำโดยรับประทานคล้ายกับรับประทานถั่วฝักยาว และชาวบ้านเล่าว่าฝักมะรุมอ่อนนำไปแกงส้มได้โดยไม่ต้องปอกเปลือก ชาวเหนือนำดอกอ่อน ฝักอ่อนไปแกงกับปลา

2.1.7 การสกัดสารจากพืช สามารถทำได้ 3 วิธี คือ

1. Maceration วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด โดยเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับ สารในพืชสมุนไพร แล้วนำสมุนไพรไปแช่ในภาชนะที่ปิด เขย่าเป็นเวลา และแช่ไว้อย่างน้อย 2-7 วัน จากนั้นนำมากรองเอาสารสกัดออกมาจากกากสมุนไพรให้ได้มากที่สุด นำสารสกัดที่ได้มา ระเหย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวทำละลายออก แล้วจึงนำสารที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อ วิธีนี้มีข้อดีคือ สารสกัดจะไม่ถูก ความร้อน ทำให้โอกาสในการสลายตัวของสารสกัดลดลง ข้อเสียของวิธีนี้คือจะสิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2. Soxhlet Extraction เป็นวิธีที่ใช้ความร้อนในการสกัดและต้องอาศัยการควบแน่นเข้า ช่วย เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง จึงไม่เหมาะกับการสกัดสารจากพืชสมุนไพรที่มีสารที่ระเหย ง่าย เป็นองค์ประกอบ วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสำหรับการสกัดสารองค์ประกอบที่ทน ต่อความร้อน และใช้ตัวทำละลายน้อยไม่สิ้นเปลือง

3. Extraction of volatile oil ใช้สำหรับการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีการต่างๆ หลายวิธี เลือกใช้ตามความเหมาะสมของพืชแต่ละชนิด เช่นการดูดซับ การใช้ตัวทำละลาย วิธีการบีบ การกลั่นโดยน้ำหรือไอน้ำ สารสกัดที่ได้นี้จะเป็นสารผสมที่มีสารออกฤทธิ์หลายชนิดปนกันอยู่ ถ้าต้องการสกัดที่ บริสุทธิ์มากขึ้น หรือแยกสารประกอบต่างๆ เพื่อนำไปทดสอบต่อก็สามารถใช้เทคนิคอื่นๆ ที่ เหมาะสมในการแยกต่อไปได้อีก เช่น chromatography แบบต่างๆ เพื่อแยกสารออกเป็น fraction เป็นต้น

2.2 อนุมูลอิสระ (Free radical) หรืออนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (Reactive oxygen species, ROS)

อนุมูลอิสระ (Free radical) หรืออนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (Reactive oxygen species, ROS) คือ โมเลกุลหรืออิเล็กตรอนที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวอยู่รอบนอกและมีอายุสั้นประมาณ 1 หรือ 10^{-3} –10^{-10} วินาที จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี แสดงการเกิดอนุมูลอิสระในรูปที่ 2.2 โดยสามารถตรวจวัดด้วย Electron Spin Resonance (ESR) โมเลกุลหรืออิออนชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ หรือ ROS มีดังนี้ superoxide anion radical $O_2^{\cdot}$, Hydroxyl radical $HO^{\cdot}$, Peroxide radical $ROO^{\cdot}$, Peroxyl radical $LOO^{\cdot}$, Hydrogen peroxide H_2O_2, Ozone O_3, Singlet oxygen $^1O_2$, Hydrogen radical $H^{\cdot}$, Methal radical $CH_3^{\cdot}$

ชนิดของอนุมูลอิสระสามารถแบ่งได้อย่างง่ายๆ คือ

1. อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของร่างกาย
2. อนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกาย
    2.1 การติดเชื้อทั้งจากแบคทีเรีย และไวรัส
    2.2 การอักเสบชนิดไม่ทราบสาเหตุ (autoummune diseses) เช่น ข้ออักเสบ, รูมาตอยด์, โรคเก๊าท์
3. รังสี
4. สิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ เช่น ควันเสีย, เขม่าจากเครื่องยนต์ และควันบุหรี่
5. การออกกำลังกายอย่างหักโหม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากที่กล่าวมาแล้วว่าอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาทั้งจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของร่างกายเอง และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษโดยภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกันการโดนทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านั้น

ร่างกายมีกลไกที่สามารถป้องกันตัวเองจากอันตรายของอนุมูลอิสระที่สำคัญ 2 วิธี คือ (1)กลไกการซ่อมแซม DNA (DNA repair) การตัด DNA ส่วนที่ผิดปกตินั้นออกไป และการสร้างสาย DNA ที่ปกติขึ้นมาแทนที่และ (2) การใช้สารต้านอนุมูลอิสระจะเป็นตัวจัดการกับอนุมูลอิสระเหล่านั้น ก่อนที่มันจะเข้าทำลายต่อ DNA จากข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่าประชากรที่บริโภคพืชผัก ผลไม้ ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ จะเป็นโรคมะเร็งน้อยมาก สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี สามารถลดการเกิดการกลายพันธุ์และการเกิดมะเร็งได้ แต่อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่อนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่ระบบต้านอนุมูลอิสระจะจัดการได้ จะเกิดสภาวะที่เรียกว่า ภาวะเครียดจากการออกซิเดชัน (oxidative stress) ขึ้นมาซึ่งจะส่งผลต่างๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต

ภาวะเครียดจากการออกซิเดชัน (oxidative stress) คือ สภาวะที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับปกติที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายได้ โดยอนุมูลอิสระที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ภายในร่างกาย เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน, คาร์โบไฮเดรต, โปรตีน และกรดนิวคลีอิก การสร้างพันธะโควาเลนต์กับโปรตีน เป็นผลทำให้เกิด inactivation ของโปรตีน เป็นต้น และพบว่าอนุมูลอิสระก่อให้เกิดสภาวะทางพยาธิสภาพในโรคสำคัญบางโรค ได้แก่ มะเร็ง โรคหัวใจไขมันอุดตันในเส้นเลือด ไขข้ออักเสบ ต้อกระจก เป็นต้น

การทำลายโมเลกุลที่เป็นต้นเหตุการณ์เกิดของอนุมูลอิสระ นับเป็นกลไกการทำงานของระบบต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญกลไกหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่อาศัยเอนไซม์หรือไม่ก็ได้ สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกายและจัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่ Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione (GPX), Glutathione reductase (GR), Glutathione S-transferase (GST) เป็นต้น ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระพบในร่างกายแต่ไม่จัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่ Glutathione, Haptogobin, Hemopexin, Lipic acid, Uric acid, Ceruloplasmin, Bilirubin, Cysteine, Albumin, และ Transferrin เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะทำลายอนุมูลอิสระโดยการจับกันกับอนุมูลอิสระ ลดการเกิดปฏิกิริยา ณ จุดตั้งต้นหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่

กลไกการทำงานของอนุมูลอิสระ

ส่วนใหญ่มักเกิดแบบแรดิคัล หรืออนุมูลอิสระ คือ เมื่อออกซิเจนในอากาศได้รับความร้อนหรือถูกแสงจะเกิดการแตกพันธะแบบเสมอภาค (hemolytic cleavage) ได้เป็นอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวสองตัว เรียกว่า ไดแรดิคัล (diradicals) และเมื่อมีแรดิคัลอื่นที่เหมาะสม ($Ra^{\cdot}$) มารับไฮโดรเจนจากสารอินทรีย์ไป จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ แรดิคัลตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เริ่มต้น ($Ra^{\cdot}$) จะรับเอา H จากโมเลกุลของสารอินทรีย์ (R-H) แล้วให้แอลคิวแรดิคัล ($R^{\cdot}$) ไปรวมกับออกซิเจน กลายเป็นเปอร์ออกซีแรดิคัล ($ROO^{\cdot}$) ซึ่งมีความว่องไวสูงกว่าออกซิเจนไดแรดิคัล ($O\text{-}O^{\cdot}$) จึงสามารถรับเอา H จาก R-H ได้เกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (ROOH) และให้แอลคิวแรดิคัลเข้าไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป กลไกนี้จะเกิดได้เร็วขึ้นเมื่อมีไอออนของโลหะ (M^{n+}) บางชนิดเช่น Fe^{2+} Cu^{2+} หรือ Co^{2+} ร่วมอยู่ด้วย จะทำให้ช่วยเหนี่ยวนำลดลง โดยไอออนของโลหะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนกับไฮโดรเปอร์ออกไซด์อย่างรวดเร็ว กลายเป็นแอลคอกไซด์แรดิคัล (RO) และเมื่อ $M^{(n+1)+}$ เพิ่มมากขึ้น จะสามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเปอร์ออกไซด์โมเลกุลอื่น โดยรับอิเล็กตรอน 1 ตัว กลับมาเป็น M^{n+} เข้าไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อไปได้อีก ไอออนของ Fe^{2+} จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่า Fe^{3+} และ Fe^{3+} จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่า Cu^{2+} นอกจากนี้ปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน (autoxidation) เป็นการที่ไขมันกับออกซิเจนในอากาศทำปฏิกิริยากันได้สารประกอบเพอร์ออกไซด์ ซึ่งมีสาเหตุการเกิดจากออกซิเจนและแสง เรียกกลไกนี้ว่า กลไกแบบโฟโตออกซิเดชัน (photooxidation) (ศิวาพร, 2535) โดยกลไกแบบนี้จะไม่มีช่วงเวลาเหนี่ยวนำ ออกซิเจนในสภาวะปกติจะมีอิเล็กตรอนอยู่ในสภาวะที่มีพลังงานต่ำสุดหรือสภาวะพื้น (ground state) การจัดอิเล็กตรอน (electron spin) เป็นแบบ $^3O_2$ (triplet electron state) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ R-H จะได้เป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์

แต่เมื่อปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันมีแสงที่ตัวเร่งปฏิกิริยาและมีสารที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (sensitizer) ชนิดอื่น เช่น คลอโรฟิลล์ พอร์ไพริน (porphyrins) บิลิรูบิน (bilirubin) หรือไรโบฟลาวิน (riboflavin) ร่วมอยู่ในปฏิกิริยาด้วย จะทำให้เกิดโฟโต้ออกซิเดชัน

ออกซิเจนที่สภาวะ $^3O_2$ จะถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงการจัดอิเล็กตรอนไปเป็นแบบ $^1O_2$ (singlet electron state) ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ประเภทไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) ได้เป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ นอกจากนี้ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลไฮโดรเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่ให้แสงจะเร่งการเกิดได้มากกว่าไม่ให้แสงถึง 1,500 เท่า ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะสลายตัวต่อไปเป็นไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์และคีโตนที่ระเหยได้เป็นสาเหตุของกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในอาหาร (Wikipedia, 2007)

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในที่นี้ หมายถึง สารที่สามารถยับยั้งและควบคุมป้องกันอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Gordon, 1990)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่มีในปริมาณน้อยเทียบกับสารที่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งสามารถยับยั้งหรือหน่วงเหนี่ยวให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันไม่เกิดขึ้น

สารที่จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีกลไกการทำงาน ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. กำจัดกลุ่มอนุมูลออกซิเจน (ROS)

2. กำจัดอนุมูลอิสระ

3. กำจัดโลหะไอออน

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ แบ่งได้เป็น 4 ประเภท คือ

1. เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในร่างกาย ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส คาตาเลส กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส และเมทไธโอนีนรีดักเทส (methionine reductase) เป็นต้น

2. วิตามินต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ วิตามินอี ในถั่ว ธัญพืช รำ ข้าวกล้อง งา และ วิตามินซี ในผลไม้ ผักสด เป็นต้น

3. แร่ธาตุ เช่น ซิลิเนียม และสังกะสีเป็นโคแฟกเตอร์ (Co-factors) ของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

4. สารพฤกษเคมี (phytochemicals) เป็นสารเคมีจากพืชที่ไม่ใช่วิตามินและสารอาหาร เช่น แคโรทีน (carotene) ไลโคพีน (lycopene) แซนโธฟิล (xanthophyl) แทนนิน (tannin) และฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นต้น

2.3.1 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถจำแนกได้อย่างกว้างๆ จากกลไกของสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิและสารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ บางปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกการทำงานมากกว่า 1 กลไก และจะทำหน้าที่หลายๆ อย่างในแต่ละกลไก ปฏิกิริยาต่างๆ ของสารต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างผันแปรมาก และสามารถทำปฏิกิริยาได้ทุกขั้นตอนในปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ เป็นตัวรับอนุพันธ์อิสระที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน เริ่มแรกจะเกิดขึ้นเมื่อโมเลกุลของ α-methylenic hydrogen ถูกดึงจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวออกมาอยู่ในรูปของกรดไขมันอิสระ ($R^{\cdot}$)

กรดไขมันอิสระนี้จะเกิดปฏิกิริยาได้สูง สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของเปอร์ออกไซด์แรดิคัล ($ROO^{\cdot}$)

ในระหว่างปฏิกิริยาการถ่ายทอดอนุมูลเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไขมันทำให้เกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ และได้อนุมูลของกรดไขมันอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียร กรดไขมันอิสระนี้จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนให้อนุมูลเปอร์ออกไซด์อิสระอีกตัวหนึ่ง

ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ไม่เสถียรและสามารถแตกสลายให้อนุมูลที่จะไปเร่งปฏิกิริยาต่อไป ปฏิกิริยาเหล่านี้คือปฏิกิริยาลูกโซ่ไฮโดรเปอร์ออกไซด์แตกสลายทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติไม่ดีคล้ายๆ กับการเกิดกลิ่นเหม็นหืนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลไขมัน และเปอร์ออกไซด์แรดิคัล และจะเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปที่เสถียรมากขึ้น สารต้านอนุมูลอิสระจะให้อะตอมของไฮโดรเจนแก่กรดไขมันอิสระทำให้เกิดอนุพันธ์ของไขมันและอนุพันธ์อิสระจากสารต้านอนุมูลอิสระ ($A^{\cdot}$) ซึ่งจะมีความเสถียรและมีน้อยลงที่จะไปทำปฏิกิริยาออ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โตออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิในฐานะที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนจะมีความเฉพาะเจาะจงกับเปอร์ออกไซด์แรดิคัลมากกว่าไขมัน ดังนั้นอนุมูลจะอยู่ในรูปของเปอร์ออกซีและออกซีแรดิคัลที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาการถ่ายทอด และปฏิกิริยาปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน ที่เกิดขึ้นต่อกันจะถูกยับยั้งโดยสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ สารต้านอนุมูลอิสระจะมีปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระโดยตรง

อนุมูลของสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเมื่อให้ไฮโดรเจนไปแล้วจะมีความเสถียรโดยจะทำปฏิกิริยากับไขมันได้น้อยมาก ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อไปได้น้อย อนุมูลของสารต้านออกซิเดชันสามารถเข้าร่วมในปฏิกิริยาสุดท้ายโดยทำปฏิกิริยากับอนุมูลเปอร์ออกซี ($ROO^{\cdot}$) อนุมูลออกซี ($RO^{\cdot}$) และสมการต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ปฏิกิริยาเหล่านี้คือการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของปฏิกิริยาออโตออกซิเดชัน

ก่อนที่จะเริ่มปฏิกิริยาออโตออกซิเดชันจะต้องผ่านช่วงเวลาเหนี่ยวนำซึ่งจะมีการเกิดอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระถูกใช้ไป ดังนั้น สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิจะมีประสิทธิภาพมากถ้ามีการเติมลงไปในช่วงแรกของการเกิดออกซิเดชันเมื่อยังไม่เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป การเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปในไขมันซึ่งมีปริมาณเปอร์ออกไซด์สูงอยู่แล้วจะเป็นผลให้สารต้นอนุมูลอิสระสูญเสียการทำงานไปอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีการใช้สารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณมาก นอกเหนือจากหน้าที่ในการจับอนุมูลอิสระแล้ว สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิยังสามารถรีดิวส์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นสารประกอบไฮดรอกซี อย่างไรก็ตามกลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านก็คือการจับกับอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิเป็น Mono หรือ Polyhydroxy phenols ที่มีหลายวงแหวนแทนที่หมู่ที่ให้อิเล็กตรอน (ortho และ para) ไปเป็นหมู่ไฮดรอกซีของฟีนอลจะช่วยกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ การแทนที่ของหมู่ Butyl หรือหมู่ Ethy para ไปเป็นหมู่ Hydroxyl จะช่วยเพิ่มกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ ส่วนใหญ่สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิในอาหารจะเป็นสารประกอบที่สังเคราะห์ขึ้น ตัวอย่างความสำคัญของฟีนอลิกซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิจะประกอบด้วย Butylated hydroxyanisole (BHA), Butylated hydroxytoluene (BHT), Propyl gallate (PG) และ Tertiary butylhydrogiunone (TBHQ) อย่างไรก็ตามองค์ประกอบธรรมชาติในอาหารจะมีกระบวนการทำงานเหมือนกับสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ วิตามินอีส่วนใหญ่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิตามธรรมชาติ แคโรทีนอยด์ก็เป็นสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิจากธรรมชาติถึงแม้ว่ากลไกการทำงานจะแตกต่างกับสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปของสารประกอบฟีนอลก็ตาม

2.3.2 หลักการหาขีดความสามารถในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ

หลักการหาขีดความสามารถในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ ส่วนใหญ่ทำโดยขั้นแรกจะเป็นการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมาก่อน แล้วจึงเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป จากนั้นทำการตรวจวัดหาอนุมูลที่เหลือหลังจากเกิดปฏิกิริยา ซึ่งหลักการนี้สามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปใช้ได้อย่างหลากหลายขึ้นกับการเลือกชนิดของตัวกำเนิดอนุมูลอิสระและชนิดของตัวตรวจวัดอนุมูลอิสระ

การตรวจหาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ อาทิเช่น การทดสอบสาร DPPH เป็นการตรวจวัดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการตรวจสอบการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ซึ่งเกิดปฏิกิริยารีดักชัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระ (AH) หรือสารตัวอย่างที่ทดสอบทำปฏิกิริยากับ DPPH และสารอนุมูลอิสระ ($R^{\cdot}$) ทำปฏิกิริยากับ DPPH ในการตรวจสอบ DPPH ในสารประกอบฟีนอล จะเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วในช่วงแรก แต่ต่อมาปฏิกิริยาจะเกิดช้าลง หากในสารสกัดมีสารต้านอนุมูลอิสระจะมีการลดลงของค่าการดูดกลืนแสง ดังนั้นสภาวะที่เสถียรจะเกิดขึ้นโดยใช้เวลาไม่นาน พบว่าจะเกิดหลังจากเวลาผ่านไป 15-30 นาที ทำให้สามารถทราบค่า half maximal effective concentration (EC_{50}) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของอนุมูลอิสระที่เหลือ 50 เปอร์เซ็นต์ (Pokorny, 2001)

2.3.3 การตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระทำได้หลายวิธี

1.1 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu Singleton และ Rossi(1965) โดยนำสารสกัดที่ละลายด้วยเอทานอล จำนวน 50 ไมโครลิตร ผสมกับ Folin reagent จำนวน 250 ไมโครลิตร และสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์ sodium carbonate จำนวน 250 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวัดหาปริมาณสารประกอบฟีนอลจากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ gallic acid และค่าการดูดกลืนแสงในหน่วย gallic acid equivalents (GAE) มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง

1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ $ABTS^{+}$

การหาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระโดยใช้ $ABTS^{+}$ ซึ่งได้มาจากนำ $ABTS^{+}$ ละลายในน้ำ 7 ไมโครโมลาร์ ซึ่ง $ABTS^{+}$ จะได้มาจากเติม potassium 2.45 ไมโครโมล เก็บในห้องมืดที่อุณหภูมิห้อง 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้งาน ส่วนของอนุมูลอิสระจะประกอบตัวได้ดี ต้องใช้เวลามากว่า 2 วัน ถ้าสารมีความเข้มข้นมากก็เจือจางโดยใช้น้ำกลั่น ซึ่งในการทดลองจำเป็นต้องทำ black ด้วยเพื่อเป็น A_0 วิธีการทำก็คือใส่น้ำกลั่นไปแทนตัวอย่างแล้วนำไปวัดค่า absorbance ที่ 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่า 0.700 ± 0.02 เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติม $ABTS^{+}$ 3 มิลลิลิตร เติมสารสกัดจากพืชที่ทำการทดลอง 30 ไมโครลิตร วัดค่า absorbance ที่ 6 นาที จะได้ค่าเป็น A_t การแสดงผลที่ถูกต้องจะแสดงออกมาในรูปของ ไมโครโมลาร์trolox / 100 กรัมของน้ำหนักแห้งและในการทดลองควรทำ 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ FRAP

วิธีนี้เป็นการวัดสมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยหลักการว่าสารต้านออกซิเดชันทำให้ที่ให้อิเล็กตรอนจึงจัดเป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า Total Antioxidant Capacity (TAC) เป็นการวัดความสามารถรวมในการรีดิวซ์ โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริค Fe^{3+} -TPTZ (ferric tripyridyltriazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมของเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์โดยสารต้านออกซิเดชัน ได้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส Fe^{2+}-TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงินดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

การตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดสมุนไพร ด้วยเทคนิค FRAP SzöllÖsi และ Varga-SzöllÖsi (2002) โดยนำสารสกัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเจือจางในเอทานอล 10 มิลลิลิตร ใน volumetric flasks จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร เติมลงไป 3.0 มิลลิลิตร FRAP reagent (25 มิลลิลิตร ของ acetate buffer 300 มิลลิโมลาร์/ลิตร pH 3.6 กับ 2.5 มิลลิลิตร ของ 10 มิลลิโมลาร์/ลิตร TPTZ ในส่วนผสมของ 40 มิลลิโมลาร์/ลิตร HCl และ 2.5 มิลลิลิตร $FeCl_3.6H_2O$ 20 มิลลิโมลาร์/ลิตร) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรโดยใช้ตัวทำละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แทนสารสกัดเป็น blank คำนวณค่า activity จากกราฟมาตรฐานของ L-ascorbic acid (0.2-1 มิลลิโมลาร์/ลิตร)ผลที่ได้แสดงค่าเป็น ascorbic acid equivalents(AAE)/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งของพืช

1.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH

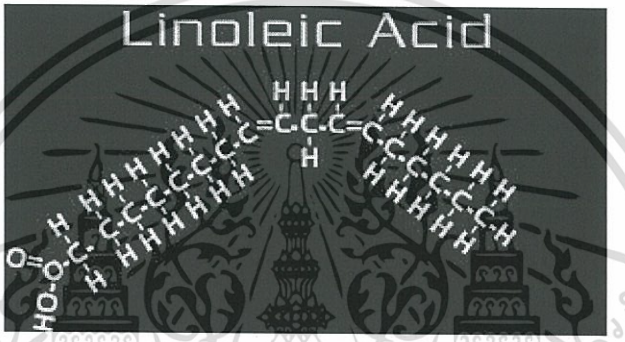
เตรียมสิ่งสกัดที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนpositive control คือ L-ascorbic acid เตรียมให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรจากนั้นนำตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical 0.025 กรัม/ลิตร ใน methanol จำนวน 180 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร โดยใช้ ELISA reader หลังจากปฏิกิริยาดำเนินไปจนถึงภาวะคงที่ ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (triplicate) หา % DPPH inhibition (Bonina et al, 2000)หา vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) โดยสร้าง calibration curveจากสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid (vitamin C) ใน methanol ความเข้มข้น 0.1, 0.01,0.001, 0.0001, 0.00001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำมาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยวิธีดังกล่าวข้างบน จากนั้นหาความเข้มข้นของสารสกัดชั้น ethanol ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจาก calibration curve นำไปคำนวณหา vitamin C equivalent antioxidantcapacity (VCEAC)ในรูป มิลลิกรัมของ vitamin C equivalents ต่อสารสกัดชั้น ethanol 100 กรัม (Dae-Ok และคณะ(2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ

วิธีที่นิยมทั่วไปมี 3 วิธีคือ (1) Antioxidant activity ซึ่งการวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการต่อต้านการเกิดอนุมูลอิสระของกรดลิโนลีอิค (2) Reducing power เป็นการวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ และ(3) Scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH) เป็นการวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการกำจัดสาร DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง โดยได้อธิบายรายละเอียดของแต่ละวิธีดังนี้

1. การวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการต่อต้านการเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ของกรดลิโนลีอิค (ดูรูปที่ 2.2) (Antioxidant activity)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างกรดลิโนลีอีค

ที่มา : www.lks.ac.th/student/kroo_su/ch...Chem.htm (30 เม.ย2553)

กรดลิโนลีอิคเป็นกรดไขมันชนิดหนึ่งที่มีพันธะคู่เป็นส่วนประกอบ ทำให้กรดนี้สามารถจับกับอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในระบบ ทำให้กลายเป็นอนุมูลอิสระ จากนั้นจึงทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศได้ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็น conjugated diene ที่เสถียร (Erikson,1987) สารต้านอนุมูลอิสระมีพันธะคู่เป็นส่วนประกอบ ทำให้สารต้านนี้สามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระได้ จึงสามารถลดการเกิดเป็นอนุมูลอิสระของกรดลีโนลีอิกได้ ด้วยเหตุนี้ประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการต่อต้านการเกิดอนุมูลอิสระของกรดลิโนลีอิคจึงวัดโดยเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงสารละลายที่มีกรดลิโนลีอิคผสมอยู่ ทิ้งไว้ระยะหนึ่ง จากนั้นใช้เครื่อง UV Spectrophotometer วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร ค่าที่ได้นี้แปรผันกับความเข้มข้นของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นดังนั้นการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงจึงบ่งบอกได้ถึงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการต่อต้านการเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Reducing power) สารที่เป็นรีดิวซิงเอเจนต์สามารถจ่ายอิเล็คตรอนให้กับอะตอมหรือโมเลกุลในตระกูลของโลหะที่สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้ (เช่น เหล็ก ทองแดง เป็นต้น) (Halliwell and Gutteridge,1984) เหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์ริคไอออน (Fe 3+) มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนจากสารอื่นๆ ได้ดี ในด้านชีวเคมี อนุมูลอิสระที่พบมากที่สุดเป็นสารที่มีออกซิเจนและไวต่อปฏิกิริยา (ROS) ไอออนอิสระของเหล็กสามารถเป็นตัวเร่งการเกิด ROS เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ อนุมูลไฮดรอกซิล เป็นต้นเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการให้อิเลกตรอนของแต่ละสารที่สกัดได้ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเฟอร์ริคไอออนกับสารสกัดแต่ละชนิดมีค่าคงที่ และค่าของการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จากเครื่องมือวิเคราะห์สารโดยใช้หลักการทางสเปคโตรสโคป(UV Spectrophotometer) จะมีค่าแปรผันตามความเข้มข้นของเฟอรร์รัสไอออนที่เกิดขึ้น ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงจึงบ่งบอกได้ถึงความสามารถของการเป็นรีดิวซิงเอเจนต์

3. การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH (Scavenging effect on 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH))

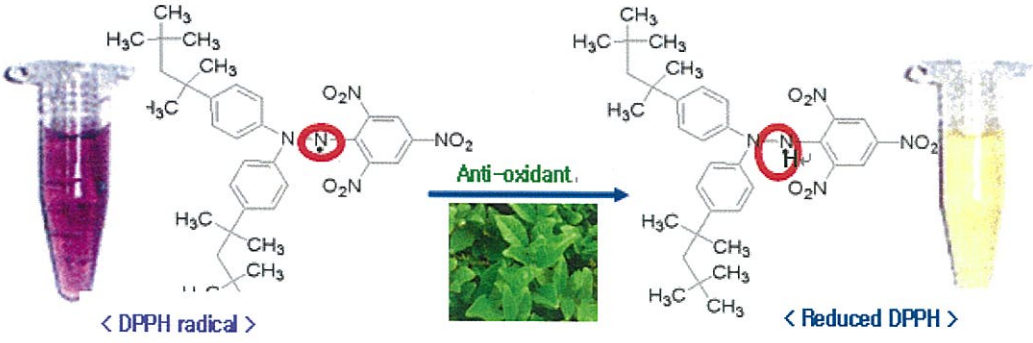
DPPH คือ อนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเลคตรอนได้อีก เพื่อเปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ ดังรูปที่ 2.3 และเมื่อได้รับอะตอมไฮโดเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ

1: Diphenylpicrylhydrazyl (free radical) 2: Diphenylpicrylhydrazine (nonradical)

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของสาร DPPH

ที่มา : pirun.ku.ac.th/~b4755242/7.htm (15 ก.ค 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 การฟอกสี DPPH ทำให้เปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองอ่อน

ที่มา : http://www.naturalsolution.co.kr/img/p_tech211.gif (15 ก. ค 2552)

ดังนั้นความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษานี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรที่อยู่ในสารละลาย (นิยมใช้ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระมาก เพราะใช้งานง่าย) โดยในการทดสอบนี้จะให้ DPPH (มีสีม่วงเข้ม) ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในระยะเวลาที่กำหนด ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จะแปรผันกับความเข้มข้นของ DPPH ดังนั้นการลดลงของความเข้มข้นของ DPPH (สีอ่อนลง) บ่งบอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ

2.5 วิตามินอี (โทโคฟีรอล)

วิตามินอี (โทโคฟีรอล) เป็นวิตามินชนิดหนึ่งทั่วร่างกายต้องการ หากขาดอาจทำเกิดภาวะผิดปกติต่อขบวนการ ทางชีวเคมีในร่างกายได้ในหลายๆ ระบบ และถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1922 ในการทดลองกับหนู แล้วพบว่าหากหนูทดลองขาดวิตามินอี จะทำให้เกิดภาวะเป็นหมัน (Infertile)

วิตามินอี จะมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลือง และละลายได้ดีในไขมัน รูป (form) ที่พบในธรรมชาติมีชื่อเฉพาะว่า “โทโคเฟอรอล” (Tocopherol) ซึ่งรูปโทโคเฟอรอลนี้มีโครงสร้างแตกต่างกันประมาณ 6-7 แบบ แต่รูปแบบที่ออกฤทธิ์ดีที่สุด คือ อัลฟาโทโคเฟอรอล (alpha - tocopherol) รูปอัลฟา – โทโคฟีรอลจะมี 2 รูป คือ ชนิดที่ได้จากธรรมชาติ (D - alpha - tocopherol) และจากการสังเคราะห์ (L - alpha – tocopherol) ซึ่งทั้ง 2 รูปนี้จะให้ผลที่ไม่แตกต่างกันมากนัก

พบว่าเมื่อร่างกายได้รับวิตามินอีไปพร้อมกับอาหาร วิตามินอีจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายยังผนังลำไส้เล็กไปพร้อมกับไขมัน และพร้อมกับวิตามินที่ละลายในไขมันชนิดอื่นๆ เช่น วิตามินเอ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

วิตามินดีและวิตามินเค ปกติเมื่อร่างกายได้รับวิตามินอีเข้าไปแล้วจะเก็บสะสมไว้ในไขมันในร่างกาย แต่พบว่าในคนที่รับประทานกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated Fatty Acids) หรือฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen) เช่น ยาเม็ดคุมกำเนิด (Contraceptive Pill) จะมีผลทำให้วิตามินอีที่สะสมไว้ใช้ประโยชน์ในร่างกายถูกขับ (Depletion) ออกจากแหล่งสะสมไปจนอาจทำให้เกิดภาวะขาดวิตามินอีได้

ประโยชน์ของวิตามินอีต่อร่างกาย

วิตามินอีเป็นวิตามินที่รู้จักกันเป็นอย่างดีว่า เป็นสารต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ดีเลิศ (Potent Antioxidant) จึงให้ผลในการป้องกันการทำลายเซลล์ หรือลดความเสื่อมของอวัยวะต่างๆ ที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ (Free Radical)

นักวิทยาศาสตร์สังเกตพบว่าการรับประทานไขมันโดยเฉพาะชนิดที่มีการเติมสารไฮโดรเจน (Hydrogenated Oil) เพื่อเปลี่ยนกรดไขมันไม่อิ่มตัวให้เป็นกรดไขมันอิ่มตัวและการรับประทานไขมันที่มีกลิ่นเหม็นหืน (Rancid) พบว่าจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (Free Radical) จากกรดไขมันดังกล่าวในร่างกายจำนวนมาก ชั้นอนุมูลอิสระนี้จะมีผลทำให้เนื้อเยื่อระคายเคืองและโดนทำลาย แล้วก่อให้เกิดอาการอักเสบเรื้อรังตามมา ซึ่งมักเกิดกับเซลล์ผนังหลอดเลือด มีผลทำให้เกิดภาวะผนังหลอดเลือดแข็งตัว (Atherosclerosis), โรคหัวใจ (Heart Disease), ภาวะความดันโลหิตสูง (Herpertension), ภาวะปวดอักเสบข้อ (Arthritis), ความแก่ (Senility) หรือภาวะมะเร็ง (Cancer) ตามมาได้ในระยะยาว ดังนั้นการรับประทานวิตามิน อี ร่วมด้วย หรือป้องกันการก่อตัวมากขึ้นของอนุมูลอิสระ ก็จะสามารถช่วยลดความเสี่ยวต่อภาวะดังกล่าวข้างต้นทั้งหมดได้เช่นเดียวกัน

นอกจากการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ดีต่อตัวเซลล์แล้ววิตามินอียังมีผลในการช่วยปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ (Stabilize) ที่อวัยวะต่างๆ เช่น เซลล์ของผิวพรรณ, ตา, ตับ, หน้าอก และลูกอัณฑะ ทำให้อวัยวะต่างๆ ดังกล่าวมีประสิทธิภาพการทำงานและอายุการใช้งานนานขึ้นด้วย

การวิจัยล่าสุดพบว่าวิตามินอีจะให้ผลในการลดการเกาะตัวกันของเกล็ดเลือด (Platelet Aggregation) และยังส่งผลทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมีประสิทธิภาพการทำงานดีขึ้น โดยใช้ก๊าซออกซิเจนน้อยลงซึ่งมีผลโดยรวมลดอัตราเสี่ยงต่อการเป็นโรคระบบหลอดเลือดและหัวใจ (CVD; Cardiovasculardisease) (http://pha.narak.com/topic.php? No=00238)

2.6 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

2.6.1. เชื้อ *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus สีแกรมบวก เป็นแบคทีเรีย ที่มีลักษณะกลม คล้ายพวงองุ่น (รูปที่ 2.5) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ นูน มีสีครีม เหลือง ส้ม จัดอยู่ในกลุ่ม Facultative anaerobe คือ สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนมากกว่าในสภาพไม่มีออกซิเจน และสามารถสร้างสารพิษ enterotoxin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
115049

แหล่งที่พบเชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ที่ผิวหนัง โพรงจมูก เยื่อบุทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร และบาดแผลที่เป็นฝี หนอง รวมถึงในดินฝุ่นละออง

อาหารที่มักพบเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์จากไข่ อาหารประเภทสลัดเช่น ไข่ ทูน่า เนื้อไก่ มันฝรั่ง และมักกะโรนี ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ครีมพาย เอแคลร์ ช็อกโกแลต แซนวิช และผลิตภัณฑ์นม ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมและเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนรับประทานการทำให้เกิดโรค

เชื้อ *S. aureus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษแม้ในปริมาณน้อยกว่า 1 ไมโครกรัม ก็สามารถทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยได้ สารพิษชนิดนี้จะมีปริมาณสูงมากเมื่อมีเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร 100,000 เซลล์ต่อกรัมอาหาร ทำให้เกิดโรค Acute infection (ฝีหนอง แผลติดเชื้อ septicemia) และ Acute toxaemias (heat stable enterotoxin)

ลักษณะอาการของโรค

หลังจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไปประมาณ 1 – 6 ชั่วโมง จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วงอย่างรุนแรงจนอ่อนเพลียมาก ปวดท้องและเป็นตะคริว ส่วนมากไม่มีไข้ ในรายที่มีอาการรุนแรงอาจช็อคได้ อาจมีอาการอื่นแทรกซ้อนในผู้สูงอายุ เด็กแรกเกิด และผู้ป่วยโรคเบาหวาน แต่ส่วนใหญ่อาการจะดีขึ้นใน 8 – 24 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานของร่างกาย และปริมาณของสารพิษที่ได้รับเข้าไปในร่างกาย

รูปที่ 2.5 ภาพของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

ที่มา : www.biology4kids.com/extras/dtop_micro/7821.htm (12 ก.ค 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 เชื้อ *Escherichia coli*

E. coli รูปร่างเป็นแท่งตรง อยู่เดี่ยว ๆ หรือ เป็นคู่ เคลื่อนที่โดยใช้ peritrichous flagella หรือไม่เคลื่อนที่ก็ได้ ขึ้นได้บนอาหารง่ายๆ (รูปที่ 2.6) โคโลนีบนอาหาร NA ผิวเรียบ ชื้น ผิวมัน สีเทา และเกิดการอิมัลซิไพง่ายในน้ำเกลือ อาจมีลักษณะหยาบ แห้ง ไม่อิมัลซิไพง่ายในน้ำเกลือ สามารถใช้แอซีเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่สามารถใช้ซิเตรท กลูโคสและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ จะถูกหมักเกิดกรดแลกติก แอซีติก และฟอร์มิก

รูปที่ 2.6 ภาพของเชื้อ *Escherichia coli*
ที่มา : www3.niaid.nih.gov (12 ก.ค 2552)

พบเชื้อ *E. coli* ครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1885 และจัดเป็นเชื้อที่ไม่เป็นอันตราย(harmless) มีรูปท่อน แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ ต้องการอากาศแบบ แฟคคัลเททีฟ แอนแอโรบ มีถิ่นที่อยู่ในลำไส้ของมนุษย์ สัตว์เลือดอุ่น และสัตว์ปีก โดยพบในปริมาณสูง (ประมาณล้านเซลล์ต่อกรัม) ใช้เชื้อชนิดนี้เป็นจุลินทรีย์ดัชนีบ่งชี้ (index microorganisms) การปนเปื้อนของอุจจาระในอาหารและน้ำ ประมาณกลางปี 1940 พบว่าเชื้อ *E. Coli* ทำให้ทารกท้องเสีย โดยตั้งชื่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคนี้ว่า enteropathogenic *E. Coli* ในปัจจุบันพบว่า *E. Coli* ก่อโรคดังนี้

1. Enteropathogenic *E. Coli* (EPEC) เป็นเชื้อที่ทำให้ทารกท้องเสีย โดยเฉพาะทารกที่เลี้ยงในสถานที่ที่มีสุขาภิบาลไม่สะอาด เชื้อสามารถแพร่ผ่านทางมนุษย์ ซึ่งเป็นพาหะทั้งทางตรงและทางอ้อม พบเชื้อหลายซีโรไทป์ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคทางเดินอาหารในน้ำและเครื่องดื่มในประเทศต่าง ๆ หลายประเทศ กลไกการเกิดโรคยังไม่ทราบชัดเจน แต่ทราบว่าผู้ป่วยต้องรับประทานเชื้อเข้าไปปริมาณมาก (ประมาณ 10^6 ถึง 10^9 เซลล์ต่อกรัม) จึงทำให้มีอาการโรคทางเดินอาหาร

2. Enterotoxigenic *E. Coli* (ETEC) เชื้อกลุ่มนี้ก่อให้เกิดโรคท้องเสีย ในหมู่นักเดินทาง รวมทั้งในทารกที่อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนาที่มีการสุขาภิบาลไม่สะอาด การพบโรคเกิดจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถของเชื้อในการผลิตสารพิษซึ่งเป็นปัจจัยในการบุกรุกเนื้อเยื่อในอวัยวะอื่น โดยเป็นสารที่ไม่ทนความร้อน หรือทนความร้อน หรือเป็นทั้งสารที่ทนความร้อน หรือไม่ทนความร้อน อาการของโรคจะเกิดขึ้นกับระบบทางเดินอาหาร โดยมีอาการคล้ายกับผู้ป่วยเป็นอหิวาตกโรค เชื้อโรคจะแพร่ระบาดโดยตรงและทางอ้อม โดยมีมนุษย์เป็นพาหะของเชื้อนี้ โดยผ่านทางอาหารและน้ำ ซึ่งพบการระบาดเป็นครั้งคราวในมนุษย์ ในปี 1983 เนยแข็งบรี (Brie) ซึ่งนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา มีเชื้อ *E. Coli* 027 :H7 ปนเปื้อน เชื้อชนิดนี้ทำให้ประชากรในสหรัฐอเมริกาและประเทศอื่นๆ ป่วย และมีอาการดังกล่าวมาแล้ว ทั้งนี้ผู้ป่วยต้องรับประทานอาหารที่มีเชื้อเข้าไปในปริมาณ 10^8 ถึง 10^9 เซลล์ต่อกรัม

3. Enteroinvasive *E. Coli* (EIEC) เชื้อกลุ่มนี้ทำให้มีอาการคล้ายโรคบิด หรือคล้ายโรคชิกเกลโลซิส โดยเชื้อสามารถสร้างปัจจัยบุกรุกเยื่อบุลำไส้ออกมาแล้วก่อโรคได้ มนุษย์เป็นพาหะที่นำเชื้อทั้งทางตรงและทางอ้อมมีการแพร่กระจายของเชื้อโรค ผู้ป่วยต้องได้รับเชื้อเข้าไป 10^6 เซลล์ทำให้เกิดโรค การระบาดในสหรัฐอเมริกาเริ่มพบเมื่อปี ค.ศ. 1971 เกิดจากการบริโภคเนยแข็งคาเมมเบิร์ต (camembert cheese) ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ซึ่งมีเชื้อ *E. Coli* 124 :B17ปนเปื้อน โรคทางเดินอาหารซึ่งเกิดจาก EIEC เกิดจากสารพิษชนิดพอลิเพปไทด์ โดย พลาสมิด (plasmid) กำหนดให้มีการสร้างสารพิษที่สามารถบุกรุกเยื่อบุลำไส้ โดยเชื้อสามารถเกาะติด และมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่ลำไส้

4. Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) เชื้อกลุ่มนี้ได้แก่ เชื้อ *E.coli* 0157 : H7 เป็นเชื้อที่ทำให้มนุษย์มีอาการท้องเสียโดยถ่ายเป็นเลือดอย่างรุนแรง (haemorhagic colitis) เนื่องจาก ลำไส้อักเสบ รวมทั้งปัสสาวะเป็นเลือด สำหรับในวัวนมที่เป็นพาหะนำโรค การรับประทานเชื้อนี้เพียง 10-100 เซลล์ ทำให้เกิดโรคได้ ความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อเกิดจากการสร้างเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxins) ออกมา

E.coli 0157 : H7 สามารถสร้างสารพิษมากกว่า 1 ชนิด ที่ทำให้เกิดโรคและมีอาการของโรคคล้ายกัน ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเชื้อสามารถสร้างปัจจัยบุกรุกหรือไม่ เชื้อสามารถเกาะที่ลำไส้และเพิ่มจำนวน พร้อมกับสร้างสารพิษได้ ซึ่งมีผลต่อลำไส้ใหญ่

E.coli 0157 : H7 ทำให้มีเลือดออกในลำไส้ใหญ่ ปัสสาวะมีเลือด และ ต่อมน้ำเหลืองอักเสบ อาการของโรคจะเกิดหลังจากรับประทานเชื้อนี้เข้าไป 3-9วัน โดยจะมีอาการอยู่ 4 วัน โดยเป็นตะคริวที่ท้อง ถ่ายเหลว อาเจียน อาจมีไข้หรือไม่มี ลำไส้ใหญ่จะมีเลือดออก สารพิษทำลายเม็ดเลือดแดง ทำให้เลือดจับตัวเป็นลิ่มในไต ทำให้ไตถูกทำลาย ในที่สุดไตจะวาย เรียก HUS (ปัสสาวะเป็นเลือด) ทำให้ผู้ป่วยตายได้เฉพาะที่เป็นเด็ก การเกิดต่อมน้ำเหลืองอักเสบ เกิดจาก เลือดมีการแข็งตัวเป็นลิ่มในสมอง ทำให้ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงและตายได้

พบเชื้อในลำไส้สัตว์ โดยเฉพาะในวัว ควาย โดยไม่ทำให้วัวควาย มีอาการของโรค การวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้แสดงให้ทราบว่ามีเชื้อ E.coli 0157 : H7 ในอาหารหลายชนิดที่ทำจากเนื้อสัตว์ เช่น เนื้อหมู วัว บด ไก่ แกะ

ลักษณะอาการของโรค

อาการของโรคคล้ายโรคชิกเกลโลซิส ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังการได้รับเชื้อโรคปริมาณ 10^6 เซลล์ และมีระยะพักโรค อาการของโรคที่เกิดขึ้นจะทำให้ผู้ป่วยเป็นตะคริวที่ท้อง ท้องเสีย ปวดศีรษะ หนาวสั่น มีไข้ ในอุจจาระที่ขับออกมาจะมีเชื้อเป็นจำนวนมาก อาการของโรคจะเป็นอยู่ 7 - 12 วัน เมื่อผู้ป่วยหายแล้วจะยังเป็นพาหะ โดยมีเชื้อในอุจจาระต่อไปเป็นเวลานาน

อาหารที่พบเชื้อ

การใช้ความร้อนอย่างถูกต้องเหมาะสม เช่น การพาสเจอร์ไรส์ สามารถกำจัดเชื้อ EIEC ได้ ไม่ว่าจะเป็นการกำจัดเชื้อที่ปนเปื้อนภายหลังการให้ความร้อนอาหารสำเร็จรูป การกำจัดเชื้อในอาหารแช่เย็นเพื่อควบคุมโรค เป็นต้น นอกจากนี้การสุขาภิบาลอาหารที่สะอาด ปลอดภัยในการปรุงและประกอบอาหาร และการเสิร์ฟอาหารทำให้อาหารปลอดภัย

การป้องกันโรค มีดังต่อไปนี้

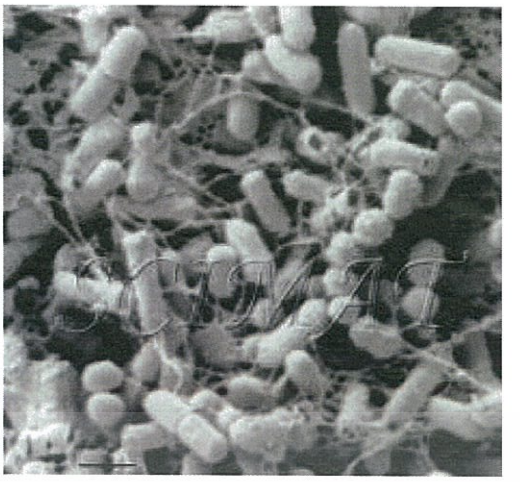
- ให้ดื่มนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์แล้ว
- อาหารที่เน่าเสียง่ายต้องแช่เย็น หรือแช่เยือกแข็ง
- ห้ามละลายน้ำแข็งที่อยู่ในอาหารเยือกแข็ง ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน กว่า 2 ชั่วโมง แต่ให้ละลายน้ำแข็งในตู้เย็น
- ล้างมือ อุปกรณ์ เครื่องมือทำอาหาร และบริเวณทำอาหาร ด้วยสบู่และน้ำอุ่น หลังจากอุปกรณ์ดังกล่าวสัมผัสเนื้อดิบ
- ทำเนื้อให้ สุกทั่วถึงตลอดกันทั้งชิ้น ด้วยความร้อน
- หลีกเลี่ยงการรับเชื้อโรคจากอุจจาระ โดยไม่อนุญาตให้ผู้ป่วยโรคทางเดินอาหาร หรือผู้ที่เพิ่งหายป่วยจากโรคนี้เป็นผู้สัมผัสอาหาร

2.6.3 เชื้อ *Bacillus subtilis*

เชื้อแบคทีเรีย บาซิลัส ซับทีลิส (บี เอส) (รูปที่ 2.7) มีคุณสมบัติสำหรับป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา สาเหตุ และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคพืชได้หลายชนิด และในขณะเดียวกันเชื้อบี เอส ยังเป็นจุลินทรีย์ ที่ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์ และไม่มีพิษตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม

เชื้อแบคทีเรีย บาซิลัส ซับทีลิส (บี เอส) มีคุณสมบัติสำหรับป้องกันกำจัด โรคกาบใบแห้งของข้าว หรือ โรคขี้กลาก เป็นโรคที่มีการระบาดก่อความ เสียหายให้แก่พี่น้องเกษตรกร และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้น โรคนี้มีสาเหตุจากเชื้อรา Rhizotonia solani Khun ที่สามารถก่อโรคพืชได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังสามารถสร้างเม็ดขยายพันธุ์ (sclerotium) ที่จะตกค้างอยู่ในดินเมื่อหมดฤดู และทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้เป็นเวลานาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 ภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis*

ที่มา : www.magma.ca/~scimat/B_subtil.htm (12 ก.ค 2552)

การใช้สารเคมีเพื่อควบคุมโรคของเชื้อรานี้ เป็นเรื่องยุ่งยาก สิ้นเปลืองและก่อมลภาวะ ต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ในประเทศจีนมีรายงานถึงการใช้ชีวภัณฑ์ของเชื้อจุลินทรีย์ แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อราชนิดนี้ได้เป็นผลดี

ประเทศไทยก็มีการใช้ชีวภัณฑ์จากเชื้อ จุลินทรีย์ ชนิดนี้อยู่เช่นกัน ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์ไทยจึงได้พัฒนาชีวภัณฑ์ของเชื้อ *B. subtilis* จากดินใน ประเทศไทย เพื่อควบคุมโรคดังกล่าว โดยความร่วมมือกันของนักวิจัยจากหลายแห่ง ทั้งจากคณะ ต่างๆ ในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และจากกรมวิชาการเกษตร โดยการสนับสนุน ของ สำนัก งานกองทุนสนับสนุนการวิจัย กลุ่มนักวิจัยเหล่านี้ได้ทำการทดลองค้นหาเชื้อปฏิปักษ์ ของเชื้อรา โรคกาบใบแห้งของข้าวจากต้นข้าว เมล็ด ดิน และน้ำแหล่งโรค ด้วยความคิดที่ว่าอยาก ได้ลูกเสือ ต้องเข้าถ้ำเสือฉันใด อยากได้เชื้อปฏิปักษ์ต่อโรคก็ต้องหาในแหล่งโรค

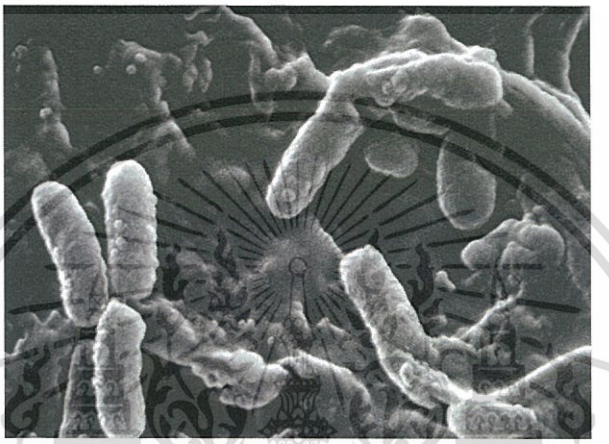
เชื้อจุลินทรีย์ ทีดีที่สุดคือ *B. subtilis* ทั้งยังทำการศึกษาความเป็นพิษของเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* และสารออก ฤทธิ์ที่ได้ ซึ่ง สามารถควบคุมโรคได้อย่าง มีประสิทธิภาพ เมื่อทำการทดลองจริงผลการทดสอบทำให้ได้สารละลายของเชื้อ *B. subtilis* เกิดเป็นชีวภัณฑ์ขึ้น

เชื้อ *B. subtilis* นอกจากจะยับยั้งโรคกาบใบแห้งของข้าว แล้วยัง ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้อีกด้วย ยังพบว่า กลไกในการควบคุมเชื้อรา โรคกาบใบแห้ง ของข้าวโดยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* คือ เชื้อจะสร้างสารปฏิชีวนะขึ้นมายับยั้งการ เจริญของเชื้อรา โดยมีผลทำให้เส้นใยของเชื้อรา รวมทั้งเม็ดขยายพันธุ์ของเชื้อราปริแตก ซึ่งจะส่ง ผลให้เชื้อราตาย และไม่สามารถแผลงฤทธิ์ซ้ำเติม ความลำบากของชาวนาได้อีก ชีวภัณฑ์สำเร็จรูปนี้ สามารถเก็บ ที่อุณหภูมิห้องได้ถึง 6 เดือน และสามารถเก็บในอุณหภูมิตู้เย็นได้เป็นปีเลยทีเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.4 เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa เป็นแบคทีเรียรูปท่อนหรือโค้งเล็กน้อย เคลื่อนที่ด้วยโพลาร์แฟลกเจลลา ติดสีแกรมลบ ผนังเซลล์ประกอบด้วยลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ (รูปที่ 2.8) (lipopolysaccharide,LPS) ส่วนของโพลิแซ็กคาไรด์ที่ยื่นออกจากเมมเบรนชั้นนอก (LPS) เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับความจำเพาะทางซีโรโลยีและความไว (susceptible) ต่อแบคทีริโอซินหรือไพโอซิน (bacteriocin หรือ pyocin) และแบคทีริโอเฟจ *P. aeruginosa* ยังมีชั้นเมือก (slime layer) ที่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์และมีพิไลอยู่ที่ผิวเซลล์ด้วย



รูปที่ 2.8 ภาพของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

ที่มา : www.health.qld.gov.au/EndoscopeR...e13d.htm (12 ก.ค 2552)

P. aeruginosa เป็นเชื้อชนิดหนึ่งที่ให้ผลบวกกับออกซิเดส เคลื่อนที่ได้ และไม่เฟอร์เมนต์แล็กโทสเมื่อเลี้ยงใน Mac conkey agar สร้างรงควัตถุไพโอไซยานิน (pyocyanin) ที่มีสีฟ้า และไพโอเวอดิน (pyoverdin) สีเหลืองที่เป็นสีเหลือบ (fluorescens) เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รงควัตถุทั้ง 2 สีรวมกันเป็นสีเขียวละลายน้ำได้และแพร่เข้ามาในอาหารเลี้ยงเชื้อ บางสายพันธุ์ให้รงควัตถุสีสนิมไพโอรูบริน (ptorubrin)

โดยปกติแล้ว *P. aeruginosa* ไม่ค่อยทำให้เกิดโรคในคนที่มีสุขภาพดี แต่จะเป็นเชื้อฉวยโอกาสทำให้เกิดโรคได้ในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรืออ่อนแอ หรือเมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายในบริเวณที่ไม่มีความต้านทานตามปกติ เช่น เยื่อเมือกหรือผิวหนังที่ถลอก คนไข้ในโรงพยาบาลจะมีการติดเชื้อ *Pseudomonas* ได้ง่ายและรุนแรง โดยที่เชื้อเพิ่มจำนวนอยู่ในน้ำหรือที่มีความชื้นตามเครื่องมือ หรือเครื่องช่วยหายใจ การติดเชื้อจะเกิดขึ้นเมื่อมีการใช้เครื่องมือทางการแพทย์เพื่อตรวจหรือรักษา เช่น การใช้เครื่องสวนในหลอดเลือดหรือปัสสาวะ คนที่มีแผลเปื่อยอักเสบ แฟลไฟไหม้ การตีดเชื้อที่ตา คนไข้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือสูงอายุ โรคที่ภูมิคุ้มกันถูกกด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว และคนที่ได้รับ

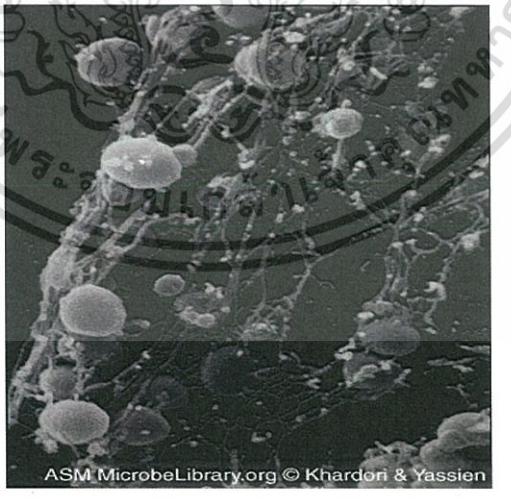
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยากดภูมิคุ้มกันมักเกิดการติดเชื้อ *Pseudomonas* ได้ง่าย ทำให้เชื้อเข้าสู่ร่างกายและเกิดปอดบวมตามมา

การติดเชื้อ *P. aeruginosa* มักร้ายแรงและดื้อต่อยาที่ใช้รักษา ทำให้เชื้อเพิ่มจำนวนขึ้น เมื่อเชื้อแบคทีเรียอื่นที่ไวต่อยาถูกระงับการเจริญ การที่เชื้อพัฒนาการดื้อยาที่ใช้รักษาเนื่องจากการกระตุ้นของเอนไซม์ เช่น β-lactamase หรือการถ่ายทอดพลาสมิดที่นำยีนการดื้อยาจากเชื้อหนึ่งไปยังอีกเชื้อหนึ่ง นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะบางกลุ่ม เช่น อะมิโนไกลโคไซด์ ก็ไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อตรงบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ เนื่องจากบริเวณที่ติดเชื้อเกิดหนองมีสภาพเป็นกรดมาก ประสิทธิภาพของยาจึงลดต่ำลง

การรักษาในปัจจุบัน เนื่องจากเชื้อนี้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด จึงต้องมีการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะก่อนใช้ การใช้ยาชนิดเดียวจะไม่ค่อยได้ผลในการรักษา จึงมักใช้ยาในกลุ่มเพนนิซิลินร่วมกับยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ คนไข้ที่มีบาดแผลไฟไหม้รุนแรง อาจรักษาด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับการให้ IgG (ของคน) ที่มีแอนติบอดีต่อโพลิแซ็กคาไรด์แอนติเจนของเชื้อ *P. aeruginosa* จะช่วยลดอัตราการตายได้ดีกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างเดียว การให้วัคซีนชนิดพอลิวาเลนท์ (polyvalent vaccine) ที่ประกอบด้วยสารสกัดจากเซลล์ *P. aeruginosa* ก็ให้ผลในการป้องกันการติดเชื้อได้ดี

2.6.5 *Staphylococcus epidermis*



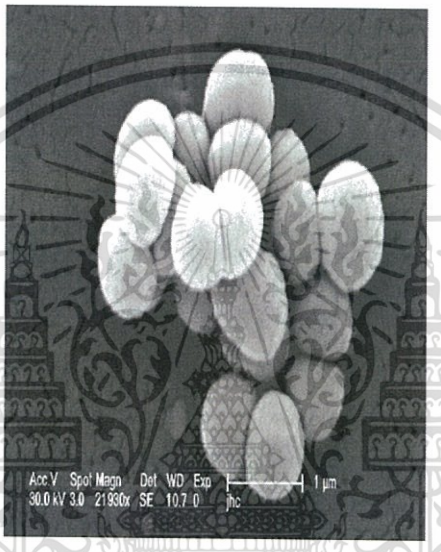
รูปที่ 2.9 ภาพของเชื้อ *Staphylococcus epidermis*

ที่มา : www.microbelibrary.org/asmonly/d...6Lang%3D (12 ก.ค 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.6 Micrococcus luteus

M. luteus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (รูปที่ 2.10) พบได้ทั่วไปในดิน ฝุ่นละออง น้ำและอากาศ นอกจากนี้ยังเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นบนผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยพบในมนุษย์บริเวณปาก เยื่อเมือก ทางเดินหายใจ สามารถทนต่อความแห้งแล้งและปริมาณความเข้มข้นของเกลือที่สูงได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อ *M. luteus* จากการรักษาในโรงพยาบาลด้วย พบมากในอากาศภายในอาคาร เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดการอักเสบแล้วแต่ตำแหน่งของอวัยวะที่ติดเชื้อ เช่น ฝีหนองบนผิวหนัง หรือปอดอักเสบ



รูปที่ 2.10 ภาพของเชื้อ *Micrococcus luteus*

ที่มา : www. cellbiology.med.unsw.edu.au/unit...0802.htm (12 ก.ค 2552)

2.7 ยาต้านจุลชีพ

ยาต้านจุลชีพเป็นยากึ่งสังเคราะห์ที่ได้มาจากสารสกัดจากจุลชีพด้วยกัน เช่น จากแบคทีเรียหรือเชื้อรา แล้วนำมาปรับปรุงสูตโครงสร้างอีกเล็กน้อยเพื่อให้ออกฤทธิ์ดีขัน หรือบริหารยาง่ายขึ้น หรือมีความปลอดภัยเพิ่มมากขึ้น จนสามารถสังเคราะห์ยาได้เองโดยไม่ต้องสกัดสารใดๆจากจุลชีพอีกต่อไป ยาต้านจุลชีพบางขนานจึงเป็นสารเป้าหมายในตัวจุลชีพ จนสามารถขัดขวางกระบวนการเจริญเติบโต หรือการแบ่งตัว ทำให้จุลชีพหยุดการเจริญเติบโตหรือตายไปในที่สุด วงการแพทย์แบ่งยาเหล่านี้ออกเป็นประเภทต่างๆ หลายกลุ่ม ตัวอย่างของยาต้านจุลชีพได้แก่

- เพนิซิลลิน วี (Penicillin V)
- คล็อกซาซิลิน (Cloxacillin)
- คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol)
- กรีซิโอฟลาวิน (Griseofulvin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- คีโตโคนาโซล (Ketoconazole)
- โคไตรม็อกซาโซล (Cotrimoxazole)
- ดอกซีไซคลิน (Doxycycline)
- เตตราไซคลิน (Tetracycline)
- นอร์ฟล็อกซาซิน (Norfloxacin)
- ไพราซินาไมด์ (Pyrazinamide)
- เมโทรไนดาโซล (Metronidazole)
- ไรแฟมฟิซิน (Rifampicin)
- สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)
- อะม็อกซีซิลิน (Amoxicillin)
- อีแทมบูทอล (Ethambutol)
- อีริโทรมัยซิน (Erythromycin)
- ไอ เอ็น เอช (INH/ Isoniazid)

กระบวนการออกฤทธิ์โดยจับกับสารเป้าหมายในตัวจุลชีพนั้น เป็นลักษณะเฉพาะตัวของยาแต่ละขนานกับจุลชีพแต่ละชนิด ดังนั้น ยาจึงออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้บางชนิด และไม่สามารถทำลายเชื้อทุกชนิดได้ จึงไม่มียาต้านจุลชีพใดที่กว้างครอบจักรวาลจริง การใช้ยาจึงต้องเลือกให้ "ตรง" กับเชื้อโรคด้วย มิฉะนั้นจะไม่สามารถทำลายเชื้อก่อโรค หรือรักษาโรคได้ถึงแม้ยาที่มีราคาแพงมากก็ตาม นอกจากนั้น ยังมีเชื้อก่อโรคบางชนิดที่ยังไม่มียาต้านจุลชีพไปทำลายได้ เชื้อกลุ่มนี้มักอยู่ในกลุ่มไวรัส เช่น เชื้อก่อโรคไข้หวัด ไข้เลือดออก ไข้สมองอักเสบ โรคพิษสุนัขบ้า เป็นต้น

ในวงการแพทย์ยาแก้อักเสบและยาต้านจุลชีพเป็นยาคนละกลุ่ม ยาต้านจุลชีพเป็นยาทำลายเชื้อหรือยับยั้งการเจริญเติบโต เมื่อให้ยาต้านที่ตรงกับเชื้อโรค ยาจะไปทำลายเชื้อนั้น และทำให้ปฏิกิริยาอักเสบลดลงและหายไปในที่สุด ส่วนยาแก้อักเสบไปยับยั้งกระบวนการอักเสบที่ร่างกายนำมาต่อสู้สิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพที่บุกรุกเข้ามาสู่ร่างกายยาแก้อักเสบจึงไปลดกระบวนการต่อสู้ของร่างกายทำให้ปฏิกิริยาอักเสบซึ่งได้แก่ ยาเพรดนิโสโลน (prednisone) ยาเม็ดเบอร์ 5 หรือ ยาลูกกลอนบางชนิดที่ผสมยาแผนปัจจุบันเข้าไปด้วยโดยรู้เท่าไม่ถึงการณ์ เมื่อมีการติดเชื้อและกินยาแก้ต้านจุลชีพ จึงไม่ควรกินยาแก้อักเสบดังกล่าวไปพร้อมกัน

จุลชีพในร่างกาย

จุลชีพในร่างกายมีทั้งชนิดที่ก่อโรคและชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย จุลชีพที่เป็นประโยชน์ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในช่องปาก ช่องคลอด ทางเดินอาหาร และลำไส้ แบคทีเรียเหล่านี้ย่อยเศษอาหารที่เหลือใช้ สร้างวิตามินให้เราและหลั่งสารหรือกรดที่คอยป้องกันจุลชีพแปลกปลอมหรือเชื้อโรคเข้ามาเพิ่มจำนวนหรือบุกรุกเข้าสู่ร่างกาย แบคทีเรียเหล่านี้ไวต่อยาต้านจุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีพกลุ่มนี้ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายด้วย การกินยาต้านจุลชีพที่ไม่จำเป็นจึงเกิดผลเสียได้เพราะยาไปทำลายจุลชีพชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายจนทำให้เกิดโรคบางอย่างได้เอง เช่น ตกขาวคันที่ช่องคลอดจากเชื้อรา อุจจาระร่วงอย่างรุนแรงและยังทำให้แบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพง่ายขึ้นด้วย

หลักการใช้ยาต้านจุลชีพ

โดยทั่วไปโรคติดเชื้อทำให้เกิดไข้และกระบวนการอักเสบตามมา ทำให้ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามตัว อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร และอาการเฉพาะที่ตามอวัยวะต่างๆ เช่น ถ้ามีการติดเชื้อที่ปอดจะทำให้เกิดอาการไอ มีเสมหะเจ็บหน้าอก และหอบเหนื่อยได้ เชื้อก่อโรคมีหลายชนิด ตั้งแต่ เชื้อไวรัส (ทำให้เกิดไข้หวัด ไข้หวัดใหญ่ หลอดลมอักเสบฉับพลัน ไข้เลือดออก เป็นต้น) เชื้อคลามัยเดีย (chlamydia) ริกเก็ตเซีย (rickettsia) มัยโคพลาสมา (mycoplasma) เชื้อแบคทีเรีย เชื้อสไฟโรคีต เชื้อรา เป็นต้น เชื้อบางชนิดก่อโรคชั่วคราวแล้วโรคหายได้เอง บางชนิดก่อโรคชั่วคราวแล้วโรคหายได้เอง บางชนิดก่อโรครุนแรงจนถึงแก่กรรมได้ การเลือกยาต้านจุลชีพจึงต้องเลือกยาให้ "ตรง" กับเชื้อ แพทย์จะทราบว่า กลุ่มอาการแบบนี้น่าจะเกิดจากเชื้อโรคชนิดใดหรือกลุ่มใด ก็จะเลือกใช้ยาหรือแนะนำตามข้อมูลที่ได้จากผู้ป่วย หรือได้จากการชันสูตรเพิ่มเติมโดยขอเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยมาเพาะหาเชื้อก่อโรค เช่น เจาะเลือดเพื่อเพาะเชื้อหรือเก็บปัสสาวะมาเพาะเชื้อ เป็นต้น เมื่อเพาะได้เชื้อจากตัวอย่างแล้ว ห้องปฏิบัติการสามารถทดสอบว่า เชื้อดังกล่าวไวต่อยาต้านจุลชีพขนานใด ทำให้เลือกยาต้านจุลชีพได้แม่นยำขึ้นอีก

ในกรณีที่โรคเกิดจากเชื้อที่ยังไม่มียาต้านจุลชีพทำลายเชื้อได้ เช่น เชื้อไวรัสบางชนิดที่ก่อโรคไข้หวัดใหญ่ ไข้เลือดออก ไข้หวัด-เจ็บคอ เป็นต้น ถ้าโรคหายได้เอง แพทย์อาจจะให้ยารักษาตามอาการเพื่อทำให้ผู้ป่วยรู้สึกสบายและพักผ่อนนอนหลับได้ดีขึ้น แต่ถ้าเป็นโรคร้ายแรงและไม่หายเอง เช่น ไข้เลือดออกอีโบลา ไข้ทรพิษ เป็นต้น เราต้องป้องกันการกระจายของโรคไปสู่ผู้อื่น โรคบางชนิดมีอาการเหมือนกัน แต่เกิดจากเชื้อได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น ไข้-เจ็บคอ มีเชื้อก่อโรคส่วนใหญ่เป็นไวรัสที่ไม่ยาต้านจุลชีพทำลายได้ ส่วนน้อยเกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่มียาต้านจุลชีพทำลายได้ การตรวจคอหอยโดยดูว่า มีหนองหรือไม่จะชี้แนะถึงเชื้อก่อโรคว่า เป็น ไวรัสหรือแบคทีเรีย ถ้าไม่พบหนองที่ต่อมทอลซิลจะเกิดจากไวรัสและไม่ต้องกินยาต้านจุลชีพ ถ้าพบจุดหนองที่ต่อมทอลซินหรือต่อมน้ำเหลือง 1 เม็ด ใต้มุมขากรรไกรโตและเจ็บ จะเกิดจากแบคทีเรียและต้องกินยาต้านจุลชีพทำลายเชื้อโรคจะหายเร็วขึ้น นอกจากนี้โรคอาจจะเกิดจากเชื้อต่างชนิดกันแต่มียาทำลายได้ทั้งคู่และเป็นยาคนละประเภท ยาต้านจุลชีพที่กินก็อาจจะแตกต่างกันได้ด้วย จึงสรุปได้ว่า แม้อาการของโรคจะเหมือนกัน ผู้ป่วยอาจจะไม่ต้องกินยาต้านจุลชีพ หรือต้องกินยาต้านจุลชีพ แต่เป็นต้นจุลชีพคนละชนิดกันก็ได้ เพราะเชื้อที่ก่อโรคเป็นคนละชนิดกัน ระยะเวลาที่กินยาอาจจะสั้น คือกินเพียงครั้งเดียว หรือกินนานหลายเดือนเป็นปี จึงต้องกินยาต้านจุลชีพให้ครบกำหนดระยะเวลาที่กำหนดโดยเฉพาะโรคที่ต้องรักษายาวนาน เช่น วัณโรค การหยุดยาก่อนกำหนดจะทำให้โรคกลับเป็นซ้ำใหม่ได้ง่ายและมีเชื้อที่ดื้อยาเพิ่มขึ้น ทำให้การรักษายุ่งยากขึ้น สำหรับผู้ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รับประทานยาต้านจุลชีพ ควรถามแพทย์หรือเภสัชกรถึงประเภทและชื่อยาต้านจุลชีพที่ให้กิน ความจำเป็นที่ต้องกินยาต้านจุลชีพขนานนี้ในการรักษาโรค วิธีการอื่นๆที่รักษาโรคนี้ได้ผลดีเช่นกัน ควรทราบว่า โรคนี้หายเองได้ไหมและการกินยาต้านจุลชีพทำให้โรคหายเร็วกว่าเดิมจริงหรือไม่ การกินยาทำให้เกิดอาการข้างเคียงหรือแพ้ยาได้อย่างไรบ้าง ควรบอกประวัติอดีตที่เคยแพ้ยาต้านจุลชีพให้แพทย์และเภสัชกรทราบด้วย

ผู้ที่มีโรคประจำตัวอยู่ เช่น โรคไตหรือตับพิการ ต้องแจ้งให้แพทย์ทราบด้วยเพื่อจะได้หลีกเลี่ยงยาที่อาจจะมีพิษต่ออวัยวะนั้น หรือเพื่อจัดขนาดยาให้เหมาะสม ส่วนยาที่กินอยู่เป็นประจำควรแจ้งให้แพทย์ทราบด้วย เพราะการกินยาจุลชีพร่วมกับยาบางอย่าง เช่น ยาแก้หอบหืดทำให้ระดับยาแก้หอบหืดสูงมากในเลือดจนมือหรือใจสั่นได้

การแพ้ยาต้านจุลชีพและข้อควรระวังในการใช้ยา

การแพ้ยาต้านจุลชีพเป็นสิ่งที่พบได้เสมอ และส่วนใหญ่เกิดขึ้นระหว่างร้อยละ 0.1-10 ของผู้ที่กินยา อาการที่พบได้บ่อยสำหรับยากินคือ คลื่นไส้ อาเจียน อุจจาระร่วง อาการอื่นๆ พบได้บ้าง ได้แก่ ผื่นคันหลังจากกินแอมปิศิลลิน หรือผิวหนังรอบปากบวม และมีสีดำหลังจากกินยาสัลฟาหรือเตตร้าศัยคลิน ผิวหนังบวมแดงเมื่อถูกแสงแดดจัดๆ ถ้ากินยาควินโนโลนบางขนาน บางรายแพ้ยาแล้วมีดีซ่าน เป็นต้น บางรายแพ้ยารุนแรงถึงแก่กรรมได้ เช่น แพ้ยาเพนิศิลลิน ทำให้มีอาการแน่นน่าอก หายใจไม่ออก ยาคลอแรมเฟนิคอลอาจจะทำให้ไขกระดูกฝ่อ หรือยากลุ่มอื่นอาจจะทำให้ผิวหนังลอกหลุดทั่วร่างกายเหมือนกับถูกไฟไหม้ทำให้โรครุนแรงถึงแก่กรรมได้ ยาเตตร้าศัยคลีนที่หมดอายุทำให้เกิดโรคไตพิการ ดังนั้น เมื่อได้ยาต้านจุลชีพมาแล้ว ควรเก็บไว้ในที่เย็นหรือในตู้เย็นและใช้ให้หมด ไม่ควรนำยาที่เหลืออยู่กับมาใช้อีกโดยเฉพาะยาต้านจุลชีพที่ผสมน้ำก่อนนำมาใช้

ตัวอย่างยาต้านจุลชีพ

สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)

รูปที่ 2.11 สเตรปโตมัยซิน(Streptomycin)

ที่มา : http://www.ideaforlife.net/health/drug/0051.html (12 ก.ค 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรรพคุณ

ใช้รักษาโรคติดเชื้อได้หลายชนิด แต่ที่แนะนำในที่นี้ คือ ใช้รักษาวัณโรค

ประเภทยา

ยาฉีด ขวดละ 1 กรัม และ 5 กรัม

ขนาดและวิธีใช้

ผู้ใหญ่ ฉีดวันละครั้ง ๆ ละ 1 กรัม (คนแก่หรือร่างกายอ่อนแออาจลดเหลือ 0.5-0.75 กรัม) นาน 2-3 เดือน สำหรับการรักษาวัณโรคเด็ก ให้ฉีดขนาด 20-40 มก. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. มักให้ร่วมกับไอเอ็นเอช และยารักษาวัณโรคชนิดอื่น ๆ

ผลข้างเคียง

ทำให้แพ้ หรือทำให้หูหนวก วิงเวียน

ข้อควรระวัง

1. ไม่ควรใช้ยาตัวนี้เพียงตัวเดียวในการรักษาวัณโรค เพราะจะทำให้เชื้อดื้อยาง่าย ต้องใช้ร่วมกับไอเอ็นเอช และยารักษาวัณโรคชนิดอื่น ๆ
2. อาจแพ้ มีผื่นคัน เป็นไข้ บางครั้งอาจแพ้ถึงตายได้ แต่ไม่บ่อยเท่าเพนิซิลลิน
3. ถ้าใช้นาน ๆ จะทำให้วิงเวียนหรือหูหนวก เพราะยานี้ไปทำลายประสาทที่ควบคุมการได้ยินและการทรงตัว
4. มีพิษต่อไต ไม่ควรใช้ในคนที่เป็นโรคไต
5. ถ้าใช้ในหญิงตั้งครรภ์นาน ๆ อาจทำให้ทารกหูพิการได้

ข้อห้ามใช้

คนที่มีประวัติแพ้ยาสเตรปโตไมซิน (ข้อมูลจาก thailabonline.com)

2.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ

ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ คือ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญ (microbiostatic) และ/หรือ ความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลชีพ (microbicidal) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสมุนไพร คือ การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพที่มีอยู่ในสมุนไพร

2.8.1 การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดวิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพเป็นวิธีมาตรฐานไว้ โดยมีขั้นตอนที่ชัดเจนตามชนิดของเชื้อ (รวมถึงเชื้อดื้อยาที่เป็นปัญหา) อาหารเลี้ยงเชื้อ ความ หนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมเชื้อในการทดสอบ อุณหภูมิ เวลา และสภาวะในการบ่ม เพาะเชื้อตลอดจนการอ่านและแปรผล ดังนั้นห้องปฏิบัติการต้องปฏิบัติตามแบบแผนอย่าง ถูกต้องทุก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอน จึงจะทำให้ผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพเชื่อถือได้และทำให้การ อ่านและแปรผลถูกต้อง

1 . MIC (minimal inhibitory concentration)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หน่วยที่ใช้โดยทั่วไป คือ ไมโครกรัม (μg) ต่อมิลลิลิตร(ml) หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อมิลลิลิตร ค่า MIC นี้สามารถนำมาใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อหนึ่งๆ ต่อยาต้านจุลชีพหลายๆ ชนิด หรือความไวของเชื้อหลายๆ ชนิดต่อยาหนึ่งๆ และรวมทั้งเพื่อประเมินค่าอื่นที่ เกี่ยวข้องกับยาหรือแปรผลของยาต่อเชื้อ ในการทดสอบเพื่อหาค่า MIC ยา ควรได้รับการเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงทุก 2 เท่า ไปเรื่อยๆ (2-fold serial dilution)

2 . MLC (minimal lethal concentration)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อ (หรือมีเชื้อเจริญไม่เกินกำหนด) หากเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรีย อาจใช้คำที่จำเพาะเจาะจงกว่า คือ MBC (minimal bactericidal concentration) แต่ถ้าเป็นรา อาจใช้คำว่า MFC (minimal fungicidal concentration) ยาต้านจุล ชีพที่มีวิถีการออกฤทธิ์เป็นชนิดฆ่าทำลาย (microbicidal) จะมีค่า MIC และ MLC เหมือนหรือ ใกล้เคียงกัน (ไม่เกินหนึ่งหรือสองความเข้มข้น; MLC/MIC $\leq$4) ยกเว้นแบคทีเรียบางชนิดที่ถูกวิธีทดสอบความไวของเชื้อต่อยามีหลายวิธี หากเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรียและรา สามารถทำได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth medium) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar medium) โดยมีวิธีหลักอยู่ 2 รูปแบบ คือ (1) dilution susceptibility test และ(2) agar diffusion tes

2.8.2 การเลือกรูปแบบวิธีการทดสอบ ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างที่สำคัญ คือ

1. ลักษณะของงาน เช่น เป็นงานวิจัย งานตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่ทำเป็นประจำหรือนานๆ ทำครั้ง งานที่ต้องรู้ค่า MBC ดังตัวอย่าง งานตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่นานๆ ทำครั้ง และแต่ละครั้งมีจำนวนเชื้อที่ทดสอบน้อย จะนิยมใช้ agar diffusion test (เพื่อตัดปัญหาต้อง เตรียมและเก็บสารละลายของตัวยาที่ต้องใช้ใน dilution test) ขณะที่งานที่ต้องการรู้ค่า MBC ของตัวยาจะนิยมใช้ broth dilution test

2. ชนิดของเชื้อทดสอบ เช่น เชื้อที่เจริญช้าหรือเลือกเฟ้นการใช้อาหารมาก (fastidious dilution test) จะนิยมใช้ broth dilution test ขณะที่เชื้อซึ่งต้องเจริญบนเลือดหรือไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobe) มักใช้ agar diffusion test หรือเชื้อที่มีอัตราการเจริญไม่คงที่ควรเลือก dilution test

3. จำนวนเชื้อทดสอบ เช่น มีจำนวนเชื้อทดสอบมากและต้องการหาค่า MIC จะนิยมทำ agar dilution test

4. ชนิดของยาทดสอบ เช่น ตัวยาแพร่กระจาย (diffuse) ใน agar medium ไม่ดี จะนิยม หาค่า MIC ด้วยวิธี dilution test เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. จำนวนยาทดสอบ เช่น มีตัวยาจำนวนมากแต่มีเชื้อจำนวนน้อย จะนิยมใช้ agar diffusion test

เมื่อเลือกรูปแบบวิธีการทดสอบได้แล้ว อาจต้องพิจารณาปัจจัยต่างๆ ที่อาจมีผลต่อการทดสอบ อาทิ ชนิดของ medium สำหรับ medium ที่ดีนั้นควรยอมให้เชื้อทุกชนิดเจริญได้ ไม่มี การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง (pH) มากขณะที่มีเชื้อเจริญ ไม่มีสารรบกวนการออก ฤทธิ์ของยา มีส่วนผสมที่ปรากฏใน broth และ agar medium เหมือนกัน (ยกเว้นสารช่วยให้ แข็ง) และควรทดสอบก่อนว่าเชื้อชนิดที่ต้องการทดสอบสามารถเจริญได้ (Alderman and Smith, 2001) medium ที่นิยมใช้ ได้แก่ Mueller Hinton (MH) broth (agar)) ถ้าทดสอบพวกที่ เจริญยากจะนิยมใช้ brain heart infusion broth (agar) หรือ trypticase soy broth (agar) ใน การทดสอบเชื้อรา medium ที่ใช้มีหลายชนิด ขึ้นกับชนิดของรา และชนิดของยาที่ทดสอบ กล่าวคือ ถ้าเป็นราชั้นสูง จะใช้ Sabouraud dextrose broth (agar), tryptic soy broth (agar), potato dextrose agar แต่ถ้าเป็นราชั้นต่ำ จะใช้ glucose yeast extract broth (agar) เป็นต้น

2.8.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ

1. Dilution Susceptibility Test หรือ การทดสอบ MIC

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี dilution test จะเป็นการทดสอบในเชิงปริมาณ เพราะสามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ทำลายเชื้อได้ นิยมใช้ทดสอบเชื้อที่เจริญได้ช้า ใช้ทดสอบยืนยันผลวิธี diffusion ที่ให้ความไวปานกลางหรือดื้อยา เพื่อ ว่าจะสามารถใช้สารสกัดสมุนไพรนั้นในจำนวนสูงๆ ได้ และใช้ทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ (anaerobe) หลักการโดยทั่วไปของวิธีทดสอบแบบ broth และ agar dilution susceptibility test จะคล้ายคลึงกัน คือ จะเจือจางสารสกัดสมุนไพรใน medium ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นจึงใส่เชื้อลงในบน medium ที่มีสมุนไพร ภายหลังการบ่มเพาะ ให้ดูค่า MIC ทั้งนี้โดยสังเกตความขุ่นหรือใสของ broth และมีหรือไม่มีเชื้อเจริญขึ้นบน agar

Broth dilution test

เป็นการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสมุนไพรที่ละเอียดวิธีหนึ่ง การทดสอบนี้จะทำให้ ทราบทั้ง MIC และ MBC ของสมุนไพรนั้นๆ กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้คือ เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีสารสกัดสมุนไพรในปริมาณต่างๆ กันผสมอยู่ และสังเกตการณ์เจริญเติบโตของเชื้อ

วิธีการทำ broth dilution test

วิธีการนี้ยังสามารถแบ่งเป็น macrodilution (หรือ tube) test และ microdilution dilution test

- Broth Macrodilution test จะทำในหลอดทดลอง โดยทำการเจือจางสารสกัดสมุนไพร stock solution ด้วยตัวเจือจาง หรือด้วย broth ในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution) ไปเรื่อยๆ ปริมาตรสุดท้ายที่อยู่ในหลอด เท่ากับ 0.5 มล. และต้องมีหลอดควบคุมที่ไม่ มีสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมุนไพรด้วย เตรียมเชื้อที่ทดสอบให้ได้ขนาด โดยอาจใช้วิธีเทียบความขุ่นกับ McFarland เบอร์ 0.5 หรืออาจใช้การวัดความขุ่นด้วย spectrophotometer แล้วเจือจางลงเพื่อให้ได้ขนาดเชื้อที่ต้องการ

- Broth Microdilution test ทำใน microtiter plate 96-well โดยเจือจาง stock solution ด้วย broth แบบ 2-fold serial dilution มีหลุมควบคุมเป็น broth ที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร ในแต่ ละหลุมจะมีปริมาตรเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เชื้อที่ปรับขนาดแล้ว (ใช้เชื้อประมาณ 10_5 CFU/มล.) 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วปิดฝาก่อนนำไปบ่มเพาะ อ่านค่า MIC โดยดู ความขุ่นด้วยตาเปล่า หรือ อาจใช้สารบางอย่างที่สามารถบ่งชี้การเจริญของเชื้อได้เพื่อให้อ่านค่า ได้ง่ายขึ้น

วิธีการทดสอบ microbicidal activity

การทดสอบ MLC จะทำต่อเนื่องจากการหาค่า MIC ซึ่งนิยมทำจาก broth dilution test โดยการ subculture เชื้อจาก broth ที่ไม่มีเชื้อขึ้นตั้งแต่ช่วงค่า MIC ขึ้นไป streak บน agar plate เพื่อให้เปรียบเทียบได้ชัดขึ้น ควรเพาะจากหลอด control ที่ไม่มีสมุนไพรด้วย จากนั้น นำ plate ไปบ่มแล้วดูการเจริญของเชื้อเพื่ออ่าน MLC (MBC หรือ MFC) โดยที่ความเข้มข้น ดังกล่าวจะต้องไม่มีเชื้อขึ้นหรือเกือบไม่มีเชื้อขึ้น (99.9% ของเชื้อถูกฆ่า)

Agar dilution test

เป็นการทดสอบความไวของเชื้อแบบปริมาณวิเคราะห์โดยมีหลักการทดสอบคล้ายคลึงกับ Broth dilution method ต่างกันเพียงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น กล่าวคือทำการ ทดสอบโดยการเจือจางสารทดสอบในอาหารวุ้น และถ่ายเชื้อลงบนผิวของอาหารวุ้น ข้อดีของวิธี นี้คือ สามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานเดียวกันได้ วิธีนี้สามารถหา ค่า MIC ได้ แต่ไม่สามารถหาค่า MLC ได้ ค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่ไม่พบการเจริญ ของเชื้อเป็นค่า MIC

วิธีการทำ agar dilution test

นำ stock solution มาเจือจางด้วยน้ำหรือตัวเจือจางที่เหมาะสมจนได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ แล้วจึงใส่ใน agar medium ซึ่งหลอมไว้ (45-50 องศาเซลเซียส) การเตรียมขนาดเชื้อ ด้วยวิธีการเดียวกับที่ทำใน broth dilution test แต่เจือจางขนาด เชื้อลงให้ได้ขนาดเชื้อซึ่งเมื่อแตะลงบน agar แล้วให้ได้เชื้อประมาณ 1×10^4 ตัวต่อจุด เมื่อแตะ เชื้อลงบน agar ทดสอบแล้ว ต้องทิ้งให้ซึมหมดก่อนคว่ำ plate นำไปบ่มที่ 35-37 °C นาน 16- 20 ชั่วโมง (เชื้อที่เจริญช้าอาจให้นานมากกว่า 48 ชั่วโมง) แล้วอ่านค่า MIC ที่ความเข้มข้นที่ จะต้องไม่มีเชื้อขึ้นเลย

2. Agar diffusion Test

วิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุด คือ Disc diffusion method (Kirby-Bauer) เนื่องจากสะดวกประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่นๆ วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ ไม่อาจทราบค่า MIC หรือ MLC ได้ ไม่เหมาะในการ ทดสอบเชื้อที่เจริญช้า และเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ หลักการทั่วไปคือ การทำ ให้สารสกัดสมุนไพรที่มีในแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ที่เตรียมไว้ก่อนซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระจายเชื้อ (spread)ในจำนวนที่เหมาะสมไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งจะ เห็นเป็นวงใสไม่มีโคโลนีเชื้อรอบๆ แผ่น disc ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแปรตามขนาดของ inhibition zone วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบสมุนไพรเพียงความเข้มข้นเดียว และใช้ เป็นการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในเบื้องต้น นอกจากขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลาง ของบริเวณใสที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบแล้ว ยังอาจขึ้นอยู่กับ ปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพร ความสามารถในการละลายหรือ ซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของสมุนไพร อัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรด-ด่างและ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อ สำหรับแหล่งรองรับสมุนไพร (drug reservoir) ที่ใช้มักใช้เป็นกระดาษซับวงกลม (filter paper dish)หรืออาจเรียกว่า dish sensitivity test หรือ อาจเป็นหลุมที่เจาะลงในเนื้อ agar

วิธีการทำ Agar Diffusion Test (disc diffusion test และ hole–plate diffusion)

เตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบโดยเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว วัดความขุ่นของเชื้อเพื่อให้ได้จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมกับการทดสอบแล้ว spread เชื้อบน Mueller-Hinton agar ให้ทั่ว จุ่มกระดาษกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. ในสารละลายสกัดสมุนไพร และวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรทำกลุ่มควบคุม คือ กระดาษกรองปลอดเชื้อที่จุ่มในตัวทำละลายที่ใช้สกัดสมุนไพรด้วย หรืออาจใช้วิธีการเจาะหลุม (hole – plate diffusion) (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม.) แล้วหยดสารละลายสมุนไพรลงไปประมาณ 40 ไมโครลิตร/หลุม บ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกที่ใช้ยาปฏิชีวนะที่ทราบปริมาณยาที่แน่นอนการแปรผลของวิธีนี้จะสามารถบอกได้เพียงว่าสมุนไพรที่ความเข้มข้นนั้นๆ สามารถ ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากหรือน้อยตามขนาดของบริเวณใสเท่านั้น และอาจใช้การ เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เกิดจากยาปฏิชีวนะมาตรฐานก็ได้

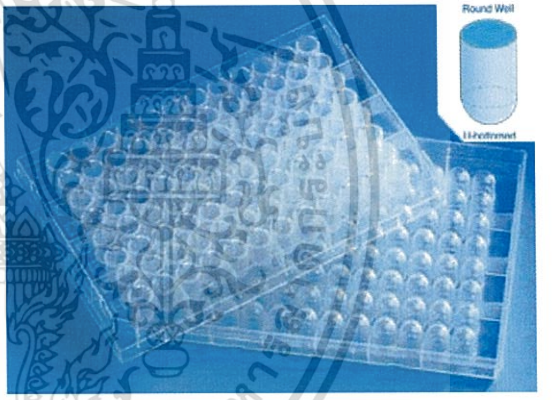
2. 9 ไมโครเพลท

โดยทั่วไปแล้วไมโครเพลท มักใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาที่ใช้ตัวอย่างปริมาตรต่ำ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในไมโครเพลท ส่วนใหญ่ผลของปฏิกิริยาจะเกิดในรูปของการเปลี่ยนสีหรือการเรืองแสง ซึ่งอาจมีทั้งปฏิกิริยาที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบสังเกตได้ด้วยตาเปล่า และแบบที่ไม่สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างด้วยตาเปล่าได้ชนิดที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปคือไมโครเพลท ขนาด 96 ช่อง (รูปที่ 2.12 ก) ไมโครเพลท มักใช้สำหรับทดสอบปฏิกิริยาพร้อมกันหลายๆปฏิกิริยาโดยใช้ตัวอย่างปริมาตรต่ำ ส่วนเครื่องมือที่ใช้สำหรับวัดผลของปฏิกิริยาคือเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (รูปที่ 2.12 ข)ซึ่งมีด้วยกัน 2 ประเภทคือ เครื่องอ่านปฏิกิริยาแบบ Fluorescence และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Luminescence การใช้ประโยชน์ของเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทนี้นิยมใช้ในการตรวจวัดในห้องปฏิบัติการทางชีววิทยา เช่น การตรวจสอบปริมาณ กรดอะมิโน โปรตีนATP และการตรวจสอบปริมาณกรดนิวคลีอิก ไมโครเพลท ถูกออกแบบมาให้มีขนาดเล็ก เพื่อช่วยให้ประหยัดเนื้อที่ของห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังมีความสามารถเก็บข้อมูลประมวลผลข้อมูล และกำหนดหน้าที่การทำงานได้หลายอย่าง จึงนับได้ว่าเครื่องมือนี้เป็นเครื่องมือหลากความสามารถ (multiple-competency) อย่างแท้จริง

ไมโครเพลท เป็นอุปกรณ์ที่นิยมใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาใน เครื่องมือในการอ่านผลจึงถือเป็นอุปกรณ์ที่สำคัญในการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา ปัจจุบันเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไม โครเพลท มีทั้งเครื่องที่อ่านปฏิกิริยาได้ชนิดเดียว และทั้งที่อ่านปฏิกิริยาได้ทั้ง 2 ชนิด คืออ่านผลได้ทั้งแบบ ฟลูออเรสเซนและลูมิเนสเซน และสามารถอ่านผลได้ทั้งจากด้านบนและด้านใต้เพลท ทำให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายจึงถือเป็นเครื่องมือที่หลากความสามารถ ซึ่งจะช่วยยกระดับงานวิจัยให้เข้ากับแนวทางใหม่ในอนาคตได้ต่อไป



รูปที่ 2.12 ก เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ **รูปที่ 2.12 ข** microplate ขนาด 96 well

ที่มา : www.abgene.com/productDetails.as...ID%3D120 (19 ม.ค 2553)

2.10 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้ไรน้ำสีน้ำตาล (Brine Shrimp Cytotoxicity Test) (Solis และคณะ, 1993)

ในการศึกษาวิจัยเพื่อสืบเสาะหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและทำการคัดเลือกสารที่มีฤทธิ์เป็น cytotoxic compound ในเบื้องต้นนั้น นิยมทำการทดสอบแบบ Brine shrimp cytotoxicity test โดยการเลือกใช้สัตว์ทดลองชนิดไรสีน้ำตาล (Brine shrimp ; *Artemia salina*) ที่มีการตอบสนองต่อสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้คล้ายคลึงกับระบบการตอบสนองที่มีในร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยที่ *Artemia salina* จะมีเอนไซม์ชนิด DNA-dependent RNA polymerase ที่คล้ายคลึงกับชนิดที่มีใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและยังมี ouabaine sensitive Na^+ และ K^+ dependent ATPase ดังนั้นจึงนิยมใช้ Brine shrimp ในการทดสอบสารสกัดต่างๆ ที่มีผลต่อระบบเอนไซม์เหล่านี้ได้ดี

ในปัจจุบันการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น นิยมใช้วิธีที่เรียกว่า Microwell Cytotoxicity โดยใช้ *Artemia salina* เพื่อวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกและค้นหาสารสกัดที่มีฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ยาฆ่าแมลง ฯลฯ ซึ่งจะได้ผลที่ชัดเจน การทดสอบแบบข้างต้นนี้เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน สะดวกและรวดเร็ว ไม่สิ้นเปลืองและมีข้อดีหลายประการ ได้แก่

- ใช้สารที่ต้องการทดสอบในปริมาณน้อย
- ใช้ระยะเวลาในการทดลองและเก็บข้อมูลในเวลาสั้นๆ
- รู้ผลรวดเร็ว
- สามารถทำการศึกษาสารหลายๆ ชนิดและเปรียบเทียบความเข้มข้นได้หลายๆ ระดับได้พร้อมๆ กัน
- สามารถทำได้ผลดีในห้องปฏิบัติการทางชีววิทยาทั่วๆ ไป
- สัตว์ทดลองมีขนาดเล็กทำให้สามารถดูแล เพาะเลี้ยงได้ตลอดเวลา โดยไม่ต้องใช้พื้นที่ในการปฏิบัติการมาก

สรุปแล้วจึงเป็นวิธีการที่สะดวก ได้ผลรวดเร็ว ถูกต้องและประหยัดคุ้มค่า สามารถนำไปใช้ในการตัดสินใจคัดเลือกสารที่มีประโยชน์ในงานวิจัยระดับสูงต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

Staphylococcus aureus	ATCC 25923	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
Escherichia coli	ATCC 25922	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
Micrococcus luteus	ATCC 9341	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
Bacillus subtilis	ATCC 6633	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
Pseudomanas aeruginosa	ATCC 27853	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
Staphylococcus epidermis	ATCC12228	กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์

3.2 พืชที่ใช้ในการทดสอบ

ใบมะรุมเก็บมาจากอำเภอบ้านหมอ จังหวัดสระบุรี เดือนพฤษภาคม 2552

3.3 สารเคมี

แอลกอฮอล์ร้อยละ 70 95 และ 99.99

2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

α – tocopherol

3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphyl tetrazolium bromide (MTT)

ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide; DMSO)

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride; NaCl)

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิด Nutrient Broth

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิด Nutrient Agar

น้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 อุปกรณ์

ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (temperature incubator)

ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (laminar air flow hood)

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave)

เครื่องอบลมร้อน (hot air oven)

ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เครื่องปั่น (blender)

เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (balance)

ชุดกรองสุญญากาศ

เครื่องระเหยระบบสุญญากาศ (rotary evaporator)

แผ่นทดสอบ (paper disc) Whatman เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

กระดาษกรอง What man No. 2, 4 และ 5

ปากคีบ (forceps)

ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)

ไม้พันสำลี

ทิป (tip)

ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 10 100 1000 ไมโครลิตร

ไมโครปิเปต ขนาด 30 ไมโครลิตร

ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)

จานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร

จานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96 – well plate) และ 24 หลุม (24 – well plate)

ไมโครไตเตอร์เพลทรีดเดอร์ (microtiter plate reader)

ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร

ปิเปตต์แก้วขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร

ขวด vial

ฟอยด์

ขวดที่ใช้สำหรับระเหยสารขนาด 500 มิลลิลิตร

พาสเจอร์ปิเปตต์

ลูกยาง

กรวยแก้ว

ขวด Duran ขนาด 1000ml

ช้อนตักสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างใบมะรุมจำนวน11 กิโลกรัมจากนั้นนำใบมะรุมมาผึ่งลมให้แห้งนาน 2-3 วันแล้วมาอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิภายในตู้อบ 60-70 องศาเซลเซียส (รูปที่ 3.1) เพื่อให้แห้งสนิทจึงนำมาบดให้ละเอียดด้วยมือจะได้ลักษณะเป็นผงแล้วชั่งน้ำหนักใบมะรุมที่บดละเอียดได้น้ำหนักแห้งได้ประมาณ 3.314 กิโลกรัม

3.5.2 การสกัดสารสกัดหยาบ

นำส่วนของใบมะรุมที่บดละเอียดจนเป็นผงแช่ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์โดยใส่ขวด Duran ขนาด 1,000 มิลลิลิตรจำนวน 11 ขวดด้วยอัตราส่วน 1:9 (ใบมะรุมแห้ง 100 กรัมต่อเอทานอลปริมาตร 900 มิลลิลิตร) แล้วแช่ผงของใบมะรุมเป็นเวลา 7 วันโดยไม่ให้โดนแสง เมื่อครบ 7 วัน นำสารสกัดจากใบมะรุมที่ได้ทำการกรองเอาเฉพาะส่วนใสด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์5 ลงในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.2) ส่วนใสที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร เตรียมรอสกัดในขั้นตอนต่อไป

3.5.3 การทำให้สารบริสุทธิ์

นำส่วนใสที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 500 มิลลิลิตรระเหยเอาเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator)โดยใส่ในขวด pair shape ขนาด 1000 มิลลิลิตร ตั้งค่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสโดยให้ความดันที่ 170 Pa และลดความดันลงเรื่อยๆ จนความดันคงที่ (รูปที่ 3.3) และเมื่อทำการระเหยแล้วจะได้ 2 ส่วนคือส่วนที่อยู่ในขวด pair shape ขนาด 1000 มิลลิลิตรเป็นสารสกัดหยาบและส่วนที่อยู่ในขวดก้นกลมเป็นเอทานอลแล้วชั่งน้ำหนักขวด vial เพื่อเตรียมนำมาใส่สารที่สกัดได้จากนั้นนำส่วนที่เป็นสารสกัดหยาบที่เราต้องการเก็บในขวด vial และนำไปชั่งหาน้ำหนักสารและนำขวด vial ที่มีสารอยู่หุ้มด้วยกระดาษฟลอย์และเก็บให้พ้นแสง (รูปที่ 3.4) หลังจากนั้นนำส่วนใบที่เหลือหลังจากกรองเอาเอทานอลออกแล้วกลับมาแช่อีกครั้งในขวด Duran ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่มีผงมะรุมโดยแช่ทิ้งไว้ 7 วัน (ซ้ำ 3 ครั้ง)

3.5.4 ศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุม

3.5.4. การทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Radical scavenging assay

การเตรียมสารดักจับอนุมูลอิสระด้วย DPPH (radical 2,2 diphenylpicryhydrazyl) จะใช้เครื่องอ่านค่าดูดกลืนแสงของสารที่เกิดปฏิกิริยาโดยใช้ไมโครเพลท เพื่อดูการรับไฮโดรเจนของสารละลาย DPPH เมื่อทำปฏิกิริยากันแล้วจะเปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นสีเหลือง นำสารสกัดหยาบในส่วนเอทานอลที่สกัดได้ของใบมะรุมโดยชั่งสารสกัดใบมะรุมมา 12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วละลายใน absolute ethanol 1 มิลลิลิตรจากนั้นนำมาทำการเจือจางด้วยเอทานอลเข้มข้นให้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 8 ระดับ ได้แก่ 12 10 8 6 5 4 3 และ2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิตามินอี มีปริมาณสารสูงสุด 50 ไมโครโมลโดยทำการเจือจางด้วยเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์เป็น 8 ระดับความเข้มข้น (50 25 12.5 6.125 3.06 1.53 0.77 และ 0.39 ไมโครโมล) แล้วนำสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตรหยดลงในหลุมของจานเลี้ยงเชื้อ 96 หลุม (96-well plate)จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ปริมาณ 190 ไมโครลิตรความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ นำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และเมื่อครบเวลาที่กำหนดนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยใช้วิตามิน E (α-tocopherol) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) และเอทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) ผลที่ได้เป็นค่าดูดกลืนแสงต่อมิลลิกรัมของตัวอย่าง รายงานผลเป็นค่าร้อยละของปฏิกิริยาดักจับอนุมูลอิสระ จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับผลของตัวควบคุมเชิงบวก(positive control)

การคำนวณร้อยละของปฏิกิริยาดักจับอนุมูลอิสระ (Free Radical Scavenging)

ร้อยละของปฏิกิริยาดักจับอนุมูลอิสระทำการคำนวณ ดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ DPPH reduction} = [(A-B)/A] \times 100$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรหลังจากการบ่ม

B = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่นำมาทำปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร หลังจากการบ่ม

สำหรับการประเมินค่า IC_{50} ของสารที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทำได้โดยเขียนกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบเทียบกับ% DPPH reduction ที่ได้จากการคำนวณ จากนั้นจะหาค่า IC_{50} เมื่อได้วิเคราะห์จากกราฟ

3.5.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

เตรียมสารละลายสารตัวอย่างคือสารสกัดจากใบมะรุมความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย ใส่สารสกัดจากใบมะรุมที่ได้ ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมของจานลี้ยงเซลล์ 96 หลุม หลังจากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent 100 ไมโครลิตร และ sodium carbonate (75 กรัมต่อลิตร) 80 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรโดยใช้ gallic acid เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) และเอทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) ในแต่ละความเข้มข้นจะทำการทดสอบซ้ำ 4 ครั้ง คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเทียบจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5 ศึกษาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial) ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุม

3.5.5.1 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial) ด้วย Paper Disc Diffustion method การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทำโดยใช้วิธี Agar Disc Diffusion ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเบื้องต้น โดยเชื้อที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228 โดยมีวิธีการทดสอบ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) นำเชื้อที่ใช้ทดสอบมาผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ (normal salt saline 0.85%) ปรับให้มีความขุ่นเท่ากับมาตรฐาน Mcfarland 0.5 ซึ่งมีจำนวนเซลล์ประมาณ $1x10^8$ CFU/mL โดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารแขวนลอยที่เจือจางไว้และทา (swap) (ดูที่ภาคผนวก ค) ลงบนผิวหน้าของอาหารแข็งด้วยเทคนิคปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นนำแผ่นทดสอบ (disc) ที่หยดสารสกัดจากใบมะรุมที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อแผ่นทดสอบ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อที่เราใช้ทดสอบอยู่และนำแผ่นทดสอบควบคุม (control) โดยใช้ DMSO เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัดหยาบจากพืชเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) และใช้ยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 – 2 วัน แล้วทำการตรวจผลโดยดูจากเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญ (clear zone) เปรียบเทียบกับแผ่นทดสอบชุดควบคุม (negative และ positive) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดหยาบจากพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่นำมาทดสอบแต่ละชนิด

3.5.5.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth dilution

เมื่อได้เชื้อที่ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีความไวต่อสารสกัดหยาบจากพืชที่ต้องการทดสอบจึงนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อย่างละเอียด คือ การหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum inhibition concentration; MIC) โดยใช้เครื่องไมโครไตเตอร์เพลทรีดเดอร์ ทำได้โดยละลายสารสกัดหยาบจากพืชที่มีด้วย DMSO เข้มข้นร้อยละ 5 แล้วทำการเจือจางสารสกัดหยาบจากใบมะรุมด้วยอาหาร Nutrient Broth (NB) ให้มีระดับความเข้มข้น 10 ระดับ ดังนี้ 512 256 128 64 32 16 8 4 2 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหาร Nutrient Broth ซึ่งถูกเตรียมให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ $5x10^5$ CFU โดยใช้น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ (normal salt saline 0.85%) เป็นตัวเจือจาง ทำการใส่อาหาร Nutrient Broth ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 – well plate) 75 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นใส่สารสกัดหยาบจากใบมะรุม 75 ไมโครลิตรต่อหลุม ตามด้วยเชื้อทดสอบ 75 ไมโครลิตรต่อหลุม ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำของเชื้อแต่ละชนิด สำหรับชุดควบคุม (control) ชุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

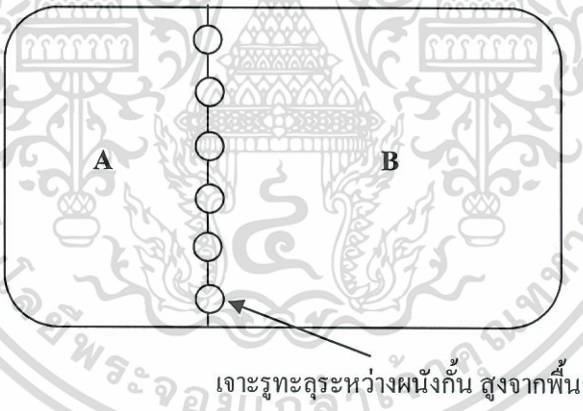
ควบคุมปราศจากเชื้อ (sterile control) จะประกอบไปด้วยอาหาร Nutrient Broth ที่ปราศจากเชื้อ ชุดควบคุมการเจริญของเชื้อ (growth control) จะประกอบด้วยอาหาร Nutrient Broth และเชื้อจุลินทรีย์ ชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) ประกอบด้วยอาหาร Nutrient Broth เชื้อจุลินทรีย์และยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เช่นเดียวกับสารสกัดหยาบจากพืชที่ต้องการทดสอบ ส่วนชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) ประกอบด้วยอาหาร Nutrient Broth เชื้อจุลินทรีย์และ DMSO เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

3.5.6 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบมะรุมโดยใช้ไรสีน้ำตาล (Brine shrimp cytotoxicity test)

3.5.6.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้ตัวอ่อน (nauplii) ระยะที่ 1 ภายหลังจากนำซีสต์ (cyst) ของ *Artemia salina* มาฟักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในน้ำทะเลเทียม โดยมีวิธีการดังนี้

เติมน้ำทะเลเทียม (โซเดียมคลอไรด์ 3.8 เปอร์เซ็นต์) ลงในกล่องพลาสติกซึ่งใช้เป็นภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยง *Artemia* ดังในรูป



รูปที่ 3.1 แสดงภาชะที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงไรสีน้ำตาล

โรยผงไข่ของไรน้ำสีน้ำตาล (*Artemia* cyst) ประมาณครึ่งช้อนชาลงในน้ำเฉพาะช่องฝั่งด้าน B แล้วปิดฝาด้วยแผ่นฟลอยด์ เพื่อให้แสงไม่สามารถผ่านเข้าไปได้ที่ด้าน B แล้วคลุมทั้งกล่องด้วยผ้าขาวบาง ตั้งกล่องทิ้งไว้และเปิดไฟให้ส่องสว่างในด้าน A ในระยะห่าง 1 ฟุต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ไข่ของไรน้ำสีน้ำตาล (*Artemia* cyst) ที่ฟักออกมาเป็นตัวอ่อนจะว่ายน้ำลอดผ่านรูตรงกลางผนังออกมายังด้าน A ที่มีแสงสว่าง ซึ่งมีลักษณะเป็นตัวสีส้มอ่อน ๆ ขนาดเท่าปลายเข็มหมุดและว่ายน้ำเคลื่อนไหวตลอดเวลา ตัวอ่อนที่ฟักออกมาพร้อมที่จะนำมาใช้สำหรับการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลองต่อไปจะอยู่ในระยะ 1st instar (ตัวอ่อนระยะที่ 1) แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอ่อนของไรน้ำสีน้ำตาล (*Artemia* cyst) ไปทำการทดลองในจานเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม (microwell plate)

3.5.6.2 วิธีการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบมะรุม *Artemia salina* โดยวิธี Microwell Cytoxicity โดยใช้ *Artemia salina* (Brine shrimp) ไรน้ำสีน้ำตาล

ชั่งสารสกัดหยาบจากใบมะรุม 4 มิลลิกรัม เติมสารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาณ 80ไมโครลิตร เขย่าด้วย vortex แล้วเติมน้ำทะเลเทียมปริมาณ 3,120 ไมโครลิตร ได้เป็นสารละลายเจือจางที่ 1 ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลตร นำไปเขย่าด้วย vortex เพื่อช่วยในการละลาย แล้วทำการเจือจางต่อไปโดย ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเจือจางที่ 1 ปริมาณ 400 ไมโครลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำทะเลเทียมปริมาณ 3600 ไมโครลิตร ได้เป็นสารละลายเจือจางที่ 2 ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลตร แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเจือจางที่ 2 ปริมาณ 400 ไมโครลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำทะเลเทียมปริมาณ 3600 ไมโครลิตร ได้เป็นสารละลายเจือจางที่ 3 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลตร และใช้ไมโครปิเปตดูดตัว *Artemia* 10 ตัว ในน้ำทะเล 100 ไมโครลิตร นำมาใส่ในหลุมแต่ละหลุมจนครบทั้ง 24 หลุมของจานเลี้ยงเซลล์ (microwell plate) หลังจากนั้นจึงใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเจือจางที่ 1, 2 และ 3 ลงในหลุมของจานเลี้ยงเชื้อ 24 หลุม (microwell plate) ปริมาณหลุมละ 400 ไมโครลิตร จำนวน 6 หลุมต่อสารละลายแต่ละความเข้มข้น

การเตรียมชุดควบคุมทำได้โดยดูดสารละลาย DMSO ปริมาณ 80 ไมโครลิตร มาผสมกับน้ำทะเลเทียมจำนวน 3120 ไมโครลิตร ผสมกันแล้วดูดสารละลายนี้ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมทั้ง 6 หลุม แล้วดูดตัวอ่อน *Artemia* จำนวน 10 ตัว พร้อมกับน้ำทะเลเทียม 100 ไมโครลิตรใส่ลงในหลุมแต่ละหลุมข้างต้น โดยนำจานเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม (microwell plate) มาปิดฝาแล้วส่องไฟเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นับจำนวนตัวที่ตายเมื่อครบ 6 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ สุดท้ายนำผลที่ได้ในสารสกัดทุกระดับความเข้มข้นที่เวลา 6 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง ไปคำนวณหาค่า LC_{50} โดยใช้ Probit Analysis (Finney, 1971)

3.5.6.3 การวิเคราะห์ผลทำได้โดยคำนวณค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง โดยใช้ Probit Analysis (Finney, 1971) แบ่งฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด แบ่งออกได้เป็น 4 ระดับ ได้แก่

1. สารสกัดที่มีฤทธิ์ในระดับสูง (High activity) จะมีค่า LC_{50} น้อยกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. สารสกัดที่มีฤทธิ์ในระดับกลาง (Medium activity) จะมีค่า LC_{50} น้อยกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สารสกัดที่มีฤทธิ์ในระดับต่ำ (Low activity) จะมีค่า LC_{50} น้อยกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. สารสกัดที่ไม่มีฤทธิ์ (no activity) จะมีค่า LC_{50} มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 สารสกัดหยาบจากพืชที่ใช้ในการทดลอง

สารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดลอง คือใบมะรุม โดยนำมาผ่านกระบวนการอบแห้งและบดให้เป็นผงแล้วนำมาสกัดโดยใช้เอทานอลร้อยละ 95 จนได้สารสกัดหยาบ นำสารสกัดหยาบที่ได้มาทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบเข้มข้นของใบมะรุม

4.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพสารสกัดหยาบจากพืช

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากใบมะรุมมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 3 ประการ คือ

4.2.1 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบมะรุม

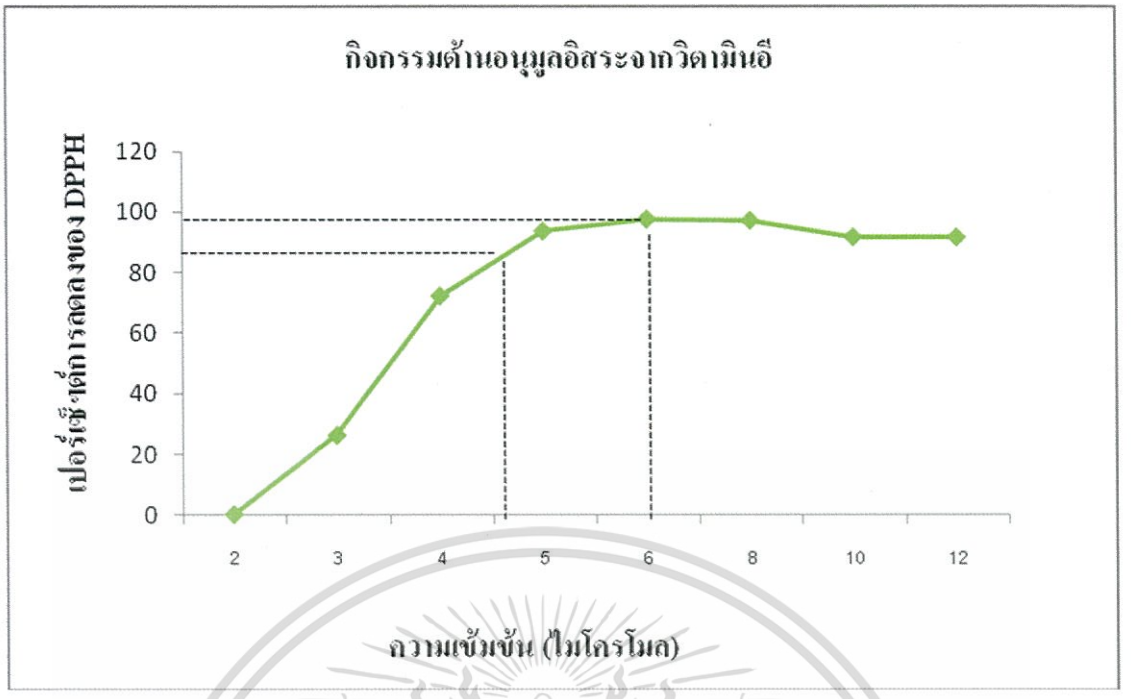
4.2.1.1 การตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากพืช โดยวิธี DPPH Radical Scavenging

เมื่อนำสารสกัดหยาบของใบมะรุมมาทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการดักจับอนุมูลอิสระของ DPPH (DPPH Radical Scavenging method) เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครไตเตอร์เพลทรีดเดอร์ (Microtiter plate reader 96-well plate) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมในชั้นของตัวทำละลายเอทานอล (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กับเปอร์เซ็นต์ DPPH ที่ถูกรีดิวซ์

รูปที่ 4.1 ก สารสกัดหยาบจากใบมะรุมในชั้นตัวทำละลายเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ข วิตามินอี (α - tocopherol) ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control)

ตารางที่ 4.1 ค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมและวิตามินอี (Positive control)

ตัวอย่าง	IC_{50}
สารสกัดหยาบจากใบมะรุม	6.34 mg/ml
วิตามินอี (control)	0.14 µM

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุม มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด 89.57 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบเท่ากับวิตามินอีความเข้มข้น 4.60 ไมโครโมล และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรส่วนวิตามินอีมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดที่ 97.49 % ที่ความเข้มข้น 6.25 ไมโครโมลและมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.14 ไมโครโมล การทดลองได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบมะรุมมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับวิตามินอี

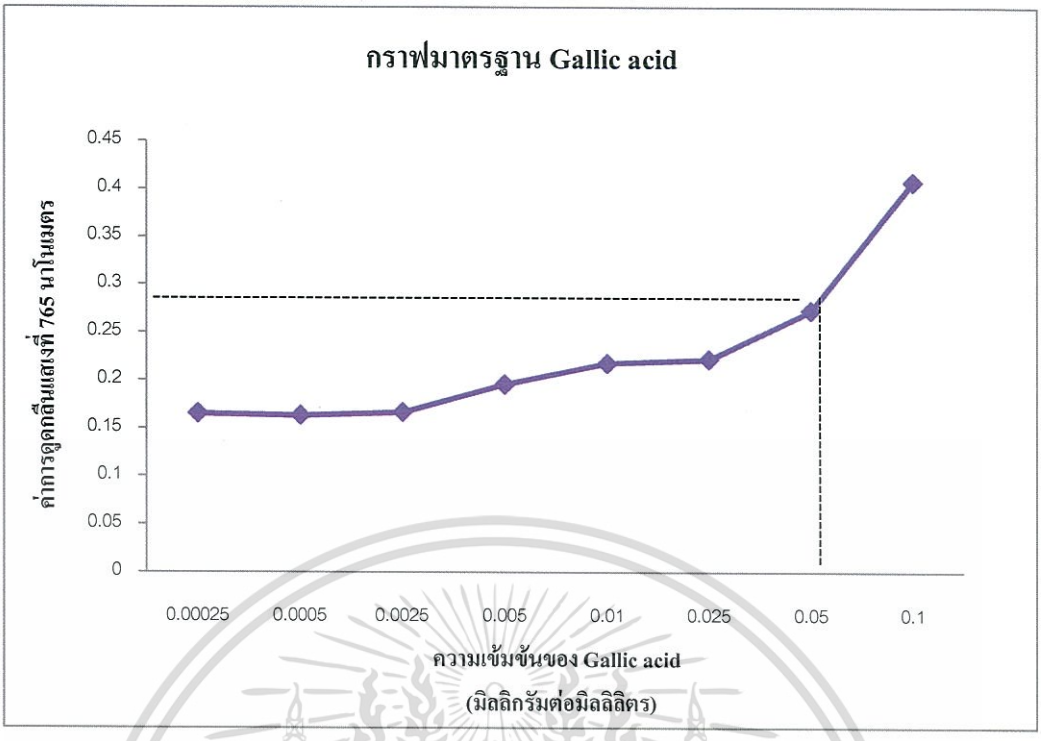
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's reagent วิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ ใช้ Folin-Ciocalteu's reagent โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน

ตารางที่ 4.2 ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ Gallic acid ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์

ความเข้มข้น (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร
0.1	0.407
0.05	0.272
0.025	0.221
0.01	0.217
0.005	0.199
0.0025	0.166
0.001	0.163
0.0005	0.163
0.00025	0.165

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐาน Gallic acid เพื่อคำนวณหาปริมาณ สารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด

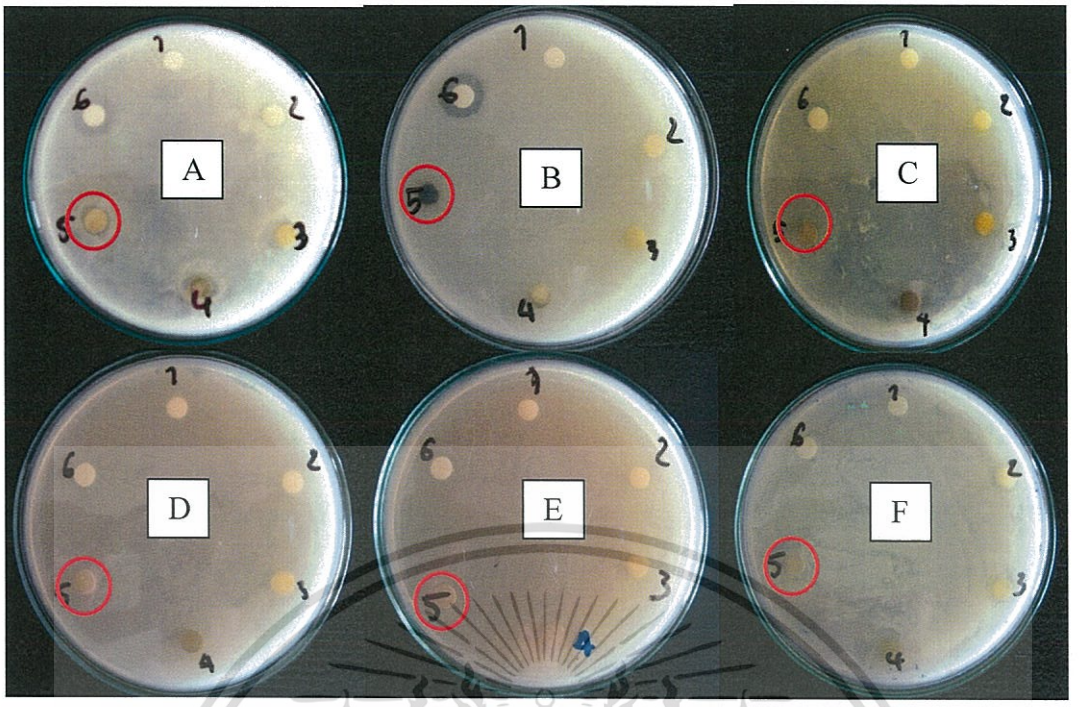
จากค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกพบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.06 มิลลิกรัม และเมื่อนำมาคำนวณปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้งร้อยกรัม เท่ากับ 302.48 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบจากใบมะรุม

4.2.2.1 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบจากใบมะรุมโดยวิธี Paper disc diffusion

ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นโดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomanas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228 เมื่อนำสารสกัดหยาบจากใบมะรุมที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น 6 ชนิด โดยใช้เทคนิค Paper disc diffusionพบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 3 ชนิด ดังรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากใบมะรุมที่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

หมายเหตุ

A : *Micrococcus luteus* B : *Bacillus subtilis*

C : *Staphylococcus aureus* D : *Pseudomonas aeruginosa*

E : *Escherichia coli* F : *Staphylococcus epidermis*

1 : ethanol 95%

2 : สารสกัดหยาบจากผักบุ้งไทยต้นขาว 50 mg/ml (ณัฐพรและคณะ,2553)

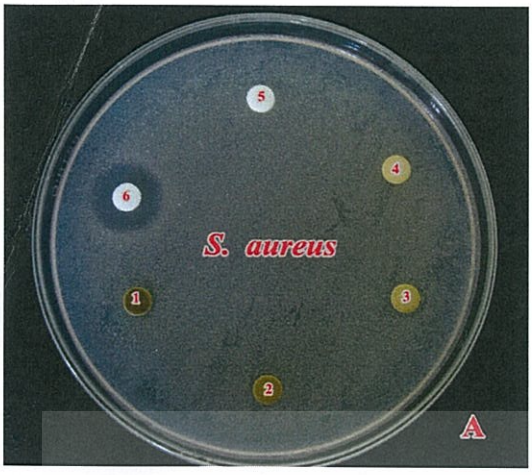
3 : สารสกัดหยาบจากผักบุ้งจีน 50 mg/ml (ณัฐพรและคณะ,2553)

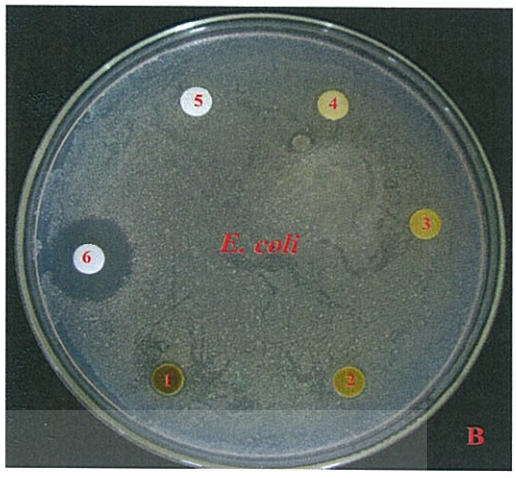
4 : สารสกัดหยาบจากใบทองหลาง 50 mg/ml (สริญญาและคณะ,2553)

5 : สารสกัดหยาบจากใบมะรุม 50 mg/ml

6 : ยาปฏิชีวนะ streptomycin 10 µg/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





รูปที่4.5 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะรุมที่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ

A : เชื้อ *Staphylococcus aureus*

B : เชื้อ: *Escherichia coli*

C : เชื้อ: *Micrococcus luteus*

1 : สารสกัดหยาบจากใบมะรุมที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2 : สารสกัดหยาบจากใบมะรุมที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3 : สารสกัดหยาบจากใบมะรุมที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4 : สารสกัดหยาบจากใบมะรุมที่ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5 : เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

6 : ยาปฏิชีวนะ streptomycin 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมด้วยวิธี disc diffusion method โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Micrococcus luteus* และแกรมลบคือ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ตามลำดับ โดยการทดสอบนี้จะนำมาเปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) และตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) ซึ่งใช้ Streptomycin เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงลบ และระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ 50 25 12.5 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.3 แสดงการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli S.aureus M.luteus* โดยสารสกัดหยาบจากใบมะรุมโดยวิธี Disc Diffusion

ปริมาณสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	Clear zone (mm)		
	E.Coli	*S.aureus*	*M.luteus*
50	10.00 ± 0.37^{a}	8.00 ± 0.20^{a}	$11.75^{a} \pm 0.14^{a}$
25	9.50 ± 0.35^{a}	8.00 ± 0.20^{a}	$10.00^{a} \pm 0.31^{a}$
12.5	9.25 ± 0.29^{a}	8.00 ± 0.20^{a}	$15.00^{a} \pm 0.37^{a}$
6.25	8.25 ± 0.23^{a}	8.00 ± 0.20^{a}	$10.00^{a} \pm 0.32^{a}$
Control			
Streptomycin	12.50	13.00	12.50
ETOH	6.50	0	0

หมายเหตุ

- ความเข้มข้นของชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แผ่น disc มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
- เมื่อพิจารณาในสดมภ์เดียวกันอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สารสกัดหยาบจากใบมะรุมสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังแสดงในรูปที่ 4.5 โดยที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้ง *M.luteus*, *S.aureus* และ *E.Coli* คือ 50 6.25 และ50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อนำแผ่น disc ที่หยดสารสกัดหยาบจากใบมะรุมของตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.3 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 8.00 ถึง 15.00 มิลลิเมตร ขณะที่แผ่น disc ที่หยดเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ไม่ทำให้เกิดวงใส ดังแสดงในรูปที่ 4.5 สารสกัดหยาบจากใบมะรุมสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* โดยเกิดบริเวณการยับยั้ง (clear zone) เท่ากับ 10 9.5 9.25 และ 8.25 มิลลิเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 50 25 และ 12.5 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แต่การเจริญของ *S.aureus* เกิดบริเวณการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้ง (clear zone) เท่ากับ 8 8 8 และ8 มิลลิเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 50 25 และ 12.5 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สำหรับ *M. luteus* เกิดบริเวณการยับยั้ง (clear zone) ได้มากเท่ากับ 11.75 10 15 10 ที่ระดับความเข้มข้น 50 25 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาทำวิเคราะห์ทางสถิติจะเห็นได้ว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดได้น้อยกว่ายา Steptomycin ทุกระดับความเข้มข้นซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก

4.2.2.2 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธีการเจือจางในอาหารเหลว

จากนั้นนำสารสกัดจากพืชที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 10 ระดับมาทดสอบความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC; Minimum Inhibition Concentration) โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดดังนี้

ระดับความเข้มข้นที่ 1	คือ	512	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ระดับความเข้มข้นที่ 2	คือ	256	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ระดับความเข้มข้นที่ 3	คือ	128	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ระดับความเข้มข้นที่ 4	คือ	64	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ระดับความเข้มข้นที่ 5	คือ	32	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ระดับความเข้มข้นที่ 6	คือ	16	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ระดับความเข้มข้นที่ 7	คือ	8	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ระดับความเข้มข้นที่ 8	คือ	4	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ระดับความเข้มข้นที่ 9	คือ	2	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ระดับความเข้มข้นที่ 10	คือ	1	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งจุลินทรีย์ (MIC) ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายซึ่งทำทั้งหมด 10 ความเข้มข้นคือ 512 256 128 64 32 16 8 4 2 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เมื่อนำสารสกัดหยาบของใบมะรุมที่สกัดโดยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ได้แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Straphylococcus aureus Escherichia coli* และ *Micrococcus luteus* โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครไตเตอร์เพลทรีดเดอร์ (Microtiter plate reader) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ผลการทดลองดังแสดงผลในตารางที่ 4.4 เมื่อพิจารณาจากค่า MIC โดยรวมพบว่าสารสกัดจากใบมะรุมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์คือสามารถยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* ได้ดีที่สุด *Straphylococcus aureu*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ *Escherichia coli* ตามลำดับ (ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ คือ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งความเข้มข้นของยาสเตรปโตมัยซินที่ต่ำสุดยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ คือ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) แสดงว่าใบมะรุมมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ต่ำกว่าสเตรปโตมัยซินเพราะฉะนั้นจุลินทรีย์ที่ก่อโรคที่ทดสอบพบว่า *Straphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Micrococcus luteus* ค่อนข้างไวต่อสารสกัดจากใบมะรุม

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกับสารสกัดหยาบจากใบมะรุมก่อนหยด MTT และหลังหยด MTT ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรโดยมียาเสตปโตมัยซินเป็นชุดควบคุมเชิงบวก สำหรับผลก่อนหยด MTT ของเชื้อ *E.coli* และเชื้อ *S.aureus* ที่ระดับความเข้มข้น 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสง 0.53 0.38 ตามลำดับ เชื้อ *M.luteus* ที่ระดับความเข้มข้น 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 0.36 และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวกที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าเชื้อ *E.coli* สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสง 0.54 เชื้อ *S.aureus* 0.39 เชื้อ *M.luteus* เมื่อทำการเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวกสารสกัดหยาบจากใบมะรุมที่ระดับความเข้มข้น 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของเชื้อ *E.coli* และ เชื้อ *S.aureus* ที่ระดับความเข้มข้น 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของเชื้อ *M.luteus* จะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าชุดควบคุมเชิงบวก แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมที่ระดับความเข้มข้น 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดี เมื่อทำการหยด MTT พบว่า MTT จะไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเพราะมีค่ามากกว่าชุดควบคุมเชิงบวกในทุกระดับความเข้มข้น และเมื่อทำการทดสอบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรแล้วเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวกพบว่าสารสกัดจากใบมะรุมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E.coli* และเชื้อ *M.luteus* ได้ที่ความเข้มข้น1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งดีกว่าชุดควบคุมเชิงบวกที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อ *S.aureus* ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.4 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเมื่อทดสอบกับสารสกัดหยาบจากใบมะรุม ก่อนและหลังหยด MTT ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยทำที่ความ เข้มข้นละ 3 ซ้ำ

สารสกัด	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย (Abs.)					
	E.coli		*S.aureus*		*M.luteus*	
	ก่อนหยด MTT	หลังหยด MTT	ก่อนหยด MTT	หลังหยด MTT	ก่อนหยด MTT	หลังหยด MTT
MA-1 (512 μg/mL)	0.530	3.513	0.377	2.138	0.392	2.112
MA -2 (256 μg/mL)	0.587	3.555	0.399	2.614	0.390	2.122
MA -3 (128 μg/mL)	0.621	3.485	0.434	3.055	0.382	3.148
MA -4 (64 μg/mL)	0.605	3.556	0.431	3.126	0.364	3.259
MA -5 (32 μg/mL)	0.603	3.581	0.447	3.202	0.383	2.975
MA -6 (16 μg/mL)	0.599	3.472	0.372	3.117	0.392	3.083
MA -7 (8 μg/mL)	0.571	3.528	0.383	3.066	0.359	2.838
MA -8 (4 μg/mL)	0.591	3.382	0.474	2.950	0.357	2.881
MA -9 (2 μg/mL)	0.483	3.434	0.347	2.940	0.363	2.697
MA -10 (1 μg/mL)	0.436	3.434	0.359	3.021	0.380	3.256
ST-1 (512 μg/mL)	0.070	0.164	0.131	0.738	0.177	0.867
ST-2 (256 μg/mL)	0.079	0.194	0.120	0.712	0.182	0.881
ST-3 (128 μg/mL)	0.084	0.272	0.123	0.717	0.191	0.924
ST-4 (64 μg/mL)	0.089	0.400	0.107	0.656	0.185	0.893
ST-5 (32 μg/mL)	0.110	0.668	0.116	0.691	0.187	0.902
ST-6 (16 μg/mL)	0.177	1.133	0.150	1.095	0.198	1.024
ST-6 (8 μg/mL)	0.336	1.797	0.244	1.901	0.206	1.454
ST-6 (4 μg/mL)	0.380	1.867	0.349	2.458	0.254	1.945
ST-9 (2 μg/mL)	0.461	2.461	0.355	2.355	0.289	2.299
ST-10 (1 μg/mL)	0.542	2.542	0.393	2.373	0.387	2.419
ชุดควบคุมการเจริญ	0.444	2.472	0.471	2.668	0.337	2.167
5% DMSO	0.567	3.254	0.343	2.744	0.403	2.143
NB	0.06	0.059	0.058	0.056	0.055	0.055

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.5 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเมื่อทดสอบกับสารสกัดหยาบจากใบมะรุม ก่อนหยด MTT ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยทำที่ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

สารสกัด	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย (Abs.)		
	E.coli	*S.aureus*	*M.luteus*
MA-1 (512 μg/mL)	0.444	0.285	0.305
MA -2 (256 μg/mL)	0.507	0.297	0.320
MA -3 (128 μg/mL)	0.522	0.326	0.325
MA -4 (64 μg/mL)	0.537	0.355	0.329
MA -5 (32 μg/mL)	0.537	0.346	0.333
MA -6 (16 μg/mL)	0.531	0.320	0.337
MA -7 (8 μg/mL)	0.513	0.312	0.318
MA -8 (4 μg/mL)	0.541	0.337	0.355
MA -9 (2 μg/mL)	0.517	0.319	0.330
MA -10 (1 μg/mL)	0.323	0.333	0.392
ST-1 (512 μg/mL)	0.063	0.109	0.153
ST-2 (256 μg/mL)	0.067	0.100	0.169
ST-4 (64 μg/mL)	0.073	0.094	0.17
ST-5 (32 μg/mL)	0.089	0.097	0.175
ST-6 (16 μg/mL)	0.144	0.125	0.189
ST-7 (8 μg/mL)	0.245	0.198	0.196
ST-8 (4 μg/mL)	0.308	0.283	0.251
ST-9 (2 μg/mL)	0.385	0.293	0.382
ST-10 (1 μg/mL)	0.313	0.326	0.331
ชุดควบคุมการเจริญ	0.444	0.2715	0.3378
5% DMSO	0.414333	0.218667	0.342667
NB	0.054333	0.052667	0.0515

หมายเหตุ

MA : สารสกัดหยาบจากใบมะรุม

ST (ชุดควบคุมเชิงบวก) : ยาปฏิชีวนะ Streptomycin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชุดควบคุมการเจริญ : เชื้อแบคทีเรียเลี้ยงร่วมกับอาหาร Nutrient Broth

ชุดควบคุมเชิงลบ : 5% DMSO เลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียและอาหาร Nutrient Broth

ตารางที่ 4.6 การศึกษาความเป็นพิษของมะรุมโดยใช้ไรสีน้ำตาล (Brine Shrime) ทดสอบในสภาวะที่มีแสงเมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดจากใบมะรุมที่เวลา 6 ชั่วโมงและ 24ชั่วโมง

ความเข้มข้นสารสกัดหยาบจากใบมะรุม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	จำนวนไรสีน้ำตาล (Brine Shrime) ที่ตาย (ตัว)	
	บ่ม 6 ชั่วโมง	บ่ม 24 ชั่วโมง
1000	4.33	6.67
100	0.67	8.83
10	0.17	8.50
Control	0.00	2.17

จากการทดลองเลี้ยงไรสีน้ำตาล (Brine Shrime) ตาราง 4.6 ซึ่งจะนับจำนวนไรสีน้ำตาลที่ตาย เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมงเพื่อดูพิษที่เกิดขึ้นแบบเฉียบพลันและนับจำนวนไรสีน้ำตาลที่ตาย เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อดูพิษที่เกิดขึ้นแบบเรื้อรังโดยบ่มในที่มีแสง มีไรสีน้ำตาลที่ตายเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากใบมะรุมทุกระดับความเข้มข้น คือ 10 100 1000 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อทำการบ่มที่เวลา 6 ชั่วโมงจะเห็นว่าที่ความเข้มข้น 1000ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะมีจำนวนไรสีน้ำตาลตายมากที่สุดคือ 4.33 และ เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 100ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีจำนวนไรสีน้ำตาลตายมากที่สุด เป็นระยะเวลาเวลา 24 ชั่วโมง ไรน้ำสีน้ำตาลจะมีจำนวนที่ตายมากขึ้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุม ระยะเวลามีผลต่อจำนวนเซลล์ที่ตาย และเมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ผลคำนวณค่า LC_{50} โดยใช้ Probit analysis ได้ผลคือ ที่เวลา 6 ชั่วโมง สารสกัดหยาบจากใบมะรุมมีค่า LC_{50} เท่ากับ 1303.180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่เวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดหยาบจากใบมะรุม มีค่า LC_{50} เท่ากับ 4453.200ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เมื่อศึกษาถึงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบมะรุมด้วยวิธี DPPH ผลปรากฏว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีค่าสูง (มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด 89.57 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนวิตามินอีมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.14 ไมโครโมล มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด 97.45 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 6.25 ไมโครโมล ซึ่งสารสกัดจากใบมะรุมจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

เนื่องจากในมะรุมมีสารพวก Coumarins ซึ่งจัดเป็นกลุ่มฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ในการต้านนุมูลอิสระสูง เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีว่าสารสกัดจากใบมะรุมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมด พบว่าสารสกัดจากใบมะรุมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เมื่อเทียบกับ gallic acid (302.48 มิลลิกรัมต่อ100 กรัมน้ำหนักแห้ง)

จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี paper disc diffusion ทั้งหมด 6 ชนิด *Micrococus luteus* ATCC 9341 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228 ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุม พบว่า *E.coli S.aureus* และ *M.luteus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่ค่อนข้างไวต่อการยับยั้งต่อสารสกัดหยาบจากใบมะรุมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นนำเชื้อ 3 ชนิดมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 50 25 12.5 และ6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *M.luteus* ได้ดีที่สุด คือ 11.75 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ *E.coli* ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีขนาดของบริเวณยับยั้งคือ 10 มิลลิเมตร และ*S.aureus* ที่ระดับความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีขนาดของบริเวณยับยั้ง คือ 9.5 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.3) ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

เมื่อทดสอบด้วยวิธีการเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution) ที่ระดับความเข้มข้น 512 256 128 64 32 16 8 4 2 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าสารสกัดจากใบมะรุมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *M.luteus* ได้ดีที่สุดคือที่ระดับความเข้มข้น 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าการดูดกลืนแสง 0.363 นาโนเมตร รองลงมา คือ *S.aureus* ที่ระดับความเข้มข้น 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าการดูดกลืนแสง 0.383 นาโนเมตร และ*E.coli* ที่ระดับความเข้มข้น 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าการดูดกลืนแสง 0.383 นาโนเมตรเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวกที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อมิลลิลิตรที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร จะเห็นได้ว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่า เมื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

วิธีการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบมะรุมโดยใช้ *Artemia salina* ในการทดสอบโดยวิธี Microwell Cytoxicity เมื่อนำผลที่ได้ในสารสกัดทุกระดับความเข้มข้นที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ไปคำนวณหาค่า LC_{50} โดยใช้ Probit Analysis (Finney, 1971) ที่เวลา 6 ชั่วโมง สารสกัดหยาบจากใบมะรุม มีค่า LC_{50} เท่ากับ 1303.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่เวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดหยาบจากใบมะรุม มีค่า LC_{50} เท่ากับ 4453.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมไม่มีความเป็นพิษ ดังนั้นจึงสามารถนำสารสกัดจากใบมะรุมไปพัฒนาเพื่อใช้ร่วมกับยารักษาโรคได้และนำไปประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและใช้เป็นอาหารเสริมได้

ข้อเสนอแนะ

1. การเก็บรักษาสารสกัดหยาบที่สกัดได้มีผลต่อการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เพราะหลังจากการทำการทดสอบครั้งแรกนั้น สารสกัดหยาบในตัวทำละลายแต่ละส่วนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ แต่หลังจากการเก็บรักษาสารสกัดหยาบนาน 3 เดือนพบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดเปลี่ยนไป
2. การศึกษาเบื้องต้นของกิจกรรมการยับยั้งกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระและศึกษาความเป็นพิษของเซลล์ทำเฉพาะในสารสกัดหยาบจากใบมะรุมเท่านั้น ส่วนต่างๆ ของต้นมะรุมนอกเหนือจากใบมีความน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาเช่นเดียวกัน
3. นอกจากสารสกัดหยาบจากใบมะรุม ซึ่งสกัดด้วยเอทานอลมีความน่าสนใจที่นำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและศึกษาความเป็นพิษของเซลล์แล้วในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบมะรุมมีความน่าสนใจที่จะนำมาทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร วาธินี ดอกสาคู พิมพาพร ธนจิรัชยา และพรรณี รัตนชัยสิทธิ์. 2552. การศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของเปลือกข้าวในระหว่างการเก็บ. สาขาวิทยาศาสตร์ การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 : 276-283.

เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์.2552. การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นด้านพิษวิทยาต่อระบบภูมิคุ้มกัน. สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ปวลี คงศิริสัจธรรม, ราเชพ เรืองศิริ, ศศิภา เดชะปรากรม. 2551. การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่และพันธุ์ทองดี. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รสริน วีทอง วรรณพร จำปาทอง และวัลย์วสันต์ ว่องวงศ์ศรี. 2551. การศึกษาเบื้องต้นในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ และน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งและขาวแป้น. โครงงานพิเศษ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ

วิทย์ เที่ยงคุณธรรม. 2542. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ : รวมสาส์น, 1977.

วรรณวิษา อามีน, อรวรรณ อาคม. 2550. ผลต้านออกซิเดชันและการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากผักพื้นบ้านของไทยในกุนเชียง. โครงงานพิเศษ. กรุงเทพฯ : สำนักหอสมุดกลาง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ศิริวรรณ ศรีสัจจะเลิศวาจา. 2539. สารต้านเชื้อราจากเปลือกส้มโอ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สุชาดา ไชยสวัสดิ์ วราภรณ์ เมธาวิริยะศิลป์ และเพ็ญประภา บัวลอย. 2550. การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นของเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม. สถาบันพัฒนาพันธุ์พืชและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. กรุงเทพฯ

Aline Meda, Charles Euloge Lamien, Marco Romito, Jeanne Millogo and Odile Germaine Nacoulma, 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry, Vol.91, 571-577.

Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen .Food Chemistry 115 :1299–1305

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ping-Hsien Chuang, Chi-Wei Lee, Jia-Ying Chou, M. Murugan,Bor-Jinn Shieh, Hueih-Min Chen. 2007.Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera Lam*. Bioresource Technology. 98 : 232–236.

Blaise W. LeBlanc , Owen K. Davis , Stephen Boue , Anthony DeLucca , Thomas Deeby. 2009.

Hyun Young Kil , Eun Soo Seong, Bimal Kumar Ghimire, Ill-Min Chung, Soon Sung Kwon ,Eun Jeong Goh , Kweon Heo , Myong Jo Kim , Jung Dae Lim , Dokyoung Lee , Chang Yeon Yu . 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract . Food Chemistry .115:1234–1239

Marja P. Kahkonen, Anu I. Hopla, Heikki J. Vuorela, Jussi-Pekka Rauha, Kalevi Pihlaja, Tytti S. Kujala and Marina Heinonen, 1999. J. Agri. Food Chem., Vol.47, 3954-3962

Pilaipark Chumark, Panya Khunawat , Yupin Sanvarind, Srichan Phornchirasilp, Phumala Morales,Laddawal Phivthong-ngam, Piyanee Ratanachamnong,Supath Srisawat Klai-upsornS.Pongrapeeporn.2008.The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties,hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam Leaves. Journal of Ethnopharmacology .116: 439–446

Solis, N.P., Wright, W. C., Anderson, M. M., Gupta, P.M. and Phillipson, D. J. 1993. A Microwell Cytotoxicity Assay using *Artemia salina* (Brine Srimp) *Planta med.* 59; 250 - 253

[Online].Available : www.pamame.com/magazine

[Online].Available : pirun.ku.ac.th/~b4755242/7.htm

[Online].Available : www.biology4kids.com/extras/dtop_micro/7821.htm

[Online].Available : www3.niaid.nih.gov

[Online].Available : www.magma.ca/~scimat/B_subtil.htm

[Online].Available : www.magma.ca/~scimat/B_subtil.htm

[Online].Available : www.microbelibrary.org/asmonly/d...6Lang%3D

[Online].Available : www. cellbiology.med.unsw.edu.au/unit...0802.htm

[Online].Available : http://www.ideaforlife.net/health/drug/0051.html

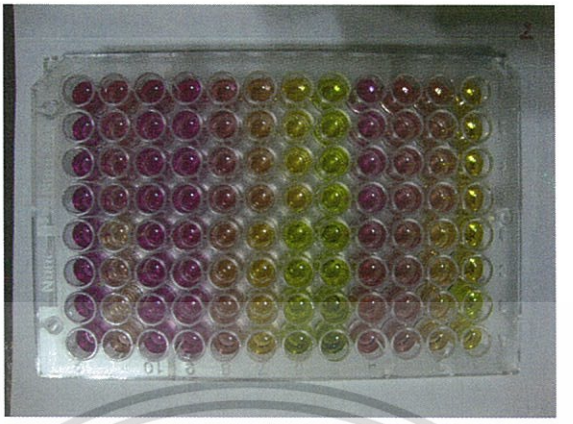
[Online].Available : http://wheat.pw.usda.gov/genome/methods/microplate.jpg

[Online].Available : www.nicaonline.com/new-53.htw

[Online].Available : thailabonline.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

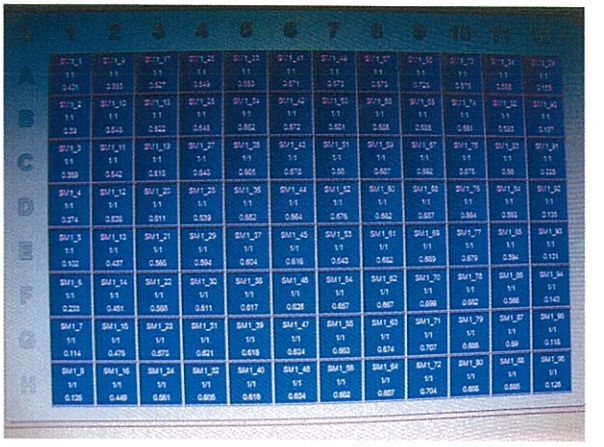
ภาคผนวก ก



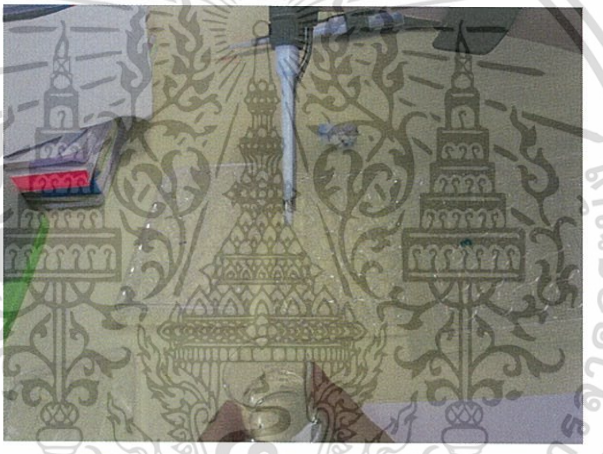
ก-1 รูปผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีDPPH เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์

ก-2 รูปการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดโดยใช้วิธี Folin-CiocalteuSingleton และ Rossi(1965) เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก-3 รูปผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่วัดค่าได้



ก-4 รูปการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบมะรุมโดยทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นด้านความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้ไรสีน้ำตาล (Brine shrimp cytotoxicity test) ในการดูดไรน้ำขึ้นมา 10 ตัวใส่ใน plate 24 microwell plate ทำการทดสอบหลังจากเลี้ยงไรสีน้ำตาลไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH reaction ของสารสกัดจากใบมะรุม

1. ความเข้มข้น 2 mg/ml

$$\% \text{ DPPH reaction} = \frac{(0.547375 - 0.578) \times 100}{0.547375} = 5.595 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

2. ความเข้มข้น 3 mg/ml

$$\% \text{ DPPH reaction} = \frac{(0.547375 - 0.568) \times 100}{0.547375} = 3.767 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

3. ความเข้มข้น 4 mg/ml

$$\% \text{ DPPH reaction} = \frac{(0.547375 - 0.530) \times 100}{0.547375} = 3.175 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

4. ความเข้มข้น 5 mg/ml

$$\% \text{ DPPH reaction} = \frac{(0.547375 - 0.490) \times 100}{0.547375} = 10.481 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

5. ความเข้มข้น 6 mg/ml

$$\% \text{ DPPH reaction} = \frac{(0.547375 - 0.468) \times 100}{0.547375} = 14.501 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

6. ความเข้มข้น 8 mg/ml

$$\% \text{ DPPH reaction} = \frac{(0.547375 - 0.372) \times 100}{0.547375} = 58.532 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

7. ความเข้มข้น10 mg/ml

$$\% \text{ DPPH reaction} = \frac{(0.547375 - 0.294) \times 100}{0.547375} = 46.289 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

8. ความเข้มข้น 12 mg/ml

$$\% \text{ DPPH reaction} = \frac{(0.547375 - 0.279) \times 100}{0.547375} = 89.571 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข้อมูลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ข– 1 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าการยับยั้งการเจริญของ *E.coli* ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมในชั้นของตัวทำละลายเอทานอลด้วย Paper Disc Diffustion method

Descriptives

data

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
6.25	4	.8250	.45000	.22500	.1089	1.5411	.60	1.50
12.50	4	.9250	.58523	.29262	-.0062	1.8562	.60	1.80
25.00	4	.9500	.70000	.35000	-.1639	2.0639	.60	2.00
50.00	4	1.0000	.73485	.36742	-.1693	2.1693	.60	2.10
Total	16	.9250	.56510	.14127	.6239	1.2261	.60	2.10

Test of Homogeneity of Variances

data

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.374	3	12	.774

ANOVA

data

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		.065	3	.022	.055	.982
	Linear Term	Contrast	.050	1	.050	.127	.728
		Deviation	.015	2	.007	.019	.981
Within Groups			4.725	12	.394		
Total			4.790	15			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

data

Duncan[a]

Group	N	Subset for alpha = .05
		1
6.25	4	.8250
12.50	4	.9250
25.00	4	.9500
50.00	4	1.0000
Sig.		.721

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ข – 2 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าการยับยั้งการเจริญของ *Straphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมในชั้นของตัวทำละลายเอทานอลด้วย Paper Disc Diffustion method

Descriptives

data

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
6.25	4	.8000	.40000	.20000	.1635	1.4365	.60	1.40
12.50	4	.8000	.40000	.20000	.1635	1.4365	.60	1.40
25.00	4	.8000	.40000	.20000	.1635	1.4365	.60	1.40
50.00	4	.8000	.40000	.20000	.1635	1.4365	.60	1.40
Total	16	.8000	.35777	.08944	.6094	.9906	.60	1.40

Test of Homogeneity of Variances

data

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.000	3	12	1.000

ANOVA

data

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		.000	3	.000	.000	1.000
	Linear Term	Contrast	.000	1	.000	.000	1.000
		Deviation	.000	2	.000	.000	1.000
Within Groups			1.920	12	.160		
Total			1.920	15			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

data

Duncan[a]

Group	N	Subset for alpha = .05
		1
6.25	4	.8000
12.50	4	.8000
25.00	4	.8000
50.00	4	.8000
Sig.		1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ข– 3 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าการยับยั้งการเจริญ ของ *Micrococcus luteus* ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมในชั้นของตัวทำละลายเอทานอลด้วย Paper Disc Diffustion method

Descriptives

data

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
6.25	4	1.0000	.60553	.30277	.0365	1.9635	.60	1.90
12.50	4	1.5000	.73937	.36968	.3235	2.6765	.60	2.20
25.00	4	1.0000	.61644	.30822	.0191	1.9809	.60	1.90
50.00	4	1.1750	.29861	.14930	.6998	1.6502	.90	1.60
Total	16	1.1688	.56653	.14163	.8669	1.4706	.60	2.20

Test of Homogeneity of Variances

data

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.358	3	12	.302

ANOVA

data

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		.667	3	.222	.643	.602
	Linear Term	Contrast	.002	1	.002	.007	.935
		Deviation	.664	2	.332	.961	.410
Within Groups			4.148	12	.346		
Total			4.814	15			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

data

Duncan[a]

Group	N	Subset for alpha = .05
		1
6.25	4	1.0000
25.00	4	1.0000
50.00	4	1.1750
12.50	4	1.5000
Sig.		.286

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ข- 4 ตารางวิเคราะห์ทางสถิติที่แสดงจำนวนตายของไรสีน้ำตาลสารสกัดหยาบจากใบมะรุมในชั้นของตัวทำละลายเอทานอลที่เวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง โดยใช้ Probit analysis

```
PROBIT death6 OF total WITH conc
  /LOG 10
  /MODEL PROBIT
  /PRINT FREQ CI
  /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
```

Probit Analysis

```
[DataSet2] F:\Marum.sav
```

Warnings

Relative Median Potency Estimates are not displayed because there is no grouping variable in the model.

Data Information

		N of Cases
Valid		18
Rejected	Missing	0
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group		6

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	14	Yes

Parameter Estimates

	Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.
PROBIT[a]	conc	1.384	.269	5.139	.000
	Intercept	-4.310	.734	-5.873	.000

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

Parameter Estimates

	Parameter	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
PROBIT[a]	conc	.856	1.912
	Intercept	-5.044	-3.577

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df[a]	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	18.057	16	.321[b]

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Cell Counts and Residuals

	Number	conc	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses
PROBIT	1	3.000	10	3	4.368
	2	3.000	10	5	4.368
	3	3.000	10	5	4.368
	4	3.000	10	5	4.368
	5	3.000	10	1	4.368
	6	3.000	10	7	4.368
	7	2.000	10	2	.614
	8	2.000	10	0	.614
	9	2.000	10	0	.614
	10	2.000	10	0	.614
	11	2.000	10	0	.614
	12	2.000	10	2	.614
	13	1.000	10	0	.017
	14	1.000	10	0	.017
	15	1.000	10	0	.017
	16	1.000	10	0	.017
	17	1.000	10	0	.017
	18	1.000	10	0	.017

Cell Counts and Residuals

	Number	Residual	Probability
PROBIT	1	-1.368	.437
	2	.632	.437
	3	.632	.437
	4	.632	.437
	5	-3.368	.437
	6	2.632	.437
	7	1.386	.061
	8	-.614	.061
	9	-.614	.061
	10	-.614	.061
	11	-.614	.061
	12	1.386	.061
	13	-.017	.002
	14	-.017	.002
	15	-.017	.002
	16	-.017	.002
	17	-.017	.002
	18	-.017	.002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for conc			95% Confidence Limits for log (conc)[a]
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate
PROBIT	.010	27.155	4.253	65.335	1.434
	.020	42.742	8.724	92.099	1.631
	.030	56.995	13.721	114.842	1.756
	.040	70.772	19.251	135.858	1.850
	.050	84.400	25.315	156.021	1.926
	.060	98.048	31.911	175.782	1.991
	.070	111.819	39.042	195.421	2.049
	.080	125.783	46.709	215.135	2.100
	.090	139.991	54.915	235.075	2.146
	.100	154.484	63.661	255.366	2.189
	.150	232.284	115.466	365.736	2.366
	.200	321.220	180.296	500.189	2.507
	.250	424.210	256.904	673.025	2.628
	.300	544.557	343.846	902.186	2.736
	.350	686.358	440.478	1210.522	2.837
	.400	854.913	547.519	1628.227	2.932
	.450	1057.291	667.051	2197.464	3.024

a. Logarithm base = 10.

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for log (conc)[a]	
		Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	.629	1.815
	.020	.941	1.964
	.030	1.137	2.060
	.040	1.284	2.133
	.050	1.403	2.193
	.060	1.504	2.245
	.070	1.592	2.291
	.080	1.669	2.333
	.090	1.740	2.371
	.100	1.804	2.407
	.150	2.062	2.563
	.200	2.256	2.699
	.250	2.410	2.828
	.300	2.536	2.955
	.350	2.644	3.083
	.400	2.738	3.212
	.450	2.824	3.342

a. Logarithm base = 10.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for conc			95% Confidence Limits for log (conc)[a]
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate
PROBIT	.500	1303.180	802.431	2979.966	3.115
	.550	1606.255	958.442	4069.995	3.206
	.600	1986.494	1141.836	5617.212	3.298
	.650	2474.336	1362.464	7870.749	3.393
	.700	3118.643	1635.455	11270.399	3.494
	.750	4003.395	1985.654	16654.503	3.602
	.800	5286.972	2457.697	25798.194	3.723
	.850	7311.208	3142.744	43083.336	3.864
	.900	10993.227	4269.350	82384.142	4.041
	.910	12131.345	4595.473	96385.243	4.084
	.920	13501.675	4977.345	114321.114	4.130
	.930	15187.751	5433.112	137939.559	4.181
	.940	17320.910	5990.581	170160.119	4.239
	.950	20121.834	6695.155	216234.686	4.304
	.960	23996.504	7627.621	286615.280	4.380
	.970	29796.891	8950.894	405399.203	4.474
	.980	39733.617	11066.733	643076.169	4.599
	.990	62539.345	15448.188	1331900.442	4.796

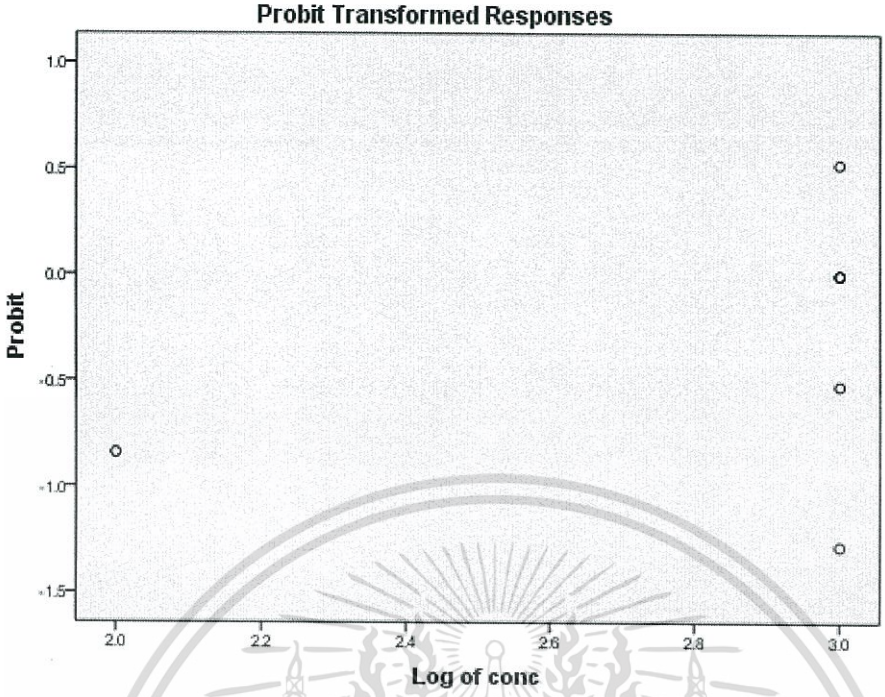
a. Logarithm base = 10.

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for log (conc)[a]	
		Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.500	2.904	3.474
	.550	2.982	3.610
	.600	3.058	3.750
	.650	3.134	3.896
	.700	3.214	4.052
	.750	3.298	4.222
	.800	3.391	4.412
	.850	3.497	4.634
	.900	3.630	4.916
	.910	3.662	4.984
	.920	3.697	5.058
	.930	3.735	5.140
	.940	3.777	5.231
	.950	3.826	5.335
	.960	3.882	5.457
	.970	3.952	5.608
	.980	4.044	5.808
	.990	4.189	6.124

a. Logarithm base = 10.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
PROBIT death24 OF total WITH conc
  /LOG 10
  /MODEL PROBIT
  /PRINT FREQ CI
  /CRITERIA P(0.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
```

Probit Analysis

```
[DataSet2] F:\Marum.sav
```

Warnings

Relative Median Potency Estimates are not displayed because there is no grouping variable in the model.

Data Information

		N of Cases
Valid		18
Rejected	Missing	0
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group		6

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	10	Yes

Parameter Estimates

	Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.
PROBIT[a]	conc	-.473	.132	-3.587	.000
	Intercept	1.727	.305	5.659	.000

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

Parameter Estimates

	Parameter	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
PROBIT[a]	conc	-.732	-.215
	Intercept	1.422	2.032

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df[a]	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	25.731	16	.058[b]

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than .150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Cell Counts and Residuals

	Number	conc	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses
PROBIT	1	3.000	10	7	6.206
	2	3.000	10	5	6.206
	3	3.000	10	5	6.206
	4	3.000	10	5	6.206
	5	3.000	10	9	6.206
	6	3.000	10	3	6.206
	7	2.000	10	7	7.824
	8	2.000	10	10	7.824
	9	2.000	10	8	7.824
	10	2.000	10	10	7.824
	11	2.000	10	8	7.824
	12	2.000	10	10	7.824
	13	1.000	10	7	8.951
	14	1.000	10	9	8.951
	15	1.000	10	8	8.951
	16	1.000	10	10	8.951
	17	1.000	10	9	8.951
	18	1.000	10	8	8.951

Cell Counts and Residuals

	Number	Residual	Probability
PROBIT	1	.794	.621
	2	-1.206	.621
	3	-1.206	.621
	4	-1.206	.621
	5	2.794	.621
	6	-3.206	.621
	7	-.824	.782
	8	2.176	.782
	9	.176	.782
	10	2.176	.782
	11	.176	.782
	12	2.176	.782
	13	-1.951	.895
	14	.049	.895
	15	-.951	.895
	16	1.049	.895
	17	.049	.895
	18	-.951	.895

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for conc			95% Confidence Limits for log (conc)[b]
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate
PROBIT[a]	.010	3.655E8	609511.557	5.476E27	8.563
	.020	97058730.056	283200.613	2.775E25	7.987
	.030	41848690.388	173972.313	9.713E23	7.622
	.040	22224973.022	120513.075	7.806E22	7.347
	.050	13282492.910	89360.664	1.005E22	7.123
	.060	8570250.494	69252.808	1.755E21	6.933
	.070	5836464.538	55365.104	3.801E20	6.766
	.080	4137721.434	45298.970	9.667E19	6.617
	.090	3026204.637	37733.425	2.783E19	6.481
	.100	2269008.998	31884.283	8.850E18	6.356
	.150	688724.951	15831.674	7.723E16	5.838
	.200	267006.860	9038.087	1.791E15	5.427
	.250	118432.798	5564.178	7.119E13	5.073
	.300	57071.829	3582.624	3.950E12	4.756
	.350	29015.331	2369.466	2.725E11	4.463
	.400	15270.228	1589.573	2.169E10	4.184

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for log (conc)[b]	
		Lower Bound	Upper Bound
PROBIT[a]	.010	5.785	27.738
	.020	5.452	25.443
	.030	5.240	23.987
	.040	5.081	22.892
	.050	4.951	22.002
	.060	4.840	21.244
	.070	4.743	20.580
	.080	4.656	19.985
	.090	4.577	19.446
	.100	4.504	18.947
	.150	4.200	16.888
	.200	3.956	15.253
	.250	3.745	13.852
	.300	3.554	12.597
	.350	3.375	11.435
	.400	3.201	10.336

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for conc			95% Confidence Limits for log (conc)[b]
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate
PROBIT[a]	.450	8205.795	1070.349	1.892E9	3.914
	.500	4453.200	715.677	1.739E8	3.649
	.550	2416.706	468.700	16317579.220	3.383
	.600	1298.670	294.134	1527510.822	3.113
	.650	683.466	169.348	141707.388	2.835
	.700	347.474	80.473	13603.368	2.541
	.750	167.445	23.897	1636.566	2.224
	.800	74.271	2.794	342.588	1.871
	.850	28.794	.108	116.969	1.459
	.900	8.740	.001	45.370	.942
	.910	6.553	.000	37.066	.816
	.920	4.793	.000	29.952	.681
	.930	3.398	.000	23.838	.531
	.940	2.314	.000	18.581	.364
	.950	1.493	.000	14.065	.174
	.960	.892	.000	10.200	-.049
	.970	.474	.000	6.916	-.324
	.980	.204	.000	4.158	-.690
	.990	.054	.000	1.887	-1.266

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

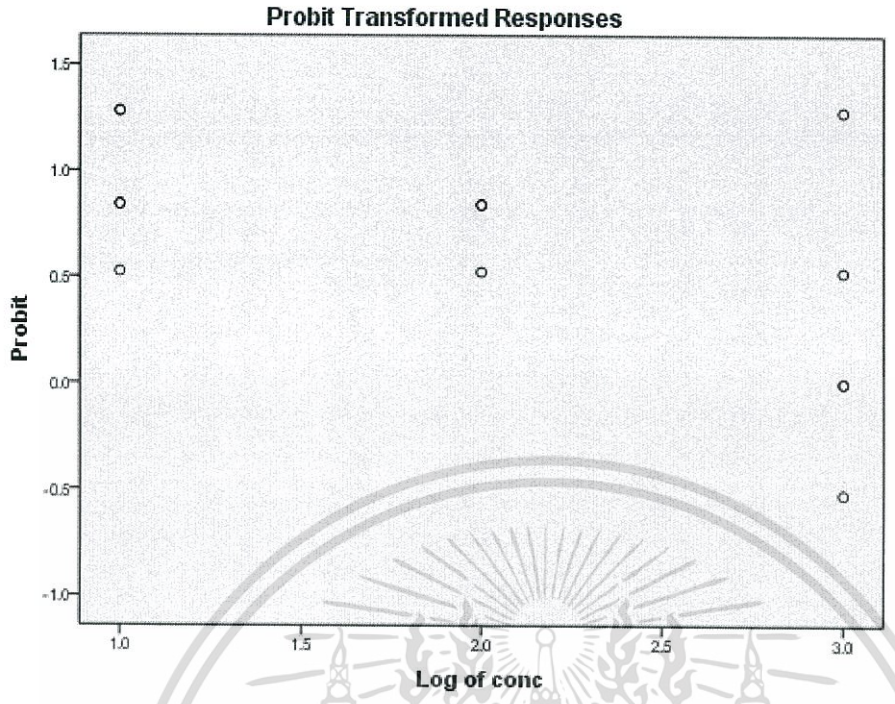
Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for log (conc)[b]	
		Lower Bound	Upper Bound
PROBIT[a]	.450	3.030	9.277
	.500	2.855	8.240
	.550	2.671	7.213
	.600	2.469	6.184
	.650	2.229	5.151
	.700	1.906	4.134
	.750	1.378	3.214
	.800	.446	2.535
	.850	-.965	2.068
	.900	-2.917	1.657
	.910	-3.400	1.569
	.920	-3.928	1.476
	.930	-4.510	1.377
	.940	-5.164	1.269
	.950	-5.911	1.148
	.960	-6.792	1.009
	.970	-7.878	.840
	.980	-9.324	.619
	.990	-11.609	.276

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ข– 5 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าการยับยั้งการเจริญของ *E.coli* ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมในชั้นของตัวทำละลายเอทานอล และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

Oneway

Descriptives

data

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	.4933	.01102	.00636	.4660	.5207	.49	.51
2.00	3	.5167	.01464	.00845	.4803	.5530	.50	.53
4.00	3	.5407	.06213	.03587	.3863	.6950	.47	.59
8.00	3	.5127	.02892	.01670	.4408	.5845	.48	.54
16.00	3	.5317	.01106	.00639	.5042	.5591	.52	.54
32.00	3	.5377	.01620	.00935	.4974	.5779	.52	.55
64.00	3	.5373	.02272	.01312	.4809	.5938	.51	.56
128.00	3	.5223	.02359	.01362	.4637	.5809	.50	.55
256.00	3	.5073	.01582	.00913	.4680	.5466	.49	.52
512.00	3	.4437	.01629	.00940	.4032	.4841	.43	.46
Total	30	.5143	.03566	.00651	.5010	.5276	.43	.59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Test of Homogeneity of Variances

data

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.819	9	20	.026

ANOVA

data

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)	.023	9	.003	3.627	.008
	Linear Ter Contrast	.014	1	.014	20.668	.000
	Deviation	.008	8	.001	1.497	.220
Within Groups		.014	20	.001		
Total		.037	29			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

data

Duncan[a]

Group	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
512.00	3	.4437	
1.00	3		.4933
256.00	3		.5073
8.00	3		.5127
2.00	3		.5167
128.00	3		.5223
16.00	3		.5317
64.00	3		.5373
32.00	3		.5377
4.00	3		.5407
Sig.		1.000	.071

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-6 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าการยับยั้งการเจริญของ *Straphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมในชั้นของตัวทำละลายเอทานอลและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

Oneway

Descriptives

data

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	.3030	.03500	.02021	.2161	.3899	.27	.34
2.00	3	.3190	.03951	.02281	.2209	.4171	.29	.36
4.00	3	.3367	.06352	.03667	.1789	.4945	.27	.40
8.00	3	.3117	.03723	.02150	.2192	.4042	.28	.35
16.00	3	.3200	.03064	.01769	.2439	.3961	.29	.34
32.00	3	.2983	.03001	.01732	.2238	.3729	.27	.33
64.00	3	.3550	.01992	.01150	.3055	.4045	.34	.38
128.00	3	.3260	.00964	.00557	.3020	.3500	.32	.33
256.00	3	.2967	.01943	.01122	.2484	.3449	.28	.32
512.00	3	.2853	.00473	.00273	.2736	.2971	.28	.29
Total	30	.3152	.03399	.00621	.3025	.3279	.27	.40

Test of Homogeneity of Variances

data

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.512	9	20	.211

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

data

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)	.012	9	.001	1.183	.357
	Linear Term Contrast	.003	1	.003	3.044	.096
	Deviation	.008	8	.001	.950	.500
Within Groups		.022	20	.001		
Total		.034	29			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

data

Duncan[a]

Group	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
512.00	3	.2853	
256.00	3	.2967	.2967
32.00	3	.2983	.2983
1.00	3	.3030	.3030
8.00	3	.3117	.3117
2.00	3	.3190	.3190
16.00	3	.3200	.3200
128.00	3	.3260	.3260
4.00	3	.3367	.3367
64.00	3		.3550
Sig.		.114	.075

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-7 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าการยับยั้งการ เจริญของ *Micrococcus luteus* ของสารสกัดหยาบจากใบมะรุมในชั้นของตัวทำละลายเอทานอลและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

Oneway

Descriptives

data

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	.3420	.06391	.03690	.1832	.5008	.29	.41
2.00	3	.3293	.03595	.02076	.2400	.4186	.29	.36
4.00	3	.3553	.04120	.02379	.2530	.4577	.31	.39
8.00	3	.3180	.01044	.00603	.2921	.3439	.31	.33
16.00	3	.3373	.02892	.01670	.2655	.4092	.32	.37
32.00	3	.3330	.01735	.01002	.2899	.3761	.31	.34
64.00	3	.3287	.02369	.01368	.2698	.3875	.31	.36
128.00	3	.3250	.02663	.01537	.2589	.3911	.30	.35
256.00	3	.3203	.02610	.01507	.2555	.3852	.29	.35
512.00	3	.3047	.04210	.02431	.2001	.4092	.28	.35
Total	30	.3294	.03181	.00581	.3175	.3412	.28	.41

Test of Homogeneity of Variances

data

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.812	9	20	.129

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

data

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		.005	9	.001	.485	.868
	Linear Term	Contrast	.003	1	.003	2.379	.139
		Deviation	.002	8	.000	.248	.976
Within Groups			.024	20	.001		
Total			.029	29			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

data

Duncan [a]

Group	N	Subset for alpha = .05
		1
512.00	3	.3047
8.00	3	.3180
256.00	3	.3203
128.00	3	.3250
64.00	3	.3287
2.00	3	.3293
32.00	3	.3330
16.00	3	.3373
1.00	3	.3420
4.00	3	.3553
Sig.		.137

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

Mueller Hinton Agar (MHA)

Beef infusion form	300	กรัม
Casein acid hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
pH	7.3 ± 0.2	

วิธีการเตรียม

การเตรียมอาหาร Mueller Hinton Agar โดยใช้อาหารสำเร็จรูป ทำได้โดยชั่งอาหาร MHA สำเร็จรูป 38 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้น ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนำเข้าหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อาหารที่ได้จะมีลักษณะใส สีเหลืองคค่อนข้างน้ำตาล

Nutrient agar medium (NA)

Nutrient broth	8.0	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Nutrient broth ลงในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้วให้สารอาหารละลาย ปรับ pH ด้วย 0.1 NaOH หรือ 0.1 N HCl จนได้ประมาณ 6.8 -7 ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปผสมวุ้นต้มจนละลาย เทอาหารใส่ขวดปริมาณขวดละ 200 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี ปิดทับด้วยกระดาษอีกครั้ง นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

วิธีการ swab

1. การนำเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 1 ลูป ใส่ลงในสารละลายน้ำเกลือ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร
2. นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เชื้อเข้ากัน นำไปเทียบความขุ่น MaFarland Standard No. 0.5
3. นำไม้พันสำลีไปจุ่มลงในหลอดเชื้อจุลินทรีย์ ระวังอย่าให้สำลีชุ่มมากเกินไป และนำไม้สำลีนั้นมาทาลงบนจานอาหารเลี้ยวเชื้อ โดยป้าย 3 ทิศทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Agar Disc Diffusion Method

การวิเคราะห์ผลผลิตโดยการทางชีววิทยา Agar Disc Diffusion เป็นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตของสารชีวภาพโดยอาศัยหลักการแพร่ ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้อาหารวุ้นผสมเชื้อทดสอบลงในจานเพาะเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง จากนั้นจึงนำกระดาษกรองรูปวงกลม (paper disc) ดูดซับสารที่ต้องการวิเคราะห์วางลงไป สารที่ต้องการวิเคราะห์จะแพร่ออกไปตามแนวรัศมีรอบๆ เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (inhibition zone) ของเชื้อทดสอบจะแปรตามปริมาณของสารที่ต้องวิเคราะห์

วิธีการทำ Agar Disc Diffusion Method

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ เตรียมอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย
2. เตรียมสารละลายแขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ โดยเตรียมให้การละลายมีความขุ่นเท่ากับ MaFarland Standard No. 0.5
3. ทำการทา(swap) เชื้อจุลินทรีย์แขวนลอยที่มีความถี่เท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ลงบนอาหารที่เตรียมไว้
4. นำสารสกัดที่ต้องการทดสอบมาทำการละลาย โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย โดยให้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 5, 25 และ 50 มิลลิกรัมมิลลิลิตร เมื่อทำการละลายเรียบร้อยแล้วทำการหยดลงบนแผ่นทดสอบ (Disc) แผ่นละ 20 ไมโครลิตร
5. เมื่อแผ่นทดสอบ (Disc) แห้งแล้วก็ทำการวางลงบนอาหารที่ทำการทา (swap) เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบไว้แล้ว
6. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสำรับเชื้อแบคทีเรีย และ 30 อาศาเซลเซียส สำหรับเชื้อยีสต์ ทำการบ่มไว้ 24 ชั่วโมง
7. ทำการวัดส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น (มิลลิเมตร)

การเตรียม McFarland standard No. 0.5

1. เตรียมสารละลายแบเรียมคลอไรด์($BaCl_2$) ความเข้นข้น 0.048 โมลต่อลิตร (1.17%w/v $BaCl_2.H_2O$)
2. เตรียมสารละลารกรดไฮโดรคลอลิก (HCl) ความเข้มข้น 0.18 โมลต่อลิตร (1%w/v)
3. นำสารละลายแบเรียมคลอไรด์ 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายไฮโดรคลอลิก 99.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้