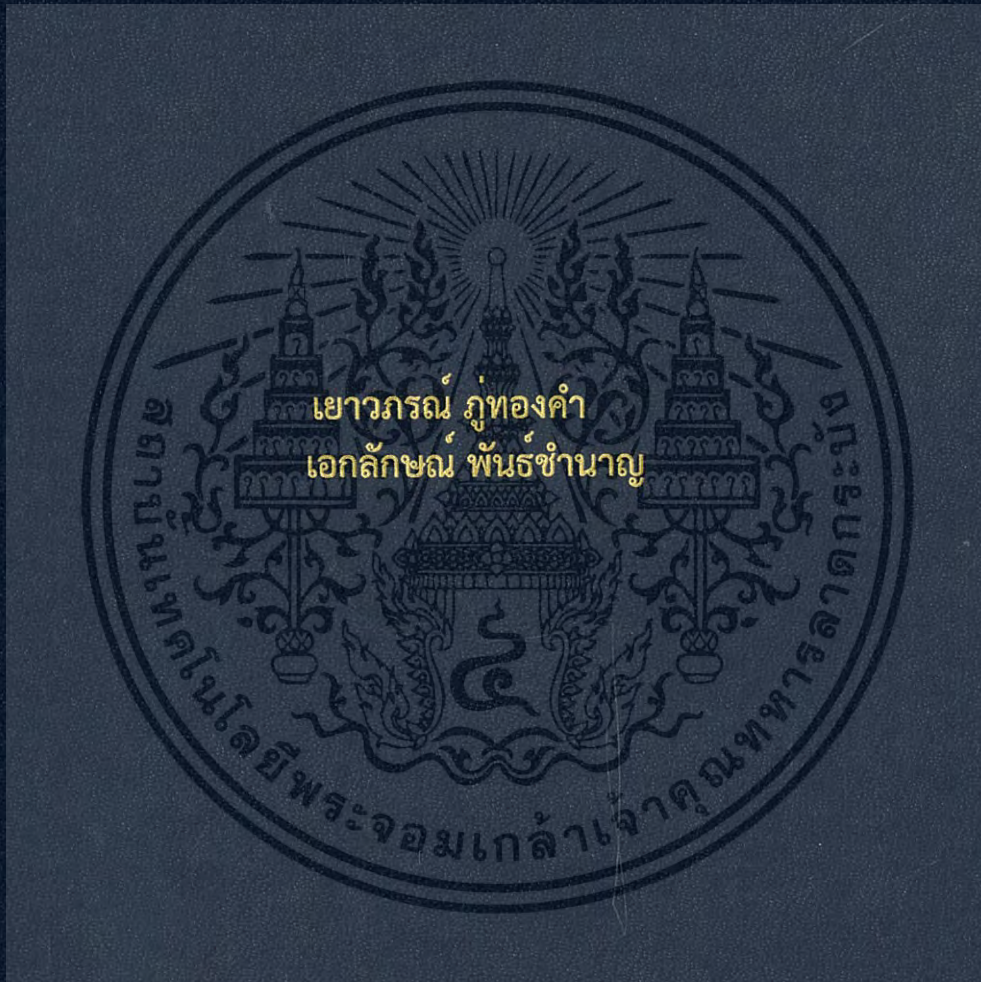


ฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบของต้น *Eucalyptus tereticornis*  
Biological activity of *Eucalyptus tereticornis* leaves



ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2558

ฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบของต้น *Eucalyptus tereticornis*  
Biological activity of *Eucalyptus tereticornis* leaves



เยาวภรณ์ ภูทองคำ

เอกลักษณ์ พันธุ์ชำนาญ

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# Biological activity of *Eucalyptus tereticornis* leaves

Yaowaporn Phoothongkham

Eakalak Phanchamnan

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY PROGRAM)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2015


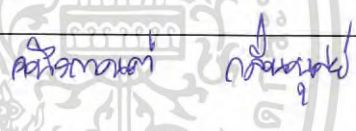
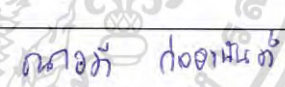
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ                   ฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบของต้น *Eucalyptus tereticornis*  
 Biological Activity of *Eucalyptus tereticornis* Leaves

ชื่อนักศึกษา                               นางสาว เขียวภรณ์ ภูทองคำ รหัสนักศึกษา 55051371  
   นาย เอกลักษณ์ พันธุ์ชำนาญ รหัสนักศึกษา 55051438

ปริญญา                                       วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
 ภาควิชา                                       ชีววิทยา  
 ปีการศึกษา                                 2558  
 อาจารย์ที่ปรึกษา                         อ.ธนาวัตี ก่ออานันต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้  
 ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา  
 อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.มงคล เพ็ญสายใจ ประธานกรรมการ	
ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการ	
อ.ธนาวัตี ก่ออานันต์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	ฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบของต้น <i>Eucalyptus tereticornis</i>
ชื่อนักศึกษา	นางสาว เยาวภรณ์ ภู่ทองคำ รหัสนักศึกษา 55051371 นาย เอกลักษณ์ พันธุ์ชำนาญ รหัสนักศึกษา 55051438
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	อ.ธนาวดี ก่ออานันต์

### บทคัดย่อ

สิ่งสกัดหยาบด้วยวิธีการแช่ใบของยูคาลิปตัสพันธุ์ *Eucalyptus tereticornis* มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เมื่อทดสอบสกัดสารสำคัญด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ กัน เช่น เฮกเซน อะซิโตน เมทานอล และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี broth microdilution การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ปริมาณสารฟีนอลิกทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH วิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณด้วยสถิติและค่าความแปรปรวนแบบ ANOVA พบว่าสิ่งสกัดเมทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวม มากที่สุดคือ 44.80 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสิ่งสกัด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสิ่งสกัดหยาบจากตัวทำละลายอะซิโตนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรให้ %EC สูงที่สุดคือร้อยละ 91.95±0.07 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* และ *Vibrio parahaemolyticus* พบว่าสิ่งสกัดหยาบด้วยเฮกเซนและอะซิโตนสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* มากที่สุด (3.0±0 mg/ml) สิ่งสกัดหยาบจากเมทานอลยับยั้ง *Ps. aeruginosa* ได้มากที่สุด (3.0±0 mg/ml) สิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลสามารถยับยั้ง *Aspergillus* sp. ได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ขณะที่สิ่งสกัดจากเฮกเซน ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ นอกจากนี้สิ่งสกัดจากยูคาลิปตัสมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเมื่อทดสอบด้วย MTT assay ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 µg/ml พบว่าสิ่งสกัดจากอะซิโตนไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ทดสอบ และสิ่งสกัดจากเฮกเซนมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG-2 สูง ประมาณร้อยละ 96.03 ในขณะที่สิ่งสกัดจากเมทานอลเป็นพิษต่อทุกเซลล์ยกเว้นเซลล์ลิงแอฟริกา

คำสำคัญ: *Eucalyptus tereticornis*, ฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Title	Biological Activity of <i>Eucalyptus tereticornis</i> Leaves
Students	Miss Yaowaporn Phoothongkham Student ID 55051371 Mr. Eakalak Phanchamnan Student ID 55051438
Degree	Bachelor of Science (Industrial microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2015
Advisor	Thanawadee Kor-anan

### Abstract

Maceration was used for extract crudes from *Eucalyptus tereticornis* leaves by using various solvent i.e. hexane, acetone and methanol. Their antibacterial activity carried out by broth microdilution, antiproliferation evaluated by MTT assay, total phenolic content in Folin-Ciocalteu method and antioxidation evaluated by using 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging assay expressed in percent of effective concentration (%EC). Method and result were expressed as mean values  $\pm$  standard deviation (S.D.) and one-way analysis of variance (ANOVA). The results shown that The methanolic extract was the highest in total phenolic content (44.80 Gallic acid/1mg crude extract) and the acetonic extract concentration 1 mg/mL was found to strongest antioxidant activity (91.95 $\pm$ 0.07%) in scavenging DPPH radicals. The antibacterial activity against 5 bacteria species i.e. *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio parahaemolyticus*. The minimal inhibitory concentration (MIC) revealed hexanic and acetonic extracts were highest inhibit *B. subtilis* (3.0 $\pm$ 0 mg/mL). Whereas methanolic extract was highest inhibit *Ps. aeruginosa* (3.0 $\pm$ 0 mg/mL). The antifungal activity showed high polarity crude extract (methanolic extract) abled to against 5 species of *Aspergillus* sp. but contrast on hexane. The antiproliferation of crude extracts evaluated by MTT assay using primary screening (1,000  $\mu$ g/mL) expressed in percent of cytotoxicity (% Cytotoxicity) in 4 test cell lines i.e. Vero (kidney of a normal adult African green monkey), HT-29 (colon), MFC-7 (breast) and HepG-2 (liver). The results showed that acetonic extract was not effect

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา ขลจะต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

to all test cell lines. The hexanic extract was highest effect to HepG-2 (96.03%) and the methanolic extract effected to all cell lines except Vero cell line.

**Keywords:** *Eucalyptus tereticornis*, Biological activity, Antimicrobial potential, Anti-bacteria, Anti-fungi, Anti-proliferation, Anti-oxidation



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา **ค**ละต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษเรื่องฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบของต้น *Eucalyptus tereticornis* สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ธนาวดี ก่ออานันต์ ผู้คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ คอยให้ความช่วยเหลือให้ความรู้ทางด้านการทำวิจัยในเรื่องของการปฏิบัติการช่วยสอนเทคนิค และขั้นตอนในการปฏิบัติงานรวมทั้งการวิจัยเขียนเล่มปัญหาพิเศษ กรุณาสละเวลาเพื่อติดตามการวิจัย ตั้งแต่เริ่มจนจบการทำวิจัยเพื่อแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น รวมไปถึงความกรุณาที่ตรวจสอบความถูกต้องและชี้แนะข้อบกพร่องจนโครงการเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ จึงกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผศ. มงคล เพ็ญสายใจ และ ดร. คณิงกานต์ กลิ่นบุศย์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา ที่เสียสละเวลาเพื่อมาเป็นประธานกรรมการและกรรมการในการสอบปัญหาพิเศษ รวมทั้งคอยให้คำปรึกษา ชี้แนะในเรื่องของการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ศึกษาศาสตร์ ชั้น 4 และ ตึกจุฬารัตน์วลัยลักษณ์ 1 ชั้น 4 ทุกท่าน ได้รับความช่วยเหลือ เอื้ออำนวยสารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือ สถานที่ในการปฏิบัติการ รวมถึงความรู้ เทคนิค ในการใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ ทำให้การทำปฏิบัติการเป็นไปได้อย่างราบรื่นกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.วราพร เหลือสินทรัพย์ ที่เสียสละเวลาให้คำปรึกษาการเลือกสถิติเพื่อใช้จัดการข้อมูลของงานวิจัย

ขอกราบคุณท่านคณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกท่าน ที่คอยให้ความรู้ตลอดสปีเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณผู้แต่งบทความทุกท่านที่ได้นำมาอ้างอิงในปัญหาพิเศษเล่มนี้ ตลอดจนผู้ที่มีส่วนร่วม ในการทำวิจัยและเขียนเล่มปัญหาพิเศษเล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ทุกท่านที่กล่าวนามได้ไม่หมด

เยาวภรณ์ ภูทองคำ

เอกลักษณ์ พันธุ์ชำนาญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฉ
สัญลักษณ์.....	ญ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย/ปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....</b>	<b>3</b>
2.1 อนุกรมวิธานของยูคาลิปตัส.....	3
2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.....	3
2.3 สรรพคุณทางยาและประโยชน์.....	4
2.4 ฤทธิ์ต้านจุลชีพ.....	4
2.5 องค์ประกอบทางเคมีของใบ <i>E. tereticornis</i> .....	5
2.6 กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพ.....	6
2.7 อนุมูลอิสระ.....	6
2.8 สารต้านอนุมูลอิสระ.....	7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา **จ**จะต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.8.1 แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ.....	7
2.9 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	8
2.10 สารประกอบฟีนอลิก.....	9
2.11 มะเร็ง.....	9
2.12 ความเป็นพิษต่อเซลล์.....	10
2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	11
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>12</b>
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	12
3.1.1 แบคทีเรีย.....	12
3.1.2 เชื้อรา.....	12
3.2 เซลล์สัตว์.....	12
3.3 ตัวอย่างพืช.....	12
3.4 วัสดุและอุปกรณ์.....	13
3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์.....	13
3.4.2 สารเคมี.....	13
3.4.3 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	13
3.5 วิธีการทดลอง.....	15
3.5.1 การสกัดสิ่งสกัดหยาบยุคาลิปตัส.....	15
3.5.2 ฤทธิ์ต้านจุลชีพ.....	15
3.5.2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ.....	15
3.5.2.2 ความเข้มข้นต่ำสุดที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC)	

และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC)..... 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.2.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่เกิดการยับยั้งเชื้อรา (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา(MFC).....	16
3.5.3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดยูคาลิปตัสต่อเซลล์.....	16
3.5.4 การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	17
3.5.4.1 หาปริมาณกรดฟีนอลิกทั้งหมด.....	17
3.5.4.2 การทดสอบ DPPH scavenging assay.....	17
3.5.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	18
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>19</b>
4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์.....	19
4.1.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย.....	19
4.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา.....	21
4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	23
4.2.1 การหาสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocaltue.....	23
4.2.2 การหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging.....	23
4.3 การยับยั้งการเจริญของเซลล์.....	24
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>26</b>
บรรณานุกรม.....	28
ภาคผนวก ก.....	36
ภาคผนวก ข.....	38
ภาคผนวก ค.....	61
ภาคผนวก ง.....	71
ภาคผนวก จ.....	75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา **ขอ** ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงร้อยละองค์ประกอบทางเคมีของใบ <i>E. tereticornis</i> .....	5
4.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Folin-Ciocaltue แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิก.....	23
4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Scavenging แสดงค่า %EC ของสารสกัดหยาบยูคาลิปตัสที่สกัดจากตัวทำละลายต่างๆในแต่ละความเข้มข้น.....	24
4.3 การยับยั้งการเจริญของเซลล์โดยวิธี MTT แสดงค่าร้อยละการยับยั้ง การเจริญของเซลล์ของสารสกัดหยาบยูคาลิปตัสที่สกัดจากตัวทำละลาย Acetone, Hexane และMethanol.....	25



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา ซึ่งจะต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะใบ ดอก และผลของ <i>E. tereticornis</i> .....	4
2.2 แสดงโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มต่างๆ.....	8
2.3 แสดงโครงสร้างของ MTT และปฏิกิริยาของ MTT colorimetric assay.....	10
4.1 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) (mg/ml) ของเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์.....	20
4.2 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) (mg/ml) 5 สายพันธุ์.....	21
4.3 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) (mg/ml) ของเชื้อรา 5 สายพันธุ์.....	22
4.4 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (MFC) (mg/ml) 5 สายพันธุ์.....	22



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
MIC	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้
MBC	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้
MFC	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้
DPPH	สารเคมี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
D-ala-D-ala	การเชื่อมพันธะเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโน D-alanine 2 โมเลกุล
MTT	สารเคมี 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MTS	สารเคมี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
XTT	สารเคมี 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
%EC	percent of effective concentration หรือ ร้อยละ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง
Vero	เซลล์ไตลิงแอฟริกา
HT-29	เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก
MCF-7	เซลล์มะเร็งเต้านม
HepG-2	เซลล์มะเร็งตับ
McFarland No 0.5	ความขุ่นมาตรฐานแมกซ์ฟาร์แลนด์ หมายถึง จำนวนเชื้อ ประมาณ $1.5 \times 10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร
mRNA	Messenger ribosomal nucleic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา ญ่จะต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ยูคาลิปตัสเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศออสเตรเลียมีลักษณะสูงและมีใบเขียวชุ่มตลอดปี สามารถพบได้ทั่วโลกปัจจุบันมีการเพาะปลูกอย่างแพร่หลายในหลายๆประเทศ (Bruneton. *et al.*, 1995) ยูคาลิปตัสเป็นพืชในวงศ์ *Myrtaceae* ซึ่งมีมากกว่า 900 สปีชีส์ (Brooker and Kleinig, 2004) ในอดีตยูคาลิปตัสถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์ของจีน เช่น ใบแห้งของ *Eucalyptus citriodora* สกัดด้วยน้ำร้อนใช้รักษาอาการอักเสบ บรรเทาอาการปวด การติดเชื้อทางระบบหายใจ เช่น ไข้หวัด ไซนัส (Silva. *et al.*, 2003) ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยของ *E. citriodora* จึงมักนำมาใช้ทางการแพทย์และเภสัชกรรม (Ghisalberi, 1995; Leung and Foster, 1996) ปัจจุบันมีหลายงานวิจัยได้ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยจากยูคาลิปตัสพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์ เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus subtilis* เมื่อทดสอบด้วยวิธี diffusion method (Cimanga. *et al.*, 2002) และมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์ เช่น มะเร็งลำไส้ ปอด ต่อมลูกหมาก รังไข่ ปากมดลูก ตับ และเม็ดเลือดขาว (Al-Sayed. *et al.*, 2012 ; Bhagat. *et al.*, 2012 ; Islam. *et al.*, 2012)

สายพันธุ์ยูคาลิปตัสที่สนใจและนำมาทำการศึกษาคือ *Eucalyptus tereticornis* ซึ่งสารสกัดจากใบมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Ps. aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบยูคาลิปตัสสายพันธุ์อื่น (Bachheti. *et al.*, 2011 ) จากงานวิจัยการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบของ *E. tereticornis* ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันคือ Ethanol และ Methanol พบว่า สารขั้วต่ำ (Ethanol) มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่า สารขั้วสูง (Methanol) (Badrunnisa and Shantaram, 2011) นอกจากนี้ *E.tereticornis* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทดสอบด้วยวิธี DPPH scavenging activity ( Kaur. *et al.*, 2011) การรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีเคมีบำบัดอาจส่งผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติซึ่งนอกเหนือจากเซลล์มะเร็งโดยทำให้เกิดอาการผมร่วง ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร เป็นต้น การศึกษาสารที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ จึงเป็นที่น่าสนใจ ทั้งนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าต้นยูคาลิปตัสที่ปลูกในประเทศไทยอีกด้วย

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อสกัดสารจากใบของต้นยูคาลิปตัสสายพันธุ์ *E. tereticornis* ด้วยตัวทำละลายต่างๆ
- 2) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา ฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสิ่งสกัดหยาบจากใบของต้นยูคาลิปตัสสายพันธุ์ *E. tereticornis*

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) ทำการสกัดใบยูคาลิปตัสด้วยวิธีสกัดหยาบโดยการแช่ตัวทำละลาย เฮกเซน อะซิโตน และเมทานอล ตามลำดับ
- 2) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพ ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสิ่งสกัดหยาบของยูคาลิปตัส สายพันธุ์ *E. tereticornis*

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ส่งเสริมการใช้ประโยชน์เกี่ยวกับการยับยั้งจุลชีพ ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และต้านอนุมูลอิสระจากต้นยูคาลิปตัสทางเภสัชวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและหลักการ

### 2.1 อนุกรมวิธานของยูคาลิปตัส

Kingdom: Plantae

Phylum: Angiosperms

Class: Eudicots

Subclass: Rosids

Order: Myrtales

Family: Myrtaceae

Genus: *Eucalyptus*

Species: *E. tereticornis*

### 2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ยูคาลิปตัสที่นำมาศึกษามีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *E. tereticornis* มีชื่อสามัญว่า Forest red gum, Blue gum, grey gum, Queensland blue gum เป็นต้น เป็นพืชยืนต้นความสูง 20-50 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 เมตร ลำต้นตรง ไม่มีการแตกแขนงกิ่งก้านในช่วงครึ่งแรกของความยาวต้น กิ่งก้านจะมีความชันมากกว่ายูคาลิปตัสสายพันธุ์อื่นๆ ส่วนเปลือกนั้นจะมีลักษณะเป็นแผ่นเรียบมันที่ไม่มีระเบียบและมีสีขาว เทา ฟ้า (Boland. *et al.*, 1984) ดอกของต้นยูคาลิปตัสมีลักษณะเป็นช่อเกิดขึ้นระหว่างกิ่งและใบ แตกแขนงออกไปอีก 7-11 ดอก มีก้านดอกที่เรียว และดอกเป็นสีขาว ยูคาลิปตัสจะออกดอก 7-8 เดือนต่อปี ผลของยูคาลิปตัสนั้นมีลักษณะครึ่งวงกลม สีเขียว แต่เมื่อผลแก่จะมีสีน้ำตาล และปลายผลจะแยกออกจากกันทำให้เมล็ดที่อยู่ด้วยในหล่นออกมา (วิทยา, 2554)



รูปที่ 2.1 ลักษณะใบ ดอก และผลของ *E. tereticornis*

### 2.3 สรรพคุณทางยาและประโยชน์

รักษาอาการอักเสบ บรรเทาอาการปวด การติดเชื้อทางระบบหายใจ เช่น ไข้หวัด ไซนัส (Silva และคณะ 2003) ใช้ในการสารต้านอนุมูลอิสระต้านการเจริญของเชื้อรา (Kaur และคณะ 2011) และต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารในลำไส้และเชื้อที่ไม่ต้องการออกซิเจน (Quwehand. *et al.*, 2010) ทั้งนี้ น้ำมันหอมระเหยยังสามารถนำมาใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชได้อีกด้วย (Kaur. *et al.*, 2010)

### 2.4 ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial activity)

ฤทธิ์ต้านจุลชีพ คือ ความสามารถของสารเคมีหรือน้ำมันหอมระเหยหรือสิ่งสกัดจากพืช ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ (microstatic) หรือ ฆ่าเชื้อจุลชีพ (microbicidal) ทั้งนี้การแยกแยะระหว่างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและสารที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลชีพนั้นไม่สามารถแบ่งแยกได้อย่างชัดเจน เนื่องจากสารบางชนิดอาจมีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งการเจริญต่อจุลชีพสายพันธุ์หนึ่งและในขณะเดียวกันยังสามารถเป็นสารที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลชีพอีกสายพันธุ์ด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงนำกลไกการออกฤทธิ์มาเป็นปัจจัยในการจำแนกสารต้านจุลชีพชนิดต่างๆ โดยสามารถแบ่งออกได้ 5 กลุ่ม ได้แก่ (1) ยับยั้งการสร้างผนัง (2) รบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ (3) ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (4) ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (5) รบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้าน จุลชีพได้กำหนดโดย The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยวิธีการการทดสอบได้อธิบายถึงขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อจุลชีพต่างๆ ทั้ง แบคทีเรีย รา ยีสต์ ไวรัส เป็นต้น ประเภทและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความหนาและปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมเชื้อเริ่มต้นและความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสม ขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างเพื่อทดสอบ สภาวะการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญและการทดสอบต่อเชื้อ เช่น อุณหภูมิ เวลา ของการบ่มเชื้อ ทั้งนี้ยังอธิบายถึงขั้นการตรวจวัดผล ทำให้ได้ผลการทดลองที่แม่นยำ และเป็นที่ยอมรับ การแปรผลจะแสดงผลในค่า MIC หรือ Minimum inhibitory concentration คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญจุลชีพได้ ค่า MBC และ MFC หรือ Minimum bactericidal concentration และ Minimum fungicidal concentration คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียและราได้ (ประสาทร และคณะ, 2551)

## 2.5 องค์ประกอบทางเคมีของใบ *E. tereticornis* (Kaur. et al., 2011)

ตาราง 2.1 แสดงร้อยละองค์ประกอบทางเคมีของใบ *E. tereticornis*

Number	compound	Percentage (%)
1	$\alpha$ -Pinene	32.5
2	$\alpha$ -Thujene	0.07
3	Camphene	0.15
4	$\beta$ -Pinene	10.13
5	Sabinene	0.05
6	$\beta$ -Myrcene	0.36
7	$\alpha$ -Phyllandrene	1.31
8	$\alpha$ -Terpinene	0.1
9	Limonene	3.38
10	1,8-Cineole	22.4
11	$\gamma$ -Terpinene	2.8
12	Cymene	1.12
13	Terpinolene	0.62
14	$\beta$ -Citronellal	1.4
15	Isopulegol-I	0.42
16	Isopulegol-II	0.32
17	endo-Fenchol	0.34
18	trans- $\beta$ -Caryophyllene	0.42
19	Aromadendrene	0.34
20	Terpinen-4-ol	0.61
21	trans-Pinocarveol	1.42
22	Citronellyl acetate	0.16
23	$\alpha$ -Terpineyl acetate	0.47
24	$\alpha$ -Terpineol	3.09
25	$\beta$ -Citronellol (R)	0.52
26	Myrtenol	0.41
27	trans- $\rho$ -mentha-1(7),8-dien-2-ol	0.09
28	Globulol	0.41
29	$\gamma$ -Eudesmol	1.85
30	Guaiol	1.09
31	Aristolene	0.32
32	Hinesol	0.42
33	$\alpha$ -Eudesmol	3.45
34	$\beta$ -Eudesmol	5.89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในพิธีการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพ (Mode of Action of Antimicrobial Agent)

(1) ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (Inhibition of cell wall) มักเป็นสารพวกที่ยับยั้งการสังเคราะห์เปปทิโดไกลแคนของแบคทีเรีย โดยจะเข้าไปสะสมในส่วนของผนังเซลล์และก่อให้เกิด autolysis ทำให้เซลล์แตก หรือ ย่อย pentapeptide side chain และ peptide cross bridge ออกจากกัน เกาะที่บริเวณปลายหรือย่อยพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโน D-ala-D-ala เพื่อไม่ให้เกิดการรวมกันของหน่วยย่อยหรือป้องกันปฏิกิริยา dephosphorylation เพื่อไม่ให้มีการสร้างผนังเซลล์

(2) รบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ (Inhibition of cytoplasmic membrane function) โดยจะเข้าไปทำลาย phospholipid ทำให้สูญเสียคุณสมบัติของการเป็นเยื่อเลือกผ่าน ส่งผลให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโตและตายในที่สุด

(3) ยับยั้งการสังเคราะห์ของกรดนิวคลีอิก (Inhibition of nucleic acid synthesis) โดยมักจะเข้ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ gyrase และ topoisomerase ในขณะที่เซลล์แบ่งตัว เป็นผลให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนได้ หรือเข้ายับยั้งการสังเคราะห์ mRNA เป็นต้น

(4) ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (Inhibition of protein synthesis) สารจะเข้าจับกับหน่วยย่อยของไรโบโซมทำให้เกิดกระบวนการแปลรหัสจาก mRNA เป็น กรดอะมิโน เช่นในแบคทีเรีย จะเข้าจับกับ 50S หรือ 30S ส่งผลเกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

(5) รบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึม (Antimetabolites) มักเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารตัวกลางในปฏิกิริยาที่สำคัญในการสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อเซลล์ต่างๆ เช่น สารพันธุกรรม ได้แก่ ไพริมีน ไพริมิดีน เมื่อเข้าสู่เซลล์จะเกิดการทำปฏิกิริยาแข่งขันกับสารตัวกลางที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน ทำให้เป็นการลดผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์ เป็นผลให้เซลล์ถูกยับยั้งการเจริญ

## 2.7 อนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระ หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่ไม่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว ไม่เสถียรและไวต่อปฏิกิริยา สามารถเกิดขึ้นได้เองตามสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาทางชีวภาพต่างๆ เช่น กระบวนการเมตาบอลิซึม การส่งสัญญาณของเซลล์ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น และส่วนมากจะเกิดกับปฏิกิริยาชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับวิถีเมตาบอลิซึมของออกซิเจน (Uppu. *et al.*, 2010) อนุมูลอิสระ และ Reactive Oxygen Species (ROS) เช่น super oxide anion, hydrogen peroxide, peroxy radical, hydroxyl radical, singlet oxygen และ peroxy nitrite เป็นต้น จะถูกสร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ (Sánchez-Moreno, 2002) เมื่อมีสารหรือโมเลกุลจำพวกนี้เป็นจำนวนมากจะก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งจะทำลายสารชีวโมเลกุลและฟังก์ชันการทำงานของมาร์โครโมเลกุล เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน ลิพิด (Temple, 2000 ; Apel and Hirt, 2004) และเป็นการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคเรื้อรัง เบาหวาน มะเร็ง การเสื่อมของเนื้อเยื่อสมอง โรคหัวใจและหลอดเลือด หลอดเลือดตีตัน การอักเสบ การทำลายเนื้อเยื่อ เป็นต้น (Halliwell, 1996 ; Young and Woodside, 2001 ; Slavin, 2003 ; Yu. *et al.*, 2005 ; Rajendran. *et al.*, 2014) อย่างไรก็ตามสารต้านอนุมูลอิสระจะป้องกันอนุมูลอิสระจากร่างกาย

มนุษย์ ไม่ก่อให้เกิดการทำลายเซลล์ และลดการเกิดโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (Halliwell. *et al.*, 1996)

## 2.8 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่มีความสามารถในการหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไป เช่น ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ลดปริมาณสารอนุมูลอิสระ ยับยั้งปฏิกิริยาไลปิดเพอร์ออกซิเดชัน เป็นต้น (Pieniz. *et al.*, 2009) ที่เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค มะเร็ง เบาหวาน โรคหัวใจ (Rajendran. *et al.*, 2014 ; Yu. *et al.*, 2005) สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มีทั้งในรูปแบบของเอนไซม์ และไม่เป็นเอนไซม์ ที่ละลายน้ำได้และละลายในไขมัน (เจนจิรา , 2554) เช่น วิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน ยูบิควินโอน ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dimutase) แคทาเลส (catalase) แคโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายแบบ เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) ดักจับโลหะที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระของเซลล์ (Chain-breaking) ดังสมการที่แสดงปฏิกิริยาต่อไปนี้ (Pokorny. *et al.*, 2001)



โดย  $R\cdot$  และ  $RO\cdot$  คือ อนุมูลอิสระ และ  $AH$  คือ สารต้านอนุมูลอิสระ

### 2.8.1 แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งมีสภาพเสถียรกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ มักใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ที่เป็นสาเหตุของกลิ่น สี รวมถึงรสชาติที่เปลี่ยนไปของอาหาร เช่น propyl gallate, 2-butylate hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, BHT (butylate hydroxtoluene), tertiary butylhydroquinone เป็นต้น (Pokorny. *et al.*, 2001)

สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) ซึ่งมักพบในพืชและสัตว์ แบ่งเป็น 4 ประเภท (Frankel and Meyer, 2000) ได้แก่

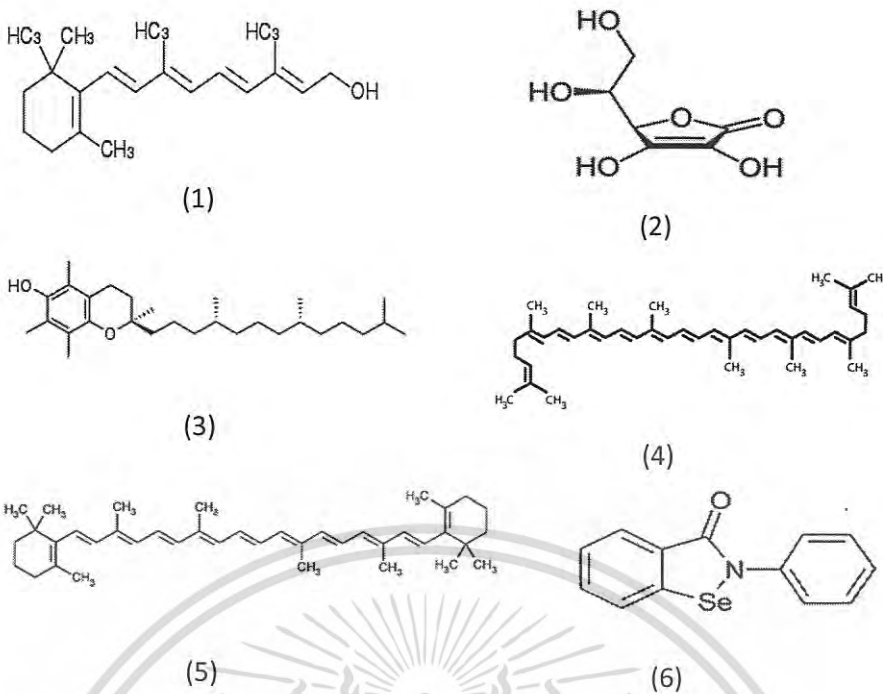
(1) สารในกลุ่มเอนไซม์ เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส แคทาเลส กลูตาไทโอน เพอร์ออกซิเดส เป็นต้น

(2) สารในกลุ่มวิตามิน เช่น วิตามิน เอ ซี อี บี1 บี2 บี3 (Zhou, 2012)

(3) กลุ่มแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม ซีลีเนียม สังกะสี ซีลีเนียม ฟอสฟอรัส เจอร์แมนเนียม เหล็ก แมงกานีส นิกเกิล โคบอลต์ สารหนู (Zhou 2012)

(4) สารในกลุ่มพฤษเคมี เช่น ไลโคปีน (licopen) แคโรทีน (carotene) และและสารประกอบฟีนอลิก เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มต่างๆ

- (1) วิตามิน เอ (2) วิตามิน ซี (3) วิตามิน ฮี (4) ไลโคปีน  
(5) แคโรทีน (6) กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส

## 2.9 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

DPPH scavenging assay เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ด้วยวิธีการทางเคมีโดยใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นสารอนุมูลอิสระ ซึ่งคือ DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็นอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้มีความเสถียรโดยได้รับไฮโดรเจนอะตอมจากสารต้านอนุมูล



ทำให้ DPPH เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระสามารถคำนวณได้จากสมการของค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงเทียบกับค่าดูดกลืนแสงตั้งต้นของสาร DPPH โดยวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (พวงศักดิ์, 2555)

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = \frac{[\text{A}_0 - \text{A}_s]}{\text{A}_0} \times 100$$

โดย  $\text{A}_0$  = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น และ  $\text{A}_s$  = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

## 2.10 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของสารพฤษเคมีที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ตั้งแต่ 1 หมู่ขึ้นไป สามารถละลายน้ำได้ ตามธรรมชาติจะพบสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระได้บ้างเล็กน้อย โดยส่วนมากจะพบในรูปที่รวมกับสารประกอบอื่นๆ (bound form) ซึ่งมักจะรวมอยู่กับโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ เช่น น้ำตาล กลูโคส กาแลคโตส แรมโนส โซโลส อะลาบินอส เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบฟีนอลิกอยู่ร่วมกับ โพลีแซคคาไรด์ ไขมัน กรดอินทรีย์ เอมีน เป็นต้น (วิวัฒน์, 2545)

หน้าที่ของสารประกอบฟีนอลิก คือเป็นสารต้านและป้องกันเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งมีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ (Kahkonen. *et al.*, 1999) โดยกระบวนการจับไล่ออนุมูลอิสระประกอบด้วย 2 กลไก คือ เมื่ออยู่ในสถานะที่มีความเข้มข้นต่ำเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีนอลิกจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และอีกกลไก คืออนุมูลอิสระที่เกิดในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียรโดยสารประกอบฟีนอลิกจะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระส่งผลให้อนุมูลอิสระมีพลังงานน้อยลงและไม่สามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นเพื่อเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไปได้ (พิชญ์อร, 2547 ; วิวัฒน์, 2545)

ในการตรวจวิเคราะห์หากรดฟีนอลิกรวม (Total Phenolic acid) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent เป็นการอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของโมลิบดีนัมเตตระไอออน (Molybdenum ion) ซึ่งสารรีเอเจนต์นั้นจะประกอบไปด้วย โซเดียมทังสเตต โซเดียมโมลิบเดต กรดฟอสฟอริก และโซเดียมคาร์บอเนต ในการเกิดปฏิกิริยาสามารถสังเกตการณ์การเปลี่ยนแปลงของไอออน Mo(VI) ซึ่งมีสีเหลือง จากนั้นเมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำเงิน โดยสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และรายงานค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในรูปของมิลลิกรัมของกรดแกลลิก (Tsai. *et al.*, 2005 )

## 2.11 มะเร็ง (Cancer)

มะเร็ง คือ กลุ่มโรคที่เกิดจากความผิดปกติระดับโมเลกุลของเซลล์ร่างกาย และมีขบวนการในการเกิดโรคหลายขั้นตอนกว่าที่เซลล์ปกติจะกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ เรียกว่า multistep carcinogenesis มีขั้นตอนต่างๆดังนี้ (เอี่ยมแซ, 2011)

- 1) Tumor initiation เป็นขั้นเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในเซลล์ร่างกายอย่างถาวร โดยจะถูกชักนำจากปัจจัยทางกายภาพภายนอก เช่น การติดเชื้อไวรัส สารเคมี รังสี เป็นต้น ซึ่งทำให้เซลล์ร่างกายมีความผิดปกติในระดับโมเลกุล เนื่องจากไปกระตุ้นยีนก่อมะเร็งหรือยับยั้งการทำหน้าที่ของยีนต้านมะเร็งซึ่งทำให้เซลล์มีความผิดปกติของการเจริญและแบ่งตัว
- 2) Tumor promotion step ในระยะนี้จะพบว่าเซลล์มีความผิดปกติที่ระดับโมเลกุล มีการแบ่งตัวของเซลล์เพิ่มมากขึ้น ทำให้โครโมโซมและยีนที่มีความผิดปกติในระยะแรกนั้นมีความผิดปกติมากขึ้นจนถึงระดับหนึ่งส่งผลให้เซลล์เข้าสู่ระยะที่ 3
- 3) Conversion step เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์ธรรมดาเป็นเซลล์ระยะก่อนมะเร็งและเข้าสู่ระยะเซลล์มะเร็งในที่สุด

- 4) Tumor progression มีการแสดงลักษณะของการเป็นเซลล์มะเร็งโดยจะลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงและแพร่กระจายไปทั่วร่างกาย

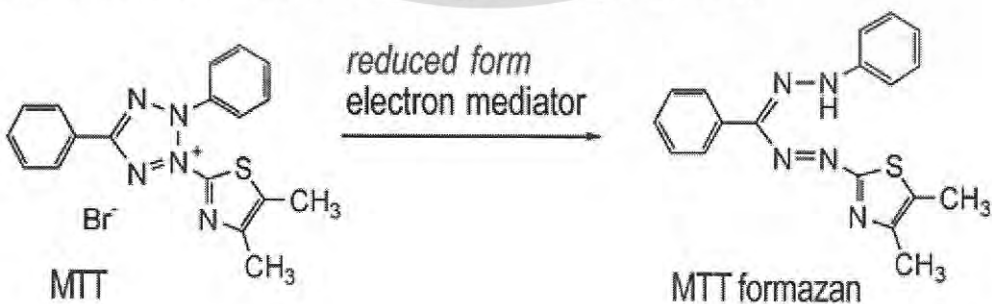
### คุณลักษณะที่สำคัญของเซลล์มะเร็ง

- 1) Proliferation เซลล์มะเร็งมีการแบ่งตัวอยู่นอกเหนือการควบคุมของร่างกาย ซึ่งการเจริญเติบโตและการแย่งตัวของเซลล์มะเร็งนั้นไม่ได้มีความรวดเร็วเท่ากับเซลล์ปกติของร่างกาย เช่น ไช้กระดูก เยื่อบุลำไส้ เป็นต้น
- 2) Loss of differentiation เซลล์มะเร็งจะมีคุณสมบัติการคงความเป็นเซลล์ตัวอ่อนที่สามารถแย่งตัวเพิ่มจำนวนได้ตลอดเวลา
- 3) Invasion and metastasis เป็นคุณสมบัติในการจำแนกกระหว่างเนื้องอกธรรมดา กับเนื้องอกร้ายหรือมะเร็ง เพราะลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียง เช่น ตับ ปอด ต่อมไทรอยด์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่พบในเซลล์มะเร็งเท่านั้น

### 2.12 ความเป็นพิษต่อเซลล์

การวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell Proliferation) ได้นำไปศึกษาผลการตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อสารที่ใช้ทดสอบโดยส่วนมากจะดูความเป็นพิษของสารทดสอบที่ส่งผลต่อเซลล์ (Cell Cytotoxicity) ปัจจุบันมีหลากหลายวิธีที่ใช้วัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์เช่น การวัดกิจกรรมเมตาบอลิซึมในเซลล์สามารถบอกได้ว่าเซลล์มีพลังงานที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนอยู่หรือไม่ ถ้ากลุ่มเซลล์ใดที่แสดงให้เห็นถึงกิจกรรมเมตาบอลิซึมมาก หมายถึงว่า ยังคงมีเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ในการตรวจวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยการวัดกิจกรรมเมตาบอลิซึมมีอยู่หลายวิธีด้วยกัน ตัวอย่างเช่น MTT, MTS, XTT

MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay เป็นการตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์ โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ทำให้ MTT ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์สีเหลืองเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ formazan ที่มีสีม่วง โดยสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 570 nm ซึ่งการตรวจวัดสามารถแยกแยะระหว่างเซลล์มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้วออกจากกันได้ โดยมีเพียงเซลล์มีชีวิตเท่านั้นจะพบสีม่วงของผลิตภัณฑ์ formazan ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะมีสีใสโปร่งแสง (เบ็ญจมาศ, 2543)



รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของ MTT และปฏิกิริยาของ MTT colorimetric assay

## 2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Tyaki and Malik (2011) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพจากน้ำมันหอมระเหยทั้งในรูปของของเหลวและรูปที่ระเหยได้ของ *Eucalyptus globulus* ต่อเชื้อจุลชีพที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหาร 14 สายพันธุ์คือ *Escherichia coli*  $\alpha$ DH5, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Mucor* spp., *Rhizopus nigricans*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยวิธี agar dilution/well diffusion และ วิธี volatilization โดยอ้างอิงวิธีทดสอบตาม NCCLS M27-A พบว่าความเข้มข้นที่สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียและราอยู่ในช่วง 2.25-9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นที่สามารถต้านการเจริญของยีสต์จะอยู่ในช่วง 1.13-2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Hussian. et al. (2011) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากน้ำมันหอมระเหยของกะเพราะบางสายพันธุ์โดยเรซาซูรินเป็นตัวบ่งชี้การเจริญของเซลล์ซึ่งเป็นวิธีที่ถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็ว ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติการ

Hrubik. et al. (2012) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม 2 ชนิดคือ MCF-7 MDA-MB-231 ด้วยวิธี MTT assay จาก *Myrtus communis* L. และ *Eucalyptus camaldulensis* dehn. ที่สกัดด้วยตัวทำละลายหลายชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทิลอะซิเตต บิวทานอล และน้ำ พบว่าผลการทดสอบที่ให้ค่า  $IC_{50}$  ของยูคาลิปตัสนั้นมีค่าในช่วง 3-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อสิ่งสกัดมีข้มมากขึ้นจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากขึ้น ทั้งในเซลล์ชนิด MCF-7 และ MDA-MB-231

Hassine. et al. (2012) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดยูคาลิปตัสด้วยตัวทำละลาย 6 ชนิดที่ต่างขั้วกัน คือ เฮกเซน ปีโตรเลียมอีเทอร์ อะซิโตน เอทานอล เมทานอล และน้ำ ของใบ *Eucalyptus gillii* โดยใช้วิธี DPPH scavenging, ABTS Radical-Scavenging assay โดยมีกรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน พบว่าจากวิธี DPPH นั้นสารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดจากตัวทำละลายทั้งหมด โดยให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $11.4 \pm 40.5$  มิลลิกรัมต่อลิตร และวิธี ABTS สารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $12.6 \pm 0.7$  มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งยังทำการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu การหาปริมาณแทนนิน ด้วยวิธี Vanillin method การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธี Dowd method และการหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ด้วยวิธี The pH differential absorbance method ผลการทดลองพบว่า สารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด เท่ากับ  $216.6 \pm 0.4$  มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด สารสกัดเมทานอลมีปริมาณแทนนินมากที่สุด เท่ากับ  $251.3 \pm 0.7$  กรัมของแคทเทชินต่อกิโลกรัมของสารสกัด สารสกัดเอทานอลพบปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด เท่ากับ  $34.3 \pm 0.1$  กรัมของเคอร์ซีทินต่อกิโลกรัมของสารสกัด และสารสกัดเฮกเซนพบปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุดเท่ากับ  $45.3 \pm 0.1$  มิลลิกรัมของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อกิโลกรัมของสารสกัด เมื่อเทียบกับสารสกัดจากตัวทำละลายชนิดอื่น

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เชื้อจุลินทรีย์

##### 3.1.1 แบคทีเรีย

1. *Proteus vulgaris*
2. *Bacillus subtilis*
3. *Pseudomonas aeruginosa*
4. *Vibrio parahaemolyticus*
5. *Salmonella typhimurium*

##### 3.1.2 เชื้อรา

1. *Aspergillus fumigatus*
2. *Aspergillus flavus* TISTR 8041
3. *Aspergillus versicolor*
4. *Aspergillus ochraceus*
5. *Aspergillus phoenicis*

#### 3.2 เซลล์สัตว์

1. เซลล์ไตลิงแอฟริกา (Vero)
2. เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (HT-29)
3. เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7)
4. เซลล์มะเร็งตับ (HepG-2)

#### 3.3 ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชคือ *E. tereticornis* ได้จากบริเวณคันนา ตำบลบ้านนา อำเภอกบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี

### 3.4 วัสดุและอุปกรณ์

#### 3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Mueller Hinton (SRL, India)
2. Sabouraud dextrose (SRL, India)

#### 3.4.2 สารเคมี

1. เมทานอล
2. อะซิโตน
3. เฮกเซน
4. เอทานอล
5. สาร DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (Merck, Germany)
6. สาร Resazurin
7. สาร 0.1% Tween 80
8. น้ำเกลือ (NaCl) เข้มข้นร้อยละ 0.85
9. DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma, USA)
10. วิตามิน ซี (Fisher, UK)
11. สาร Folin-Ciocalteu
12. สารละลาย กรดแกลลิก
13. โซเดียมคาร์บอเนต
14. สารละลาย Phosphate buffer saline pH 7.4
15. สาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
16. สารละลาย 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

#### 3.4.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กรวยแยก
2. ขวดแก้วขนาดเล็กแบบใส (vial)
3. ขวดแก้วสีชา (amber vial)
4. แท่งแก้วคน
5. ช้อนตักสาร
6. ปีกเกอร์
7. หลอดทดลอง
8. หลอดหยด
9. เครื่องปั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. กระดาษกรอง เบอร์ 1 (whatman)
11. ไมโครเพลท ชนิด 96 หลุม
12. โพลแก้ว
13. ผ้าขาวบาง
14. ถังพลาสติก
15. หนัวยาง
16. ถังมือยาง
17. กระดาษฟอยล์
18. เพลทแก้ว
19. กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร
20. ทิป
21. ลูปเขี่ยเชื้อ (loop)
22. เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
23. ตะเกียงแอลกอฮอล์
24. กระบอกฉีดแอลกอฮอล์ 70 %
25. ขวดเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Duran, Germany)
26. หลอดไมโครทูบขนาด 1500 ไมโครลิตร (ExtraGene, USA)
27. ปีเปตต์แก้ว
28. ปีเปตต์แบบอัตโนมัติ
29. ปีเปตต์แบบหลายช่องดูด-จ่าย
30. ซีมาไฮโตมิเตอร์ (Neubauer, Germany)
31. ตู้ปลอดเชื้อ
32. ตู้บ่มเชื้อ
33. เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Tommy Tokyo, Japan)
34. ตู้อบลมร้อน (Contherm, England)
35. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Heidolph, Germany)
36. ชุดเครื่องกรองสุญญากาศ
37. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (OHAUS, USA)
38. เครื่อง Ultrasonic bath (Creast, USA)
39. เครื่อง Spectrophotometer (UNICO, USA)
40. เครื่องวัด pH (Denver, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 14 ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.5 วิธีการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ใช้ใบ *E. tereticornis* ซึ่งเป็นพืชที่ปลูกใน อ.กบินทร์บุรี จ.ปราจีนบุรี ประเทศไทย

#### 3.5.1 การสกัดสิ่งสกัดหยาบยูคาลิปตัส

สกัดใบ *E. tereticornis* โดยวิธี Maceration โดยตากใบยูคาลิปตัสให้แห้งหรืออบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน จากนั้นทำการบดใบยูคาลิปตัสแห้งให้เป็นผงโดยใช้เครื่องบด จากนั้นนำผงยูคาลิปตัสที่ได้ห่อด้วยผ้าขาวบางมัดให้แน่น นำไปแช่ในตัวทำละลายเริ่มตั้งแต่ช่วงต่ำไปสูงคือ เฮกเซน อะซิโตน และ เมทานอล ตามลำดับ นาน 2 วัน หลังการแช่นำสารสกัดของเหลวที่ได้ไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ (Buchner funnel) โดยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) แล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวที่ได้หลังจากการกรองไปทำให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นโดยการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ rotary evaporator (Heidolph, Germany) ในการระเหยตัวทำละลายจะทำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 40 รอบต่อนาที ในการระเหยตัวทำละลายเฮกเซน อะซิโตน และเมทานอล จะใช้ความดัน 556 335 และ 337 มิลลิบาร์ตามลำดับ จะได้สารสกัดหยาบของตัวทำละลายชนิดต่างๆ นำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

#### 3.5.2 ฤทธิ์ต้านจุลชีพ

##### 3.5.2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรีย เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) โดยวิธี cross streak จนได้โคโลนีเดี่ยว โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเชยโคโลนีเดี่ยวลง Mueller Hinton broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-6 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แขวนลอยมีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5

เชื้อรา เลี้ยงเชื้อรบนอาหาร Sabouraud dextrose Agar (SDA) Slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเติม tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงไปเพื่อทำให้สปอร์หลุดจากเส้นใยของเชื้อราและทำการเจือจางด้วย Normal saline ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ทำการนับสปอร์ให้ได้ 2000 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ Haemocytometer

##### 3.5.2.2 ความเข้มข้นต่ำสุดที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เกิดการยับยั้ง (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ซึ่งใช้ความเข้มข้นของสารสกัดคือ 0.03125-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตาม NCCLS M27-A2 และ 0.27-36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามงานวิจัยของ Tyagi และ Malik เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 15 ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดสอบจะเติมเซลล์แขวนลอยที่มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No 0.5 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารสกัดยูคาลิปตัสความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังการบ่มทำการประเมินค่า MBC โดยขีดเชื้อลงบนอาหาร Mueller Hinton Agar ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม สารละลาย resazurin เข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ซึ่ง resazurin เป็น redox indicator ที่ใช้ทดสอบการมีชีวิตของแบคทีเรียในแต่ละหลุม นำไมโครเพลทไปบ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ใช้การเจริญของแบคทีเรียในอาหาร Mueller Hinton broth ในหลุมสุดท้ายของไมโครเพลทเป็นตัวควบคุมเชิงลบคือไม่มีการเติมสิ่งสกัด

### 3.5.2.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่เกิดการยับยั้งเชื้อรา (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (MFC)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เกิดการยับยั้งเชื้อรา (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (MFC) ความเข้มข้นของสารสกัดคือ 0.03125-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตาม NCCLS M27-A2 และ 0.27-36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามงานวิจัยของ Tyagi และ Malik เติมสารแขวนลอยของสปอร์ของเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เจริญบนอาหาร SDA slant ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารสกัดยูคาลิปตัสความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม นำไมโครเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หลังการบ่มทำการประเมินค่า MFC โดยขีดสารในแต่ละหลุมลงบนอาหาร SDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หลังการบ่มเติมสารละลายความเข้มข้นร้อยละ 3 ของ resazurin ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในไมโครเพลท ซึ่ง resazurin เป็น redox indicator ที่ใช้ทดสอบการมีชีวิตของเชื้อราในแต่ละหลุม นำไมโครเพลทไปบ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ใช้การเจริญของเชื้อราในอาหาร SDA ในหลุมสุดท้ายของไมโครเพลทเป็นตัวควบคุมเชิงลบคือไม่มีการเติมสิ่งสกัด

### 3.5.3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดยูคาลิปตัสต่อเซลล์

เซลล์ที่ใช้ทดสอบได้แก่ Vero, HT-29, MCF-7 และ HepG-2 ในการหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์จะทำการทดสอบขั้นต้น (primary screening) ด้วยวิธี MTT Assay เริ่มจากการละลายสิ่งสกัดโดยชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 0.1 กรัม ใส่ในขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อเพื่อเตรียมเป็น stock จากนั้นทำการละลายตัวอย่างเพื่อเตรียมเป็น stock ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สาร DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 จากนั้นเติมสารละลาย PBS (Phosphate buffer saline, pH 7.4) ให้มีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของ DMSO ใน stock เท่ากับร้อยละ 1 หลังจากนั้นกรองสารละลายตัวอย่างด้วยแผ่นกรองสารขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บเป็น stock เพื่อเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับใช้ทดสอบต่อไป

วิธีการทดสอบจะทำการปลูกเซลล์ Vero จำนวน  $5 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์ HT-29, MCF-7 และ HepG-2 ปลูกเซลล์จำนวน  $1 \times 10^3$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในเพลทชนิด 96 หลุม ปริมาตรเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มเซลล์ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณ CO<sub>2</sub> ร้อยละ 5 นาน 24 ชั่วโมง หลังการบ่มดูดอาหารออกจากแต่ละหลุม จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เมื่อบ่มเซลล์ในสารละลายตัวอย่างครบตามเวลาที่กำหนดคือเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณ CO<sub>2</sub> ร้อยละ 5 นาน 4 ชั่วโมง เมื่อบ่มเซลล์ใน MTT ครบ 4 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT ทิ้ง และเติมสารที่ละลายผลึก Formazan ในที่นี้ใช้ DMSO ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 100 : SDS ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 ในอัตราส่วน 9:1 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ตั้งโปรแกรมเขย่า 5 นาทีก่อนวัดค่าดูดกลืนแสง คำนวณค่าร้อยละ Cytotoxicity ของสารแต่ละชนิด โดยใช้สูตร ต่อไปนี้

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \left[ \frac{A-B}{A} \right] \times 100$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ในสารละลายตัวอย่างแต่ละชนิด ความเข้มข้น 1,000 µg/ml

โดยค่า A และ B จะต้องนำค่าการดูดกลืนแสงของ Blank (ในที่นี้ คือหลุมที่เติมสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 100 และสารละลาย SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ) มาหักลบออกก่อน จากนั้นจึงนำไปคำนวณจากสูตรข้างต้น

### 3.5.4 การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย

#### 3.5.4.1 หาปริมาณกรดฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content)

โดยวิธี Folin-Ciocalteu (Singleton, *et al.*, 1999) ในการเตรียมสารละลาย ของสารสกัดหยาบทำโดยชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 0.1 กรัมละลายในเมทานอล 100 มิลลิลิตร ทำการทดสอบ โดยเริ่มจากการเติมสารละลายของสิ่งสกัดหยาบปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสาร Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติมโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 100 มิลลิลิตรกรัมต่อมิลลิลิตร (เติมหลังจากเติม Folin-Ciocalteu เป็นเวลา 2 นาที) และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยทำในที่มืด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจะแสดงในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสิ่งสกัด

#### 3.5.4.2 การทดสอบ DPPH Scavenging assay

เตรียมสารละลายจากสิ่งสกัดหยาบเฮกเซน อะซีโตน และเมทานอล ความเข้มข้น 0.1 0.25 0.50 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.8 เตรียมสารละลายแอสคอร์บิก (วิตามิน ซี) ความเข้มข้นเดียวกันเพื่อเป็นตัวควบคุมเชิงบวก จากนั้นเตรียม

สารละลาย 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง DPPH 0.007 กรัม ละลายลงในเมทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 99.8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการทดสอบ เริ่มจากเติมสารละลายสิ่งสกัดหยาบลงในขวดทดลองที่บัสแสง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 950 ไมโครลิตรลงไป ปิดฝา และบ่ม ที่ที่บัสแสงนาน 30 นาที หลังการบ่มนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการ ทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยมีสารละลายกรดแอสคอร์บิกเป็นตัวควบคุมเชิงบวก และสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ที่ไม่มีการเติมสารละลายสิ่งสกัดหยาบเป็นสารควบคุมเชิงลบ ทำ การคำนวณ % Inhibition concentration ได้จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition concentration} = \left[ \frac{A-B}{A} \right] \times 100$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

B = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

### 3.5.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

ผลการทดลองวิเคราะห์โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one-way ANOVA) จะได้ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ  $p < 0.05$  ในการทดลองทั้งหมดทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Ver. 14.0

## บทที่ 4

# ผลการวิจัยและอภิปรายผล

### 4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

#### 4.1.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

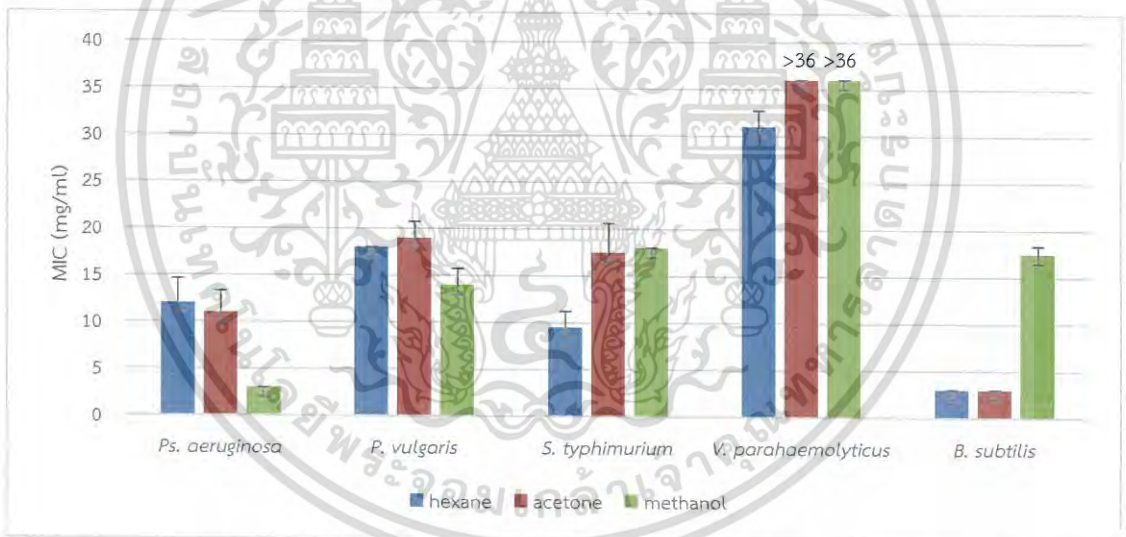
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยสิ่งสกัดหยาบจากตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน อะซิโตน และเมทานอล ซึ่งไล่จากขั้วต่ำไปขั้วสูง ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ได้แก่ เชื้อแกรมลบคือ *Ps. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *S. typhimurium*, *V. parahaemolyticus* เชื้อแกรมบวกคือ *B. subtilis* ด้วยวิธี broth microdilution อ้างอิงโดย NCCLS-27A และวัดการเจริญของเชื้อด้วยวิธี Resazurin (Hussian. et al., 2011)

เมื่อสังเกตจากค่า MIC พบว่าสิ่งสกัดยูคาลิปตัสขั้วต่ำและขั้วกลาง เฮกเซน และอะซิโตน ยับยั้ง *B. subtilis* ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียแกรมลบอีก 4 สายพันธุ์ จึงมีแนวโน้มที่จะทำลายแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้ดีเช่นกันโดยให้ค่าเท่ากับ  $3.0 \pm 0$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สิ่งสกัดยูคาลิปตัสขั้วสูงเมทานอลยับยั้งได้ที่มีความเข้มข้น  $17.5 \pm 0.87$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Badrunnisa และคณะ โดยพบว่า *E. tereticornis* ที่เก็บได้จากประเทศอินเดียโดยสกัดจากเอทานอลสามารถยับยั้ง *Bacillus cereus* และ *Bacillus thuringiensis* ได้โดยใช้ความเข้มข้นของสิ่งสกัด 0.50 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ความเป็นขั้วเพิ่มขึ้นคือสิ่งสกัดจากเมทานอลนั้นยับยั้งได้ไม่ดีเท่าเอทานอลซึ่งเป็นขั้วต่ำกว่า โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 25.00 50.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ( Badrunnisa. et al., 2011 )

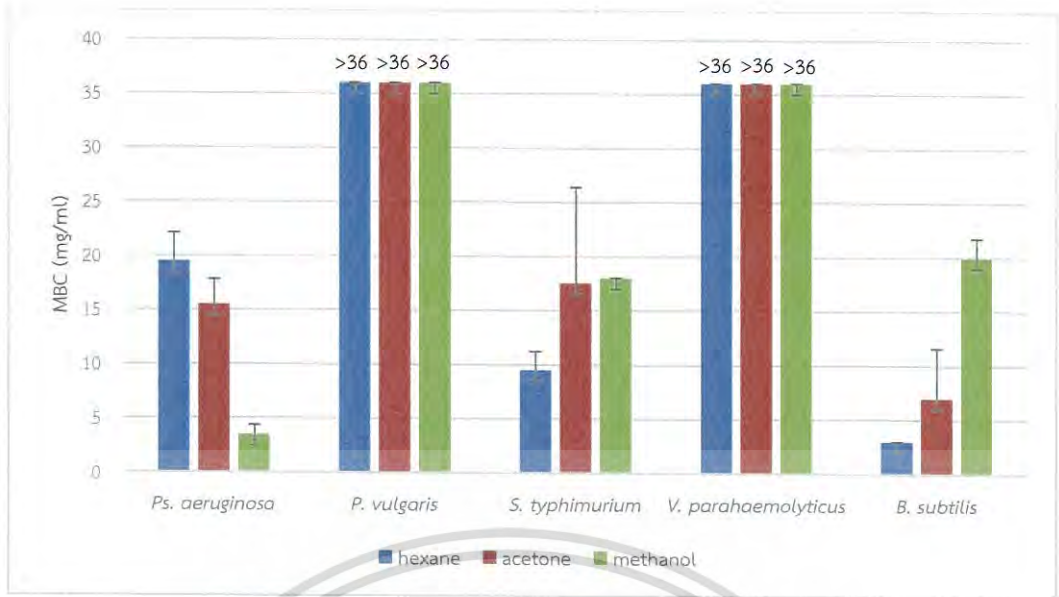
นอกจากนี้ค่า MIC ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบพบว่าสิ่งสกัดยูคาลิปตัสจากเมทานอลขั้วสูงสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบดีกว่าสิ่งสกัดขั้วต่ำโดยดูจาก *Ps. aeruginosa* ( $3.0 \pm 0$ ) ดีกว่า *P. vulgaris* ( $14.0 \pm 1.73$ ) *S. typhimurium* ( $18.0 \pm 0$ ) และ *V. parahaemolyticus* (ไม่สามารถยับยั้งได้) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Elaissi และคณะ พบว่าเมื่อทำการสกัดสิ่งสกัดยูคาลิปตัสด้วยวิธี Hydro-distillation จาก *Eucalyptus odorata* และ *Eucalyptus bicostata* ยับยั้ง *Haemophilus Influenza* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยใช้ความเข้มข้น 0.306 และ 0.331 ตามลำดับได้ดีที่สุด (Elaissi. et al., 2012 ) ขณะที่ *S. typhimurium* ถูกยับยั้งด้วยสิ่งสกัดจากเฮกเซน ( $9.5 \pm 1.73$ ) ได้ดีกว่าสิ่งสกัดขั้วสูง ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dupont และคณะ ที่ได้ทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้ง *S. typhimurium* จากสิ่งสกัดจากน้ำ เมทานอล และเฮกเซน จาก *Eucalyptus olida* และ *Eucalyptus staigerana* ที่เก็บจากนิวกินี ประเทศออสเตรเลีย พบว่าสิ่งสกัดจากเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าสิ่งสกัดขั้วน้ำโดยใช้ความเข้มข้นของสิ่งสกัด 0.125 และ  $> 0.5$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (Dupont. et al., 2006) และพบว่า *V. parahaemolyticus* ถูกยับยั้งได้น้อยสุดจากทุกสิ่งสกัด ผลการทดลองมีความแตกต่างจากงานวิจัยของ Debarma และคณะ โดย *V. parahaemolyticus* ถูกยับยั้งได้ด้วยสิ่งสกัดยูคาลิปตัสจาก *Eucalyptus camaldulensis* ด้วยน้ำที่ความเข้มข้นของสิ่งสกัด 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองมีความแตกต่างกันนี้อาจเป็นเพราะพืชยูคาลิปตัสนั้นไม่ใช่สายพันธุ์เดียวกัน และการสกัดด้วยวิธี

hydro-distillation ซึ่งน้ำนั้นมีความเป็นขี้สูงกว่าตัวทำละลายเมทานอลที่ใช้ในการทดลองนี้ จึงสามารถยับยั้งได้ดีกว่า (Debbarma. *et al.*, 2012)

เมื่อสังเกตจากค่า MBC เห็นว่าสิ่งสกัดจากเฮกเซนซึ่งมีขี้ต่ำสามารถฆ่าแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าสิ่งสกัดจากขี้สูงโดยสังเกตจาก *B. subtilis* แสดงค่า MBC จากการทดสอบด้วยสิ่งสกัดต่างขี้กันเฮกเซน ( $3.0 \pm 0$ ) และ อะซิโตน ( $7.0 \pm 4.6$ ) มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับการศึกษาของ Behbahan และคณะที่ศึกษาการสกัด *E. camaldulensis* ด้วยน้ำ และเอทานอล พบว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลใช้ความเข้มข้นของสิ่งสกัดในการฆ่า *S. aureus* (16 mg/ml) ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่า *E. coli* (64 mg/ml) ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และที่ความมีขี้สูงขี้ที่สกัดด้วยน้ำนั้นมียุทธในการฆ่าแบคทีเรียได้ไม่ตีเท่าโดยใช้ความเข้มข้นของสิ่งสกัดฆ่า *S. aureus* (32 mg/ml) ได้ดีกว่า *E. coli* (256 mg/ml) ตามลำดับ (Behbahani. *et al.*, 2013) ในขณะที่สิ่งสกัดจากเมทานอลที่มีขี้สูงที่สุดสามารถฆ่า *Ps. aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ดีที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Seyyednejad และคณะ โดยทำการสกัด *Eucalyptus microtheca* ที่เก็บจากจังหวัดคุเซสถาน ประเทศอิหร่านด้วยตัวทำละลาย เอทานอล และเมทานอล พบว่าสิ่งสกัดเมทานอลที่มีขี้สูงฆ่าแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าสิ่งสกัดจากเอทานอลที่ขี้ต่ำกว่าโดยดูจาก *Ps. aeruginosa* มีค่า เท่ากับ 8 และ 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (Seyyednejad. *et al.*, 2014)



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



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

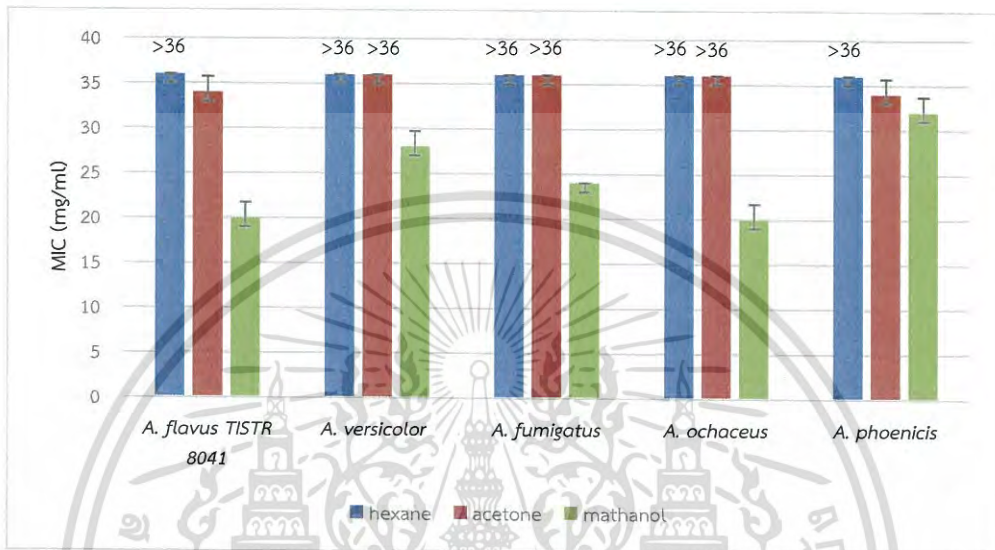
#### 4.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา

จากการทดสอบยับยั้งเชื้อราด้วยสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด คือ เฮกเซน อะซิโตน และเมทานอล ต่อเชื้อเชื้อรา *Aspergillus sp.* 5 สายพันธุ์ได้แก่ *A. flavus* TISTR 8041, *A. versicolor*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus* และ *A. phoenicis* ด้วยวิธี broth microdilution อ้างอิงโดย NCCLS-27A และวัดการเจริญของเชื้อด้วยวิธี Resazurin (Hussian. et al., 2011) และการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นหรือสารแขวนลอยของสปอร์จะอ้างอิงตาม NCCLS-38A2

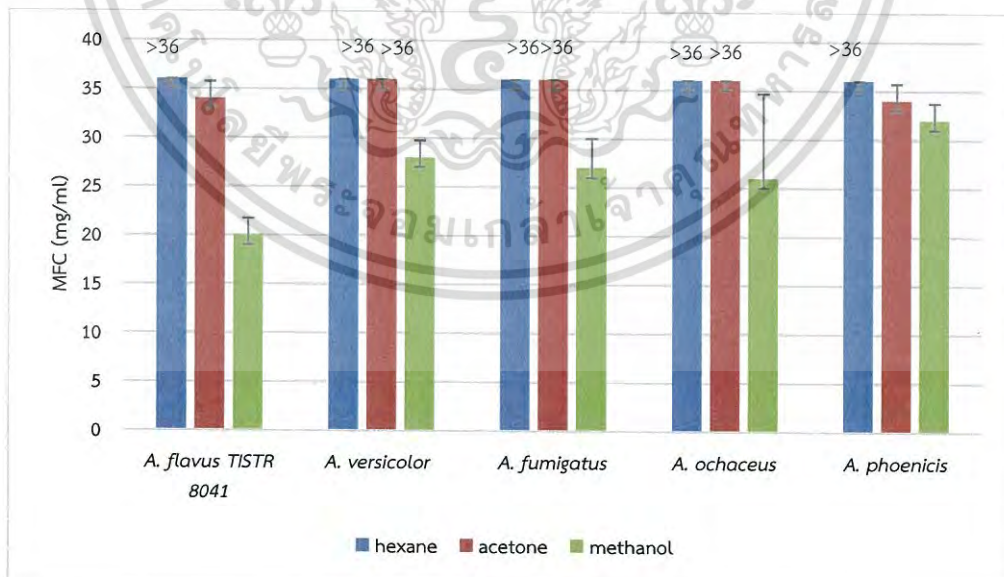
สังเกตค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดที่ใช้ยับยั้งเชื้อราพบว่า สิ่งสกัดยูคาลิปตัสจากตัวทำละลายขั้วสูง (เมทานอล) ยับยั้ง *Aspergillus sp.* ได้ดีกว่าสิ่งสกัดขั้วต่ำโดยดูจาก *A. flavus* TISTR 8041 และ *A. versicolor* ที่ใช้ความเข้มข้นของสิ่งสกัดเมทานอล  $20.0 \pm 1.73$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการยับยั้งการเจริญ ในขณะที่สิ่งสกัดจากเฮกเซนและอะซิโตนนั้นยับยั้งได้ไม่ดีและไม่สามารถยับยั้งได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Safaei-Ghomi และ Abbasi ที่ทำการสกัดพิษยูคาลิปตัสที่ได้จากอิสฟาฮานประเทศอิหร่านด้วยน้ำและคลอโรฟอร์มทำการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus niger* พบว่าสิ่งสกัดด้วยน้ำสามารถยับยั้งเชื้อราได้โดยใช้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ลดความมีขั้วลงโดยใช้สิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มพบว่าไม่สามารถยับยั้ง *A. niger* ได้ (Safaei-Ghomi and Abbasi, 2010)

สังเกตจากค่า MFC พบว่าสิ่งสกัดจากเมทานอลมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราดีที่สุดเมื่อเทียบกับสิ่งสกัดจากตัวทำละลายทั้งหมด โดยฆ่า *A. flavus* TISTR 8041 และ *A. ochraceus* ได้ที่ความเข้มข้น  $20.0 \pm 1.73$  และ  $26.0 \pm 8.66$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Baptista และคณะ ทำการศึกษาฤทธิ์ฆ่าเชื้อราจาก *Eucalyptus smithii* ที่เก็บจากประเทศบราซิล ทำการสกัดด้วยวิธี steam distillation พบว่าใช้ความเข้มข้นของสิ่งสกัดเท่ากับ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้ง *Trichophyton rubrum* CCT 5507 ได้ดีที่สุด (Baptista. et al., 2015) ในขณะที่ลดความมีขั้วของสิ่งสกัดลงมาโดยใช้เฮกเซนและอะซิโตนนั้นมีแนวโน้มการฆ่าเชื้อราได้น้อยมาก จนไม่

สามารถฆ่าได้เลย ค่า MFC มีความแตกต่างกับผลการทดลองของ Behbahani และคณะ ที่ทำการศึกษาลิงสกัดจากพืช *E. camaldulensis* ด้วยน้ำ และเอทานอล พบว่า ลิงสกัดเข้มข้นต่ำกว่าสามารถฆ่า *Penicillium digitatum* PTCC 5251 ได้ดีกว่าสิ่งสกัดเข้มข้น โดยใช้ความเข้มข้นของสิ่งสกัดในการฆ่าเชื้อรา 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สิ่งสกัดจากน้ำใช้ความเข้มข้น 64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลที่แตกต่างกันอาจเกิดจากใช้ยูลิปิดส์ที่ต่างสายพันธุ์กัน และใช้ตัวทำลายที่มีเข้มข้นกว่าตัวทำลายเฮกเซนและอะซิโตนที่ใช้ทำการทดลอง (Behbahani. et al., 2013)



รูปที่ 4.3 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) (mg/ml) ของเชื้อรา 5 สายพันธุ์



รูปที่ 4.4 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (MFC) (mg/ml) 5 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

### 4.2.1 การหาสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu

จากการทำปฏิกิริยาระหว่างสิ่งสกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายกับรีเอเจนต์ Folin-Ciocalteu และโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมในเมทานอล 1 มิลลิลิตร วัดปฏิกิริยาด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร หาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกความเข้มข้น 0 20 40 60 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสิ่งสกัดหยาบจากเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด คือ 44.80 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสิ่งสกัด รองลงมาคือสิ่งสกัดหยาบจากอะซิโตนและเฮกเซน คือ 25.08 และ 23.68 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสิ่งสกัดตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Luis และคณะ โดยทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu จากเนื้อไม้ของพืช *E. globulus* ที่นำมาจากบริเวณเมดิเตอร์เรเนียน ผลการทดลองพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสิ่งสกัดเมทานอล ( $251.00 \pm 5.06$  มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสิ่งสกัด) นั้นมีมากที่สุดเมื่อเทียบกับสิ่งสกัดจากเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 75 ( $218.67 \pm 4.52$  มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสิ่งสกัด) และสิ่งสกัดจากเฮกเซน ( $17.00 \pm 2.55$  มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสิ่งสกัด) (Luis. *et al.*, 2014)

ตารางที่ 4.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Folin-Ciocalteu แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ตัวทำละลาย	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อ กรัมของสิ่งสกัด) $\pm$ SE
Hexane	$23.68 \pm 0.12$
Acetone	$25.08 \pm 0.05$
Methanol	$44.80 \pm 0.13$

### 4.2.2 การหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging

วัดปฏิกิริยาระหว่างสิ่งสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดโดยใช้ 5 ความเข้มข้นคือ 0.1 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของเมทานอล กับ 2mM DPPH เข้มข้นร้อยละ 0.007 กรัมในเมทานอล 100 มิลลิลิตร โดยจะทำการทดสอบในที่มืดเนื่องจาก DPPH จะสูญเสียความเสถียรเมื่อถูกแสง การวัดปฏิกิริยาจะวัดด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

จากการหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสิ่งสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดโดยแสดงค่าความสามารถในการต้านในตารางที่ 4.2 พบได้ว่าสิ่งสกัดจากอะซิโตนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดเมื่อเทียบกับสิ่งสกัดจากเฮกเซนและเมทานอลและดีเกือบเทียบเท่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ Ascorbic acid สอดคล้องกับงานวิจัยของ Luis และคณะ โดยทำการสกัด เนื้อไม้จาก *E. globulus* ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เอทานอล เมทานอลและเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 75 พบว่า สิ่งสกัดเอทานอลซึ่งมีขั้วต่ำกว่าเมทานอลและสูงกว่าเฮกเซนเช่นเดียวกับอะซิโตนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดโดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 9.33 ± 0.61 มิลลิกรัมต่อลิตร สิ่งสกัดจากเฮกเซนและเมทานอลให้ค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 369.29±23.62 และ 10.84 ± 0.23 ตามลำดับ (Luis. *et al.*, 2014)

ตารางที่4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Scavenging แสดงค่า %EC ของสารสกัดหยาบยูคาลิปตัสที่สกัดจากตัวทำละลายต่างๆในแต่ละความเข้มข้น

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	%EC			
	Hexane	Acetone	Methanol	Ascorbic acid
0.1	43.67 <sup>b</sup> ±1.28	75.15 <sup>g</sup> ±2.3	70.1 <sup>f</sup> ±1.25	94.47 <sup>l</sup> ±0.35
0.25	44.46 <sup>b</sup> ±1.12	91.71 <sup>k</sup> ±0.31	77.8 <sup>h</sup> ±0.65	95.14 <sup>lm</sup> ±0.1
0.5	51.7 <sup>c</sup> ±2.93	90.78 <sup>k</sup> ±0.35	85.45 <sup>i</sup> ±0.57	95.18 <sup>lm</sup> ±0.11
0.75	55.66 <sup>d</sup> ±2.51	91.14 <sup>k</sup> ±0.4	88.11 <sup>j</sup> ±3.50	96.52 <sup>lm</sup> ±0.3
1	66.36 <sup>e</sup> ±1.23	91.95 <sup>k</sup> ±0.07	36.37 <sup>o</sup> ±1.13	97.17 <sup>m</sup> ±0.11

แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

อักษรที่แสดงแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

### 4.3 ยับยั้งการเจริญของเซลล์ (Antiproliferation Activity)

ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์ 5 ชนิดโดยเซลล์ปกติคือ เซลล์ไตลิงแอฟริกา (Vero) และเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งตับ (HepG-2) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (HT-29) ด้วยการหาค่าการยับยั้งการเจริญของเซลล์แบบปฐมภูมิ (primary screening) ซึ่งจะใช้เวลาความเข้มข้นของสิ่งสกัดหยาบแต่ละชนิด 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการวัดเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay

จากการหาค่าการยับยั้งการเจริญของเซลล์โดยจะแสดงค่าการยับยั้งการเจริญของเซลล์ในตารางที่ 4.3 พบว่าตัวอย่างสิ่งสกัดจากอะซิโตนที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ทุกชนิดที่ทดสอบ สิ่งสกัดจากเฮกเซนที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ HepG-2 (ร้อยละ 96.03) เท่านั้นแต่ไม่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 24 ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ Vero, HT-29 และ MCF-7 และสารสกัดหยาบจากเมทานอลที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรยับยั้งการเจริญของ HT-29 (ร้อยละ 66.34), MCF-7 (ร้อยละ 86.20) และ HepG-2 (ร้อยละ 50.17) ได้แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ Vero

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bhagat และคณะ ที่ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์โดยสิ่งสกัดจากยูคาลิปตัสสายพันธุ์ *E. citriodora* ด้วย น้ำ เฮกเซน เมทานอล เอทิลอะซิเตต โคลโรฟอร์ม พบว่าสิ่งสกัดจากเฮกเซนความเข้มข้นร้อยละ 100 ยับยั้งการเจริญของเซลล์ HepG-2 ได้ดีกว่าสิ่งสกัดจากเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 100 โดยให้ค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเซลล์เท่ากับ 60 และ 30 ตามลำดับ (Bhagat. *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อความเป็นขั้วของตัวทำละลายที่นำมาสกัดสูงขึ้นจะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-7 ได้มากขึ้นซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Hrubik และคณะ ที่ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 โดยสิ่งสกัดจากยูคาลิปตัสสายพันธุ์ *E. camaldulensis* ด้วยตัวทำละลายบิวทานอล เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำ พบว่าน้ำซึ่งมีความเป็นขั้วสูงที่สุดจะให้ค่า  $IC_{50}$  มากที่สุดรองลงมาคือ เมทานอล เอทิลอะซิเตต และ บิวทานอล ตามลำดับ (Hrubik. *et al.*, 2012) และยังพบว่าสิ่งสกัดจากเมทานอลมีผลในการยับยั้งการเจริญของ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 มากที่สุดคือร้อยละ 66.34

ตารางที่ 4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT แสดงค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบยูคาลิปตัสที่สกัดจากตัวทำละลาย Acetone, Hexane และ Methanol

สิ่งสกัดหยาบยูคาลิปตัส	ความเข้มข้น (µg/ml)	% Cytotoxicity			
		Vero	HT-29	MCF-7	HepG-2
Acetone	1,000	13.92	4.88	-21.88	-1.59
Hexane	1,000	-28.81	6.49	-36.83	96.03
Methanol	1,000	4.38	66.34	86.20	50.17
DMSO	0.1%	3.38	4.60	4.49	0.48

## บทที่ 5

### สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผล

สิ่งสกัดจากใบยูคาลิปตัส สายพันธุ์ *E. tereticornis* ด้วยตัวทำลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน อะซิโตน และเมทานอล ต่อเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ เมื่อสังเกตจากค่า MIC พบว่าสิ่งสกัดยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดและสิ่งสกัดยับยั้งการเจริญของ *S. typhimurium* รองลงมา โดยมีค่า MIC เท่ากับ  $3.0 \pm 0$  และ  $9.5 \pm 1.73$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่าที่ความเข้มข้น 36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสิ่งสกัดยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ได้ จากการสังเกตค่า MBC พบว่าสิ่งสกัดยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด และสิ่งสกัดยับยั้งการเจริญของ *Ps. aeruginosa* ได้รองลงมา โดยมีค่า MBC เท่ากับ  $3.0 \pm 0$  และ  $3.5 \pm 0.87$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และยังพบว่าสารสกัดยับยั้งการเจริญของ *P. vulgaris* และ *V. parahaemolyticus* ที่ความเข้มข้น 36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราพบว่า สิ่งสกัดยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* TISTR 8041 และ *A. versicolor* ได้ดีที่สุดคือมีค่า MIC เท่ากับ  $20.0 \pm 1.73$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยังพบว่าสารสกัดยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* TISTR 8041 และ *A. phoenicis* ซึ่งให้ค่าการยับยั้งน้อยที่สุด คือมีค่า MIC เท่ากับ  $34.0 \pm 1.73$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาตามค่า MFC แล้วพบว่าสิ่งสกัดยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* TISTR 8041 ได้ดีที่สุดโดยใช้ความเข้มข้นของสารต้านเท่ากับ  $20.0 \pm 1.73$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดยับยั้งการเจริญของ *A. phoenicis* ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ  $34.0 \pm 1.73$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่ง นอกจากนี่ยังพบว่าสิ่งสกัดจากตัวทำลายเฮกเซนไม่มีความสามารถในการยับยั้งและฆ่าเชื้อรา ทั้ง 5 สายพันธุ์

จากการทดสอบเพื่อหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมพบว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมของสิ่งสกัดยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* TISTR 8041 ได้ดีที่สุดคือเฮกเซน ซึ่งเท่ากับ 44.80 25.08 และ 23.68 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสิ่งสกัด ตามลำดับ

จากการหาความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระของสิ่งสกัดจากตัวทำลายทั้งสามชนิด พบว่าที่ความเข้มข้นของสิ่งสกัดจากตัวทำลายอะซิโตน 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระมากที่สุดเมื่อเทียบกับสิ่งสกัดจากตัวทำลายอื่น คือมี %EC เท่ากับ  $91.71 \pm 0.31$  แต่มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระได้ไม่ดีเท่ากับตัวควบคุมเชิงบวกทั้ง 5 ความเข้มข้น

จากการหาค่าการยับยั้งการเจริญของเซลล์พบว่าตัวอย่างสิ่งสกัดชั้น อะซิโตน ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทุกชนิดที่ทดสอบ สิ่งสกัดชั้น เฮกเซน ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ HepG-2 (96.03%) แต่ไม่มีฤทธิ์

ยับยั้งการเจริญของเซลล์ Vero, HT-29 และ MCF-7 สิ่งสกัดขึ้น เมทานอล ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ HT-29 (66.34%), MCF-7 (86.20%) และ HepG-2 (50.17%) แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ Vero ได้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการทำการทดลองการสกัดสารสำคัญจากพืชเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ สิ่งสำคัญที่ควรพิจารณาสำหรับการสกัดคือตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เนื่องจากตัวทำละลายที่ต่างกันจะให้สารสำคัญที่ต่างกันและควรคำนึงถึงจุดประสงค์ของงานวิจัยเพื่อเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสม เช่น หากต้องการนำสิ่งสกัดไปผสมยาสำหรับรักษาโรคใน คน หรือสัตว์ ควรพิจารณาเลือกตัวทำละลายที่ไม่มีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ เป็นต้น เนื่องจากในการใช้สิ่งสกัดผสมยาเพื่อรักษานั้นอาจเกิดการตกค้างของตัวทำละลายในคนและสัตว์ได้ นอกจากนี้ในการศึกษาการสกัดพืชสมุนไพรนั้นควรใช้ตัวทำละลายที่หลากหลายเพื่อให้ทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดแต่ละชนิด หรือหากใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียวควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงเพื่อสกัดสารส่วนใหญ่ออกมา และหากพบว่ามียุทธวิธีทางชีวภาพที่ดีก็ควรใช้ตัวทำละลายนี้ในการทดลองครั้งต่อไป โดยนำสิ่งสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายขั้วสูงไปทำการสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำลงมาหรืออาจนำไปแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครโมโตกราฟีเพื่อทราบสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญ

นอกจากนี้ในการทำการสกัดสารจากพืชสมุนไพรควรคำนึงถึงฤดูกาลเก็บเกี่ยว วิธีการเก็บเกี่ยว ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยว สภาพดิน อากาศ ปริมาณน้ำ ชนิดและอัตราส่วนระหว่างอาหารเสริมกับดิน เนื่องจากปัจจัยดังกล่าวเหล่านี้ส่งผลต่อการสร้างสารสำคัญในพืช อีกทั้งสภาพแวดล้อมของพืชยังส่งผลต่อความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหารที่พืชต้องการเพื่อการเจริญเติบโตและสร้างสารสำคัญหลายชนิดดังนั้นการนำพืชแต่ละแหล่งมาทำการสกัดอาจได้ผลการทดลองที่แตกต่างกันไป

ในการสกัดสารสำคัญจากพืชสิ่งสำคัญคือควรเก็บรักษาสารสกัดนั้นไว้ให้พ้นจากแสงเนื่องจากสารสำคัญบางชนิดมีความไวต่อแสงและจะทำให้สูญเสียคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย

## บรรณานุกรม

- เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหนาม. 2554. “อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระแหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา.” *วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์*.1(1) : 57-70.
- เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์. 2553. “การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน.” *สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี*.
- ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญจนบุตร และสาธิต พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. “การทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ.” หน้า 91-101. ใน *งานประชุมวิชาการสัตว์แพทย์ ครั้งที่ 9*. ขอนแก่น.
- พิชญ์อร ไหมสุทธิสกุล. 2547. “Antioxidative Potential and Antioxidant Activity Determination of Plant Extracts.” *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย*. 2(24) : 18-35.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, นิธิยา รัตนาปนนท์. 2559. *Aspergillus*. [Online]. Available : [www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1438/aspergillus](http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1438/aspergillus). เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 พ.ค.59.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, นิธิยา รัตนาปนนท์. 2559. *Bacillus/ บาซิลลัส* [Online]. Available : [www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1226/bacillus-บาซิลลัส](http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1226/bacillus-บาซิลลัส). เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 พ.ค. 59.
- พยุงค์ศักดิ์ ต้นติไพบูลย์วงศ์ และสุรศักดิ์ ใจเขียนดี. 2555. “การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลดีพีพีเอชและการฟอสโฟอินทรีย์เอสบีทีเอส.” หน้า 21-26. ใน *ชลธิชา เทพหนัสน์ (บรรณาธิการ). เทคนิคในการตรวจวัด อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและดัชนีภาวะเครียดออกซิเดชัน, คณะวิทยาศาสตร์ การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ร่วมกับสมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย. บริษัท นพบุรีการ พิมพ์ จำกัด. เชียงใหม่*.
- โรงพยาบาลจุฬารัตน์ 9. 2559. มะเร็งตับ. [Online]. Available : [www.chularatcancercenter.com/cancer\\_type\\_detail.php?cid=7](http://www.chularatcancercenter.com/cancer_type_detail.php?cid=7). เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 พ.ค. 59.
- วิวัฒน์ หวังเจริญ. 2545. “บทบาทของสารประกอบฟีนอลิกต่อสุขภาพ”. *วารสารอาหาร*. 32(4) : 245-253.
- วิทยา บุญวัฒน์. 2554. “ยูคาลิปตัส.” *สารานุกรมสมุนไพรไทย-จีน ที่ใช้บ่อยในประเทศไทย*. หน้า 468.
- สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. 2559. มะเร็งตับ. [Online]. Available : [www.nci.go.th/th/Knowledge/tubcopy.html](http://www.nci.go.th/th/Knowledge/tubcopy.html). เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 พ.ค. 59.
- สาขารังสีรักษาและมะเร็งวิทยา ฝ่ายรังสีวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. 2559. มะเร็งลำไส้ใหญ่. [Online]. Available: [www.chulacancer.net/education-inner.php?id=385](http://www.chulacancer.net/education-inner.php?id=385). เข้าถึงเมื่อวันที่ 8 พ.ค. 59.

- สำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สวนจิตรลดา. 2559. สรรพคุณสมุนไพรแบ่งตามกลุ่มอาการ. [Online]. Available: [http://www.rspg.or.th/plants\\_data/herbs/](http://www.rspg.or.th/plants_data/herbs/) . เข้าถึงเมื่อวันที่ 12 พ.ค. 59
- อรอนงค์ พริงสุลกะ. 2555. จุลชีววิทยาทางการแพทย์: แบคทีเรียก่อโรค. กรุงเทพฯ : จรัสสินทวงศ์ การพิมพ์.
- อิสยา จันทรวิธานุชิต และ วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์. 2556. แบคทีเรียทางการแพทย์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เอี่ยมแซ สุขประเสริฐ. 2554. “Cancer Therapy.” หน้า 25-26. ใน เอกสารประกอบการบรรยายการประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง “Workshop and Traineeship for Oncology Pharmacy Practitioners 2011.” ขอนแก่น.
- Al-Sayed, E. Singab, A. Ayoub, N. Martiskainen, O. Sinkkonen, J. Pihlala, K. 2012. “HPLC–PDA–ESI–MS/MS profiling and chemopreventive potential of *Eucalyptus gomphocephala* DC.” *Food Chemistry*. 133 : 1017-1024.
- Apel, K. and Hirt, H. 2004. “Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction.” *Annual Review of Plant Biology*. 55 : 373–399.
- Aryal, S. 2015. Thiosulfate-Citrat-Bile Salt-Sugar (TCBS) Agar-Composition Principle, Use, Preparation and Colony Morphology. [Online]. Available : [www.microbiologyinfo.com/thiosulfate-citrate-bile-salts-sucrose-tcbs-agar-composition-principle-uses-preparation-and-colony-morphology](http://www.microbiologyinfo.com/thiosulfate-citrate-bile-salts-sucrose-tcbs-agar-composition-principle-uses-preparation-and-colony-morphology). เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 พ.ค. 59.
- Ashour, H.M. 2008. “Antibacterial, antifungi and anticancer activities of volatile oils and extracts from stems leaves and flowers of *Eucalyptus sideroxylon* and *Eucalyptus torquata*.” *Cancer Biology & Therapy*. 1555-8576.
- ATCC. 2014. Ver0. [Online]. Available : <http://www.atcc.org/products/all/CCL-81.aspx#documentation>. เข้าถึงเมื่อวันที่ 12 พ.ค. 59.
- Bachheti, R.K. Joshi, A. Singh, A. 2011. “Oil Content variation and Antimicrobial activity Of *Eucalyptus* leaves oils of three different Species of Dehradun, Uttarakhand, India.” *International Journal of ChemTech Research*. 2(3) : 625-628.
- Badrunnisa, S. Pai, V.R. Shantaram, M. 2011. “Antibacterial activity of *Eucalyptus tereticornis* extracts for in use coolants of steel industry.” *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2(4) : 1789-1794.

- Baptista, E.B. Zimmermann-Franco, D.C. Lataliza, A.A.B. Raposo, N.R.B. 2015. "Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Eucalyptus smithii* against dermatophytes. Revista da Sociedade." *Brasileira de Medicina Tropical*. 48(6) : 746-752.
- Behbahani, B.A. Yazdi, F.T. Mortazavi, A. Zendeboodi, F. Gholian, M.M. Vasiee, A. 2013. "Effect of aqueous and ethanol extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms in vitro." *Journal of Paramedical Sciences (JPS)*. 4(3) : 2008-4978.
- Bhagat, M. Sharma, V. Saxena, A.K. 2012. "Anti-Proliferation effect of leaf extracts of *Eucalyptus citriodora* against human cancer *in vitro* and *in vivo*. Indian." *Journal of Biochemistry and Biophysics*. 49 : 451-457.
- Boland, D.J. Brooker, M.I.H. Chippendale, G.M. Hall, N. Hyland, B.P.M. Johnston, R.D. Kieining, D.A. Turner, J.D. 1984. *Forest Trees of Australia*. 4<sup>th</sup> ed. Collingwood : CSIRO.
- Brooker, M.I.H. and Kleinig, D.A. 2004. *Field guide to Eucalypts*. 2<sup>nd</sup> ed. Melbourne : Bloomings Books.
- Bruneton, J. 1995. *Pharmacognosy, phytochemistry of medicinal plants*. Paris : Lavoisier Publishing.
- Burch, K. 2016. *Aspergillus phoenicis* colony. [Online]. Available : [www.studyblue.com/notes/n/kelly-burch-okstate-edu/deck/16947558](http://www.studyblue.com/notes/n/kelly-burch-okstate-edu/deck/16947558). เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 พ.ค. 59.
- Celedonian Science Press. 2016. *Lycopene*. [Online]. Available : [www.lycocard.com/index.php/lyco\\_pub/disease](http://www.lycocard.com/index.php/lyco_pub/disease). เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 พ.ค. 59.
- Cimanga, K. Kambu, K. Tona, L. Apers, S. De Bruyne, T. Hermans, N. Totte, J. Pieters, L. Vlietinck, A.J. 2002. "Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo." *Journal of Ethnopharmacology*. 79 : 213-220.
- Debbarma, J. Kishore, P. Nayak, B.B. Kannuchamy, N. Gudipati, V. 2012. "Antibacterial activity of ginger, Eucalyptus and sweet orange peel essential oils on fish-borne bacteria." *Journal of Processing and Preservation*. 1745-4549.
- Department of Biochemistry and Microbiology SEBS. 2004. *Valgarisflag*. [Online]. Available : [www.rci.rutgers.edu/~microlab/CLASSINFO/IMAGESCI/vulgarisflag.htm](http://www.rci.rutgers.edu/~microlab/CLASSINFO/IMAGESCI/vulgarisflag.htm). เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 พ.ค. 59.
- Dupont, S. Caffin, N. Bhandari, B. Dykes, G.A. 2006. "In vitro antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria." *Food control*. 17(2006) : 929-932.

- Elaissi, A. Rouis, Z. Salem, N.A.B. Mabrouk, S. Salem, Y.B. Salah, K.B.H. Aouni, M. Farhart, F. Chemli, R. Harzallah-Skhiri, F. Khouja, M.L. 2012. "Chemical composition of 8 *eucalyptus* species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities." *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12(18) : 1472-6882.
- Fungal Research Trust. 2013. *Aspergillus flavus*. [Online]. Available : [www.aspergillus.org.uk/images/species?&page=8](http://www.aspergillus.org.uk/images/species?&page=8) เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 พ.ค. 59.
- Ghisalberti, E.L. 1996. "Bioactive acylphloroglucinol derivatives from *Eucalyptus* species." *Phytochemistry*. 41 : 7-22.
- Halliwel, B. 1996. "Antioxidants in human health and disease." *Annual Review of Nutrition*. 16 : 33-50.
- Hamilton, N. 2016. *Aspergillus versicolor*. [Online]. Available : [old.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?secure/speciesdatabase/versicolor.php~mai](http://old.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?secure/speciesdatabase/versicolor.php~mai) เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 พ.ค. 59.
- Hrubik, J.D. Kaisarevic, S.N. Glisic, B.D. Jovin, E.D. Mimica-Dukic, N.M. Kovacevic, R.Z. 2012. "Myrtus communis and *Eucalyptus camaldulensis* cytotoxicity on breast cancer cells." *Matica Serbian in the natural sciences*.123 : 65-73.
- Hussian, A.I. Anwar, F. Nigam, P.S. Sarker, S.D. Moore, J.E. Rao, J.R. Mazumdar, A. 2011. "Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth." *LWT - Food Science and Technology*. 44 : 1199-1206.
- Hassine, D.B. Abderrabba, M. Yvon, Y. Lebrihi, A. Mathieu, F. Couderc, F. Bouajila, J. 2012. "Chemical Composition and *in Vitro* Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Eucalyptus gillii* Essential Oil and Extracts." *Molecules*. 17:9540-9558.
- Islam, F. Khatun, H. Ghosg, H. Ali, M. Khanum, J. 2012. "Bioassay of *Eucalyptus* extract for anti-cancer activity against Ehrlich ascites carcinoma (eac) cells in Swissalbino mice." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(5) : 394-398.
- Japan Food Research Laboratories. 2011. HT29 cell growth inhibition test. [Online]. Available : [www.jfrr.or.jp/item/functionality/ht29.html](http://www.jfrr.or.jp/item/functionality/ht29.html) เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 พ.ค. 59.
- Kaiser, D. 2013. *Pseudomonas aeruginosa*. [Online]. Available : <https://germsandworms.wordpress.com/microbes/nonfermentative-bacilli/pseudomonas-aeruginosa/> เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 พ.ค. 59.
- Kahkpnen, M.P. Hopia, A.I. Vuorela, H.J. Rauha, J.P. Pihlaja, K. Kujala, T.S. Heinonen, M. 1999. "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47.: 3954-3962.
- Kaur, S. Singh, H. P. Batish, D.R. Kohli, R.K. 2010. "Chemical characterization and

allelopathic potential of volatile oil of *Eucalyptus tereticornis* against *Amaranthus viridis*.” *Journal of plant interactions*. 6(4) : 297-302.

Kaur, S., Singh, H. P., Batish, D.R. Kohli, R.K. 2011. “Chemical characterization, Anti-oxidant and antifungal activity of essential oil from *Eucalyptus tereticornis*.” *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(19) : 4788-479.

Kurokawa, K.. 2003. *Vibrio parahaemolyticus*. [Online]. Available : [genome.bio.titech.ac.jp/bacteria/vpara](http://genome.bio.titech.ac.jp/bacteria/vpara). เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 พ.ค. 59.

Lawrence Evans. 2016. **Beta Carotene**. [online]. Available: <http://www.newdruginfo.com/pharmacopeia/usp28/v28230/usp28nf23s0m8730.htm>. เข้าถึงเมื่อวันที่ 12 พ.ค. 59

Liu, X. Zhao, M. Wang, J. Yang, B. Jiang, Y. 2007. “Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China.” *Journal of Food Composition and Analysis*. 21 : 219–228.

Luis, A. Neiva, D. Pereira, H. Gominho, J. Domingues, F. Duarte, A.P. 2014. “Stumps of *Eucalyptus globulus* as a Source of Antioxidant and Antimicrobial Polyphenols.” *Molecules*. 19 : 16428-16446.

MicrobitosBlog. 2011. *Bacillus subtilis* 1. [Online]. Available: [microbitos.wordpress.com/2010/06/14/morfologiacolonialbacteriana/bacillus-subtilis1/](http://microbitos.wordpress.com/2010/06/14/morfologiacolonialbacteriana/bacillus-subtilis1/). เข้าถึงเมื่อวันที่ 8 พ.ค. 59.

MRSA TODAY. 2016. *Proteus mirabilis* and *vulgaris*. [Online]. Available : [www.mrsa-today.com/proteus-mirabilis-vulgaris](http://www.mrsa-today.com/proteus-mirabilis-vulgaris). เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 พ.ค. 59.

My Bio Source. 2016. MCF-7/Luc Cell Line. [Online]. Available : [http://www.mybiosource.com/prods/Cell-Line/MCF-7-Luc/datasheet.php?products\\_id=168974](http://www.mybiosource.com/prods/Cell-Line/MCF-7-Luc/datasheet.php?products_id=168974). เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 พ.ค. 59.

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

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

New World Encyclopedia. 2016. **Vitamin A**. [Online]. Available : [www.newworldencyclopedia.org/entry/Vitamin\\_A](http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Vitamin_A). เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 พ.ค. 59.

New World Encyclopedia. 2016. **Vitamin C**. [Online]. Available : [www.newworldencyclopedia.org/entry/Vitamin\\_C](http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Vitamin_C). เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 พ.ค. 59.

New World Encyclopedia. 2016. **Vitamin E**. [Online]. Available : [www.newworldencyclopedia.org/entry/Vitamin\\_E](http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Vitamin_E). เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 พ.ค. 59.

Ouweland, A.C. Tiihonen, K. Kettunen, H. Peuranen, S. Schulze, H. Ruatonen, N. 2010.

“*In vitro* Effects of essential oils potential pathogens and beneficial members of  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา 32 ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- the normal microbiota.” *Veterinari Medicina*. 55(2) : 71-78.
- Pieniz, S. Colpo, E. Oliveia, V.R. Estefanel, V. Andrezza, R. 2009. “Avaliação *in vitro* do potencial antioxidante de frutas e hortaliças.” *Ciência e Agrotecnologia*. 33(2) : 552-559.
- Pokorny, J. Yanishlieva, N. Gordon, M. 2001. **Antioxidants in food**. New York : CRC Press.
- Rajendran, P. Nandakumar, N. Rengarajan, T. Palaniswami, R. Gnanadhas, E.N. Lakshminarasiah, U. Gopas, J. Nishigaki, L. 2014. “Antioxidants and human disease.” *Clinica Chimica Acta*. 436 : 332-347.
- Sánchez-Moreno, C. 2002. “Method used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems.” *Food science and Technology International*. 8(3) : 121-137.
- Science Photo Library. 2013. *Serovar Typhimurium Photographs*. [Online]. Available : [fineartamerica.com/featured/salmonella-typhimurium-bacterium-sem-.html](http://fineartamerica.com/featured/salmonella-typhimurium-bacterium-sem-.html). เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 พ.ค. 59.
- Seyyednejad, S.M. Motamedi, H. Najvani, F.D. Hassannejad, Z. 2014. “Antibacterial Effect of *Eucalyptus microtheca*.” *Int Enteric Pathong*. 2(2) : 16515.
- Safaei-Ghomi, J. and Ahd, A.A. 2010. “Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. Pharmacognosy.” *Magazine*. 6(23) : 172-175.
- Silva, J. Abebe, W. Sousa, S.M. Duarte, V.G. Machado, M.I.L. Matos, F.J.A. 2003. “Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*.” *Bioresource Technology*. 89 : 277–283.
- Singleton, V.L. Orthofer, R. Lamuela-Raventos, R.M. 1999. “Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent.” *Methods of Enzymology*. 299 : 152–178.
- Srisawat, T. Chumkaew, P. Heed-Chim, W. Sukpondma, Y. Kanokwiroon, K. 2013. “Phytochemical Screening and Cytotoxicity of Crude extracts of *Vatica diospyroides* Symington Tpye LS.” *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 12(1) : 72-76.
- Sivaraj, A. Devagnanaropan, J. Sureshkumar, S. Senthilkumar, B. 2015. “Antibacterial potential of selective aqueous plant extracts against *Vibrio parahaemolyticus*.” *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2321-3086.
- Slavin, J. 2003. “Why whole grains are protective:biological mechanisms.” *The Proceedings of Nutrition Society*. 62(1) : 129-134.
- Temple, N.J. 2000. “Antioxidants and disease: More question than answer.” *Nutrition Research*. 20(3) : 449-459.

- Thiru, A. 2015. *Characteristics of Aspergillus*. [Online]. Available : biologyoftfeb.blogspot.com/2015/05/aspergillus.html. เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 พ.ค. 59.
- Trust. 2013. *Aspergillus ochraceus*. [Online]. Available: www.aspergillus.org.uk/images/species?&page=14. เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 พ.ค. 59.
- Tyaki, A.K. Malik, A. 2011. "Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms." *Food Chemistry*. 126 : 228-235.
- Tsai, T.H. Tsai, P.J. Ho, S. 2005. "Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Several Commonly Used Spices." *Journal of Food Science*. 70(1) : 93-97.
- Uppu, R.M. Murthy, S.N. Pryor, W.A. Parinandi, N.L. 2010. "In Vitro Imaging of Free Radicals and Oxygen." *Free Radicals and Antioxidant Protocols*. 610 : 3.
- Young, I.S. Woodside, J.V. 2001. "Antioxidation in health and disease." *Journal of Clinical Pathology*. 54(3) : 176-186.
- Yu, J. Wang, L. Walzem, R.L. Miller, E.G. Pike, L.M. Patil, B.S. 2005. "Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6) : 2009-2014.
- Wistreich. 2011. *Gram-stained preparation of Bacillus subtilis*. [Online]. Available:www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=7841. เข้าถึงเมื่อวันที่ 8 พ.ค. 59.
- Zhou, Z.Q. 2012. *Citrus fruits nutrition*. Beijing : Science Press.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 35 ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1.1 Mueller Hinton Agar (MHA) (SRL, India)

Beef infusion	300	กรัม
Casein hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	30	กรัม
น้ำกลั่นปราศจากไอออน	1,000	มิลลิลิตร

ใช้อาหาร MHA สำเร็จรูปปริมาณ 31 กรัม สามารถเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อได้ปริมาตร 1 ลิตร โดยละลายผงอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

#### 1.2 Sabouraud dextrose Agar (SDA) (SRL, India)

Dextrose	40	กรัม
Peptone	10	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่นปราศจากไอออน	1,000	มิลลิลิตร

ใช้อาหาร MHA สำเร็จรูปปริมาณ 20 กรัม สามารถเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อได้ปริมาตร 1 ลิตร โดยละลายผงอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

### 2. การเตรียมสารเคมี

#### 2.1 Phosphate Buffer Saline pH 7.4

สารละลาย A : เตรียม 0.05M dibasic sodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 7.80 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 1 ลิตร

สารละลาย B : เตรียม 0.05M monobasic sodium phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 8.90 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 1 ลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ในอัตราส่วน 40.50 : 9.50 มิลลิลิตร

## 2.2 การเตรียมสารละลาย McFarland Standard No 0.5

เตรียมสารละลาย แบเรียมคลอไรด์ ( $BaCl_2$ ) ความเข้มข้น 0.048 โมลต่อลิตรจากนั้นเตรียมสารละลาย กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.18 โมลต่อลิตร นำสารละลายทั้งสองชนิดข้างต้นที่เตรียมแล้วมาผสมกันโดยเติม แบเรียมคลอไรด์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร

## 2.3 การเตรียมสารละลายเรชาซูริน

เตรียมน้ำกลั่นขนาด 50 มิลลิลิตรใส่ในขวดสำหรับเตรียมอาหาร ปิดฝาให้แน่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอัตโนมัติ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นใส่เรชาซูรินจำนวน 1 เม็ดลงไปลงในขวดน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อขณะที่น้ำยังอุ่นอยู่ปิดฝาให้แน่นและทำการเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ควรเก็บสารที่เตรียมแล้วให้พ้นแสง และควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการใช้งาน

## 2.4 การเตรียมสารละลาย MTT

เติม MTT ปริมาตร 50 มิลลิกรัม ละลายใน PBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นของสารละลาย MTT เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลาย MTT ด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร ใส่ลงในขวด vial ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว ปิดหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์เพื่อป้องกันสารละลาย MTT ทำปฏิกิริยากับแสง เก็บที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}C$  องศาเซลเซียสพร้อมใช้งาน

## 2.5 การเตรียมสารสำหรับละลายผลึก Formazan

ทำการผสม DMSO กับ SDS เข้มข้นร้อยละ 10 โดยใช้อัตราส่วนผสมระหว่าง DMSO : SDS เป็น 9 : 1

## 2.6 การเตรียมน้ำเกลือ เข้มข้นร้อยละ 0.85

ชั่ง NaCl ปริมาณ 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งอัตโนมัติ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ควรเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

# ภาคผนวก ข

## 1. เชื้อแบคทีเรีย

### 1.1 *Bacillus subtilis*

#### 1.1.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Class: bacilli

Order: bacilliales

Family: bacillaceae

Genus: *Bacillus*

Species: *B. subtilis*



รูปภาคผนวก ข ที่ 1 *B. subtilis*

ที่มา:<http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=7841>

[8/5/2559]

### 1.1.2 ลักษณะทั่วไป

มีรูปร่างเป็นท่อน (rod หรือ bacilli) ย้อมติดสีแกรมบวกของคริสตัลไวเลต (Gram Positive) เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟกเจลลา ต้องการออกซิเจน(aerobe)หรือเฟคัลเททีฟแอนแอโรบส์ (facultative anaerobes) ในการเจริญ มีการสร้างสปอร์ที่บริเวณโคนปลายของเซลล์ (subterminal spore forming) เชื้อมีการเจริญได้ดีที่สภาวะแวดล้อมทั่วไประหว่างอุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงทั่วไปด้วยเช่นกัน การทดสอบทางชีวเคมีพบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดส แคทาเลส สร้างอินดอล ริติวส์ในเตรต ย่อยสลายแป้งได้ (อิสยา, 2556)

### 1.1.3 แหล่งที่พบ

พบได้ทั่วไปในธรรมชาติเช่น ดิน น้ำ อากาศ ฝุ่นละออง เนื่องจากมีการสร้างสปอร์จึงสามารถทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดี พบบ่อยในอาหารจำพวกแป้ง เช่น ข้าว ก๋วยเตี๋ยว บะหมี่ ขนมปัง เป็นต้น

### 1.1.4 ความสำคัญในอุตสาหกรรม

เมื่อมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ในอาหารจำพวกขนมปังหรือวัตถุดิบสำหรับผลิตขนมปังจะทำให้เกิดการเน่าเสียโดยจะย่อยสลายแป้ง ทำให้มีลักษณะเหนียวติดกัน ยืดเป็นเส้นใย มีกลิ่นเหม็น ส่วนมากมักเกิดการปนเปื้อนจากวัตถุดิบเพื่อผลิตขนมปัง เช่น แป้งสาลี



รูปภาคผนวก ข ที่ 2 *B. subtilis* บนอาหาร Nutrient Agar

ที่มา: <https://microbitos.wordpress.com/2010/06/14/morfologia-colonial-bacteriana/bacillus-subtilis1/> [8/5/2559]

## 1.2 *Proteus vulgaris*

### 1.2.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: *Proteus*

Species: *P. vulgaris*



รูปภาคผนวก ข ที่ 3 *P. vulgaris* กำลังขยาย 1000x

ที่มา: <http://www.rci.rutgers.edu/~microlab/CLASSINFO/IMAGESCI/vulgarisflag.htm>  
[9/5/2559]

### 1.2.2 ลักษณะทั่วไป

แบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟกเจลลา แบบเพอร์ริตริกซ์หรือมีแฟกเจลลาทั่วทั้งเซลล์ ความต้องการออกซิเจนในการเจริญเป็นแบบเฟคาลเททีฟแอนแอโรบส์ (Facultative anaerobes) จากการศึกษาด้านชีวเคมีพบว่าสามารถย่อยน้ำตาล สร้างกรดและแก๊ส รีดิวซ์ไนโตรเจน สร้างอินดอล สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ได้ซึ่งการสร้างอินดอลนำมาเป็นตัวบ่งชี้ความแตกต่างระหว่าง *P. vulgaris* และ *P. mirabilis* ได้

### 1.2.3 การก่อโรค

มักพบการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในกระแสเลือด ปอดบวม รวมทั้งแผลเฉพาะที่ในผู้ป่วยที่อ่อนแอ หรือผู้ป่วยที่ได้รับสารน้ำทางสายเลือด เป็นเชื้อที่ก่อโรครองลงมาจาก *P. mirabilis* โดยจะสร้างเอนไซม์ยูรีเอส ซึ่งจะทำให้เกิดการย่อยสลายยูเรียในปัสสาวะและปล่อยแอมโมเนียออกมาอย่างรวดเร็ว ทำให้ปัสสาวะมีความเป็นเบสและกระตุ้นการสร้างก้อนนิ่ว (อรอนงค์, 2555)



รูปภาคผนวก ข ที่ 4 *P. vulgaris* การแผ่นบนผิวหนังอาหารแข็ง  
ที่มา: <http://www.mrsa-today.com/proteus-mirabilis-vulgaris/> [9/5/2559]

### 1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

#### 1.3.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom: Bateria

Phylum: Proteobacteria

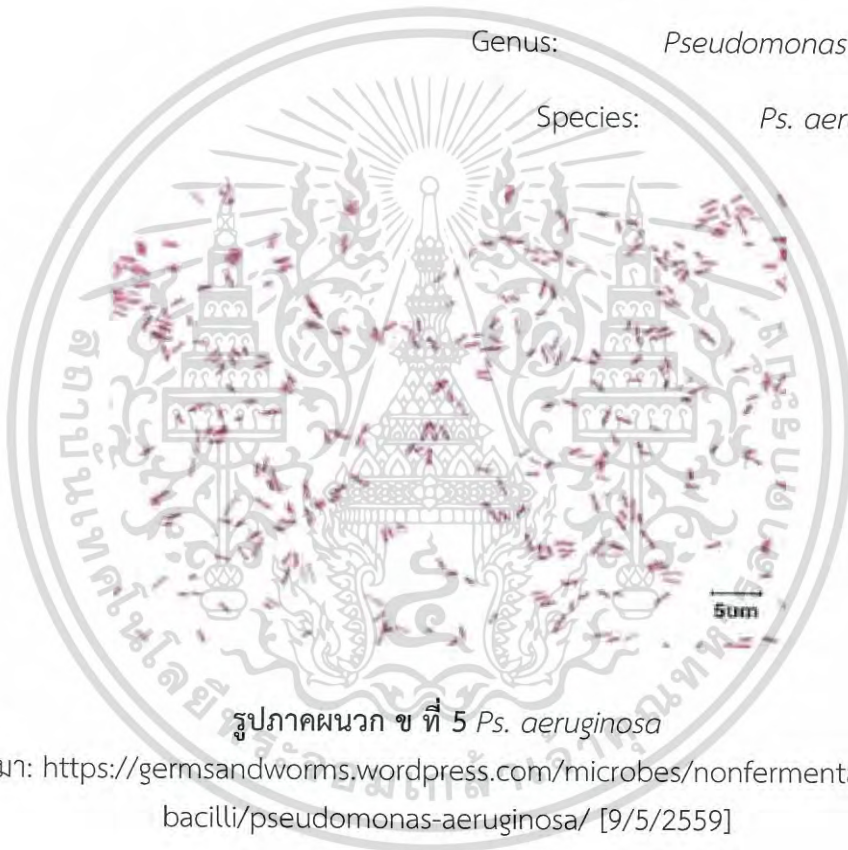
Class: GammaProteobacteria

Order: Pseudomonadales

Family: Pseudomonadaceae

Genus: *Pseudomonas*

Species: *Ps. aeruginosa*



รูปภาคผนวก ข ที่ 5 *Ps. aeruginosa*

ที่มา: <https://germsandworms.wordpress.com/microbes/nonfermentative-bacilli/pseudomonas-aeruginosa/> [9/5/2559]

#### 1.3.2 ลักษณะทั่วไป

เป็นเชื้อรูปท่อนขนาดประมาณ 0.6x2 ไมโครเมตร สามารถเคลื่อนที่ได้ ติดสีแกรมลบ (Gram negative) มักพบลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่หรือบางครั้งต่อกันเป็นสายสั้นๆ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37-42 องศาเซลเซียส จากการศึกษาด้านชีวเคมีพบว่าผลิตเอนไซม์ออกซิเดส ไม่สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตได้ มีการสร้างสารสีเขียวฟลูออเรสเซนต์เรียกว่า Pyocyanin

### 1.3.3 แหล่งที่พบ

พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติและมักพบในบริเวณที่มีความชื้นในโรงพยาบาล ดำรงชีวิตแบบ saprophyte เชื้อสามารถก่อโรคได้ในคนที่มีภูมิคุ้มกันผิดปกติ

### 1.3.4 การก่อโรค

เชื้อจะเข้าสู่ผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันผิดปกติบริเวณ เยื่อเมือก ผิวหนังที่มีการฉีกขาด เชื้อจะเข้าไปสร้างโคโลนีจากนั้นจะเกิดการบุกรุกเฉพาะที่และก่อให้เกิดโรคกระจายไปทั่วร่างกาย กระบวนการเหล่านี้จะเกิดจากพิไล (Pili) ที่ยื่นออกมาจากเซลล์ซึ่งช่วยในการเกาะกับ epithelial cell ส่วน exopolysaccharide จะทำให้เกิดเป็นลักษณะเมือกเยิ้ม ทั้งนี้เชื้อ *Ps. aeruginosa* หลายสายพันธุ์สามารถสร้าง exotoxin A ซึ่งทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อและทำให้เกิดการตายในสัตว์เมื่อฉีดในรูปที่ทำให้บริสุทธิ์ อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อนี้นั้นจะมีลักษณะเป็นแผลหรือแผลไฟไหม้ โดยจะเกิดเป็นหนองสีเขียว-น้ำเงิน ถ้าเกิดการติดเชื้อเข้าที่บริเวณเอวจะเกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ถ้าติดเชื้อจากสายหรือท่อสวนจะทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินปัสสาวะ หรือติดเชื้อในระบบหายใจจะก่อให้เกิดโรคปอดบวม



รูปภาคผนวก ข ที่ 6 ลักษณะโคโลนีและการสร้างสารสีของ *Ps. aeruginosa*  
ที่มา: <http://www.biomedhs.com/product6.php> [9/5/2559]

## 1.4 *Salmonella typhimurium*

### 1.4.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: *Salmonella*

Species: *S. typhimurium*



รูปภาคผนวก ข ที่ 7 ลักษณะทั่วไปของ *S. typhimurium*

ที่มา: <http://fineartamerica.com/featured/salmonella-typhimurium-bacterium-sem-.html>[9/5/2559]

### 1.4.2 ลักษณะทั่วไป

แบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาแบบเพอร์ริติคัสหรือมีแฟลกเจลลาทั่วทั้งเซลล์ ความต้องการออกซิเจนในการเจริญเป็นแบบเฟคาลเททีฟแอนแอโรบอส (Facultative anaerobes) อาศัยอยู่ในลำไส้ของทั้งคนและสัตว์ จากการศึกษาทางชีวเคมีพบว่า สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสกับซูโครส สร้างเอนไซม์แคทาเลส รีติวซีไนโตรเจน ย่อยไลซีนด้านหมู่คาร์บอกซิล เป็นต้น

### 1.4.3 แหล่งที่พบ

จะอาศัยอยู่ตามทางเดินอาหารบริเวณลำไส้ส่วนลูเมนของสัตว์ต่างๆ เช่น นก สัตว์เลี้ยงคาน สัตว์เลี้ยง คน แม้ว่าแหล่งที่พบของเชื้อจะเป็นลำไส้ของสิ่งมีชีวิตแต่บ่อยครั้งจะพบได้ส่วนต่างๆของร่างกาย ทั้งนี้ยังมีการแพร่กระจายของเชื้อเป็นวงกว้างจากอุจจาระของสัตว์ในแหล่งน้ำที่มีความสกปรก และในอาหารที่มีแมลงวันตอม เมื่อคนหรือสัตว์บริโภคน้ำที่มีเชื้อเข้าไปก็จะแสดงอาการของเชื้อออกมา

### 1.4.4 การก่อโรค

เชื้อ *S. typhimurium* เป็นสาเหตุของโรค gastroenteritis ในทั้งคนและสัตว์ เมื่อได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายเชื้อจะเข้าทำลายบริเวณผิวหน้าของเซลล์ลำไส้ตรง microvilli ส่งผลให้เกิดอาการอุจจาระร่วง



รูปภาคผนวก ข ที่ 8 ลักษณะโคโลนีของ *S. typhimurium* บนอาหาร SS agar  
ที่มา: <http://www.eolabs.com/salmonella-shigella-agar-modified.html>[9/5/2559]

## 1.5 *Vibrio parahaemolyticus*

### 1.5.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

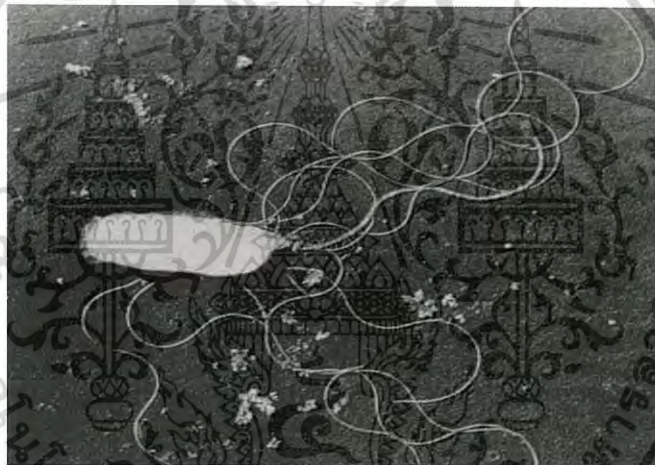
Class: Gammaproteobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: vibriionales

Genus: *Vibrio*

Species: *V. parahaemolyticus*



รูปภาคผนวก ข ที่ 9 ลักษณะทั่วไปของ *V. parahaemolyticus* ภายใต SEM  
ที่มา: [http://genome.bio.titech.ac.jp/bacteria/vpara/\[9/5/2559\]](http://genome.bio.titech.ac.jp/bacteria/vpara/[9/5/2559])

### 1.5.2 ลักษณะทั่วไป

ติดสีแกรมลบ (Gram negative) รูปท่อนแบบ comma-shaped คือมีลักษณะเป็นท่อนโค้งเคลื่อนที่ได้ด้วย polar-flagella จัดว่าเป็นแบคทีเรียที่ชอบเค็ม เมื่อเลี้ยงบนอาหาร TCBS agar (thiosulfate-citrate-bile-sucrose) จะมีลักษณะโคโลนีสีเขียวทึบแสง เนื่องจากไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ ต้องการออกซิเจนในการเจริญแบบเฟคัลเททีฟแอนแอโรบส์ (facultative anaerobes) โดยทั่วไปสามารถเจริญได้ดีที่ pH สูง (8.5-9.5) และสามารถทำลายได้อย่างรวดเร็วด้วยกรดหรือความร้อน

### 1.5.3 การก่อโรค

เป็นเชื้อก่อให้เกิดโรคอาหารทะเลเป็นพิษ มักเกิดจากการรับประทานที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป โดยเชื้อต้องมีประมาณ 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> ตัวต่อกรัมจึงจะก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ อาการจะแสดงออก หลังจากรับเชื้อเข้าไปภายหลัง 10-12 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะอาหารด้วยเช่นกัน เชื้อนี้จะเพิ่มจำนวนเป็นทวีคูณทุกๆ 10-15 นาทีที่ 37 องศาเซลเซียส เชื้อจะสร้างสารพิษทั้งในร่างกายและสร้างในอาหารก่อนรับประทาน ทำให้เกิดการท้องร่วงอย่างรุนแรง อุจจาระเป็นน้ำมีกลิ่นเหม็นคาวกุ้งเน่า มักมีอาการปวดท้องเกร็ง หรืออาจมีอาการอาเจียนร่วมด้วยในบางราย อาการมักจะคงอยู่ในช่วง 10 วันและจะทุเลาลงในช่วง 3 วันหลัง อาการโดยรวมของโรคคือ มีไข้ต่ำ ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง มีอัตราการตายต่ำ โรคมักอุบัติในช่วงฤดูร้อน



รูปภาคผนวก ข ที่ 10 แสดงโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* บน TCBS agar

ที่มา: [http://www.microbiologyinfo.com/thiosulfate-citrate-bile-salts-sucrose-tcbs-agar-composition-principle-uses-preparation-and-colony-morphology/\[9/5/2559\]](http://www.microbiologyinfo.com/thiosulfate-citrate-bile-salts-sucrose-tcbs-agar-composition-principle-uses-preparation-and-colony-morphology/[9/5/2559])

## 2. เชื้อรา

### 2.1 อนุกรมวิธานของ *Aspergillus flavus*

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

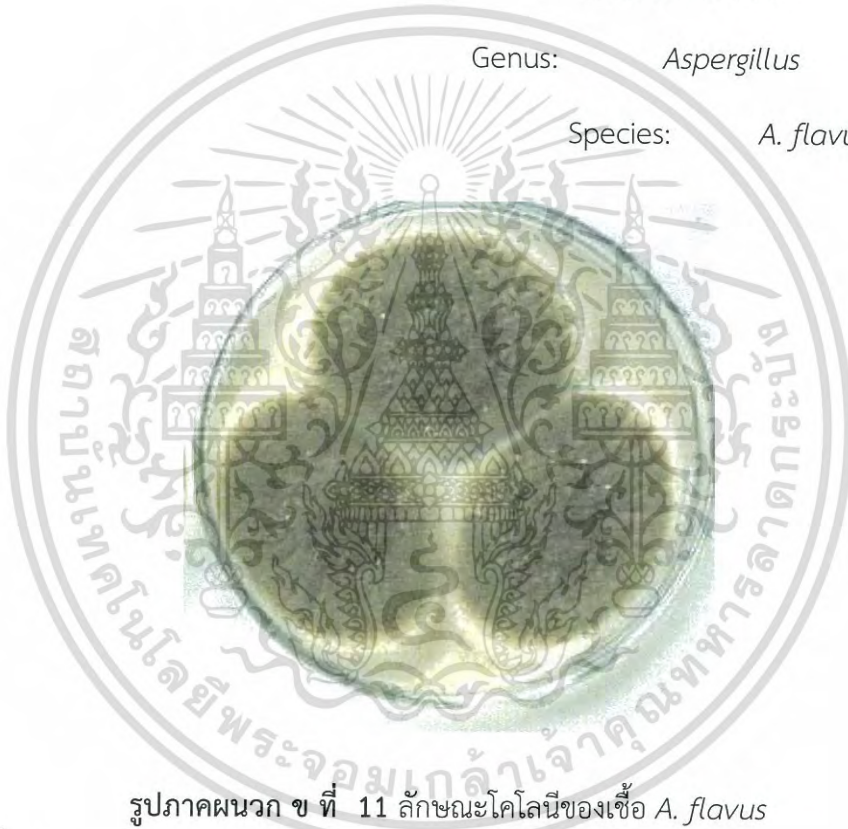
Class: Eurotiomycetes

Order: Eurotiales

Family: Trichocomaceae

Genus: *Aspergillus*

Species: *A. flavus*



รูปภาคผนวก ข ที่ 11 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. flavus*

ที่มา: <http://www.aspergillus.org.uk/images/species?&page=8> [9/5/2559]

## 2.2 อนุกรมวิธานของ *Aspergillus fumigatus*

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order: Eurotiales

Family: Trichocomaceae

Genus: *Aspergillus*

Species: *A. fumigatus*



รูปภาพผนวก ข ที่ 12 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. fumigatus*

ที่มา:<http://biologyofteeb.blogspot.com/2015/05/aspergillus.html> [9/5/2559]

### 2.3 อนุกรมวิธานของ *Aspergillus ochraceus*

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order: Eurotiales

Family: Trichocomaceae

Genus: *Aspergillus*

Species: *A. ochraceus*



รูปภาคผนวก ข ที่ 13 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. ochraceus*

ที่มา:<http://www.aspergillus.org.uk/images/species?&page=14> [9/5/2559]

## 2.4 อนุกรมวิธานของ *Aspergillus versicolor*

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order: Eurotiales

Family: Trichocomaceae

Genus: *Aspergillus*

Species: *A. versicolor*



รูปภาคผนวก ข ที่ 14 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. versicolor*

ที่มา:<http://old.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?secure/speciesdatabase/versicolor.php~mai> [9/5/2559]

## 2.5 อนุกรมวิธานของ *Aspergillus phoenicis*

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order: Eurotiales

Family: Trichocomaceae

Genus: *Aspergillus*

Species: *A. phoenicis*



รูปภาคผนวก ข ที่ 15 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. phoenicis*

ที่มา:<https://www.studyblue.com/notes/note/n/kelly-burch-okstate-edu/deck/16947558> [9/5/2559]

## 2.6 ลักษณะทั่วไป

*Aspergillus* sp. เป็นเชื้อราที่พบได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ในการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้นเชื้อราจะสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่าโคนิเดีย โคนิเดีย (conidia) มีรูปร่างกลม ผนังไม่เรียบ ไม่มีสี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยเท่ากับ 2.5-5 ไมครอน เจริญอยู่บนปลายสเตอร์ริจมา (sterigma) ที่สร้างบน vesicle ที่มีรูปร่างค่อนข้างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยเท่ากับ 25-45 ไมครอน โคนิดีโอสปอร์ สีไม่มีสี ผิวมีผนังหนาและขรุขระ มีความยาวประมาณ 480-800 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยเท่ากับ 10-15 ไมครอน

เชื้อรา *Aspergillus* sp. เป็นเชื้อราที่มักก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์รวมถึงพืชได้อีกด้วย บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ aflatoxin ได้ *Aspergillus* sp. จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อให้เกิดโรค Aspergilliosis ซึ่งโรคนี้สามารถพบได้ทั่วไปในสัตว์ปีก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ส่วนใหญ่ที่เป็นโรคจะเป็นสัตว์ปีก เช่น ไก่ นก เป็ด นกกระจอกเทศ เป็นต้น พบราสกุลนี้ได้ทั่วไปในทุกที่ เช่น ในดิน น้ำ อาหารจำพวกเมล็ดธัญพืช เช่น ถั่วลิสงที่มักพบการปนเปื้อนสารพิษ aflatoxin จาก *A. flavus* เชื้อรา *Aspergillus* sp. มักเจริญได้รวดเร็วและสามารถสร้างเส้นใยและสปอร์เป็นจำนวนมาก โดยส่วนมากจะได้รับเชื้อได้ด้วยการสูดดมเอาสปอร์ของเชื้อราเข้าไป ดังนั้นปอดจึงเป็นอวัยวะที่ติดเชื้อบ่อยที่สุด

## 2.7 อาการของโรค Aspergilliosis

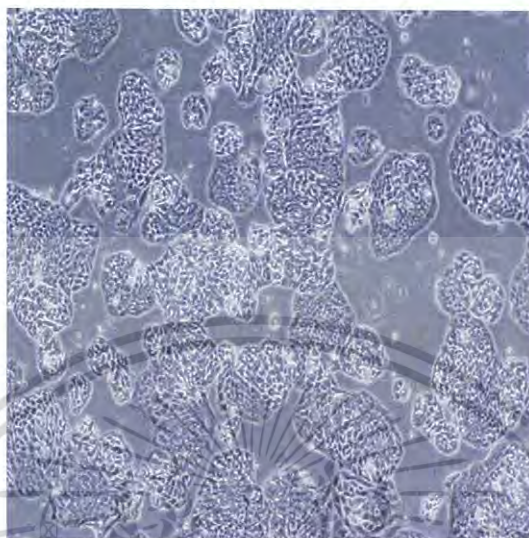
เมื่อคน สัตว์ ได้รับสปอร์ของเชื้อราสกุล *Aspergillus* นี้เข้าไปในร่างกายแล้วนั้น อาจจะยังไม่มีการแสดงอาการของโรค ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง อาทิเช่น ความเข้มข้นของสปอร์ที่รับเข้าไป และระดับภูมิคุ้มกันของแต่ละคน ถ้าหากได้รับสปอร์เข้าไปในร่างกายในปริมาณที่น้อยระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายก็สามารถจัดการได้หากได้รับปริมาณสปอร์เข้าไปจำนวนมากเกินกว่าระบบภูมิคุ้มกันจะจัดการได้ก็จะก่อให้เกิดโรค

## 2.8 การนำไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม

อุตสาหกรรมการหมัก (fermentation) เชื้อรา *Aspergillus* sp. ถูกนำมาใช้กันอย่างมากในหลายๆประเทศ เช่น จีน ญี่ปุ่น ไทย และอินโดนีเซีย เป็นต้น ส่วนใหญ่จะเป็นประโยชน์เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมทางอาหาร ใน *A. oryzae* ซึ่งใช้ผลิตอาหารหมักจากถั่วเหลือง เมล็ดธัญพืช เช่น ซีอิ๊ว สาเก มิโซ และเต้าเจี้ยว เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำไปผลิตเอนไซม์ กรดซิตริก เป็นต้น

### 3. เซลล์มะเร็งและเซลล์โตลิงแอฟริกา

#### 3.1 มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (HT-29)



รูปภาพผนวก ข ที่ 16 ลักษณะของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29)  
ที่มา: <http://www.jfrr.or.jp/item/functionality/ht29.html> [9/5/2559]

##### 3.1.1 สาเหตุการเกิดโรค

สาเหตุในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อาจเกิดการผิดปกติทางพันธุกรรมโดยที่อาจเป็นมาตั้งแต่กำเนิดหรือเกิดจากสภาพแวดล้อม หรืออาจเกิดโดยโรคบางอย่างจากลำไส้ใหญ่ ได้แก่ กลุ่มโรคที่มีอาการอักเสบของระบบทางเดินอาหาร (Inflammatory Bowel Disease)

##### 3.1.2 การแพร่กระจาย

ตำแหน่งของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่นั้นที่เป็น Intraperitoneum หรือ Extraperitoneum ส่งผลต่อการแพร่กระจายของโรคโดยที่มะเร็งที่เกิดในลำไส้ใหญ่ที่มีเยื่อช่องท้องปกคลุม ในการแพร่กระจายของมะเร็งนั้นจะแพร่ไปตามเยื่อช่องท้อง (Peritoneal Seeding) ส่วนมะเร็งที่เกิดในลำไส้ใหญ่ส่วนที่ไม่มีเยื่อช่องท้องปกคลุมจะมีการกลับมาเป็นซ้ำแบบเฉพาะที่ (Local Recurrence) สูง บริเวณลำไส้ใหญ่ที่ไม่มีเยื่อช่องท้องมาปกคลุมคือส่วนด้านหลังของ ลำไส้ใหญ่ส่วนหน้า (Ascending colon) ลำไส้ใหญ่ส่วนหลัง Decending Colon และ เร็คตัม (Rectum) ซึ่งจะมีเลือดมาเลี้ยงจาก 2 ระบบคือ Middle และ Inferior Hemorrhoidal ดังนั้นหากเกิดมะเร็งที่บริเวณนี้จะแพร่กระจายลุกลามไปยังปอดได้โดยตรง

เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่จะเกิดที่บริเวณเยื่อลำไส้ใหญ่ก่อนโดยเกิดมาจากรอยโรคก่อนมะเร็ง (Premalignant Lesion) ที่เรียกว่า Polyp และเปลี่ยนแปลงมาเป็นมะเร็งในที่สุด การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ไปสู่อวัยวะต่างในร่างกาย มีอยู่ด้วยกัน 4 ขั้นตอน ดังนี้

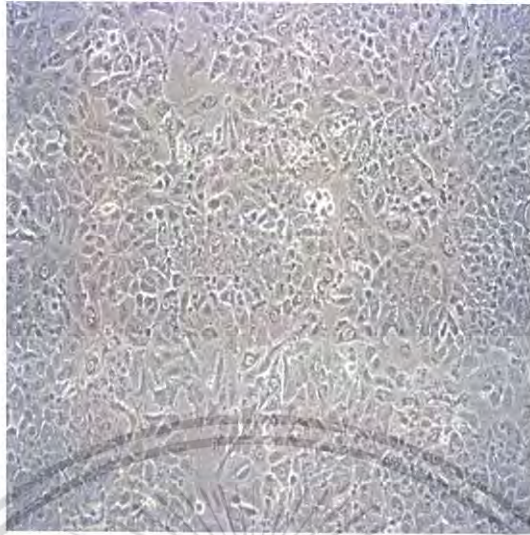
1. Local Invasion เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่จะเจริญเติบโตในผนังลำไส้ใหญ่ ทำให้ลำไส้ใหญ่เกิดการอุดตันหรืออาจโตลุกลามทะลุผนังลำไส้ใหญ่ออกไปยังอวัยวะข้างเคียงทำให้เกิดภาวะ Peritoneal Carcinomatosis
2. Lymphatic Spread ร้อยละ 50 ของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่นั้นจะมีการแพร่กระจายมะเร็งไปสู่ต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง
3. Venous Spread พบการแพร่กระจายของมะเร็งด้วยวิธีมากที่สุด โดยอัตราการแพร่กระจายนั้นเกิดขึ้นมากที่สุดเมื่อมะเร็งลุกลามไปยังเส้นเลือดดำชั้นนอก
4. Implantation เกิดจากการที่เซลล์มะเร็งหลุดออกมาจากก้อนมะเร็งทำให้แพร่กระจายลุกลามไปยังอวัยวะอื่นในร่างกายได้ อาจเกิดขึ้นระหว่างการทำการผ่าตัดก้อนมะเร็งทำให้เซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปยังแผลเย็บหรือเยื่อช่องท้องได้

### 3.1.3 การรักษา

การผ่าตัด แบ่งได้ตามกรณีดังนี้

1. ระยะที่เป็นเฉพาะที่ ในการรักษาด้วยการผ่าตัดเป็นวิธีที่ทำให้ผู้ป่วยหายขาดจากการเป็นโรคมะเร็งได้
2. เกิดภาวะแทรกซ้อน เช่น การอุดตันการแตกหรือเลือดออกจากก้อนมะเร็ง อาจพิจารณาการผ่าตัดเพื่อรักษาภาวะแทรกซ้อนดังกล่าว
3. ระยะแพร่กระจาย ถ้าผู้ป่วยมีรอยของการแพร่กระจายเพียงตำแหน่งเดียว เช่น รอยโรคที่ปอด อาจทำการพิจารณาทำการผ่าตัดเอาเนื้องอกออกที่แพร่กระจายนั้นออก

### 3.2 มะเร็งเต้านม (MCF-7)



รูปภาคผนวก ข ที่ 17 ลักษณะของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7)

ที่มา: [http://www.mybiosource.com/prods/Cell-Line/MCF-7-Luc/datasheet.php?products\\_id=168974](http://www.mybiosource.com/prods/Cell-Line/MCF-7-Luc/datasheet.php?products_id=168974) [9/5/2559]

มะเร็งเต้านมเป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับต้นๆในเพศหญิง ซึ่งมีอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งเต้านมเป็นอันดับสองรองจากมะเร็งปอด เกิดจากเนื้อเยื่อของเต้านมมีการเปลี่ยนแปลง ในระยะเริ่มต้นการพบโรคมะเร็งเต้านมนั้นหากเซลล์ยังไม่โตก็จะพบมะเร็งเต้านมเฉพาะบริเวณเต้านมเท่านั้นยังไม่แพร่กระจายไปส่วนอื่นๆ อย่างเช่นต่อมน้ำเหลืองก็ยังมีโอกาสในการมีชีวิตอยู่ต่อได้นานพอสมควร

#### 3.2.1 อาการของโรคมะเร็งเต้านม

ผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเต้านมนั้นโดยมากมักไม่มีอาการใดแสดงออกจะต้องตรวจสอบได้โดยการคลำได้เต้านมหรือรักแร้ มีการเปลี่ยนแปลงขนาดของเต้านม มีน้ำไหลออกจากหัวนม เจ็บคล้ายหัวนมถูกดิ่งรังและผิวเต้านมจะเหมือนเปลือกส้ม ความรุนแรงของมะเร็งเต้านม เป็นการแบ่งเพื่อระบุว่ามะเร็งแพร่กระจายหรือยัง

##### ระยะ 0

มะเร็งที่อยู่เฉพาะที่ยังไม่แพร่กระจายโดยแบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่

1. Ductal carcinoma insitu เป็นมะเร็งที่เกิดบริเวณท่อน้ำนม ไม่แพร่กระจาย
2. Lobular carcinoma insitu เซลล์มะเร็งที่เกิดที่ต่อมน้ำนมมักจะยังไม่แพร่กระจาย

##### ระยะ 1

เนื้องอกของมะเร็งมีขนาดเล็กกว่า 2 เซนติเมตรและไม่มีการแพร่กระจาย

## ระยะ 2A

มีอยู่ 3 ภาวะ คือ

1. ไม่พบก้อนที่เต้านม แต่พบที่บริเวณต่อมน้ำเหลืองใต้รักแร้
2. ก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กกว่า 2 เซนติเมตร และยังไม่มีการแพร่กระจายเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองใต้รักแร้
3. ก้อนมะเร็งมีขนาด 2-5 เซนติเมตร และยังไม่มีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง

## ระยะ 2B

ก้อนมะเร็งขนาด 2-5 เซนติเมตรและมีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองใต้รักแร้  
ก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่กว่า 5 เซนติเมตร และยังไม่มีการแพร่กระจาย

## ระยะ 3A

1. ไม่พบก้อนมะเร็งที่เต้านม แต่พบมะเร็งที่ต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ใกล้
2. ก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กกว่า 5 เซนติเมตรและเกิดการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองใต้รักแร้ที่อยู่ใกล้
3. ก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่กว่า 5 เซนติเมตร และเกิดการแพร่กระจายลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลืองใต้รักแร้ที่อยู่ใกล้

## ระยะ 3B

พบก้อนมะเร็งขนาดใดก็ได้และมีการลุกลามแพร่กระจายไปยังเยื่อใกล้องค์ไคย เช่นกล้ามเนื้อ ผิวหนัง เป็นต้น และแพร่ไปยังต่อมน้ำเหลือง

## ระยะ 3C

เซลล์มะเร็งลุกลามแพร่กระจายไปยังบริเวณต่อมน้ำเหลืองคอ อวัยวะข้างเคียง และต่อมน้ำเหลืองใต้รักแร้

## ระยะ 4

เซลล์มะเร็งได้มีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ เช่น สมอง ตับ และกระดูก เป็นต้น การตรวจหามะเร็งเต้านมมีหลายวิธีได้แก่

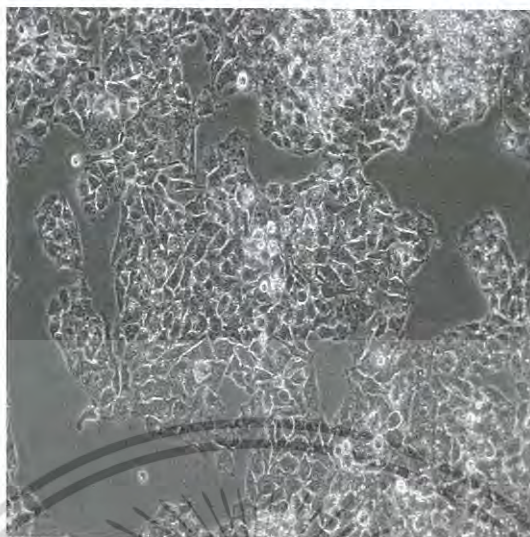
1. การตรวจเต้านมด้วย เมโมแกรม ซึ่งจัดว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการตรวจคัดกรอง มะเร็งเต้านมในผู้หญิงทั่วไป
2. การตรวจเต้านมโดยแพทย์หรือพยาบาล
3. การตรวจเต้านมด้วยตัวเอง

### 3.2.2 การรักษามะเร็งเต้านม

ในการรักษาโรคมะเร็งเต้านมนั้นจะทำการรักษาโดยขึ้นอยู่กับระยะของมะเร็งเต้านม ในการรักษาบางครั้งจะใช้การผ่าตัด บางครั้งจะทำการรักษาร่วมกันหลายวิธี วิธีการรักษามีดังนี้

- การผ่าตัด
- การฉายรังสี
- เคมีบำบัด
- การให้ฮอร์โมน

### 3.3 มะเร็งตับ (HepG-2)



รูปภาพผนวก ข ที่ 18 แสดงลักษณะของเซลล์มะเร็ง Hep-G2  
[http://www.addexbio.com/productdetail?pid=46\[9/5/2559\]](http://www.addexbio.com/productdetail?pid=46[9/5/2559])

โรคมะเร็งตับนั้นเกิดจากเซลล์ตับนั้นเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็งและมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว และทำการลุกลามแพร่กระจายไปสู่อวัยวะใกล้เคียง ซึ่งโรคมะเร็งตับนี้เป็นอีกหนึ่งสาเหตุของการเสียชีวิตของคนไทยเป็นอันดับต้นๆอีกด้วย โดยส่วนใหญ่จะพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง มะเร็งตับนี้มีความรุนแรงมากและรักษายากจึงมักเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย

#### 3.3.1 สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งตับ

โรคมะเร็งตับที่คนไทยส่วนใหญ่จะเกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและซีชนิดเรื้อรัง รวมทั้งโรคตับแข็งที่เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์ และไขมันสะสมในตับ และการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของสารพิษ aflatoxin ที่สร้างโดยเชื้อรา อาหารที่มักพบการปนเปื้อน aflatoxin นี้บ่อยครั้งคือ ถั่วลิสง พริกป่น และธัญพืช เป็นต้น

#### 3.3.2 อาการของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งตับ

มักจะมีอาการป่วยที่อาจมองไม่ออกว่าเกิดจากการมะเร็ง นั้นคือ

1.ไม่เกิดการอยากทานอาหาร ผู้ป่วยจะรู้สึกแน่น อึดท้อง ย่อยอาหารไม่ได้ตีบางครั้งถึงขั้นคลื่นไส้อาเจียน

2.ปวดท้องด้านขวาบน ร่างกายบริเวณตับจะเกิดอาการปวดอย่างต่อเนื่องหรืออาจเกิดบางครั้ง หากเนื้องอกมีการเพิ่มขนาดขึ้นหรือลุกลามจะเกิดอาการเจ็บรุนแรงขึ้น

3.เลือดออก ผู้ป่วยจะมีอาการเลือดออกทางจมูก ผิวน้ำ เป็นต้น

4.ร่างกายอ่อนเพลีย ผอม ไข้และบวมน้ำโดยไม่ทราบสาเหตุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5. ตัวเหลือง ท้องบวม ค้นตามผิวหนัง

### 3.3.3 การรักษามะเร็งตับ

ในการวินิจฉัยโรคนั้น

1. ตรวจหาระดับแอลฟาไฟโตโปรตีนในเลือด
2. การใช้เครื่องมือเช่น อัลตราซาวด์ เครื่องแสดงอวัยวะด้วยรังสีไอโซโทป และเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์
3. การดูลักษณะของเซลล์ด้วยเจาะเอาเนื้อตับมาตรวจ

มะเร็งตับเป็นโรคที่พบบ่อยในปัจจุบัน เนื่องจากผู้ป่วยที่เป็นระยะเริ่มแรกอาการจะแสดงไม่เด่นชัดทำให้บางครั้งเซลล์ได้ลุกลามไปยังระยะสุดท้ายแล้วถึงจะเพิ่งตรวจพบ ทำให้แพทย์รักษายากมากขึ้นซึ่งโรคมะเร็งตับนั้นทำลายสุขภาพถึงขั้นเสียชีวิต โดยส่วนใหญ่จะรักษาด้วยวิธีดังต่อไปนี้

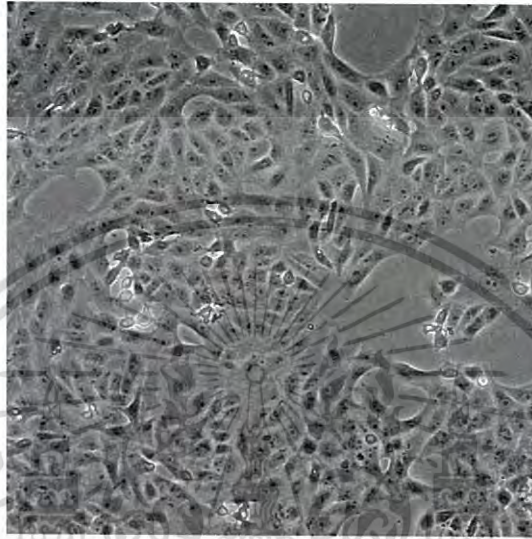
1. โดยการผ่าตัด
2. การฉีดยาเข้าที่ก้อนมะเร็งโดยตรงในมะเร็งระยะเริ่มแรก
3. การฉีดยาเคมี หรือสารอุดตันเข้าเส้นเลือดแดงที่หล่อเลี้ยงก้อนเนื้อ
4. การใช้สารเคมีส่วนใหญ่ในการรักษาเพื่อบรรเทาอาการ

### 3.3.4 การป้องกันการเกิดโรคมะเร็งตับ

1. ฉีดวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี
2. ป้องกันและรักษาโรคพยาธิใบไม้ตับ
3. ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมเพื่อสุขภาพ
4. รับประทานอาหารที่ถูกต้องตามหลัก
5. ควรรับประทานผัก และผลไม้เป็นประจำ
6. หลีกเลี่ยงอาหารหมักดอง
7. เลิกสูบบุหรี่
8. เลิกดื่มสุรา
9. เลิกเคี้ยวหมาก

### 3.4 เซลล์ไตลิงแอฟริกา (Vero)

เซลล์ไลน์ Vero นั้นเป็นเซลล์ที่แยกได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นเซลล์ไตลิงแอฟริกา มีการเจริญแบบไฟโบรบลาสต์ที่เกาะพื้นผิวเรียงตัวกันเป็นชั้นเดียวและมีการเจริญแบบต่อเนื่อง เซลล์นี้ถูกเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง(continuous cell line) ซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหารผสม bovine serum นอกจากนี้เซลล์ไตลิงแอฟริกาถูกนำมาใช้ผลิตวัคซีนเพื่อทดสอบเชื้อไวรัสก่อโรคในสัตว์หลายชนิด

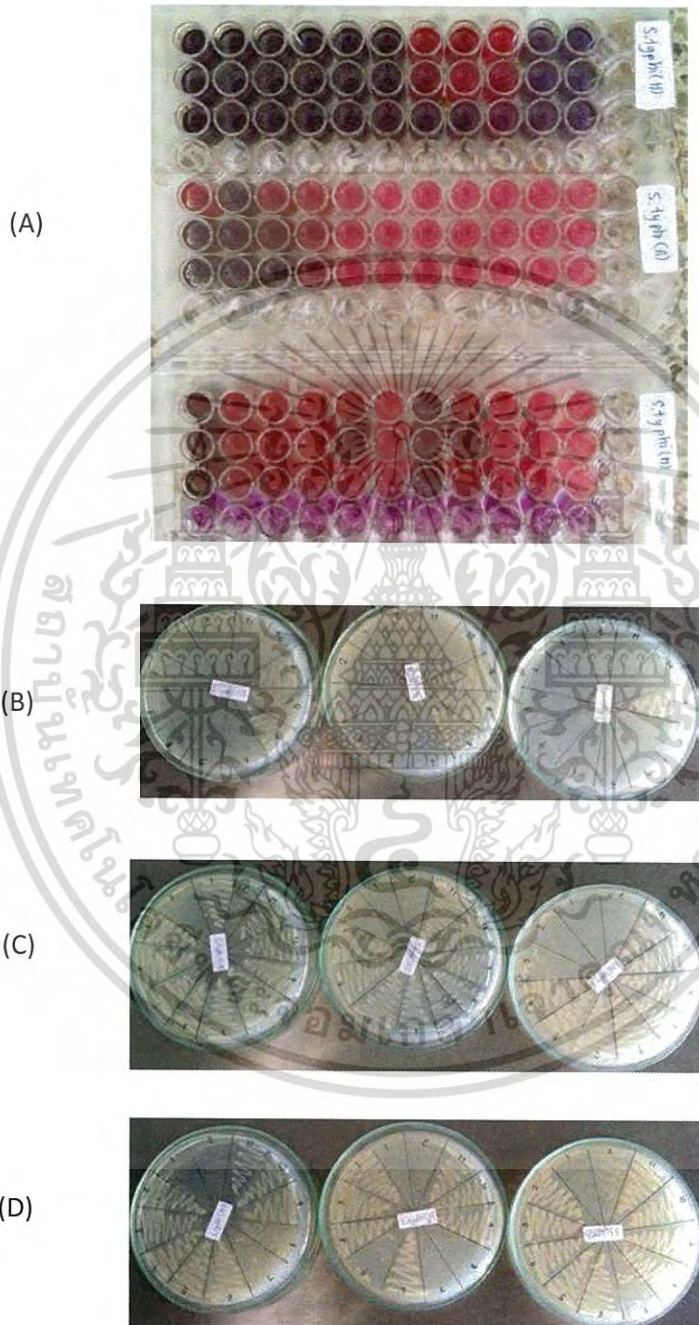


รูปภาคผนวก ข ที่ 19 แสดงลักษณะของเซลล์ไตลิงแอฟริกา

<http://www.atcc.org/products/all/CCL-81.aspx#documentation> [12/5/2559]

## ภาคผนวก ค

### 1. ลักษณะยับยั้งการเจริญแบคทีเรียในไมโครเพลทและบนอาหาร Mueller Hinton Agar

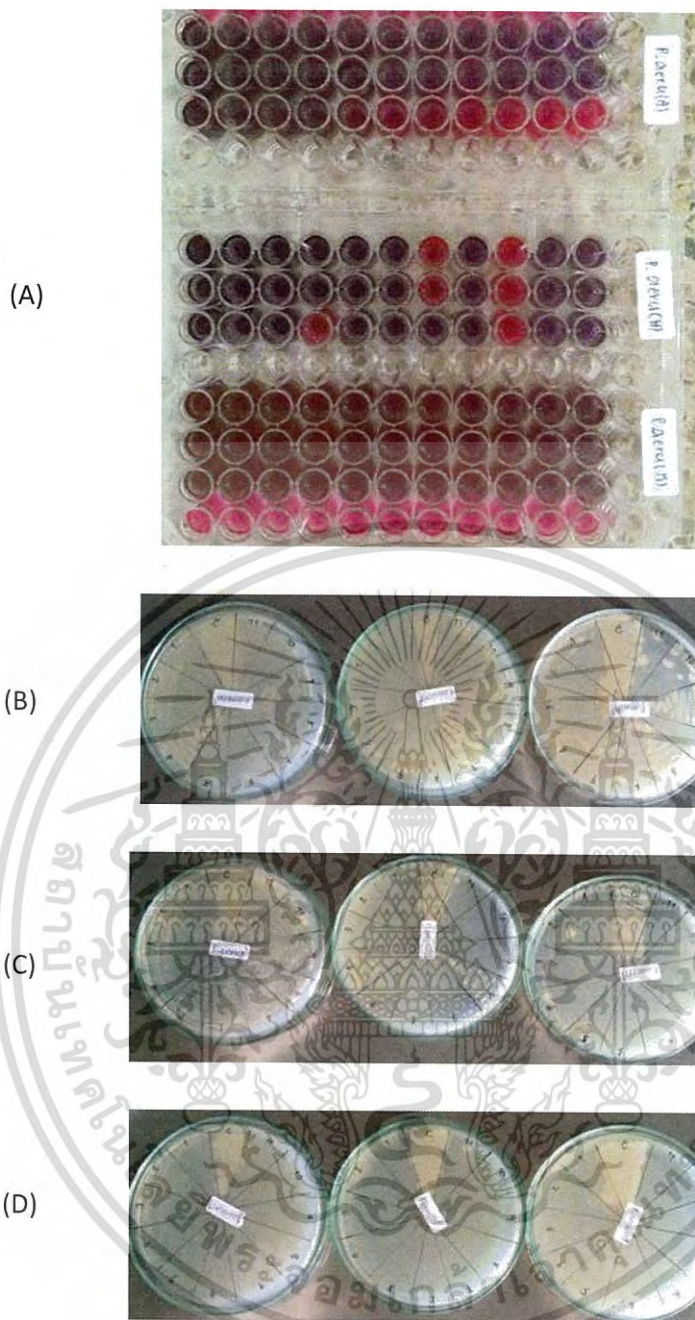


รูปภาคผนวก ค ที่ 1 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และ การประเมินค่า MBC บนอาหาร MHA ของ *S. typhimurium*

หมายเหตุ: (A) การประเมินค่า MIC บนไมโครเพลท (B) ผล MBC ของสิ่งสกัดหยาบเฮกเซน

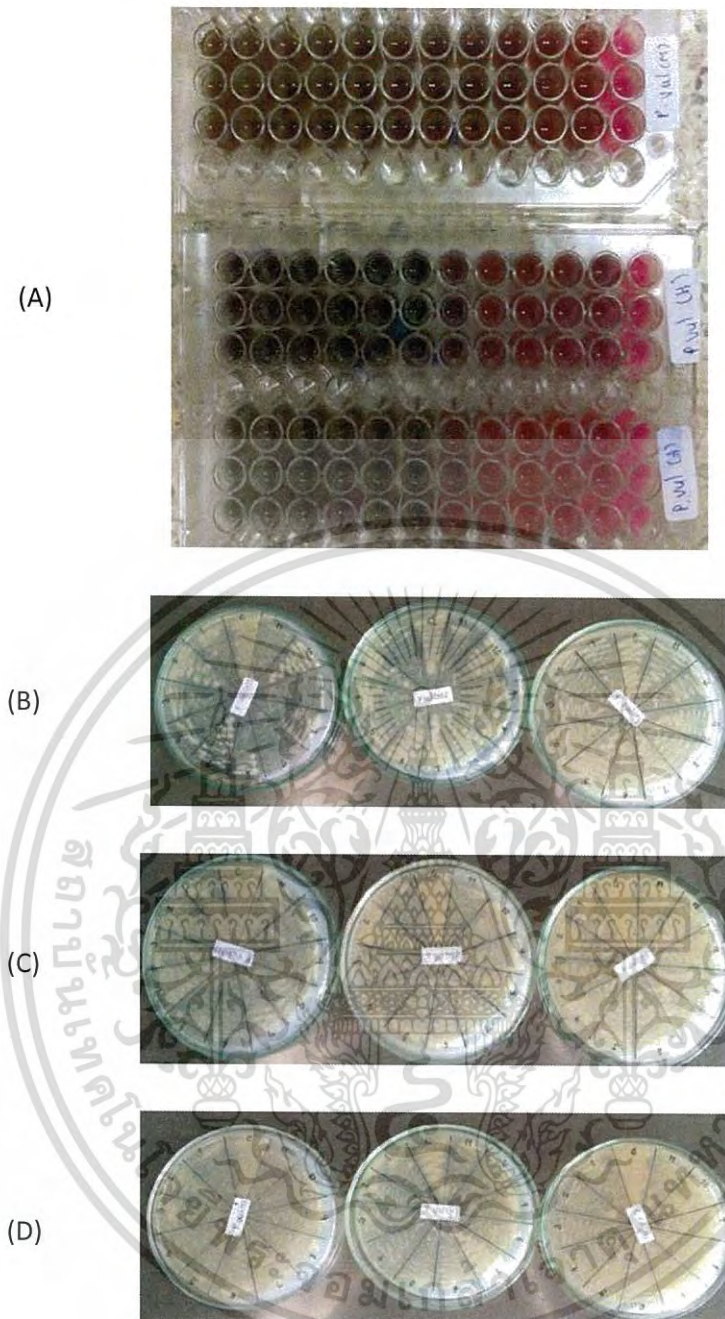
(C) ผล MBC ของสิ่งสกัดหยาบอะซิโตน (D) ผล MBC ของสิ่งหยาบเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



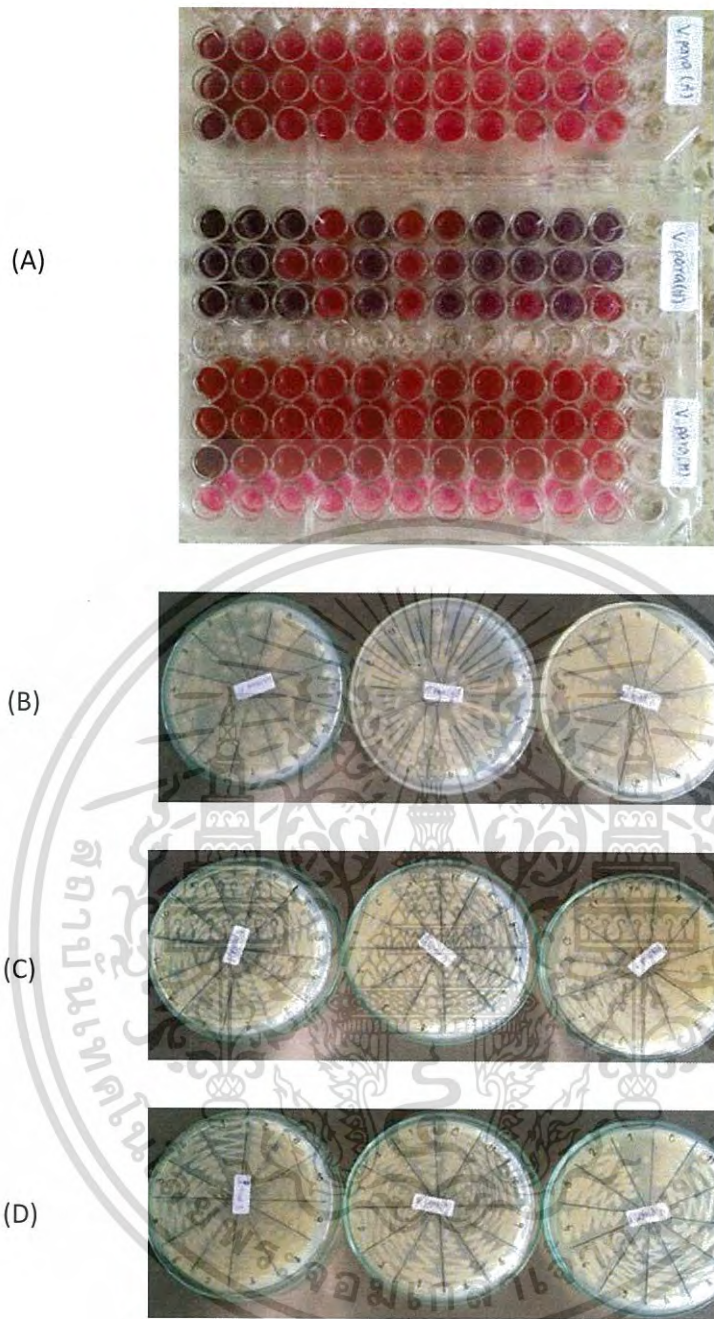
รูปภาคผนวก ค ที่ 2 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และ การประเมินค่า MBC บนอาหาร MHA ของ *Ps. aeruginosa*

หมายเหตุ: (A) การประเมินค่า MIC บนไมโครเพลท (B) ผล MBC ของสิ่งสกัดหยาบเฮกเซน  
(C) ผล MBC ของสิ่งสกัดหยาบอะซิโตน (D) ผล MBC ของสิ่งหยาบเมทานอล



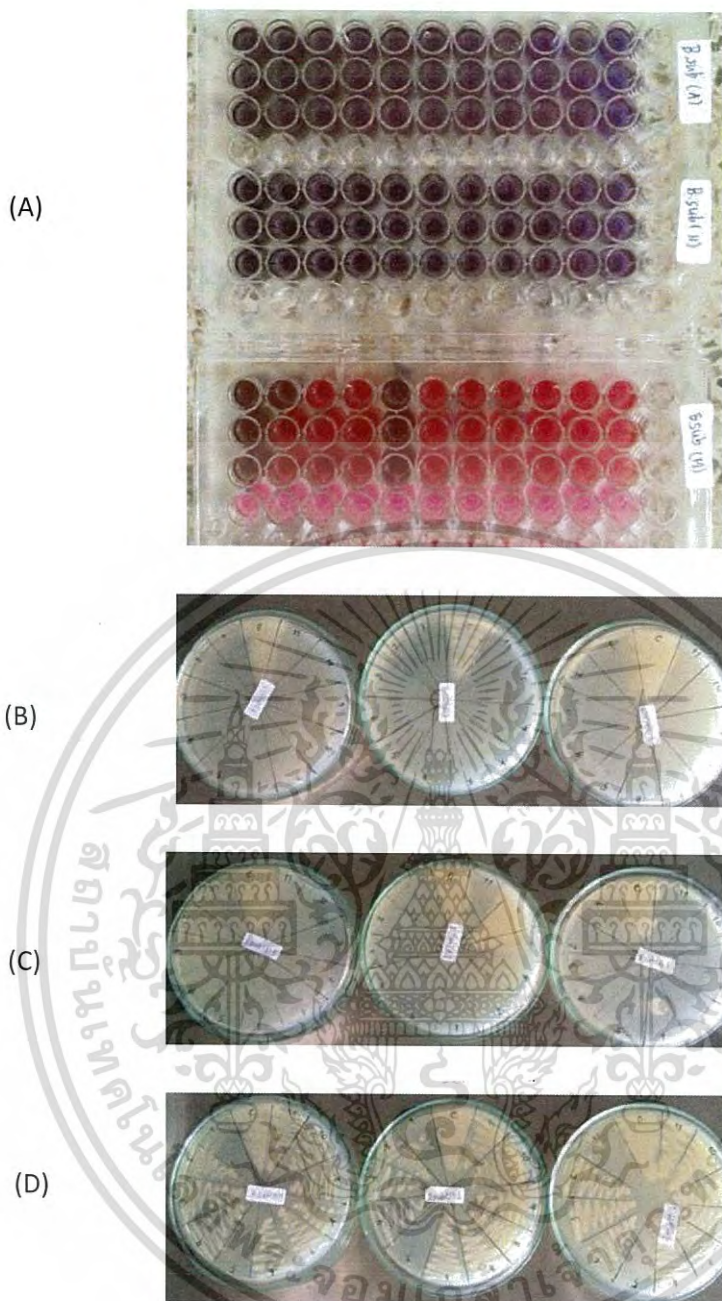
รูปภาคผนวก ค ที่ 3 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และ การประเมินค่า MBC บนอาหาร MHA ของ *P. vulgaris*

หมายเหตุ: (A) การประเมินค่า MIC บนไมโครเพลท (B) ผล MBC ของสิ่งสกัดหยาบเฮกเซน  
(C) ผล MBC ของสิ่งสกัดหยาบอะซิโตน (D) ผล MBC ของสิ่งหยาบเมทานอล



รูปภาคผนวก ค ที่ 4 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และ การประเมินค่า MBC บนอาหาร MHA ของ *V. parahaemolyticus*

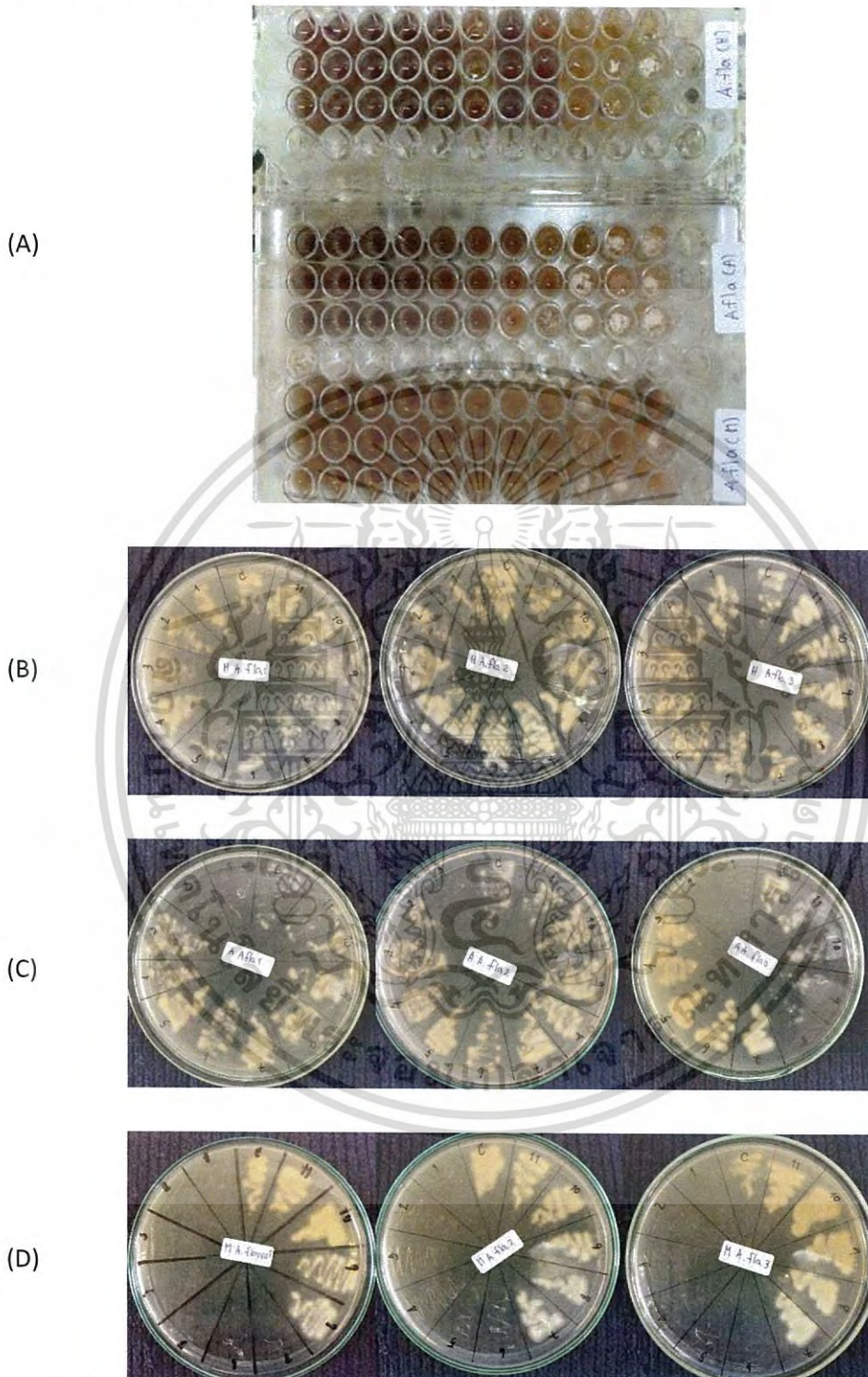
หมายเหตุ: (A) การประเมินค่า MIC บนไมโครเพลท (B) ผล MBC ของสิ่งสกัดหยาบเฮกเซน  
(C) ผล MBC ของสิ่งสกัดหยาบอะซิโตน (D) ผล MBC ของสิ่งหยาบเมทานอล



รูปภาคผนวก ค ที่ 5 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และ การประเมินค่า MBC บนอาหาร MHA ของ *B. subtilis*

หมายเหตุ: (A) การประเมินค่า MIC บนไมโครเพลท (B) ผล MBC ของสิ่งสกัดยาบเฮกเซน (C) ผล MBC ของสิ่งสกัดยาบอะซิโตน (D) ผล MBC ของสิ่งสกัดยาบเมทานอล

2. ลักษณะยับยั้งการเจริญแบคทีเรียในไมโครเพลทและบนอาหาร Sabouraud Dextrose Agar



รูปภาคผนวก ค ที่ 6 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และ การประเมินค่า

\* MBC บนอาหาร อาหาร SDA ของ *A. flavus* TISTR 8041

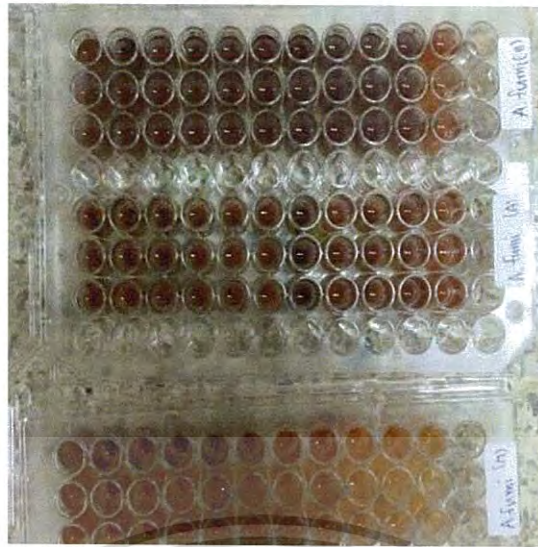
หมายเหตุ: (A) การประเมินค่า MIC บนไมโครเพลท (B) ผล MFC ของสิ่งสกัดหยาบเฮกเซน

(C) ผล MFC ของสิ่งสกัดหยาบอะซิโตน (D) ผล MFC ของสิ่งหยาบเมทานอล

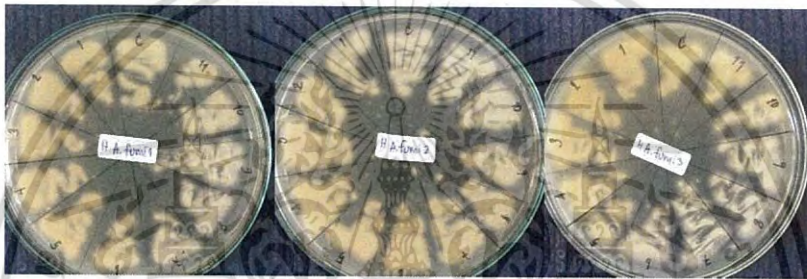
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(A)



(B)



(C)



(D)



รูปภาคผนวก ค ที่ 7 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และ การประเมินค่า  
MBC บนอาหาร อาหาร SDA ของ *A. fumigatus*

หมายเหตุ: (A) การประเมินค่า MIC บนไมโครเพลท (B) ผล MFC ของสิ่งสกัดหยาบเฮกเซน  
(C) ผล MFC ของสิ่งสกัดหยาบอะซิโตน (D) ผล MFC ของสิ่งหยาบเมทานอล

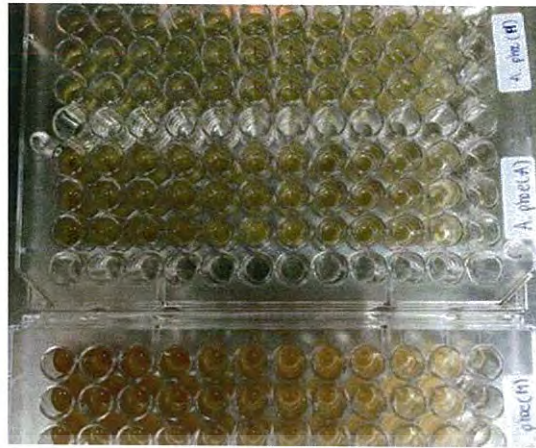
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 67 ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวก ค ที่ 8 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และ การประเมินค่า MBC บนอาหาร อาหาร SDA ของ *A. ochraceus*

หมายเหตุ: (A) การประเมินค่า MIC บนไมโครเพลท (B) ผล MFC ของสิ่งสกัดหยาบเฮกเซน  
(C) ผล MFC ของสิ่งสกัดหยาบอะซิโตน (D) ผล MFC ของสิ่งหยาบเมทานอล

(A)



(B)



(C)



(D)



รูปภาคผนวก ค ที่ 9 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และ การประเมินค่า MBC บนอาหาร อาหาร SDA ของ *A. phoenicis*

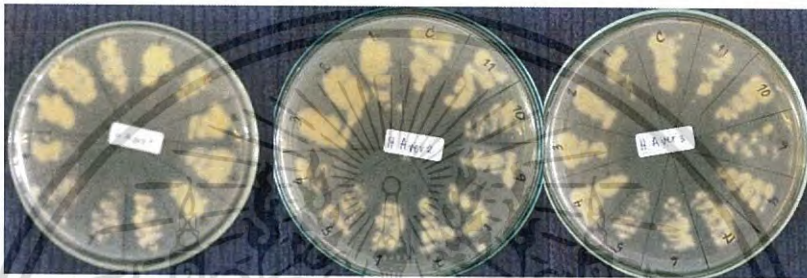
หมายเหตุ: (A) การประเมินค่า MIC บนไมโครเพลท (B) ผล MFC ของสิ่งสกัดเหยาบเฮกเซน  
(C) ผล MFC ของสิ่งสกัดเหยาบอะซิโตน (D) ผล MFC ของสิ่งเหยาบเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 69 ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(A)



(B)



(C)



(D)



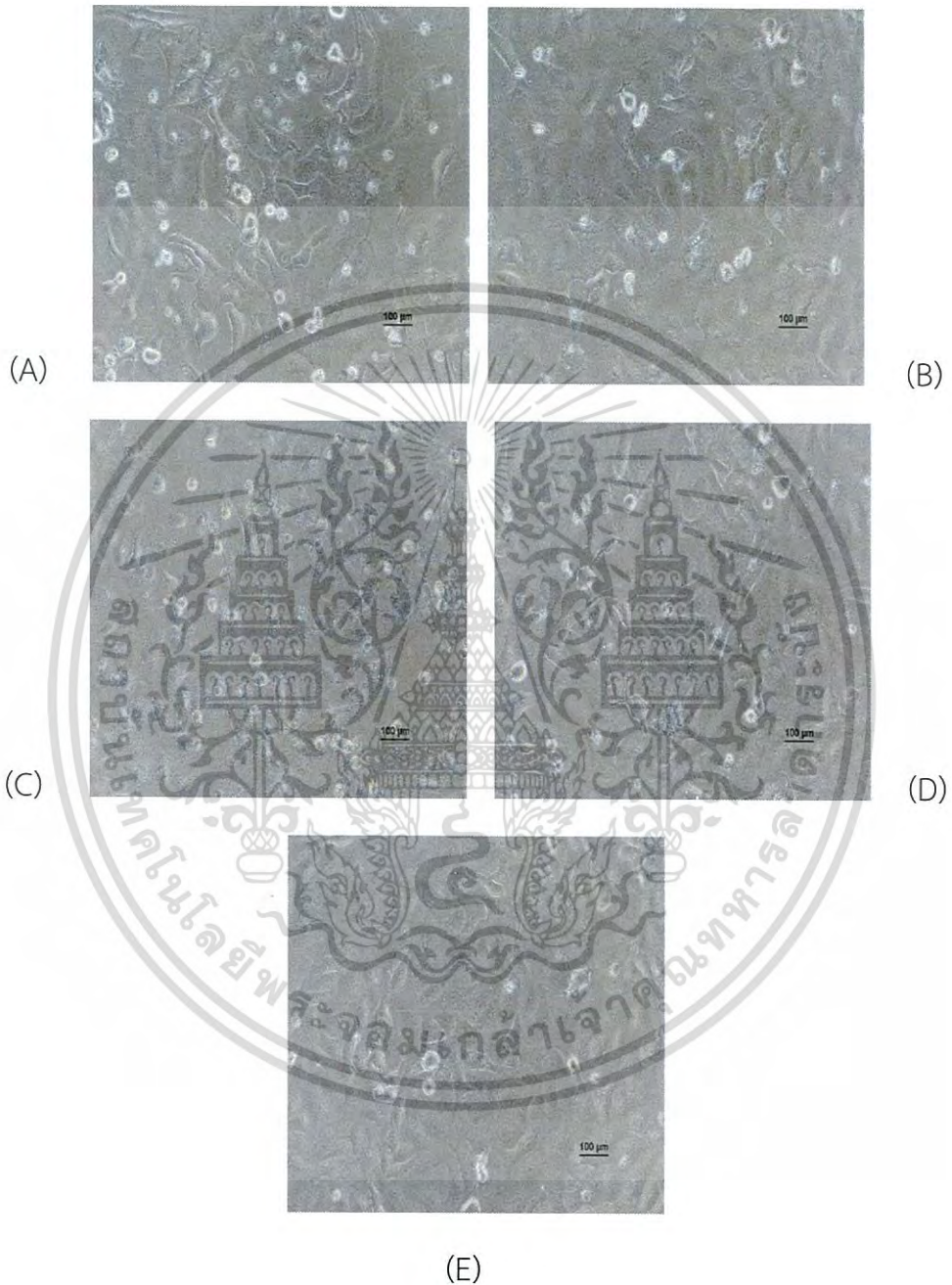
รูปภาพผนวก ค ที่ 9 แสดงลักษณะการประเมินค่า MIC ด้วย resazurin และ การประเมินค่า MBC บนอาหาร อาหาร SDA ของ *A. versicolor*

หมายเหตุ: (A) การประเมินค่า MIC บนไมโครเพลท (B) ผล MFC ของสิ่งสกัดหยาบเฮกเซน  
(C) ผล MFC ของสิ่งสกัดหยาบอะซิโตน (D) ผล MFC ของสิ่งหยาบเมทานอล

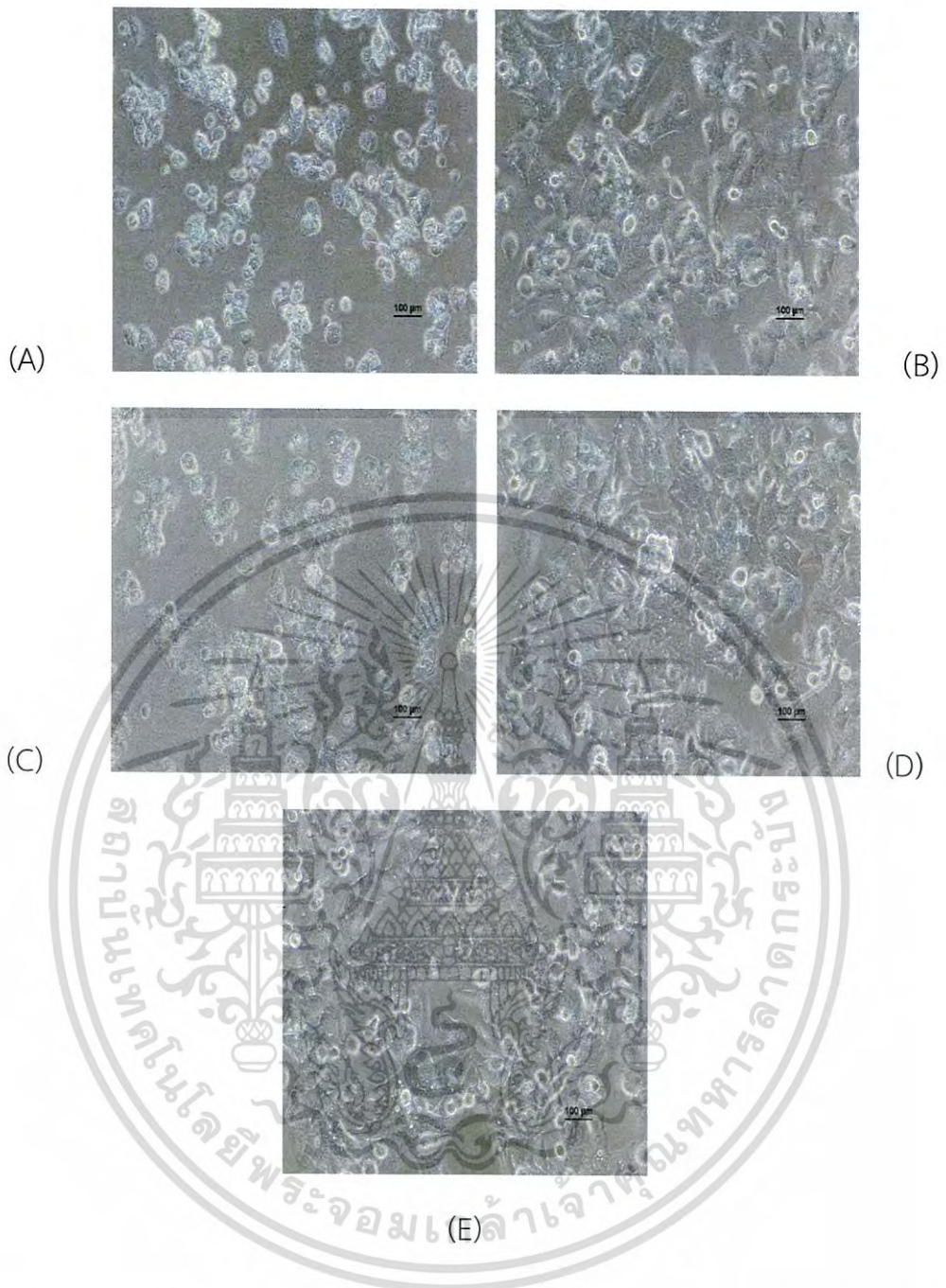
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา 70 ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

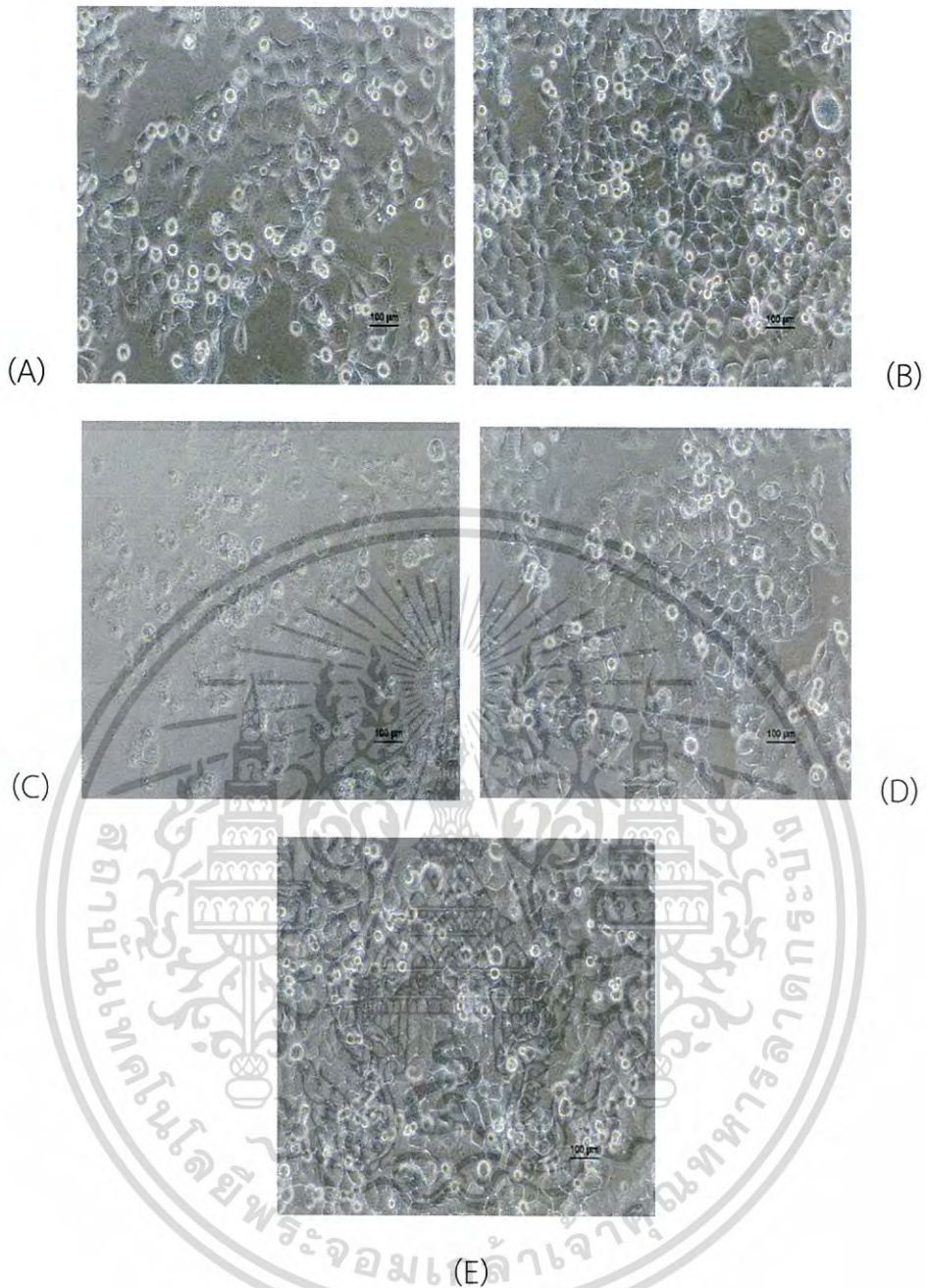
แสดงลักษณะของเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดยุคาลิปตัส



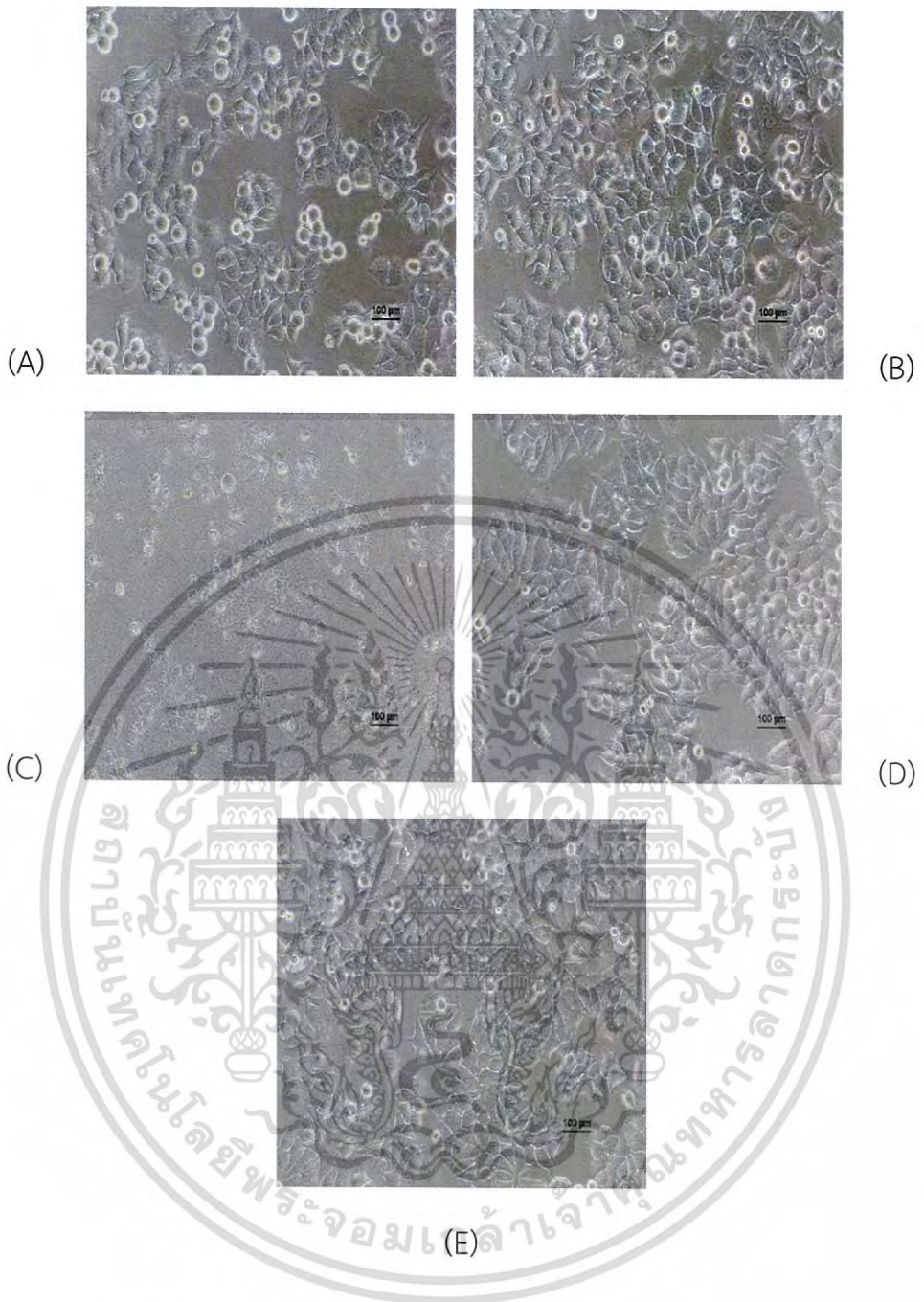
รูปภาคผนวก ง ที่ 1 แสดงลักษณะของเซลล์ Vero ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดทั้งสามชนิด  
(A) เซลล์ Vero ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดเฮกเซน (B) เซลล์ Vero ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดอะซิโตน  
(C) เซลล์ Vero ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดเมนทานอล (D) เซลล์ Vero ที่ถูกทดสอบด้วย DMSO  
(E) เซลล์ Vero control



รูปภาคผนวก ง ที่ 2 แสดงลักษณะของเซลล์ HepG2 ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดทั้งสามชนิด  
 (A) เซลล์ HepG2 ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดเฮกเซน (B) เซลล์ HepG2 ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดอะซิโตน  
 (C) เซลล์ HepG2 ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดเมทานอล (D) เซลล์ HepG2 ที่ถูกทดสอบด้วย DMSO  
 (E) เซลล์ HepG2 control



รูปภาคผนวก ง ที่ 3 แสดงลักษณะของเซลล์ HT29 ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดทั้งสามชนิด  
 (A) เซลล์ HT-29 ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดเฮกเซน (B) เซลล์ HT-29 ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดอะซิโตน  
 (C) เซลล์ HT-29 ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดเมทานอล (D) เซลล์ HT-29 ที่ถูกทดสอบด้วย DMSO  
 (E) เซลล์ HT-29 control



รูปภาคผนวก ง ที่ 4 แสดงลักษณะของเซลล์ MCF7 ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดทั้งสามชนิด  
 (A) เซลล์ MCF-7 ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดเฮกเซน (B) เซลล์ MCF-7 ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดอะซิโตน  
 (C) เซลล์ MCF-7 ที่ถูกทดสอบด้วยสิ่งสกัดเมทานอล (D) เซลล์ MCF-7 ที่ถูกทดสอบด้วย DMSO  
 (E) เซลล์ MCF-7 control

## ภาคผนวก จ

### ตารางแสดงผลการวิจัยและคำนวณทางสถิติ

1. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยแสดงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบยูคาลิปตัสที่สกัดจากตัวทำละลาย Acetone, Hexane และ Methanol

Bacteria	Gram	MIC (mg/ml)			MBC(mg/ml)		
		Hexane	Acetone	Methanol	Hexane	Acetone	Methanol
<i>Ps. aeruginosa</i>	negative	12.0 <sup>bc</sup> ±2.6	11.0 <sup>b</sup> ±2.3	3.0 <sup>a</sup> ±0	19.5 <sup>d</sup> ±2.6	15.5 <sup>c</sup> ±2.3	3.5 <sup>a</sup> ±0.87
<i>P. vulgaris</i>		18.0 <sup>d</sup> ±0	19.0 <sup>d</sup> ±1.73	14.0 <sup>c</sup> ±1.73	>36	>36	>36
<i>S. typhimurium</i>		9.5 <sup>b</sup> ±1.73	17.5 <sup>d</sup> ±3.12	18.0 <sup>d</sup> ±0	9.5 <sup>b</sup> ±1.73	17.5 <sup>cd</sup> ±0.87	18.0 <sup>cd</sup> ±0
<i>V. parahaemolyticus</i>		31.0 <sup>e</sup> ±1.73	>36	>36	>36	>36	>36
<i>B. subtilis</i>	positive	3.0 <sup>a</sup> ±0	3.0 <sup>a</sup> ±0	17.5 <sup>d</sup> ±0.87	3.0 <sup>a</sup> ±0	7.0 <sup>b</sup> ±4.6	20.0 <sup>d</sup> ±1.73

แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

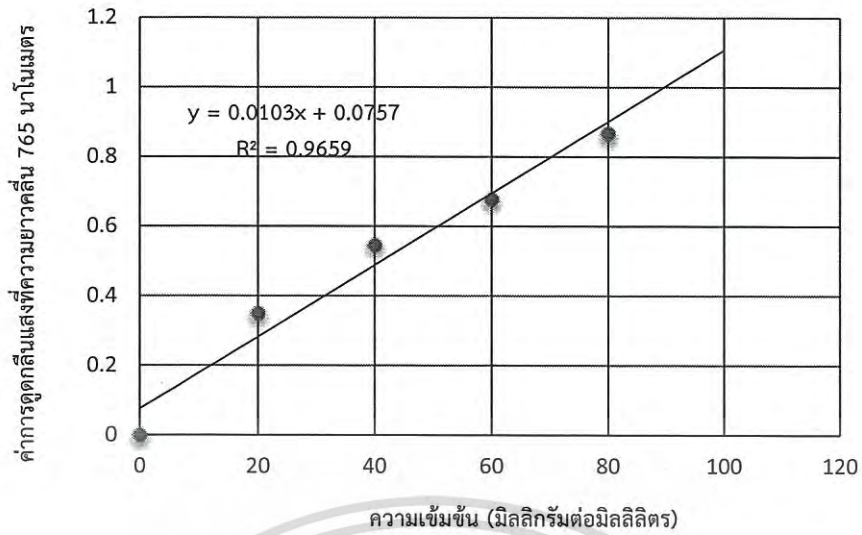
อักษรที่แสดงแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

2. ฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยแสดงค่า MIC และ MFC ของสารสกัดหยาบยูคาลิปตัสที่สกัดจากตัวทำละลาย Acetone, Hexane และ Methanol

Fungi	MIC (mg/ml)			MFC(mg/ml)		
	Hexane	Acetone	Methanol	Hexane	Acetone	Methanol
<i>A. flavus</i> TISTR 8041	>36	34.0 <sup>e</sup> ±1.73	20.0 <sup>a</sup> ±1.73	>36	34.0 <sup>d</sup> ±1.73	20.0 <sup>a</sup> ±1.73
<i>A. versicolor</i>	>36	>36	28.0 <sup>c</sup> ±1.73	>36	>36	28.0 <sup>bc</sup> ±1.73
<i>A. fumigatus</i>	>36	>36	24.0 <sup>b</sup> ±0	>36	>36	27.0 <sup>b</sup> ±3.0
<i>A. ochraceus</i>	>36	>36	20.0 <sup>a</sup> ±1.73	>36	>36	26.0 <sup>b</sup> ±8.66
<i>A. phoenicis</i>	>36	34.0 <sup>e</sup> ±1.73	32.0 <sup>d</sup> ±1.73	>36	34.0 <sup>d</sup> ±1.73	32.0 <sup>cd</sup> ±1.73

แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

อักษรที่แสดงแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก



### 3. การยับยั้งแบคทีเรียจากตัวทำละลาย (MIC)

Solvent	Bacteria	Gram	MIC (mg/ml)			mean	S.D.	S.E.
			1	2	3			
Hexane	<i>Ps. aeruginosa</i>	Negative	10.50	10.50	15	12	2.59	1.50
	<i>P. vulgaris</i>		18	18	18	18	0	0
	<i>S. typhimurium</i>		10.50	10.50	7.50	9.5	1.73	1
	<i>V. parahaemolyticus</i>		30	33	30	31	1.73	1
	<i>B. subtilis</i>	Positive	3	3	3	3	0	0
Acetone	<i>Ps. aeruginosa</i>	Negative	9	10.50	13.50	11	2.29	1.32
	<i>P. vulgaris</i>		18	18	21	19	1.73	1.00
	<i>S. typhimurium</i>		21	16.50	15	17.50	3.12	1.80
	<i>V. parahaemolyticus</i>		>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>B. subtilis</i>	Positive	3	3	3	3	0	0
Methanol	<i>Ps. aeruginosa</i>	Negative	3	3	3	3	0	0
	<i>P. vulgaris</i>		15	12	15	14	1.73	1.00
	<i>S. typhimurium</i>		18	18	18	18	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i>		>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>B. subtilis</i>	Positive	16.50	18	18	17.50	0.87	0.50

4. การฆ่าแบคทีเรียจากตัวทำละลาย (MBC)

Solvent	Bacteria	Gram	MBC (mg/ml)			mean	S.D.	S.E.
			1	2	3			
Hexane	<i>Ps. aeruginosa</i>	Negative	21	16.50	21	19.50	2.59	1.50
	<i>P. vulgaris</i>		>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>S. typhimurium</i>		10.50	10.50	7.50	9.50	1.73	1.00
	<i>V. parahaemolyticus</i>		>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>B. subtilis</i>	Positive	3	3	3	3	0	0
Acetone	<i>Ps. aeruginosa</i>	Negative	15	18	13.50	15.50	2.29	1.32
	<i>P. vulgaris</i>		>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>S. typhimurium</i>		18	18	16.50	17.50	0.87	0.50
	<i>V. parahaemolyticus</i>		>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>B. subtilis</i>	Positive	3	6	12	7	7.03	4.58
Methanol	<i>Ps. aeruginosa</i>	Negative	3	4.50	3	3.5	0.87	0.50
	<i>P. vulgaris</i>		>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>S. typhimurium</i>		18	18	18	18	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i>		>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>B. subtilis</i>	Positive	18	21	21	20	1.73	1.00

5. การยับยั้งเชื้อราจากตัวทำละลาย (MIC)

solvent	Fungi	MIC (mg/ml)			mean	S.D.	S.E.
		1	2	3			
Hexane	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>A. versicolor</i>	>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>A. fumigatus</i>	>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>A. ochraceus</i>	>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>A. phoenicis</i>	>36	>36	>36	>36	0	0
Acetone	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	33	36	33	34.00	1.73	1
	<i>A. versicolor</i>	>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>A. fumigatus</i>	>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>A. ochraceus</i>	>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>A. phoenicis</i>	33	33	36	34	1.73	1
Methanol	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	21	21	18	20	1.73	1
	<i>A. versicolor</i>	27	27	30	28	1.73	1
	<i>A. fumigatus</i>	24	24	24	24	0	0
	<i>A. ochraceus</i>	21	21	18	20	1.73	1
	<i>A. phoenicis</i>	33	33	30	32	1.73	1

6. การฆ่าเชื้อราจากตัวทำละลาย (MFC)

Solvent	Fungi	MFC (mg/ml)			mean	S.D.	S.E.
		1	2	3			
Hexane	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>A. versicolor</i>	>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>A. fumigatus</i>	>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>A. ochraceus</i>	>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>A. phoenicis</i>	>36	>36	>36	>36	0	0
Acetone	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	33	36	33	34	1.73	1
	<i>A. versicolor</i>	>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>A. fumigatus</i>	>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>A. ochraceus</i>	>36	>36	>36	>36	0	0
	<i>A. phoenicis</i>	33	33	36	34	1.73	1
Methanol	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	18	21	21	20	1.73	1
	<i>A. versicolor</i>	27	27	30	28	1.73	1
	<i>A. fumigatus</i>	24	27	30	26	8.65	5
	<i>A. ochraceus</i>	21	21	36	27	3	1.73
	<i>A. phoenicis</i>	33	33	30	32	1.73	1

7. การต้านอนุมูลอิสระจากสิ่งสกัดด้วยวิธี DPPH scavenging

Crude	rep	Absorbance 517 nm				
		Concentration				
		0.1	0.25	0.5	0.75	1
Hexane	1	0.845	0.826	0.784	0.633	0.524
	2	0.877	0.86	0.709	0.676	0.518
	3	0.842	0.842	0.705	0.656	0.489
	mean	0.854	0.843	0.733	0.655	0.510
Acetone	1	0.337	0.131	0.138	0.131	0.121
	2	0.398	0.122	0.146	0.141	0.123
	3	0.396	0.124	0.136	0.131	0.122
	mean	0.377	0.126	0.14	0.134	0.122
Methanol	1	0.441	0.326	0.23	0.119	0.953
	2	0.46	0.34	0.219	0.209	0.958
	3	0.422	0.345	0.213	0.213	0.985
	mean	0.441	0.337	0.221	0.180	0.965
Ascorbic	1	0.082	0.072	0.063	0.058	0.044
	2	0.09	0.075	0.066	0.051	0.041
	3	0.08	0.074	0.066	0.055	0.044
	mean	0.084	0.074	0.065	0.055	0.043

8. การต้านอนุมูลอิสระจากสิ่งสกัดด้วยการหา ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

ตัวทำละลาย	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	
Hexane	0.216	0.573	0.223	0.325
Acetone	0.257	0.335	0.419	0.337
Methanol	0.756	0.414	0.332	0.500
สารมาตรฐาน Gallic acid (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)				
0	0	0	0	0
20	0.325	0.263	0.461	0.350
40	0.574	0.589	0.476	0.546
60	0.575	0.576	0.885	0.679
80	0.856	0.906	0.840	0.867

9. ตารางสถิติ ในการทดสอบฤทธิ์ MIC (mg/ml) ของแบคทีเรีย

Solvent	Bacteria	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Hexane	<i>Ps. aeruginosa</i>	3	12.0000	2.59808	1.50000	5.5460	18.4540	10.50	15.00
	<i>P. vulgaris</i>	3	18.0000	.00000	.00000	18.0000	18.0000	18.00	18.00
	<i>S. typhimurium</i>	3	9.5000	1.73205	1.00000	5.1973	13.8027	7.50	10.50
	<i>V. parahaemolyticus</i>	3	31.0000	1.73205	1.00000	26.6973	35.3027	30.00	33.00
	<i>B. subtilis</i>	3	3.0000	.00000	.00000	3.0000	3.0000	3.00	3.00
Acetone	<i>Ps. aeruginosa</i>	3	11.0000	2.29129	1.32288	5.3081	16.6919	9.00	13.50
	<i>P. vulgaris</i>	3	19.0000	1.73205	1.00000	14.6973	23.3027	18.00	21.00
	<i>S. typhimurium</i>	3	17.5000	3.12250	1.80278	9.7433	25.2567	15.00	21.00
	<i>V. parahaemolyticus</i>	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
	<i>B. subtilis</i>	3	3.0000	.00000	.00000	3.0000	3.0000	3.00	3.00
Methanol	<i>Ps. aeruginosa</i>	3	3.0000	.00000	.00000	3.0000	3.0000	3.00	3.00
	<i>P. vulgaris</i>	3	14.0000	1.73205	1.00000	9.6973	18.3027	12.00	15.00
	<i>S. typhimurium</i>	3	18.0000	.00000	.00000	18.0000	18.0000	18.00	18.00
	<i>V. parahaemolyticus</i>	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
	<i>B. subtilis</i>	3	17.5000	.86603	.50000	15.3487	19.6513	16.50	18.00
	Total	45	16.5667	10.63528	1.58541	13.3715	19.7619	3.00	36.00

Crude	Bacteria	N	Subset for alpha = .05					
			a	b	c	d	e	f
Hexane	<i>B.subtilis</i>	3	3.0000					
Acetone	<i>B.subtilis</i>	3	3.0000					
Methanol	<i>Ps.aeruginosa</i>	3	3.0000					
Hexane	<i>S. typhimurium</i>	3		9.5000				
Acetone	<i>Ps.aeruginosa</i>	3		11.0000				
Hexane	<i>Ps.aeruginosa</i>	3		12.0000	12.0000			
Methanol	<i>P.vulgaris</i>	3			14.0000			
Acetone	<i>S. typhimurium</i>	3				17.5000		
Methanol	<i>B.subtilis</i>	3				17.5000		
Hexane	<i>P.vulgaris</i>	3				18.0000		
Methanol	<i>S. typhimurium</i>	3				18.0000		
Acetone	<i>P.vulgaris</i>	3				19.0000		
Hexane	<i>V. parahaemolyticus</i>	3					31.0000	
Acetone	<i>V. parahaemolyticus</i>	3						36.0000
Methanol	<i>V. parahaemolyticus</i>	3						36.0000
	Sig.		1.000	.065	.117	.289	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.00.

10. ตารางสถิติ ในการทดสอบฤทธิ์ MBC (mg/ml) ของแบคทีเรีย

Crude	Bacteria	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Hexane	<i>Ps. aeruginosa</i>	3	19.5000	2.59808	1.50000	13.0460	25.9540	16.50	21.00
	<i>P. vulgaris</i>	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
	<i>S. typhimurium</i>	3	9.5000	1.73205	1.00000	5.1973	13.8027	7.50	10.50
	<i>V. parahaemolyticus</i>	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
	<i>B. subtilis</i>	3	3.0000	.00000	.00000	3.0000	3.0000	3.00	3.00
Acetone	<i>Ps. aeruginosa</i>	3	15.5000	2.29129	1.32288	9.8081	21.1919	13.50	18.00
	<i>P. vulgaris</i>	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
	<i>S. typhimurium</i>	3	17.5000	.86603	.50000	15.3487	19.6513	16.50	18.00
	<i>V. parahaemolyticus</i>	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
	<i>B. subtilis</i>	3	7.0000	4.58258	2.64575	-4.3837	18.3837	3.00	12.00
Methanol	<i>Ps. aeruginosa</i>	3	3.5000	.86603	.50000	1.3487	5.6513	3.00	4.50
	<i>P. vulgaris</i>	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
	<i>S. typhimurium</i>	3	18.0000	.00000	.00000	18.0000	18.0000	18.00	18.00
	<i>V. parahaemolyticus</i>	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
	<i>B. subtilis</i>	3	20.0000	1.73205	1.00000	15.6973	24.3027	18.00	21.00
	Total	45	21.9667	12.72855	1.89746	18.1426	25.7907	3.00	36.00

Crude	Bacteria	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Hexane	<i>B. subtilis</i>	3	3.0000				
Methanol	<i>Ps. aeruginosa</i>	3	3.5000				
Acetone	<i>B. subtilis</i>	3		7.0000			
Hexane	<i>S.typhimurium</i>	3		9.5000			
Acetone	<i>Ps. aeruginosa</i>	3			15.5000		
Acetone	<i>S.typhimurium</i>	3			17.5000	17.5000	
Methanol	<i>S.typhimurium</i>	3			18.0000	18.0000	
Hexane	<i>Ps. aeruginosa</i>	3				19.5000	
Methanol	<i>B. subtilis</i>	3				20.0000	
Acetone	<i>P.vulgaris</i>	3					36.00
Acetone	<i>V.parahaemolyticus</i>	3					36.00
Hexane	<i>P.vulgaris</i>	3					36.00
Hexane	<i>V.parahaemolyticus</i>	3					36.00
Methanol	<i>P.vulgaris</i>	3					36.00
Methanol	<i>V.parahaemolyticus</i>	3					36.00
	Sig.		.712	.072	.087	.098	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.00.

11. ตารางสถิติในการทดสอบฤทธิ์ MIC (mg/ml) ของเชื้อรา

Crude	Fungi	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Hexane	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	3	36.00	.00	.00	36.00	36.00	36.00	36.00
	<i>A. versicolor</i>	3	36.00	.00	.00	36.00	36.00	36.00	36.00
	<i>A. fumigatus</i>	3	36.00	.00	.00	36.00	36.00	36.00	36.00
	<i>A. ochraceus</i>	3	36.00	.00	.00	36.00	36.00	36.00	36.00
	<i>A. phoenicis</i>	3	36.00	.00	.00	36.00	36.00	36.00	36.00
Acetone	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	3	34.00	1.73	1.00	29.69	38.30	33.00	36.00
	<i>A. versicolor</i>	3	36.00	.00	.00	36.00	36.00	36.00	36.00
	<i>A. fumigatus</i>	3	36.00	.00	.00	36.00	36.00	36.00	36.00
	<i>A. ochraceus</i>	3	36.00	.00	.00	36.00	36.00	36.00	36.00
	<i>A. phoenicis</i>	3	34.00	1.73	1.00	29.69	38.30	33.00	36.00
Methanol	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	3	20.00	1.73	1.00	15.69	24.30	18.00	21.00
	<i>A. versicolor</i>	3	28.00	1.73	1.00	23.69	32.30	27.00	30.00
	<i>A. fumigatus</i>	3	24.00	.00	.00	24.00	24.00	24.00	24.00
	<i>A. ochraceus</i>	3	20.00	1.73	1.00	15.69	24.30	18.00	21.00
	<i>A. phoenicis</i>	3	32.00	1.73	1.00	27.69	36.30	30.00	33.00
	Total	45	32.00	5.93	.88	30.22	33.78	18.00	36.00

Crude	Fungi	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Methanol	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	3	20.00				
Methanol	<i>A. ochaceus</i>	3	20.00				
Methanol	<i>A. fumigatus</i>	3		24.00			
Methanol	<i>A. versicolor</i>	3			28.00		
Methanol	<i>A. phoenicis</i>	3				32.00	
Acetone	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	3					34.00
Acetone	<i>A. phoenicis</i>	3					34.00
Hexane	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	3					36.00
Hexane	<i>A. versicolor</i>	3					36.00
Hexane	<i>A. fumigatus</i>	3					36.00
Hexane	<i>A. ochaceus</i>	3					36.00
Hexane	<i>A. phoenicis</i>	3					36.00
Acetone	<i>A. versicolor</i>	3					36.00
Acetone	<i>A. fumigatus</i>	3					36.00
Acetone	<i>A. ochaceus</i>	3					36.00
Sig.			1.00	1.00	1.00	1.00	.07

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.00.

12. ตารางสถิติในการทดสอบฤทธิ์ MFC ของเชื้อรา

Crude	Fungi	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for		Minimum	Maximum
						Mean			
						Lower Bound	Upper Bound		
Hexane	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
	<i>A. versicolor</i>	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
	<i>A. fumigatus</i>	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
	<i>A. ochraceus</i>	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
	<i>A. phoenicis</i>	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
Acetone	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	3	34.0000	1.73205	1.00000	29.6973	38.3027	33.00	36.00
	<i>A. versicolor</i>	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
	<i>A. fumigatus</i>	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
	<i>A. ochraceus</i>	3	36.0000	.00000	.00000	36.0000	36.0000	36.00	36.00
	<i>A. phoenicis</i>	3	34.0000	1.73205	1.00000	29.6973	38.3027	33.00	36.00
Methanol	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	3	20.0000	1.73205	1.00000	15.6973	36.0000	18.00	21.00
	<i>A. versicolor</i>	3	28.0000	1.73205	1.00000	23.6973	32.3027	27.00	30.00
	<i>A. fumigatus</i>	3	27.0000	3.00000	1.73205	19.5476	34.4524	24.00	30.00
	<i>A. ochraceus</i>	3	26.0000	8.66025	5.00000	4.4867	47.5133	21.00	36.00
	<i>A. phoenicis</i>	3	32.0000	1.73205	1.00000	27.6973	36.3027	30.00	33.00
	Total	45	32.6000	5.33598	.79544	30.9969	34.2031	18.00	36.00

Crude	Fungi	N	Subset for alpha = .05			
			a	b	c	d
Methanol	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	3	20.0000			
Methanol	<i>A. ochraceus</i>	3		26.0000		
Methanol	<i>A. fumigatus</i>	3		27.0000		
Methanol	<i>A. versicolor</i>	3		28.0000	28.0000	
Methanol	<i>A. phoenicis</i>	3			32.0000	32.0000
Acetone	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	3				34.0000
Acetone	<i>A. phoenicis</i>	3				34.0000
Hexane	<i>A. flavus</i> TISTR 8041	3				36.0000
Hexane	<i>A. versicolor</i>	3				36.0000
Hexane	<i>A. fumigatus</i>	3				36.0000
Hexane	<i>A. ochraceus</i>	3				36.0000
Hexane	<i>A. phoenicis</i>	3				36.0000
Acetone	<i>A. versicolor</i>	3				36.0000
Acetone	<i>A. fumigatus</i>	3				36.0000
Acetone	<i>A. ochraceus</i>	3				36.0000
	Sig.		1.000	.377	.066	.116

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.00.

13. ตารางแสดงสถิติในการทดสอบความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging

Crude	Conc.	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Hexane	0.1	3	43.66	1.28	.74	40.48	46.84	42.19	44.49
	0.25	3	44.45	1.12	.65	41.67	47.24	43.31	45.55
	0.5	3	51.70	2.93	1.69	44.42	58.99	48.32	53.53
	0.75	3	55.66	2.51	1.45	49.42	61.89	53.26	58.27
	1	3	66.36	1.23	.71	63.30	69.42	65.46	67.77
Acetone	0.1	3	75.15	2.28	1.32	69.47	80.82	73.76	77.79
	0.25	3	91.72	.31	.18	90.94	92.49	91.36	91.96
	0.5	3	90.77	.35	.20	89.90	91.64	90.38	91.03
	0.75	3	91.14	.38	.22	90.19	92.09	90.71	91.36
	1	3	91.96	.07	.04	91.79	92.13	91.89	92.03
Methanol	0.1	3	70.93	1.25	.72	67.81	74.04	69.68	72.18
	0.25	3	77.79	.65	.37	76.17	79.39	77.26	78.51
	0.5	3	85.45	.57	.33	84.04	86.87	84.84	85.96
	0.75	3	88.11	3.50	2.02	79.41	96.82	85.95	92.16
	1	3	36.37	1.13	.66	33.55	39.19	35.07	37.18
Ascorbic acid	0.1	3	94.46	.35	.20	93.59	95.33	94.07	94.73
	0.25	3	95.14	.10	.058	94.89	95.39	95.06	95.25
	0.5	3	95.72	.11	.066	95.43	95.99	95.65	95.85
	0.75	3	96.52	.30	.17	95.77	97.26	96.18	96.73
	1	3	97.17	.11	.066	96.88	97.45	97.09	97.29
		60	77.01	20.04	2.59	71.84	82.19	35.07	97.29

Crude	Conc.	N	Subset for alpha = .05													
			a	b	c	d	e	f	G	h	i	j	k	l	m	
Methanol	1	3	36.37													
Hexane	0.1	3		43.66												
Hexane	0.25	3		44.45												
Hexane	0.5	3			51.70											
Hexane	0.75	3				55.66										
Hexane	1	3					66.36									
Methanol	0.1	3						70.93								
Acetone	0.1	3							75.15							
Methanol	0.25	3								77.79						
Methanol	0.5	3									85.45					
Methanol	0.75	3										88.11				
Acetone	0.5	3											90.77			
Acetone	0.75	3												91.14		
Acetone	0.25	3												91.72		
Acetone	1	3												91.96		
Ascorbic acid	0.1	3													94.46	
Ascorbic acid	0.25	3													95.14	95.14
Ascorbic acid	0.5	3													95.72	95.72
Ascorbic acid	0.75	3													96.52	96.52
Ascorbic acid	1	3														97.17
			1.00	.50	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.36	.12	.12

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.00.

14. ตารางแสดงสถิติในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

ตัวทำละลาย	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Hexane	3		
Acetone	3	.34	.08	.05	-.14	.54	.26	.42
Methanol	3	.50	.22	.13	-.06	1.06	.33	.76
Total	9	.39	.18	.06	.26	.53	.22	.76

ตัวทำละลาย	N	Subset for alpha = .05
		1
Hexane	3	.3370
Acetone	3	.3373
Methanol	3	.5007
Sig.		.326

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.