

การศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบ
ต้นพญาสัตบรรณ

PHYTOCHEMICAL SCREENING AND BIOACTIVITIES OF
CRUDE EXTRACT FROM *Alstonia scholaris*

กุศลสิน แส่นศักดิ์
เขมทัต เลิศธนกุล

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบ
ต้นพญาสัตบรรณ

PHYTOCHEMICAL SCREENING AND BIOACTIVITIES OF
CRUDE EXTRACT FROM *Alstonia scholaris*

กุศลิน แสนศักดิ์
เขมทัต เลิศธนกุล

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

PHYTOCHEMICAL SCREENING AND BIOACTIVITIES OF
CRUDE EXTRACT FROM *Alstonia scholaris*

KUSALIN

SANSAK

KHEMMATAT

LERTTHANAKUN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงการพิเศษ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ
(Phytochemical Screening and Bioactivity of Crude Extract from *Alstonia scholaris*)

ชื่อนักศึกษา นางสาวกุศลิน แสนศักดิ์ รหัสนักศึกษา 57050804
นายเขมทัต เลิศธนกุล รหัสนักศึกษา 57050806


ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. วรกฤต วรนนท์กิจ ประธานกรรมการ	
ดร.วรภัทร์ สงวนไชยผ่องศรี กรรมการ	วรภัทร์ สงวนไชยผ่องศรี
ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	สุทธิจิต ศรีวัชรกุล

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบต้น พญาสัตบรรณ		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกุศลิน แสนศักดิ์	นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส	57050804
	นายเขมทัต เลิศธนกุล	นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส	57050806
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2560		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล		

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อหารสารพฤกษเคมี สารต้านอนุมูลอิสระ และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากต้นพญาสัตบรรณ 3 ส่วน ได้แก่ส่วนใบ ส่วนดอก พบว่าสารสกัดส่วนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุดที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดส่วนกิ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและแทนนินมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 0.19 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดและ 210.25 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ ปริมาณแอนโทไซยานินที่วิเคราะห์ด้วยวิธี pH differential มากที่สุดที่ส่วนดอกเท่ากับ 14.86 มิลลิกรัม cyanidin-3-glucosideต่อลิตรสารสกัด การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าค่า MBC สารสกัดส่วนกิ่งที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *B. cereus* ส่วนใบและส่วนดอกที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *B. cereus* และ *E. coli* และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC-MS มีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกัน 5 ชนิดได้แก่ 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl Quinic acid Hexadecanoic acid Phytol และ Linolenic

คำสำคัญ : พญาสัตบรรณ สารพฤกษเคมี ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ GC-MS

Title	Phytochemical screening and Bioactivity of crude extract from <i>Alstonia scholaris</i>		
Students	Miss Kusalin	Sansak	Student ID 57050804
	Mr. Khemmatat	Lertthanakun	Student ID 57050806
Degree	Bachelor of Science		
Department	Biology		
Academic Year	2017		
Advisor	Dr. Suttijit Sriwatcharakul		

Abstract

The objective of this research was study the leaf branch and flowers of *Alstonia scholaris* crude ethanolic extracts. To determine the phytochemicals composition, antioxidant and antibacterial. To determine free radical scavenging activity, expressed in terms of IC₅₀ found that for branch extracts give the best result at 0.95 mg/ml. Searched for phytochemicals from the extracts found that branch extracts had the highest contents of total phenolic and tannin as 0.19 mg GAE/g extract and 210.25 mg TAE/g extract respectively. The highest flavonoid content found in leaf extract as 118.60 mg QAE/g extract. And searching for the highest anthocyanin content by pH differential method exhibited in flower extract as 14.86 mg cyanidin-3-glucoside/l extract. The crude extracts were investigated the Minimum bactericidal concentration (MBC) by broth dilution method with 6 bacterial strains *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. The lowest concentration of branch extract against *B. cereus* was 25 mg/ml. The lowest concentration of leaf and flower extracts were 50 mg/ml against *B. cereus* and *E. coli*. To analyzed chemical compositions by GC-MS the result revealed that leaf, branch and flower extracts have the same composition are 2,3 - dihydro-3,5 - dihydroxy-6 - methyl Quinic acid Hexadecanoic acid Phytol and Linolenic acid

Keywords: *Alstonia scholaris*, Phytochemical, antibacterial, antioxidant, GC-MS

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ช่วยเหลือในทุกปัญหาการวิจัย พร้อมทั้งให้กำลังใจ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมารวมทั้งให้ความรู้แก่ ข้าพเจ้า ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง และขอบพระคุณ ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ที่กรุณาแนะนำข้อบกพร่องเพื่อให้ข้าพเจ้าได้ปรับปรุงแก้ไขโครงการพิเศษ ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. วรภฤต วรรณทกิจ ที่ช่วยชี้แนะแนวทางในการดำเนินงานวิจัยให้ ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณะอาจารย์ในภาควิชาชีววิทยา สาขาวิชาเคมี สาขาวิชาสถิติทุกท่านที่มอบ ความรู้ในเชิงทฤษฎีและทักษะในด้านการปฏิบัติ ซึ่งข้าพเจ้าสามารถนำมาใช้ในการทำโครงการพิเศษฉบับ นี้ได้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ภาคชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการ เบิกเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีรวมถึงอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ประจำสถานที่ ที่อนุเคราะห์เรื่องวัตถุดิบ สำหรับใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนด้านปัจจัยต่าง ๆ ในการศึกษาของ ข้าพเจ้าเสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้ข้อคิดเห็นสิ่งต่างๆที่ดีเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของการทำโครงการพิเศษฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่ บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และ ประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

กุศลลิน แสนศักดิ์

เขมทัต เลิศธนกุล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ญาสัตว์บรรณ.....	4
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.....	4
2.2 สารสกัดหยาบ.....	5
2.2.1.วิธีการสกัดสารสำคัญจากพืช.....	6
2.2.1.1 วิธีการหมัก.....	6
2.2.1.2 วิธีการหมักแบบต่อเนื่อง.....	6
2.2.1.3 วิธีชอกซ์เลตเอกแทรกเตอร์.....	6
2.2.2 คุณสมบัติของตัวทำละลาย.....	7
2.2.2.1 คลอโรฟอร์ม.....	7
2.2.2.2 อีเทอร์.....	7
2.2.2.3 เฮกเซน.....	7
2.2.2.4 แอลกอฮอล์.....	7
2.2.2.5 น้ำ.....	8
2.3 พฤษเคมีเบื้องต้น.....	8
2.3.1 แคโรทีนอยด์.....	8

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.2 ฟลาโวนอยด์.....	8
2.3.3 แอนโทไซยานิน.....	9
2.3.4 ฟีนอลิก.....	10
2.3.5 ซาโปนิน.....	10
2.3.6 แทนนิน.....	11
2.4 อนุมูลอิสระ.....	12
2.4.1 สารต้านอนุมูลอิสระ.....	12
2.5 เชื้อแบคทีเรียและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากพืช.....	13
2.5.1 เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค.....	13
2.5.1.1 <i>Salmonella typhimurium</i>	13
2.5.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
2.5.1.3 <i>Escherichia coli</i>	13
2.5.1.4 <i>Bacillus cereus</i>	14
2.5.1.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.5.1.6 <i>Micrococcus luteus</i>	14
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	17
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	17
3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	18
3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	19
3.3.1 การเตรียมพืชตัวอย่าง.....	19
3.3.2 การเตรียมสารสกัดหยาบ.....	19
3.3.3 ทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	19
3.3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด.....	19
3.3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์.....	20
3.3.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนิน.....	20
3.3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิก.....	21

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.3.5. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน.....	22
3.3.3.6. วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH.....	22
3.3.4 ตรวจสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค.....	22
3.3.5 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC).....	23
3.3.6 การประเมินผลทางสถิติ.....	23
3.3.7 การคำนวณ Inhibitory Concentration 50.....	23
บทที่ 4 ผลการวิจัยและปรายผล.....	24
4.1 ปริมาณผลได้ของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ.....	25
4.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ.....	26
4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวมของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ.....	28
4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ.....	27
4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแทนนินของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ.....	28
4.6 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ.....	29
4.7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ.....	30
4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ.....	35
4.8.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย.....	37
4.8.2 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย.....	42
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	46
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	46
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	48
เอกสารอ้างอิง.....	49
ภาคผนวก ก.....	57
ภาคผนวก ข.....	59
ภาคผนวก ค.....	61
ภาคผนวก ง.....	63
ภาคผนวก จ.....	66
ภาคผนวก ฉ.....	68

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ข.....	70

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 ผลได้ของการสกัดสารสกัดหยาบเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 3 ส่วนของต้น พญาสัตบรรณ.....	24
ตารางที่ 4.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ.....	25
ตารางที่ 4.3 ปริมาณแอนโทไซยานินรวมของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ.....	26
ตารางที่ 4.4 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ.....	27
ตารางที่ 4.5 ปริมาณแทนนินของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนของต้นพญาสัตบรรณ.....	28
ตารางที่ 4.6 ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ.....	29
ตารางที่ 4.7 ความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูล DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC ₅₀) ของ สารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ.....	30
ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography -Mass spectrometry (GC-MS).....	31
ตารางที่ 4.9 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ.....	37
ตารางที่ 4.10 ผลการหาค่าความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย.....	42
ตาราง ค-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของต้น พญาสัตบรรณ.....	62
ตาราง ฉ-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของสารประกอบแอนโทไซยานินจากส่วนต่างๆของต้น พญาสัตบรรณ.....	69
ตารางที่ ข-1 ผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของ สารสกัดส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	70

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ข-2 ผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	73
ตารางที่ ข-3 ผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	76
ตารางที่ ข-4 ผลการหาค่าความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย.....	79
ตารางที่ ข-5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร.....	80
ตารางที่ ข-6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดหยาบจากต้นพญาสัตบรรณ.....	80
ตารางที่ ข-7 การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากกิ่ง ใบ และดอกของต้นพญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	81
ตารางที่ ข-8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของวิตามินอี.....	82
ตารางที่ ข-9 ค่าร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี.....	82
ตารางที่ ข-10 เปอร์เซนต์ของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วน กิ่ง ใบ และดอกของต้นพญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	82
ตารางที่ ข-11 ค่าเฉลี่ยร้อยละของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วน กิ่ง ใบ และดอกของต้นพญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	83
ตารางที่ ข-12 แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระครึ่งหนึ่งจากปริมาณทั้งหมด (IC ₅₀) ของสารสกัดหยาบส่วน กิ่งใบ และดอกของต้นพญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	83
ตารางที่ ข-13 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบ กิ่ง ใบ และดอกของต้นพญาสัตบรรณ ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร.....	85

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ข-14 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในหน่วยมิลลิกรัมของควอซิตินต่อกรัมของสารสกัด (mg of -quercetin equivalents (QE/g of extract) ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของสารจากส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	85
ตารางที่ ข-15 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในหน่วยมิลลิกรัมของควอซิตินต่อกรัมของสารสกัด (mg of quercetin equivalents (QE/100 g of extract) ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร จากส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	86
ตารางที่ ข-16 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรของสารสกัดจากส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณ.....	87
ตารางที่ ข-17 ปริมาณสารแทนนินในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัด (mg of tannic acid equivalents (TAE)/g of extract) ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จากส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจากสมการกราฟมาตรฐาน.....	88
ตารางที่ ข-18 ปริมาณสารแทนนินในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg of tannic acid equivalents (TAE)/100 g dry weight) ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จากส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจากสมการกราฟมาตรฐาน.....	89
ตารางที่ ข-19 ค่าการดูดกลืนแสงของ KCl pH 1.0 ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร.....	89
ตารางที่ ข-20 ค่าการดูดกลืนแสงของ KCl pH 1.0 ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร.....	89
ตารางที่ ข-21 ค่าการดูดกลืนแสงของ CH ₃ COONa pH 4.5 ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร.....	90
ตารางที่ ข-22 ค่าการดูดกลืนแสงของ CH ₃ COONa pH 4.5 ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร.....	90
ตารางที่ ข-23 ค่าเฉลี่ยการหาสารประกอบแอนโทไซยานิน.....	90

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ข-1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>B.cereus</i> จากสารสกัดหยาบจากต้น พญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	91
ตารางที่ ข-2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>E.coli</i> จากสารสกัดหยาบจากต้น พญาสัตบรรณที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	94
ตารางที่ ข-3 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>S.typhimurium</i> จากสารสกัดหยาบจาก ต้นพญาสัตบรรณที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	97
ตารางที่ ข-4 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>P.auroginosa</i> จากสารสกัดหยาบจากต้น พญาสัตบรรณที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	100
ตารางที่ ข-5 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>S.aureus</i> จากสารสกัดหยาบจากต้น พญาสัตบรรณที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	103
ตารางที่ ข-6 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>M.luteus</i> จากสารสกัดหยาบจากต้น พญาสัตบรรณที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	106
ตารางที่ ข-7 แสดงร้อยละของคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วน ใบ กิ่ง และดอกของต้น พญาสัตบรรณ.....	109
ตารางที่ ข-8 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากส่วน ใบ กิ่ง และดอก จากต้น พญาสัตบรรณ.....	112
ตารางที่ ข-9 แสดงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบส่วน ใบ กิ่ง และดอก จาก ต้นพญาสัตบรรณ.....	113
ตารางที่ ข-10 แสดงปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบส่วน ใบ กิ่ง และดอก จากต้น พญาสัตบรรณ.....	114
ตารางที่ ข-11 แสดงปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดหยาบส่วน ใบ กิ่ง และดอก จากต้นพญาสัตบรรณ.....	115

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นพญาสัตบรรณ.....	5
รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์.....	8
รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์.....	9
รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน.....	10
รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกส์.....	10
รูปที่ 2.6 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มซาโปนิน.....	11
รูปที่ 2.7 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มแทนนิน.....	11
รูปที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วน.....	24
รูปที่ 4.2 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบส่วนดอก.....	33
รูปที่ 4.3 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบส่วนใบ.....	34
รูปที่ 4.4 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบส่วนกิ่ง.....	34
รูปที่ 4.5 บริเวณการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตรของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วน.....	36
รูปที่ 4.6 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วนที่ความเข้มข้น 50 100 และ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.....	39
รูปที่ 4.7 ความสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ ทั้ง 3 ส่วน.....	43
รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก.....	60
รูปที่ ง-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณสารละลายควอซิทินในหน่วย ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	65
รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของกรดแกลลิกสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด.....	80
รูปที่ ข-2 กราฟแสดงกราฟค่า IC ₅₀ ที่ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระครั้งหนึ่งจากปริมาณทั้งหมดของ สารสกัดหยาบ.....	84

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ ข-3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารของควอซิตินในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิตร สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด.....	84
รูปที่ ข-4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารของกรดแทนนิกในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิตร.....	87

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในปี 2015 องค์การอนามัยโลกเตือนว่าเรากำลังถอยหลังกลับไปสู่ยุคก่อนหน้าที่จะมียาปฏิชีวนะ และ จะมีคนเสียชีวิตมากขึ้นจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากการรักษาในวงการแพทย์ได้ใช้ยาเพนิซิลินฆ่าเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดมา 87 ปีที่แล้วแต่มาถึงตอนนี้มีเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดต้องอาศัยยาปฏิชีวนะมากขึ้นจากการตรวจสอบจากสำนักงานควบคุมโรคแห่งสหรัฐอเมริกาหรือ Centers for Disease Control and Prevention พบประชากรเสียชีวิตจากการติดเชื้อโรคดื้อยา ซึ่งปัญหาเชื้อโรคดื้อยาเป็นปัญหาใหญ่ ที่ผ่านมาระยะมียาปฏิชีวนะหลายชนิดเพื่อใช้บำบัดโรค และ เมื่อยาปฏิชีวนะชนิดหนึ่งใช้ไม่ได้ผล เราจะปรับไปใช้ยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์แรงขึ้นแต่มาในขณะนี้เราไม่มียาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์แรงมากพอที่จะรักษาเชื้อแบคทีเรียดื้อยาได้ และ ในปัจจุบันจึงเริ่มหันไปหาเภสัชพฤกษศาสตร์วิทยา โดยมีการค้นพบพืชที่มีคุณสมบัติทางเคมีหลายพันรายการ ที่เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้แทนหรือใช้ร่วมกันเพื่อเสริมฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะในการรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยมีพืชหลายชนิดที่ถือเป็นทางเลือกสำหรับการผลิตสารที่สามารถทำหน้าที่เป็นแทนการใช้ยาปฏิชีวนะหรือนำมาใช้ร่วมกันในการรักษา จากการศึกษา และ พัฒนาพืชตระกูลต่างๆที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งในการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเริ่มมีผลข้างเคียงจากการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาสังเคราะห์ทางเคมีมากขึ้น และต้นพญาสัตบรรณ หรือ ตีนเป็ด (ชื่อวิทยาศาสตร์: *Alstonia scholaris*) ก็เป็นหนึ่งในพืชที่นำมาวิจัยและพัฒนาโดยต้นตีนเป็ดเป็นต้นไม้ที่พบได้ทั่วไปลักษณะเด่นคือดอกมีกลิ่นหอมแรงไปจนกระทั่งกลิ่นลักษณะทั่วไปของต้นตีนเป็ด เป็นไม้โตเร็ว ลำต้นสูงใหญ่ และ ไม้ประดับ ให้ใบดกเป็นร่มเงา ดอกมีกลิ่นหอมแรงมากถึงจุดนี้เนื้อไม้นำมาแปรรูปใช้ประโยชน์ได้หลายด้านแต่ไม่นิยมทำเป็นไม้ก่อสร้าง เนื่องจากไม้คงทน เนื้อไม้มีความหนาแน่นต่ำ ต้นตีนเป็ดเป็นพืชท้องถิ่นในเขตร้อน พบได้ในประเทศอินเดีย จีนตอนใต้ อินโดนีเซีย มาเลเซีย ในประเทศไทยพบได้ทั่วไปในทุกภาค เป็นไม้ที่ชอบความชื้นสูง ดินร่วน พบมากบริเวณใกล้แหล่งน้ำในป่าเบญจพรรณ หรือชายป่าพรุ เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ สูง 35-40 เมตร เปลือกมีสีเทาอมเหลือง หรือสีน้ำตาล เมื่อถาดเปลือกออกจะมีสีขาว เปลือกชั้นในสีน้ำตาลมีน้ำยางสีขาว ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงเป็นวงรอบกิ่ง วงละ 5-8 ใบ ก้านใบยาว 1.5-3 ซม. แผ่นใบเหนียวเหมือนหนังคล้ายใบต้นดอกรัก แผ่นใบรูปถึงรูปหอก ปลายใบแหลม และมีติ่งเล็กน้อย ขอบ และ ผิวใบเรียบ ใบอ่อนมีสีด้านบน และ ด้านล่างใกล้เคียงกัน ใบแก่มีใบด้านบนสีเขียวเข้ม ส่วนด้านล่างใบมีสีขาวนวล มีเส้นใบมาก มองเห็นชัดเจน เส้นใบกางออกเป็นมุมฉากกับเส้นกลางใบดอก ออกเป็นดอกช่อ ออกดอกเป็นช่อตามปลายกิ่ง มี

ก้านดอกหลักยาว 3-8.5 เซนติเมตร ก้านดอกย่อยยาว 1 มิลลิเมตร ดอกมีขนาดเล็ก ที่เป็นกลีบดอกรูปไข่ มีหยักเว้า ขนาด 1-1.9 x 1.5-2.3 มิลลิเมตร สีขาวหรือเหลืองอมเขียว ปลายดอกอาจแหลม และ แบบมน มีขนนุ่มปกคลุม ปากท่อด้านในดอกมีขนยาวปุกปุย เกสรตัวผู้อยู่บริเวณกลางวงท่อกลิบดอก อับเรณูเกสรตัวผู้มีขนนุ่มปกคลุม ยาว 1.1-1.5 มิลลิเมตร เกสรตัวเมียมีขนาด 2.8-5.2 มิลลิเมตร ดอกเริ่มบานประมาณ เดือนตุลาคม-ธันวาคม เมื่อดอกบาน 1-2 วัน จะส่งกลิ่นหอมแรงมาก หากดมมากบางคนอาจวิงเวียนศีรษะได้สมบัติทางกายภาพเนื้อไม้ต้นเปลือกมีลักษณะเป็นมัน ไม่มีกลิ่น มีรสขม สีขาวอมเหลืองอ่อนถึงน้ำตาลจางๆ น้ำหนักเบา เส้นตรง เนื้อไม้ค่อนข้างละเอียด สมบัติทางเคมีประกอบด้วย โอลิโกเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนิน เพนโทซาน สารพฤษเคมีต้นต้นเปิด เช่น ลดอาการหวัด รักษามาเลเรีย แก้ท้องเสีย รักษาหลอดลมอักเสบ ขับพยาธิ ขับน้ำเหลืองเสีย ใช้ทารักษาแผล แผลติดเชื้อ เป็นหนอง นำมาอาบ ช่วยป้องกันโรคเชื้อราทางผิวหนัง ช่วยขับพิษต่าง ๆ จากที่กล่าวมาในช่วงต้นของลักษณะต้นที่โตเร็ว และสามารถปลูกได้ทั่วประเทศทำให้เกิดการศึกษาครั้งนี้โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อนำต้นต้นเปิดมาใช้ให้เกิดประโยชน์ และ เพิ่มมูลค่าจากการศึกษาสารสกัดของต้นต้นเปิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อประเมินฤทธิ์ความสามารถในการยับยั้งเชื้อเชื้อจุลินทรีย์จากการใช้สารสกัดจากต้นต้นเปิด

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากต้นพญาสัตบรรณ
2. เพื่อหาสารพิษเคมีที่พบในต้นพญาสัตบรรณ และ ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
3. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการนำสารสกัดทางชีวภาพจากต้นพญาสัตบรรณไปใช้ประโยชน์ในการรักษาแนวทางเลือกแทนยาปฏิชีวนะ

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ในการทำโครงการพิเศษโดยการนำสารสกัดหยาบเอทานอลจากต้นพญาสัตบรรณมาทำการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยทำการสกัดสารทั้งหมด 3 ส่วนได้แก่ ส่วนกิ่ง ส่วนใบ และ ส่วนดอก จากต้นพญาสัตบรรณเพื่อมาหาลำดับประเภทย่อยทางเคมีได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์ แทนนิน แอนโทไซยานิน สารต้านอนุมูลอิสระและการนำสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณแต่ละส่วนมาเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค 6 สายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus cereus* TISTR 5040, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Escherichia coli* ATCC 25299, *Salmonella typhimurium* TISTR 1469 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 โดยใช้วิธี agar well diffusion ในอาหาร MHA และ วิธี broth dilution โดยใช้ยาปฏิชีวนะ Ciprofloxacin 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรเป็นตัวควบคุมเชิงบวก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.ได้ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ
- 2.เป็นแนวทางการศึกษาให้กับผู้ที่สนใจศึกษาการใช้สารสกัดจากต้นพญาสัตบรรณเพื่อประโยชน์ในด้านต่างๆ
- 3.ได้ทราบถึงพิษเคมีและฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พญาสัตบรรณ (*Alstonia scholaris* (L) R.Br.)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Alstonia scholaris* (L) R.Br.

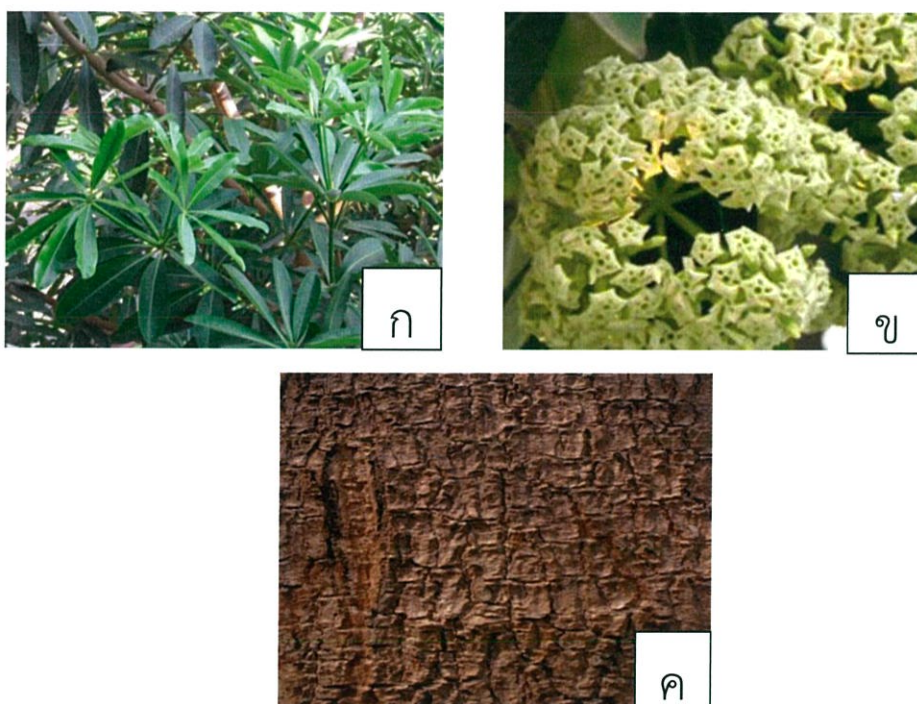
ชื่อวงศ์ : Apocynaceae

ชื่อสามัญ : Dita, Shaitan wood, Devil Tree

ชื่อท้องถิ่น : ตีนเป็ด ตีนเป็ดขาว พญาสัตบรรณ หัสบรรณ หัสบัน จะบัน
บะชา ปูลา ปูแล

Alstonia scholaris เป็นไม้ยืนต้น ขนาดใหญ่ ลำต้นตรง สูงประมาณ 20-30 เมตร เปลือกต้นหนา สีน้ำตาลปนเทาเข้ม มีน้ำยางสีขาวอยู่ภายใน เนื้อไม้อ่อนแต่เหนียว แตกกิ่งก้านเป็นชั้นๆคล้ายฉัตร ก้านใบออกเป็นช่อ 4-8 ใบต่อหนึ่งช่อ แผ่นมีลักษณะเป็นรูปไข่หรือรูปไข่รูปทรงกลม มีขนเล็กน้อย และมีลักษณะเป็นริ้วแหลมที่ปลายฐาน ใบมีความยาว 11.5-23 x 4-7.5 เซนติเมตร ก้านใบมีความยาว 1-1.5 เซนติเมตร พื้นผิวใบด้านบนมีทั้งสีเขียวอ่อนจนถึงสีเขียวเข้ม ใต้ใบมีเส้นใยสีเขียวขาว ปลายใบจะกลมหรือแหลมสั้น ๆ เรียวขึ้นไปตามฐาน ช่อดอกเป็นเกสรช่อปลายยาวถึง 120 เซนติเมตร ดอกไม้สีขาวออกครีมหรือสีเขียว ยาว 7 - 10 มิลลิเมตร มีขนสั้น และ หนาแน่นยาว กลิ่นหอมเย็น ฉุนแรง ผลมีขนสีน้ำตาลหรือเขียวไหม้มีแกนยาว 15-32 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 มิลลิเมตรมีเมล็ดแบนสีน้ำตาลรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า 4-5 x 0.9 - 1.2 มิลลิเมตร มีกระดูกขน 7 - 13 มิลลิเมตร ยาวที่ปลายแต่ละด้าน (ชายชัย, 2561) ส่วนปลายเมล็ดมีขนปุย สีขาวคล้ายฝ้าย ปลิวไปตามลมช่วยแพร่พันธุ์ดังรูปที่ 2.1 และได้รับการตั้งชื่อตาม Dr. C. Alston ศาสตราจารย์พฤกษศาสตร์ที่ Edinburgh University ชื่อเฉพาะของพญาสัตบรรณคือ Scholaris มาจากการใช้เป็นกระดานในโรงเรียนในประเทศพม่า (Pratap et al, 2013) ต้นพญาสัตบรรณโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่เป็น แดดจัด ดินร่วน และความชื้นปานกลาง ทนแล้งได้ดี และเจริญเติบโตเร็ว อาจพบปัญหาเรื่องศัตรูพืชบ้าง โดยสังเกตที่ผิวใบจะมีลักษณะขึ้นเป็นปมเล็กๆ ซึ่งเกิดจากตัวอ่อนของเพลี้ยไก่แจ้ดูดกินน้ำเลี้ยงที่ใบ ควรเด็ดใบ และ กิ่งก้านที่เป็นทิ้งไป บ้างก็ใช้วิธีเผาไฟกิ่งหรือยอดใบที่เป็นโรค (puechkaset.com, 2018) สรรพคุณส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณได้แก่ เปลือกต้น

มีรสขม ใช้รักษาบิด ท้องร่วง โรคลำไส้ ช่วยให้เจริญอาหาร รักษาโรคผิวหนัง แก้หวัด หลอดลมอักเสบ ช่วยสมานลำไส้ แก้ไข้ แก้ไอ ปวดฟัน รักษาพิษงูกัด เบาหวาน ขับพยาธิไส้เดือน ขับระดู ขับน้ำเหลืองเสีย ขับน้ำนม รักษามาเลเรีย ดอก แก้ไข้ ตัวร้อน แก้ไข้เหนือ แก้โลหิตพิการ ใบ แก้ไข้หวัด ไข้ตัวร้อน ใช้พอกดับพิษต่างๆ ใบอ่อนขงต้มรักษาโรคลักปิดลักเปิด ยาง ใช้ทำยารักษาอาการไอ เจ็บคอ แก้ไข้ แผลเน่าเปื่อย แก้ปวดหู เป็นยาบำรุงกระเพาะภายหลังเจ็บไข้ ขับโลหิตให้ตก ราก ขับผายลมในลำไส้ แก้ไข้ รักษาโรคมะเร็ง และส่วนเนื้อไม้ มีสีขาวอมเหลืองอ่อน เนื้ออ่อนหยาบ แต่เหนียว ใช้ทำไม้จิ้มฟัน ทำแท่งดินสอดำ ของเล่นสำหรับเด็ก รองเท้าไม้ ฝักมีดี ลูกหูนอวน แฉว พาย กรรเชียง ทีบใส่ใบชา ทีบใส่ของ ทีบศพ และ ของตกแต่งบ้าน (puechkaset.com, 2018)



รูปที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นพญาสัตบรรณ:ใบ (ก), ดอก (ข) ,ลำต้น (ค)

2.2 สารสกัดหยาบ

สารสกัดหยาบ (Crude extract) หมายถึง สารสกัดจากพืชที่ยังไม่ถึงขั้นตอนทำให้สารบริสุทธิ์ กรรมวิธีการสกัดไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรงหรือนำไปผ่านกรรมวิธีการผลิตก่อนที่จะนำไปทำผลิตภัณฑ์ โดยการนำพืชที่ต้องการแช่ในตัวทำละลายซึ่งเป็นเทคนิคในการแยกสารออกจากของผสมโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม และ เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในด้านเคมีอินทรีย์ การสกัดด้วยตัวทำละลายมีหลายวิธี

2.2.1 วิธีการสกัดสารสำคัญจากพืช

การสกัดเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญในการวิเคราะห์พืชเนื่องจากจำเป็นต้องสกัดสารเคมีที่ต้องการออกมาจากพืช และการดำเนินการขั้นพื้นฐานรวมถึงขั้นตอนต่างๆเช่นการทำความสะอาด และ การอบแห้งวัสดุจากพืชหรือการทำให้เป็นของแข็ง การบดบิ่นการทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกันเพื่อเพิ่มการสัมผัสกับพื้นผิวตัวอย่างกับตัวทำละลาย กรรมวิธีที่เหมาะสมกับองค์ประกอบทางเคมีเพื่อให้ได้มาซึ่งประกอบที่มีฤทธิ์ และไม่เกิดการสูญเสีย เปลี่ยนแปลงหรือถูกทำลายในระหว่างการเตรียมสารสกัดจากตัวอย่างพืช (Fabricant and Farnsworth, 2001) การเลือกตัวทำละลายส่วนใหญ่มักขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Sasidharan *et al*, 2011) วิธีการสกัดสารสำคัญพืชสามารถทำได้ดังนี้

2.2.1.1 วิธีการหมัก

วิธีการหมัก (Maceration) เป็นวิธีที่นิยม และราคาไม่แพง เป็นวิธีการทำเพื่อให้ได้น้ำมันหอมระเหย และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เหมาะสำหรับพืชที่มีโครงสร้างของเนื้อเยื่อที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เช่น ดอก ใบ (จันทร์เพ็ญ, 2559) การทำ maceration โดยทั่วไปประกอบด้วยหลายขั้นตอน คือการบดวัสดุจากพืชเป็นอนุภาคขนาดเล็กเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวให้ง่ายต่อการผสมตัวเข้ากับทำละลายโดยเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับการสกัดจากนั้นทำการแช่ และ แช่ไว้อย่างน้อย 7 วัน และ ทำการแยกสารสกัดออกจากสิ่งสกปรกโดยการกรองโดยวิธีการนี้สารสกัดจะไม่ถูกความร้อน (Flórez-Fernández *et al*, 2018)

2.2.1.2 วิธีการหมักแบบต่อเนื่อง

วิธีการหมักแบบต่อเนื่อง (Percolation) เป็นกระบวนการสกัดที่เกี่ยวข้องกับการซึมผ่านของตัวทำละลายผ่านสารสกัดหยาบภายใต้แรงโน้มถ่วง และ ดูดซับองค์ประกอบของสารสกัดหยาบจึงได้สารสกัดออกมาผ่านด้านล่างของภาชนะเหมาะสมสำหรับพืชที่มีเนื้อเยื่อแข็ง และเหนียว เช่น เปลือก ราก และเนื้อไม้ (จันทร์เพ็ญ, 2559) โดยการนำพืชตัวอย่างที่ต้องการศึกษามาหมักกับตัวทำละลายประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการฟองตัวของสารสกัดหยาบ และทำการเติมตัวทำละลายลงไปให้ท่วมสารสกัดหยาบ (solvent head)

2.2.1.3 วิธีชอกซ์เลตเอกแทรกเตอร์

เป็นวิธีการสกัดร้อนโดยใช้เครื่อง Soxhlet extractor เป็นเทคนิคการสกัดแบบดั้งเดิม และ ยังคงใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์พืช มีประสิทธิภาพดี และมักใช้เป็นวิธีการอ้างอิงสำหรับเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดทางเลือกใหม่ (Zygmunt and Namiesnik, 2003) หลักการการทำงานคือใช้ความร้อน

ในการสกัด และ อาศัยการควบแน่นเข้าช่วยโดยให้ตัวทำละลายหมุนเวียนผ่านสารที่ต้องการสกัด จนกระทั่งได้สารสกัดตามที่ต้องการเป็นวิธีสกัดสารที่ใช้ตัวทำละลายในปริมาณน้อย และตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารแล้วจะถูกทำให้ระเหย และควบแน่นกลับมาใช้ได้อีกเป็นลักษณะหมุนเวียนเนื่องจากวิธีการนี้ใช้ความร้อนควบคู่จึงไม่เหมาะกับการสกัดสารจากพืชสมุนไพรที่มีสารที่ระเหยง่าย (Ma *et al*, 2011)

2.2.2 คุณสมบัติของตัวทำละลาย

ในการสกัดแต่ละครั้งนั้นจะได้ผลดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับ การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่ดีควรมีสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่ต้องการได้ดี ไม่ระเหยง่ายหรือยากจนเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารสกัดหยาบ ไม่เป็นพิษ และ ราคาไม่แพง ตัวทำละลายที่นิยมใช้ เช่น คลอโรฟอร์ม อีเธอร์ เฮกเซน และ แอลกอฮอล์ เป็นต้น โดยอาศัยหลักเกณฑ์ดังนี้ สารละลาย และตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน และละลายสารที่ต้องการออกมาได้มากที่สุด (จันทร์เพ็ญ, 2559) และ จุดเดือดเป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญ เพราะเป็นตัวกำหนดความเร็วของการระเหยโดยตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ เช่นอีเทอร์ไดคลอโรมีเทนหรืออะซิโตนจะระเหยที่อุณหภูมิห้องขณะที่ตัวทำละลายจุดเดือดสูง เช่นน้ำหรือ dimethyl sulfoxide ต้องใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นในการระเหยตัวทำละลายสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือ สารมีขั้ว (polar) เช่น เอทานอล ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) ละลายในน้ำแต่ไม่ละลายในเฮกเซน (C_6H_{14}) และสารไม่มีขั้ว (nonpolar)เช่น คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) ละลายในเบนซีน (C_6H_6) ไม่ละลายในน้ำ โดยที่สารละลายที่มีค่าคงที่อเล็กทริกน้อยกว่า 15 นั้นจะถือว่าเป็น nonpolar (Malmberg and Maryott, 1956) ตัวทำละลายที่นิยมใช้เช่น

2.2.2.1 คลอโรฟอร์ม ไม่มีสี และ ระเหยได้ง่าย ใช้เป็นตัวทำละลายได้ดี หรือเรียกว่า ไตรคลอโรมีเทน เกิดอิมัลชันได้ง่าย ถ้าใช้เป็นตัวทำละลายกับสารสกัดที่เป็นด่างแก่อาจทำให้ได้กรดเกลือจากปฏิกิริยาดีคอมโพส

2.2.2.2 อีเธอร์ มีคุณสมบัติในการทำละลายได้ดีน้อยกว่าคลอโรฟอร์ม แต่มีความสามารถในการละลายสารเป้าหมายได้ดีกว่าคลอโรฟอร์ม

2.2.2.3 เฮกเซน สี ไม่มีสี ระเหยได้ง่าย มีกลิ่นเฉพาะตัวคล้ายน้ำมันเชื้อเพลิง ติดไฟได้ง่าย และไอระเหยสามารถทำให้เกิดการระเบิดได้ เหมาะสำหรับเป็นตัวทำละลายให้กับสารเป้าหมายที่ไม่มีขั้ว นิยมใช้กำจัดไขมันออกจากตัวอย่างที่ต้องการทำการละลาย

2.2.2.4 แอลกอฮอล์ มักนิยมใช้เป็นเมทานอล และ เอทานอล มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายได้ดีกว่าปิโตเลียมอีเทอร์ แต่ปิโตเลียมอีเธอร์นิยมใช้ในการสกัดสารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ และแอลกอฮอล์นิยมใช้กับพืช

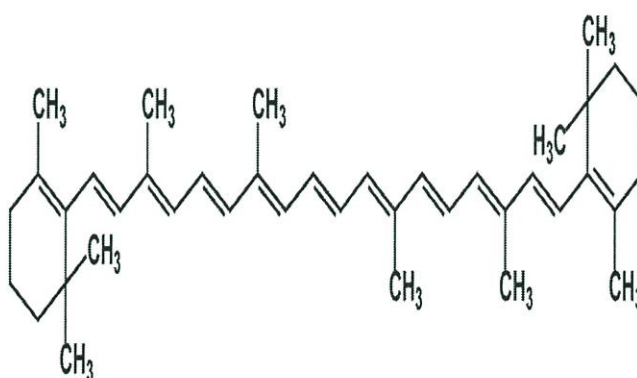
2.2.2.5 น้ำ เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงที่สุด นิยมใช้ในการสกัดสารที่มี กลิ่น และ สารที่องค์ประกอบทางพฤกษเคมี โดยน้ำจะไม่ละลายสารทั้งสารที่มีขั้วต่ำหรือไม่มีขั้วออกมา

2.3 พฤกษเคมีเบื้องต้น

สารพฤกษเคมี (Phytochemicals) คือ สารเคมีตามธรรมชาติที่พบในพืช อาจเรียกว่า ไฟโตนิวเทรียนต์ หรือ สารอาหารจากพืช มีหน้าที่ให้มีสี สีสัน รสชาติ และ การปกป้องคุ้มกันโรคแก่ผลไม้ พืชผัก เมล็ดธัญพืช และ ถั่วต่างๆ โดยพฤกษเคมีในพืชนั้นเป็นทั้งระบบภูมิคุ้มกันที่คอยปกป้องพืช และ ยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทรงประสิทธิภาพ ช่วยป้องกันโรคต่างๆ ในคนโดยกลไกการทำงานของสารพฤกษเคมีเมื่อเข้าสู่ร่างกายอาจมีการช่วยเรื่องเสริมฤทธิ์ให้เอนไซม์บางกลุ่มทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งปัจจุบันพบสารพฤกษเคมีแล้วมากกว่า 15,000 ชนิดโดยมีกลไกการออกฤทธิ์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ด้านออกซิเดชัน (Oxidative Stress) ทำลายฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ ลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอ, เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ ควบคุมการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน ต่อต้านการอักเสบ ช่วยกำจัดสารพิษ และ ช่วยให้ร่างกายทำงานประสานกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ (วินัย, 2561) ประเภทของสารพฤกษเคมีเช่น

2.3.1 แคโรทีนอยด์ (Carotenoids)

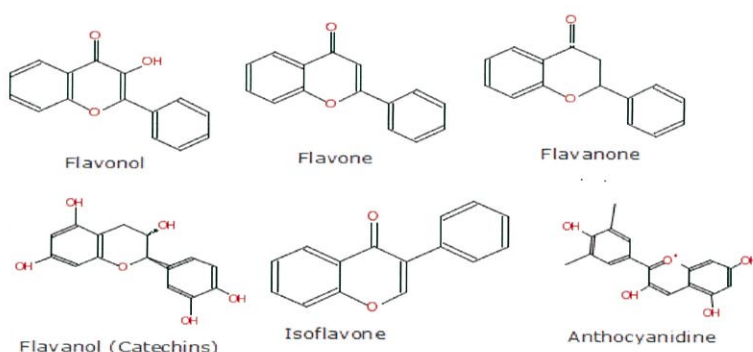
แคโรทีนอยด์ เป็นสารพฤกษเคมีชนิดละลายในไขมัน มีสีเหลือง สีส้ม และ สีแดงโดยพืชจะผลิต carotenoids เพื่อปกป้องลำต้น และ ใบจากพลังงานของดวงอาทิตย์ ความยาวคลื่นรังสีอัลตราไวโอเล็ต และ ทำหน้าที่ดูดซับพลังงานแสงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงของพืช และ แบคทีเรียบางชนิด มีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในการช่วยลดความเสียหายของอนุมูลอิสระ และ ทำลายอนุมูลอิสระในร่างกายมนุษย์ที่อาจเกิดจากร่างกายในระหว่างการเผาผลาญอาหาร สุกบู่หรี โดนแสงแดด รังสี มลพิษหรือแม้แต่ความเครียด (Szalay, 2015) อนุมูลอิสระเกิดขึ้นเนื่องจากโมเลกุลปกติสูญเสียหรือได้รับอิเล็กตรอน



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์

2.3.2 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)

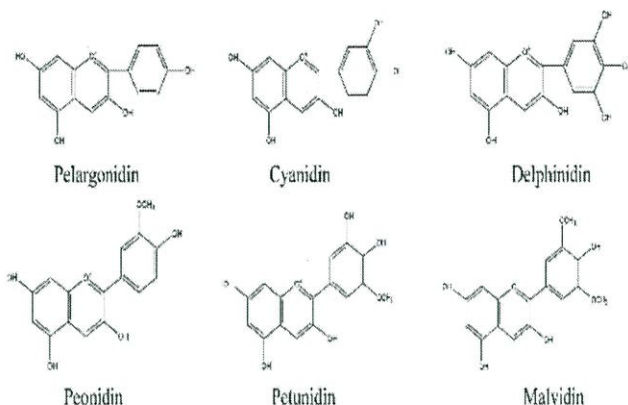
ฟลาโวนอยด์เป็นสารพฤกษเคมีชนิดละลายในน้ำของผัก ผลไม้ เมล็ดธัญพืช ใบไม้ และ เปลือกไม้ จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลที่มีโมเลกุลต่ำที่ซึ่งเป็นหนึ่งในลักษณะที่โดดเด่นที่สุดของสารประกอบในพืช มีฤทธิ์ทางชีวเคมี และสามารถต้านอนุมูลอิสระได้อย่างดีเยี่ยมซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ เช่นโรคมะเร็ง โรคอัลไซเมอร์โรคหลอดเลือดแดงเป็นต้น เป็นส่วนประกอบที่จำเป็นในด้านยาเวชภัณฑ์ และเครื่องสำอางหลายชนิดเป็นผลมาจากคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระต้านการอักเสบต่อต้านการกลายพันธุ์ และการต่อต้านสารก่อมะเร็งควบคู่กับความสามารถในการปรับบทบาทของเอนไซม์ของเซลล์ที่สำคัญ นอกจากนี้ฟลาโวนอยด์ยังพบได้ในอาหาร และ เครื่องดื่มที่มีต้นกำเนิดจากพืชเช่น ผลไม้ ผัก ชา โกโก้ และ ไวน์ (Panche *et al*, 2016)



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

2.3.3 แอนโทไซยานิน (Anthocyanins)

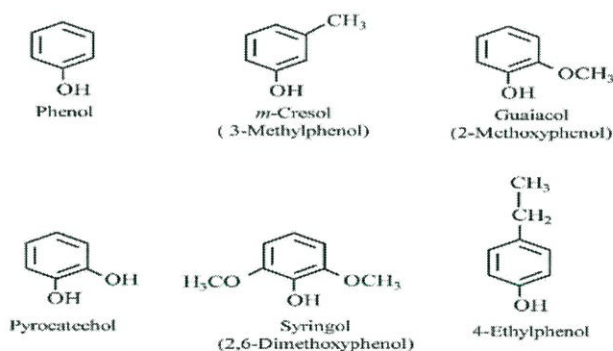
แอนโทไซยานินเป็นสารพฤกษเคมีที่มีสีส้มมากที่สุดในบรรดาพฤกษเคมีชีวภาพไล่ตั้งแต่สีส้มจนถึงสีแดงสด และ สีฟ้าเข้มจนถึงสีม่วงจากค่าความแตกต่างของค่าพีเอช โดยเฉดสีที่สังเกตเห็นในผัก และ ผลไม้นั้นเกิดจาก แอนโทไซยานิน และ นอลแอนโทไซยานิน (Lila *et al*, 2004) แอนโทไซยานินใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหาร อาหารเสริม และ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารประกอบฟีนอลอื่นๆเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการ แต่ในทางชีววิทยาจะให้ผลลัพธ์ต่ำเนื่องจากความเสถียร และการดูดซึมที่ต่ำ มีคุณสมบัติต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ ด้านการบำรุงรักษาหัวใจ และหลอดเลือด เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับโปรตีนที่เกี่ยวข้อง (Kay *et al*, 2017)



รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน

2.3.4 ฟีนอลิก (Phenolics)

เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร และ เมล็ดธัญพืช ฟีนอลิกเป็นสารที่เป็นพิษไม่มีสี สถานะเป็นของแข็ง ละลายได้ในน้ำ สารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืชจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชัน เป็นสารกันหืนโดยการยับยั้งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของไขมันมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อรา และ ไวรัส แต่มีประสิทธิภาพลดลงต่อเชื้อที่มีสปอร์ (Huang *et al*, 2009)

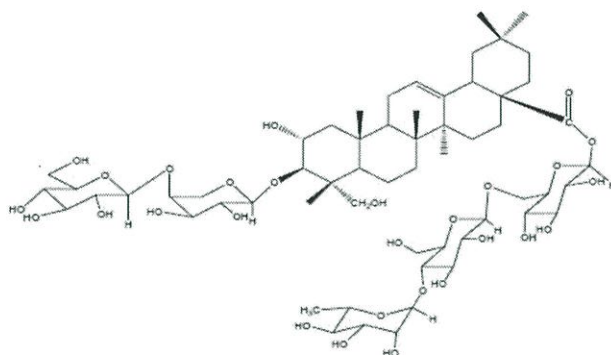


รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก

2.3.5 ซาโปนิน (Saponins)

ซาโปนินเป็นสารพฤษเคมีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ละลายได้ดีในน้ำ และ จะเกิดโฟมเมื่อละลายในน้ำ โดยที่ปลายด้านหนึ่งเป็นส่วนที่ละลายได้ดีในไขมัน (lipophilic หรือ hydrophobic) และ ส่วนอื่นๆของสารละลายเหลวของโมเลกุลซาโปนินจะเรียงตัวอยู่เป็นแนวตั้งบนผิวน้ำโดยปลายที่ไม่ชอบน้ำจะหันออกจากน้ำ (Bone and Mills, 2013) รสชาติขมบางชนิดเป็นพิษ ซึ่งเป็นที่รู้จักกันในชื่อ saponin มีคุณสมบัติในการทำควมสะอาดหรือผงซักฟอกเนื่องจากมีโครงสร้างที่ละลายได้ดีทั้งในน้ำ ไขมัน

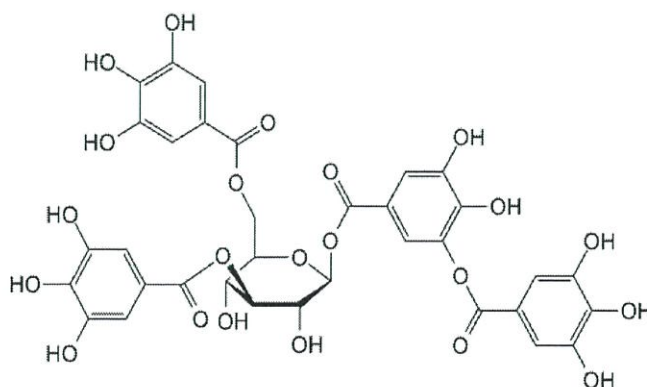
มีเสถียรภาพอย่างมากในการแปรรูปโดยใช้ความร้อน เป็นสารประกอบเชิงพาณิชย์ที่สำคัญในอาหาร เครื่องสำอาง และในด้านภาคเภสัชกรรมเช่น การต้านมะเร็ง และกิจกรรมของเอนไซม์คอเลสเทอรอล (Güçlü and Mazza, 2006)



รูปที่ 2.6 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มซาโปนิน

2.3.6 แทนนิน (Tanins)

แทนนินเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลที่ซับซ้อน มีคุณสมบัติในการตกตะกอนโปรตีนในสารละลายเหลว จากการสร้างคอมเพล็กซ์ cross-linked ขนาดใหญ่ที่ไม่ละลายในน้ำ คุณสมบัตินี้ทำให้ไม่ย่อยโปรตีน (Aylott, 2003) จากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารหรือเพื่อป้องกันการย่อยโปรตีน ส่วนใหญ่มีสองกลุ่ม คือย่อยแทนนินรูปแบบไฮโดรไลซิส สารแทนนินที่ควบแน่นได้นั้นสามารถทำให้โปรตีนตกตะกอนโดยเฉพาะเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยอาหาร แทนนินยังสามารถสร้างการเชื่อมโยงระหว่างโปรตีน และ โมเลกุลอื่นๆได้ และ ทำให้ไม่มีการย่อยอาหารได้ แทนนินจึงจัดอยู่ในสารที่ลดหรือต้านคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร (Glencross, 2015) ด้วยเหตุผลเหล่านี้แทนนินจึงมีประสิทธิภาพในการปกป้องใบจากการถูกกินโดยสัตว์ได้ และ ในกระบวนการฟอกหนังแทนนินจะยึดติดกับคอลลาเจนของหนังสัตว์ และ ทำให้หนังสามารถทนต่อจุลินทรีย์ได้ (Hans and Birgit, 2011)



ภาพที่ 2.7 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มแทนนิน

2.4 อนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระ หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุล ที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ (unpaired electron) อย่างน้อย 1 ตัวโคจรรอบวงนอกสุด อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก ทำให้อนุมูลอิสระไม่เสถียร และ วัตถุประสงค์การเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบๆ โดยรับหรือให้อิเล็กตรอนโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียรมีหลักฐานมากมายที่ใช้ในการสนับสนุนสมมติฐานนี้ได้แก่ ความแปรปรวนของอายุขัยของสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์กับอัตราการเผาผลาญ และ กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิต และความเสียหายของอนุมูลอิสระในเซลล์เพิ่มขึ้นตามอายุ ทฤษฎีอนุมูลอิสระอาจถูกนำมาใช้เพื่ออธิบายคุณสมบัติทางโครงสร้างที่เกิดขึ้นกับอายุซึ่งรวมถึงไขมัน peroxidation และ การลดประสิทธิภาพการทำงานของ mitochondrial อย่างไรก็ดีตามเรื่องนี้ยังไม่สามารถระบุถึงความไม่แน่นอนเกี่ยวกับบทบาทของความเสียหายที่เกิดจากการออกซิเดชัน (Gülçin *et al*, 2010)

2.4.1 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติจำนวนมากที่น่าสนใจคือต้นกำเนิดจากพืช และ อยู่ในกลุ่มฟีนอล และพอลิฟีนอลของสารประกอบเช่นเดียวกับ แคโรทีนอยด์ กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ และกลไกการทำงานของพวกเขาถูกกำหนดโดยคุณสมบัติโครงสร้างของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับระบบที่พืชมีอยู่ สารต้านอนุมูลอิสระใช้ในอาหารเพื่อป้องกันผลกระทบจากการเกิดออกซิเดชันที่เป็นอันตราย และ ยังใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อลดผลข้างเคียงจากการออกซิเดชัน แม้ว่าจะมีการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ แต่การใช้อย่างแพร่หลายจึงมีกฎข้อบังคับ RDI (ปริมาณที่ต้องการในแต่ละวัน) เช่นวิตามิน (Shahidi and Chandrasekara, 2015) สารต้านอนุมูลอิสระแบบสังเคราะห์เช่น butylated hydroxy anisole (BHA) butylated hydroxy toluene (BHT) แกลลอนโทพแทสเซียม (PG) และ tert-butyl hydroquinone (TBHQ) สารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติมีอยู่ในเครื่องเทศ น้ำมันหอมระเหย สารสกัดจากเครื่องเทศ โหระพา สะระแหน่ โหระพา ยี่หระ และผักชี ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารต้านอนุมูลอิสระแบบสังเคราะห์ BHT (Peter and Shylaja, 2012) โดยสารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามกลไกการทำงานได้แก่ (1) สารต้านอนุมูลอิสระขั้นต้นซึ่งทำหน้าที่เป็นหลักในฐานะที่เป็นอนุมูลอิสระ (scavengers) (2) สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในการป้องกันที่ทำงานโดยการชะลอการเริ่มต้นของปฏิกิริยาห่วงโซ่ และ (3) สารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมชิ้นส่วนชีวโมเลกุลที่เสียหาย (Daramola and Adegoke, 2011)

2.5. เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค

2.5.1. *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน จัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe คือเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และ ไม่มีอากาศ แต่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ และ ไม่สร้างสปอร์ โดยสามารถพบได้ในอาหารที่ปนเปื้อนจากแหล่งกำเนิดของสัตว์ปีก ไข่ นำนม ผลิตภัณฑ์จากนม และ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัว และ เนื้อหมูเป็นแหล่งสำคัญของ *S. Typhimurium* ในการติดเชื้อของมนุษย์ *S. Typhimurium* เป็นปัญหาที่พบทั่วโลกเกี่ยวกับโรคในระบบทางเดินอาหาร และ ลำไส้อักเสบในมนุษย์ โดยพบมากที่สุดเป็นอันดับ 3 ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในมนุษย์ เป็นเชื้อโรคที่มีการพัฒนาโลกที่ซับซ้อนขึ้นเพื่อหลีกเลี่ยงกลไกการป้องกันของโฮสต์ สามารถแพร่ระบาดไปสู่ห่วงโซ่อาหารอื่นเนื่องมาจากการปนเปื้อนในโรงงานฆ่าสัตว์ เนื่องจากความสามารถของเชื้อ Salmonellae ที่สามารถอยู่รอดได้ในเนื้อสัตว์ และ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ยังไม่สุกหรือไม่ได้รับการจัดการอย่างถูกต้อง (Akoachere et al, 2009)

2.5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25 ° C ถึง 37 ° C เป็นเชื้อแบคทีเรียที่แพร่หลายที่มีความสามารถในการอยู่รอดภายใต้สภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย ไม่เพียงแต่เป็นสาเหตุของโรคในพืชและสัตว์เท่านั้น แต่ยังเป็นเชื้อโรคที่ฉวยโอกาสที่เกิดขึ้นใหม่ที่มีความเกี่ยวข้องทางคลินิก ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้ออย่างรุนแรงในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งที่กดภูมิคุ้มกันบกพร่องที่เป็นมะเร็งได้ (Wu and Jin, 2005)

2.5.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นแท่ง สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ Flagella เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม มีช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้อยู่ในช่วง 35-37 องศาเซลเซียส พบได้ในลำไส้มนุษย์ สัตว์เลื้อยคลาน และ ในสภาพแวดล้อมทั่วไป ก่อให้เกิดอาการของโรคภายหลังจากได้รับเชื้อ 18-24 ชั่วโมง ลักษณะอาการคืออุจจาระบ่อยครั้ง อาจมีอาการชืดเนื่องจากสารพิษของเชื่อนั้นทำลายเม็ดเลือดแดงได้ (Alonso et al, 2013)

2.5.4 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีการเรียงตัวเป็นสายยาว มีสปอร์ที่ทนความร้อนสูงขนาดเล็ก เจริญได้ในอุณหภูมิสูงไม่เกิน 75 องศาเซลเซียส และ ไม่ต่ำกว่า 3 องศาเซลเซียส เป็นสาเหตุของการเน่าเสียในอาหารพวกที่มีแป้ง และโปรตีนเป็นส่วนประกอบ เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้าง Enterotoxin ได้ 2 ชนิด ชนิดหนึ่งทนต่อความร้อน (Heat stable) เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเป็นโรคอาหารเป็นพิษในโลกอุตสาหกรรม (Drobniowski, 1993)

2.5.5 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์เป็นลักษณะกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงอุ้ง เป็นพวก facultative anaerobic สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 35-37 องศาเซลเซียส ให้ enterotoxin ในจมูกหรือบนมือ ซึ่งถือเป็นแหล่งที่มาของการปนเปื้อนของอาหารโดยการสัมผัสด้วยมือหรือผ่านทางสารคัดหลั่งในระบบทางเดินหายใจ ในความเป็นจริงเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็น commensal ทั่วไปของผิวหนังของมนุษย์ พบได้ในอาหารดิบ และผลิตภัณฑ์อาหารรสเค็ม โดยการปนเปื้อนส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการจัดการอาหารปรุงสุกหรือการแปรรูปที่ไม่เหมาะสม และการเก็บรักษาภายใต้สภาวะที่ช่วยให้เชื้อ *Staphylococcus aureus* เจริญ และผลิต enterotoxin ได้ (Argudin, 2010)

2.6.6 *Micrococcus luteus*

Micrococcus luteus เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม การแบ่งเซลล์แบบ binary fission ไม่สร้างสปอร์ มีขนาดตั้งแต่ 0.5 - 2.0 ไมโครเมตร ต้องการอากาศในการเจริญ อุณหภูมิการเจริญเติบโตที่เหมาะสม 25-37 องศาเซลเซียส พบในดิน น้ำ บนผิวหนังของคน และสัตว์ เชื้อ *Micrococcus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเน่าเสียเป็น commensals ที่ผิวเยื่อเมือก คอหอยส่วนปาก (oropharynx) และบางครั้งเป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Greenblatt *et al*, 2004)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Islam *et al* (2013) ศึกษา น้ำมันหอมระเหยที่แยกได้จากดอกต้นพญาสัตบรรณที่ปลูกในประเทศบังคลาเทศโดยทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography–mass spectrometry พบสารประกอบ 6 ชนิดในน้ำมันดอกต้นตีนเป็ดที่เป็นองค์ประกอบหลักได้แก่ 2-Dodecyloxirane 31.83

เปอร์เซ็นต์ Benzene,1,2-dimethoxy-4- (2-propenyl) 8.49 เปอร์เซ็นต์ Spinacene 6.09 เปอร์เซ็นต์ 1,5,4-Dibromotetrapen tacontane 5.13 เปอร์เซ็นต์ 2,6,10,15-Tetramethylheptadecane 4.91 เปอร์เซ็นต์ Terpinyl acetate 3.74 เปอร์เซ็นต์ Linalool 2.22 เปอร์เซ็นต์ Tritetracontane 2.17 เปอร์เซ็นต์ 1-Cyclohexanol, 2- (3-methyl-1,3- butadienyl) -1,3,3-trimethyl 1.78 เปอร์เซ็นต์ และ 9-Methyl-5-methylene-8-decen-2-one 1.58 เปอร์เซ็นต์ จากการสังเคราะห์สารประกอบทางเคมีได้นำมาเทียบข้อมูลกับ National Institute of Standards and Technology (NIST) และข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดยเปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบทางเคมีจะถูกคำนวณจากพื้นที่สูงสุดของ GC บนคอลัมน์โดยไม่มีการใช้ปัจจัยอื่นร่วม

Ganjewala and Gupta (2013) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดต้นพญาสัตบรรณโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายต่อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้วิธี well diffusion techniques การวิเคราะห์ทางพิษเคมีพบว่า มีสารฟลาโวนอยด์ 97.3 mg QE / g DW โพรแอนโทไซยานิน 99.3 mg CE /g DW และ ฟีนอลิก 49.7 mg GAE / g DW ในสารสกัดจากใบ ผลและน้ำยาง มีปริมาณสารพิษเคมีข้างต้นค่อนข้างมาก และปริมาณโพรแอนโทไซยานินส่วนผลมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (46.8 mg CE / g DW) และสารสกัดจากยางมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพมากที่สุด

Subraya and Gupta (2012) ศึกษาหาปริมาณฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และ สารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดส่วน ใบ ราก และ เปลือกของต้นพญาสัตบรรณโดยใช้เมทิลแอลกอฮอล์ โดยใช้วิธี 1, 1-diphenyl-2-picryl- hydrazil (DPPH) พบว่าสารสกัดส่วนรากมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 33.00 ± 4.62 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu มีปริมาณสารฟีนอลทั้งหมดมีค่าตั้งแต่ 34.97 ± 0.76 ถึง 46.11 ± 0.85 mg GAE/g และมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่ถูกกำหนดตามการยับยั้ง DPPH และ IC_{50} ของ Moreno 11Percentage โดยปริมาณฟลาโวนอยด์มีค่าตั้งแต่ 14.43 ± 2.37 ถึง 22.54 ± 0.98 mg QE/g และ สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจะเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบ

Khyade *et al* (2014) ศึกษาฤทธิ์ทางเคมี และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของใบต้นพญาสัตบรรณโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ส่วนใบของต้นพญาสัตบรรณที่ถูกเก็บในเดือนตุลาคมจากสวนพฤกษศาสตร์ของ Dr. Babasaheb Ambedkar Marathwada University ในเมือง Aurangabad (M.S.) ประเทศอินเดีย เก็บตัวอย่างพืชอบแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน สารสกัดจากต้นพญาสัตบรรณมีองค์ประกอบทางพิษเคมีได้แก่ อะบูมิน อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน แอนโทไซยานิน ฟีนอลิก

สเตรปโตค็อกคัส แชนโทนิ และ แชนนิน และ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งเชื้อแกรมบวก และ แกรมลบ โดยสารสกัดส่วนใบที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* และสารสกัดส่วนใบที่ใช้คลอโรฟอร์ม และอะซิโตน เป็นตัวทำละลายมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้น้อยกว่าเมทานอล สำหรับสารสกัดส่วนใบที่ใช้ทำตัวละลาย ปิโตรเลียมอีเทอร์ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และจากแบคทีเรียทั้งหมดที่ผ่านการทดสอบเชื้อ แบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อสารสกัดมากกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเล็กน้อย

Antony *et al* (2012) วิเคราะห์ฤทธิ์ทางเคมี และ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของผลต้น พญาสัตบรรณ โดยส่วนผลมีองค์ประกอบของสารพฤกษเคมีที่สำคัญได้แก่ อัลคาลอยด์ คาร์โบไฮเดรต สารประกอบฟีนอล เทอร์พีนอยด์ ไกลโคซิดิกส์ และ มีปริมาณ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และ สเตรปโตค็อกคัส น้อย โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่ายับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้สูงสุด ในตัวทำละลายเบนซีน และ บิวทานอล โดยยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus lactis* และ *Staphylococcus aureus* ได้ และสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน และ น้ำจะมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอื่น ๆ ผลของฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียค่อนข้างคล้ายคลึงกับยาปฏิชีวนะ chloramphenicol

Hussain *et al* (2010) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากต้นพญาสัตบรรณส่วนเปลือกที่ถูกเก็บ จากมหาวิทยาลัยของมหาวิทยาลัยราชสถานชัยปุระ ประเทศอินเดีย ใช้เมทานอลเป็นตัวทำ โดยใช้ความ เข้มข้นที่แตกต่างกันในการทดสอบเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การยับยั้งโดยใช้วิธี disc diffusion โดยใช้เชื้อ แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบนำมาทดสอบโดยเชื้อแบคทีเรียถูกเก็บรักษาบนอาหารเลี้ยงสัตว์เลี้ยงลูก ด้วยนม และถูกเปลี่ยนถ่ายทุกๆสองสัปดาห์ ในการทดสอบที่ความเข้มข้น 100 มิลลิตรต่อมิลลิตรมี ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus coagulans* และ *Escherichia coli* ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งได้ อยู่ที่ 25 mg และ 50mg วัดบริเวณการยับยั้งได้ 8 และ 7 มิลลิเมตรตามลำดับ

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator)
2. เครื่องซั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
3. เครื่องผสมสาร (Vortex)
4. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Micropipette)
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Microplate Reader)
6. เครื่องเขย่า
7. เครื่องวัดพีเอช (pH-meter)
8. จานหลุม (96-well plate)
9. ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip)
10. ปีกเกอร์ (Beaker)
11. กระจกตวง (Graduated cylinder)
12. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)
13. กรวยแก้ว (Glass funnel)
14. ขวดก้นกลม (Round bottom flask)
15. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
16. หลอดทดลอง (Test tube)
17. ขวดสีชา
18. เครื่องอบลมร้อน (Hot air oven)
19. เครื่องปั่น (Blender)

20. ชุดกรองสุญญากาศ
21. กระดาษกรอง whatman NO.1
22. ผ้าขาวบาง
23. เครื่องบดไม้
24. เครื่อง UV-Vis spectrophotometer

3.2 สารเคมี และ อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. แอลกอฮอล์ 95 %
2. น้ำกลั่น
3. 0.1% ferric chloride
4. สารละลายแอมโมเนีย
5. Sulfuric acid
6. สารละลายอะซิติก
7. เอทานอล 95%
8. สารละลาย 2% 5 Trichloroiron (FeCl_3)
9. อาหาร MHB (Mueller Hinton Broth) , Nutrient broth
10. 10% Folin-Ciocalteu
11. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
12. วิตามินอี

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเตรียมพืชตัวอย่าง

ตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้อง ไม่พบพืชอื่นปน ไม่มีโรคพืช นำมาล้างน้ำประปา และ ผึ่งให้แห้งในที่ร่ม 1 วัน (ห้ามโดนแสงแดด)

3.3.2 การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่น และ อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 1-2 วัน และ นำแต่ละส่วนของพืชไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น โดยตัวอย่างที่ผ่านการบด และ ปั่นแล้วนั้นนำมาห่อด้วยผ้าขาวบาง และ แช่ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (v/v) อัตราส่วน 1:9 เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง นำมากรองเอาส่วนของเหลวออกจากตะกอนผงเล็กๆด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง Rotatory evaporator อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจะได้ออกมาเป็นสารสกัดหยาบ และนำเก็บในขวดสีชาปิดด้วยฟอยเจอร์ูเก็บที่อุณหภูมิห้อง 7-10 วันเพื่อให้เอทานอลที่อาจหลงเหลือระเหย

3.3.3 ทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.3.3.1. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds) จากสารสกัดหยาบของต้นพญาสัตบรรณ

เตรียมสารสกัดหยาบจากต้นพญาสัตบรรณให้มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย จากนั้นใส่สารสกัดหยาบจากต้นพญาสัตบรรณความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงหลุมจานเพาะเลี้ยงเชื้อ 96 Well plate หลังจากนั้นใส่สารละลาย (เตรียมโดยปิเปต Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 75 กรัมต่อลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายปริมาตร 80 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Vis microplate spectrophotometer นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบของต้นพญาสัตบรรณ โดยเปรียบเทียบปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมดด้วยกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ความเข้มข้น 1 0.1 0.01 0.001 0.0001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (เตรียมโดย 0.01 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร)

3.3.3.2. การวิเคราะห์ปริมาณลาโวโนอยด์ (Flavonoid determination) จากสารสกัดหยาบของต้นพญาสัตบรรณ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากต้นพญาสัตบรรณ จะวิเคราะห์ตามวิธีของ Kathirvel and Hujatha (2014) โดยปีเปตสารสกัดจากต้นพญาสัตบรรณแต่ละส่วนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30 นำสารละลายสารสกัดแต่ละส่วนมาปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และ สารละลายโซเดียมไนไตรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาทีเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ทิ้งเป็นเวลา 6 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของควอซิทิน จากนั้นรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของควอซิทินต่อกรัมของสารสกัด ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานควอซิทินที่ระดับความเข้มข้น 10 ถึง 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองตามวิธีการหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ใช้สารละลายมาตรฐาน ควอซิทินที่มีความเข้มข้นต่างๆ แทนสารสกัดจากต้นพญาสัตบรรณ ส่วนแบลงก์ใช้เอทานอล 30 เปอร์เซ็นต์ แทนสารสกัดหยาบ เมื่อได้ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของควอซิทินกับค่าการดูดกลืนแสงของควอซิทิน จะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง หาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่มีในตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์

3.3.3.3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดจากสารสกัดหยาบของต้นพญาสัตบรรณ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากต้นพญาสัตบรรณจะวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Denis (Kathirvel and Sujatha, 2012) โดยปีเปตสารสกัดหยาบแต่ละส่วนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในสารละลายเอทานอล 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง และ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 7.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Denis ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 35 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นแล้วผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบแทนนินต่อกรัมของสารสกัดหยาบ ทำการเตรียม

สารละลายมาตรฐานของกรดแทนนิกที่ระดับความเข้มข้น 10 ถึง 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองตามวิธีการหาปริมาณของสารประกอบแทนนินทั้งหมดด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ใช้สารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ แทนสารสกัดหยาดต้นพญาสัตบรรณ ส่วนแบลงก็ใช้เอทานอล 30 เปอร์เซ็นต์ แทนสารสกัดหยาด เมื่อได้ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแทนนิกกับค่าการดูดกลืนแสงของกรดแทนนิกจะให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง หาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณของสารประกอบแทนนินทั้งหมดที่มีในตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์

3.3.3.4. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิก (Folin-Ciocalteu reagent method)

ดัดแปลงวิธีจาก Majhenic *et al*, (2007) โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน เริ่มจากการผสมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (ความเข้มข้น 0.1-0.0001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ(สารสกัด) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้น เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม

3.3.3.5. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินจากสารสกัดหยาดของต้นพญาสัตบรรณ

วิเคราะห์โดยวิธี pH differential นำสารสกัดไปทำการละลายสารสกัดในน้ำ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ นำสารละลายปริมาตร 30 ไมโครลิตร เจือจางสารสกัดตัวอย่าง 1 ส่วน 9 ส่วนในสารละลายบัฟเฟอร์ ด้วยวิธี pH differential (Kerio *et al*, 2014) ใช้ 2 บัฟเฟอร์ คือ 0.025 M โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ที่ pH 1.0 และ 0.4 M โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) ที่ pH 4.5 นำสารละลายปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมกับ โพแทสเซียมคลอไรด์ 270 ไมโครลิตรในหลอดที่ 1 และนำสารละลายปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมกับโซเดียมอะซิเตต 270 ไมโครลิตร ในหลอดที่ 2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และ 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Vis microplate spectrophotometer ทำวิธีการข้างต้นซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นทำการนำค่าที่ได้มาคำนวณความแตกต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสง

$$\text{ปริมาณ anthocyanin (mg/l)} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{E \times 1}$$

โดย A คือ ความแตกต่างของ Absorbance ที่ pH 1 และ pH 4.5

$$A = (A_{520} - A_{700}) \text{ pH 1.0} - (A_{520} - A_{700}) \text{ pH 4.5}$$

MW คือ น้ำหนักโมเลกุลของ anthocyanin (449.2)

DF คือ dilution factor

E คือ cyanididin-3-glucoside molar absorbance (26,900)

3.3.3.6. วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH (DPPH reduction scavenging assay)

การหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยใช้ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ตามวิธี Brand-Williams โดยนำสารสกัดมาละลายด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.9 แล้วปรับความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละส่วนให้ได้ความเข้มข้น 10 , 5, 2.5 , 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปิดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเติม DPPH ปริมาตร 190 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของเชื้อใน 96 well plate แต่ละความเข้มข้นทำ 5 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้วิตามินอีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้เอทานอลร้อยละ 99.5 เป็นตัวควบคุมเชิงลบ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาร้อยละของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสมการดังนี้

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

A = ค่าการดูดกลืนแสงของแบลงค์ (Blank) B = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

3.3.4 ตรวจสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

ดัดแปลงจากวิธีของ Rauha *etal*, 2000 เริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละชนิดได้แก่ *Bacillus cereus* TISTR 5040, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Escherichia coli* ATCC 25299, *Salmonella typhimurium* TISTR 1469 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 ในอาหาร Nutrient broth (NB) เขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนำเชื้อแบคทีเรียมาปรับปริมาณเทียบเท่ากับ McFarland standards No. 0.5 (1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และใช้สำลีพันก้านที่ฆ่าเชื้อจุ่มเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร Muller Hinton (MHA) โดยวิธีการ Swab จากนั้นเกลี่ยด้วย

ไม้พ่นสำลีปราศจากเชื้อให้ทั่วผิวหน้า รอให้ผิวหน้าแห้งแล้วเจาะหลุมด้วยที่เจาะ (Cork-borer) เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จำนวน 5 หลุมต่อเพลท เติมสารสกัดหยาบแต่ละส่วนของพืชความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อเอทานอล 95% 1 มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิเปตยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลงในหลุมปริมาตร 20 ไมโครลิตรชนิดละหลุมเพื่อเป็นการควบคุมเชิงบวก (Positive control) และปิเปตสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ลงในหลุมปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นการควบคุมเชิงลบ (Negative control) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง โดยจะทำการทดสอบสารสกัดกับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดทั้ง 5 ซ้ำ และตรวจผลกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (Inhibition zone) ในหน่วย มิลลิเมตร ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์

3.3.5 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ด้วยวิธี Broth dilution technique และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ด้วยวิธี Agar dilution technique

เริ่มจากนำหลอดอาหาร NB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วดูดสารสกัดหยาบของแต่ละส่วนที่ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่หลอดอาหาร NB หลอดที่ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นดูดสารในหลอดที่ 1 ใส่ในหลอดอาหาร NB หลอดที่ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำด้วยวิธีเดียวกันไปจนถึงหลอดสุดท้าย ที่ทำการทดลอง จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบที่ปรับปริมาณเชื้อแล้วลงในทุกหลอด 1 ลูบ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16-24 ชั่วโมง การอ่านค่า MIC สังเกตความขุ่นของเชื้อที่เกิดขึ้น

จากค่า MIC สามารถนำมาหาค่า MBC ได้จากการนำหลอดทดลองที่ไม่มี ความขุ่นมาทำการ Cross streak ลงบนอาหาร NA และ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้จะไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16-24 ชั่วโมง

3.3.6 การประเมินผลทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอย่างโดยใช้วิธีของดันแคน (Duncan's new Multiple Test : DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 โดยโปรแกรม SPSS

3.3.7 การคำนวณค่า Inhibitory Concentration 50 (IC₅₀)

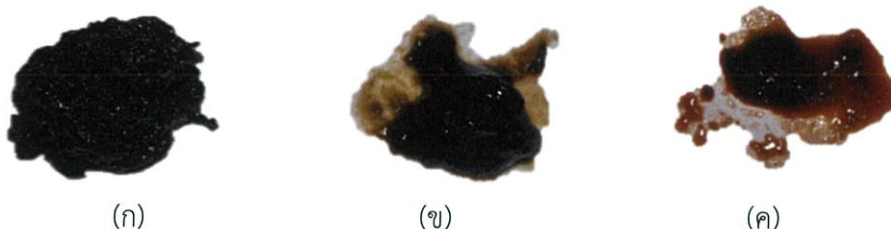
คำนวณค่า Inhibitory Concentration 50 (IC₅₀) ของสารต้านอนุมูลอิสระโดยโปรแกรม GraphPad Prism

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ปริมาณผลได้ของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ

จากการสกัดสารสกัดหยาบจากต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วนได้แก่ ใบ ดอก และกิ่ง ที่ทำให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้น้ำหนักสุทธิ 100 กรัม และใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอล 95เปอร์เซ็นต์ แช่เป็นเวลา 7 วัน โดยสารสกัดหยาบส่วนดอกให้ปริมาณผลได้ของสารสกัดมากที่สุด 10.48 กรัมลดลงมาเป็นส่วนกิ่ง 9.68 และส่วนใบ 7.80 กรัมตามลำดับดังที่แสดงในตารางที่ 4.1 โดยลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบส่วนดอกมีลักษณะเป็นของเหลวข้น หนืด สีน้ำตาลแดงเข้ม ส่วนใบมีลักษณะเป็นของแข็ง หนืด สีเขียวดำและส่วนกิ่งมีลักษณะเป็นของเหลวข้น หนืด สีน้ำตาลดำ ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วน
ส่วนใบ (ก) ส่วนดอก(ข) ส่วนกิ่ง(ค)

ตารางที่ 4.1 ผลได้ของการสกัดสารสกัดหยาบเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 3 ส่วนของต้นพญาสัตบรรณ

ต้นพญาสัตบรรณ	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ปริมาณสารสกัดหยาบ (กรัม)	ร้อยละผลผลิต (น้ำหนักสาร สกัดต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง)
ส่วนใบ	100	7.80	7.80
ส่วนดอก	100	10.48	10.48
ส่วนกิ่ง	100	9.68	9.68

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ (Total flavonoid content)

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่มีในสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี Colorimetric Aluminum Chloride วัดด้วยเครื่องเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร โดยใช้สารควอซิตินเป็นสารละลายมาตรฐาน จากนั้นนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเทียบกับปริมาณฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วน พบว่าสารสกัดหยาบส่วนใบมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด โดยมีค่าเทียบเท่ากับ 118.60 มิลลิกรัมควอซิตินต่อกรัมสารสกัด รองลงมาเป็นส่วนดอก และส่วนกิ่ง โดยมีค่าเทียบเท่ากับ 10.40 และ 59.60 มิลลิกรัมควอซิตินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังที่แสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนของต้นพญาสัตบรรณ

สารสกัดหยาบ	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมควอซิตินต่อกรัมสารสกัด)
ส่วนใบ	118.60±4.33 ^a
ส่วนดอก	10.40±2.50 ^b
ส่วนกิ่ง	59.60±5.00 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากการวิเคราะห์สารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วนพบว่าสารสกัดส่วนใบมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดรองลงมาเป็นส่วนดอกและส่วนกิ่งตามลำดับ โดยสารสกัดส่วนใบ และดอก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Dhruvi *et al* (2016) ที่ศึกษาองค์ประกอบของเคมีที่มีอยู่ในส่วนเปลือก , กิ่ง และใบของต้นพญาสัตบรรณจากประเทศอินเดีย พบว่าสารสกัดหยาบส่วนใบมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่าส่วนกิ่ง นอกจากนี้ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดพืชนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่นตัวทำละลาย โครงสร้าง และองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด (Iqbal *et al* 2015) และ โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์นั้นมีหมู่ไฮดรอกซิลซึ่งสามารถให้โปรตอนแก่สาร DPPH ได้ซึ่งทำสาร DPPH เกิดความเสถียร (Kaur and Mondal, 2014)

4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวมของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ (Total anthocyanin's content)

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวมที่มีในสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วน โดยวิธี pH differential วัดด้วยเครื่อง UV/Vis microplate spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร ที่ pH 1 และ 4.5 เมื่ออ้างอิงกับไซยานิดิน (cyanidin-3-glucoside) พบว่าสารสกัดหยาบส่วนดอกให้ปริมาณแอนโทไซยานินรวมมากที่สุดเท่ากับ 14.86 มิลลิกรัมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตรสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดส่วนใบและส่วนกิ่งเท่ากับ 9.60 และ 4.23 มิลลิกรัมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตรสารสกัด ตามลำดับ ซึ่งมีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังที่แสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณแอนโทไซยานินรวมของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนของต้นพญาสัตบรรณ

สารสกัดหยาบ	ปริมาณแอนโทไซยานินรวม (มิลลิกรัมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตรสารสกัด)
ส่วนใบ	9.60±3.77 ^a
ส่วนดอก	14.86±2.25 ^b
ส่วนกิ่ง	4.23±0.96 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวมที่มีในสารสกัดโดยวิธี pH differential เมื่ออ้างอิงกับไซยานิดิน พบว่าสารสกัดหยาบส่วนดอกให้ปริมาณแอนโทไซยานินรวมมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดส่วนใบและส่วนกิ่ง ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์นั้นไม่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดทั้งที่แอนโทไซยานินเป็นสารในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ เนื่องมาจากการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น ค่าความเป็นกรด ต่างอุณหภูมิ เวลาในการสกัดซึ่งไม่ควรเกิน 1 ชั่วโมง ระยะเวลาในการเก็บรักษาสารสกัด และอัตราส่วนของสารสกัดหยาบต่อตัวทำละลายที่ทำการสกัดด้วย โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 1 ต่อ 25 ซึ่งสารสกัดที่ได้ทำการวิเคราะห์นั้นมีอัตราส่วน 1 ต่อ 9 และมีระยะเวลาการเก็บรักษาที่นาน (Kaur and Mondal, 2014)

4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ (Total phenolic content)

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีในสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วน โดยวิธี Folin- Ciocalteu Colorimetric Method วัดด้วยเครื่อง UV/Vis microplate spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารละลายมาตรฐาน พบว่าสารสกัดหยาบส่วนกิ่งให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดเทียบเท่ากับ 0.19 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดส่วนดอกและส่วนใบเทียบเท่ากับ 0.14 และ 0.07 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังที่แสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนของต้นพญาสัตบรรณ

สารสกัดหยาบ	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด)
ส่วนใบ	0.07±0.01 ^a
ส่วนดอก	0.14±0.01 ^b
ส่วนกิ่ง	0.19±0.01 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนโดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลายพบว่าสารสกัดส่วนกิ่งให้ปริมาณฟีนอลิกมากที่สุดรองลงมาเป็นส่วนดอกและส่วนใบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Dhruvi *et al*, (2016) ที่ใช้เมทานอลเป็นตัวสกัดเปลือก กิ่ง และ ใบของต้นพญาสัตบรรณจากประเทศอินเดียพบว่าปริมาณฟีนอลิกที่ส่วนกิ่งมากกว่าส่วนใบ นอกจากนี้ปริมาณฟีนอลิกที่ทำการวิเคราะห์นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่นตัวทำละลาย โครงสร้าง และองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด (Iqbal *et al*, 2015) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าตัวทำละลายเป็นตัวแปรสำคัญของการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเนื่องจากส่วนใหญ่ฟีนอลิกจะละลายได้ที่ในตัวทำละลายที่มีสภาพความเป็นขั้วสูง (Misra *et al*, 2011) และวิธี Folin- Ciocalteu Colorimetric Method นั้นไม่ได้เป็นการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกเพียงวิธีเดียวจึงทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้นั้นไม่สอดคล้องกับค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH และตัวสารสกัดหยาบอาจ

มีสารประกอบฟีนอลิกตัวอื่นที่ไม่ได้แสดงออกมาโดยวิธีการวิเคราะห์นี้แต่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้เช่น แอสคอบิก และโทโคฟีรอล เป็นต้น (Kaur and Mondal, 2014)

4.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแทนนินของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ (Tanin's content)

จากการวิเคราะห์ปริมาณแทนนินที่มีในสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร เมื่อนำสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนมาเทียบกับกราฟมาตรฐานจากกรดแทนนิก พบว่าสารสกัดหยาบส่วนกิ่งมีปริมาณแทนนินมากที่สุด โดยมีค่าเทียบเท่ากับ 210.25 มิลลิกรัมกรดแทนนิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ รองลงมาเป็นส่วนใบ และส่วนดอก โดยมีค่าเทียบเท่ากับ 60.25 และ 0.91 มิลลิกรัมกรดแทนนิกต่อกรัมสารสกัดหยาบตามลำดับ ซึ่งส่วนใบและดอกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และส่วนกิ่งมีความแตกต่างกันกับส่วนใบ และกิ่งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังที่แสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ปริมาณแทนนินของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนของต้นพญาสัตบรรณ

สารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ	ปริมาณแทนนิน (มิลลิกรัมกรดแทนนิกต่อกรัมสารสกัด)
ส่วนใบ	60.25±7.07 ^a
ส่วนดอก	0.91±0.35 ^b
ส่วนกิ่ง	210.25±10.60 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

จากการวิเคราะห์สารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วนพบว่าสารสกัดส่วนกิ่งมีปริมาณแทนนินมากที่สุดรองลงมาเป็นส่วนใบและดอกตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Dhruvi *et al*, (2016) ที่ใช้เมทานอลเป็นตัวสกัดใบ กิ่ง และเปลือกของต้นพญาสัตบรรณจากประเทศอินเดีย พบว่า ปริมาณแทนนินที่ส่วนกิ่งมากกว่าส่วนใบ และสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณส่วนเดียวกันจะให้ปริมาณแทนนินที่ต่างกันเมื่อใช้ตัวทำละลายต่างชนิดเดียวกันโดยปริมาณแทนนินจะให้ปริมาณผลได้สูงเมื่อใช้ตัวทำละลายขั้วต่ำเช่น เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ และอะซิโตน เปอร์เซ็นต์ และจากการใช้สารโซเดียมคาร์บอเนต และ Folin Denis เป็นสารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาเชิงซ้อน ออกซิเดชั่น และรีดักชั่น และเมื่อได้รับอิเล็กตรอนของฟีนอลิกที่อยู่ในสารสกัดทำให้เกิดเป็นสีฟ้า (ขนิษฐา และคณะ, 2558) ทำให้ผล

ที่ได้ไม่สอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นกลุ่มใหญ่ของโพลีฟีนอลิกที่มีแทนนินเป็นกลุ่มย่อย
ในการวิเคราะห์ในข้างต้น

4.6 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาดต้นพญาสัตบรรณ (Scavenging activity on DPPH)

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ที่มีในสารสกัดหยาดต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วนโดยใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และวัดด้วยเครื่อง UV/Vis microplate spectrophotometer วัดที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้วิตามินอีเป็นตัวควบคุมเชิงบวกเทียบกับฤทธิ์ยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาดทั้ง 3 ส่วน ที่ความเข้มข้น 0.625 1.25 2.5 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาดต้นพญาสัตบรรณดังที่แสดงในตารางที่ 4.6 และนำมาคำนวณด้วยโปรแกรม Graphad prism พบว่าสารสกัดหยาดส่วนกิ่งออกฤทธิ์ยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.96 รองลงมาเป็นส่วนใบ และส่วนดอกมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.72 และ 2.79 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับดังที่แสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.6 ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาดทั้ง 3 ส่วนของต้นพญาสัตบรรณ

สารสกัดหยาด	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง				
	ความเข้มข้น				
	0.625	1.25	2.5	5	10
ส่วนใบ	20.65±2.57 ^a	37.67±1.23 ^b	66.78±3.04 ^c	78.57±0.47 ^d	81.94±0.61 ^d
ส่วนดอก	29.01±2.31 ^a	36.90±0.59 ^a	47.91±6.20 ^b	62.91±4.19 ^c	80.65±0.80 ^d
ส่วนกิ่ง	16.17±0.63 ^c	73.61±2.10 ^{ab}	82.29±0.63 ^a	82.63±0.17 ^a	84.68±0.63 ^b
วิตามินอี					
ความเข้มข้น			82.29		
10 มิลลิโมลาร์					

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.7 ความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูล DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนของต้นพญาสัตบรรณ

สารสกัดหยาบ	ค่า IC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ส่วนใบ	1.72
ส่วนดอก	2.79
ส่วนกิ่ง	0.96

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH พบว่าสารสกัดหยาบเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์จากต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วน ค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบส่วนกิ่งมีเปอร์เซ็นต์การการดักจับสูงสุด รองลงมาเป็นส่วนใบและส่วนดอกตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dhruvi *et al* (2016) ที่ทำการสกัดส่วนเปลือก กิ่ง และใบของต้นพญาสัตบรรณจากประเทศอินเดียโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน รายงานไว้ว่าสารสกัดหยาบส่วนกิ่งจะให้เปอร์เซ็นต์การดักจับที่สูงเมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย และวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH Scavenging รองลงมาเป็นส่วนใบ และตัวทำละลายที่แตกต่างกันการดักจับอนุมูล DPPH ที่ได้แตกต่างกันโดยที่ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงจะให้เปอร์เซ็นต์การดักจับได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ

4.7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยองค์ประกอบทางเคมีที่สกัดได้จากสารสกัดหยาบเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ของต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วนซึ่งแต่ละส่วนมีองค์ประกอบหลักของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกันโดยส่วนใบมีองค์ประกอบทางสารเคมีหลักคือ Linolenic acid 16.876 เปอร์เซ็นต์ 11,14,17-Eicosatrienoic acid, methyl ester 12.16 เปอร์เซ็นต์ Undecano-4-lactone 11.21 เปอร์เซ็นต์ Hexadecanoic acid 8.67 เปอร์เซ็นต์ และส่วนดอกมีองค์ประกอบทางสารเคมีหลักคือ 1-Isoquinolinemethanol 17.00 เปอร์เซ็นต์ Tran-linalool oxide 11.56 เปอร์เซ็นต์ Heptanoic acid 8.56 เปอร์เซ็นต์ และ Ethyl Oleate 6.48 เปอร์เซ็นต์ และส่วนกิ่งมีองค์ประกอบทางสารเคมีหลักคือ methyl(methyl-0-methyl- α -d-mannopyranoside)urate

13.12 เปอร์เซ็นต์, 2-Furancarboxaldehyde,5-(hydroxymethyl) 10.33 เปอร์เซ็นต์ Hexadecanoic acid 10.09 เปอร์เซ็นต์ Ethyl Oleate 9.20 เปอร์เซ็นต์ Linolenic acid 8.61 เปอร์เซ็นต์ และ Quinic acid 8.44 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)

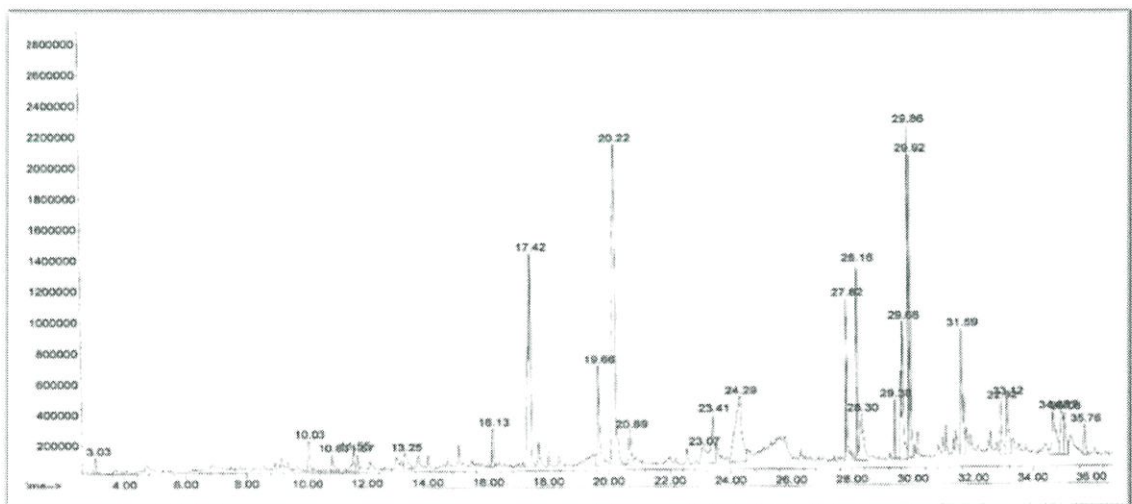
ลำดับ	Compound	ปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีใน		
		สารสกัดหยาบ (เปอร์เซ็นต์)		
		ส่วนกิ่ง	ส่วนดอก	ส่วนใบ
1	2,3-Butanediol	-	0.36	-
2	Maltol	1.22	-	-
3	Phenylethyl Alcohol	-	0.88	-
4	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl	1.30	0.69	0.16
5	Tran-linalool oxide	-	11.56	-
6	2-Furancarboxaldehyde,5-(hydroxymethyl)	10.33	-	5.82
7	2-Furancarboxaldehyde	-	1.26	-
8	Pentane,2-[(1-methylethyl) thio]	5.07	-	-
9	1,5-Hexadiene	-	1.00	-
10	2-(Chloroimino)	-	4.21	-
11	1-Isoquinolinemethanol	-	17.00	-
12	(1R2R,3R)-p-Menthanel-1,2,8-triol	-	1.52	-
13	1,4-Dihydrophenanthrene	2.50	-	-
14	Quinic acid	8.44	1.91	2.92
15	Undecano-4-lactone	-	-	11.21
16	5-isopropyl-2,7-dimethyl	-	2.50	-
17	methyl(methyl-0-methyl- α -d-mannopyranoside)urate	13.12	-	-

ตารางที่ 4.8 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)

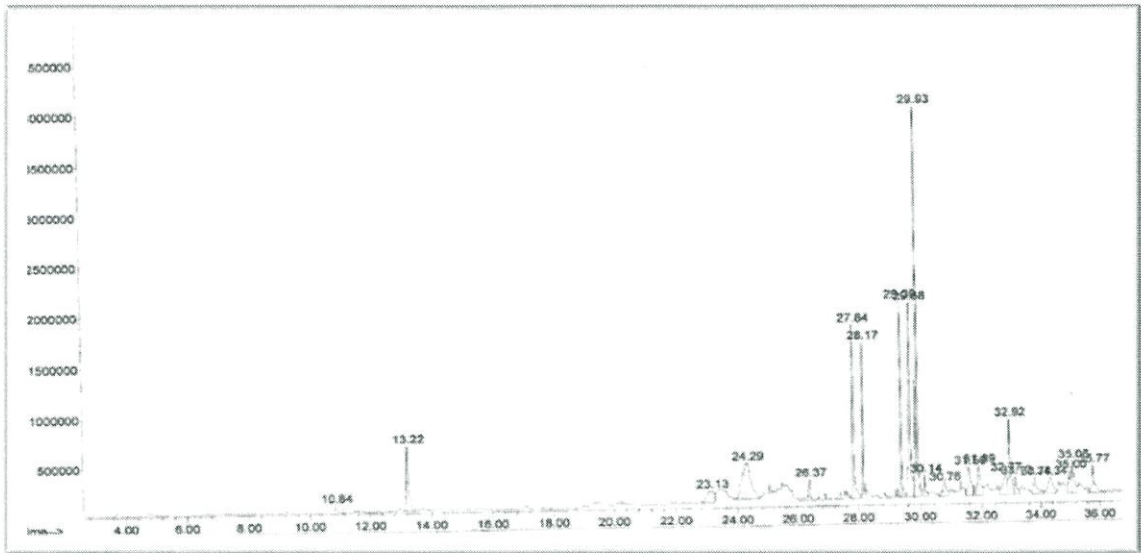
ลำดับ	Compound	ปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีใน		
		สารสกัดหยาบ (เปอร์เซ็นต์)		
		ส่วนกิ่ง	ส่วนดอก	ส่วนใบ
18	Heptanoic acid	-	8.56	-
19	6-chloro-8-(1'-metylethenyl)-1,2,4-triazolo[4,3-b]pyridazine	4.46	-	-
22	Dehydroacetic acid	1.71	-	-
23	4-Quinolinamine	1.82	-	-
24	Neophytadiene	-	-	1.49
25	Hexadecanoic acid	10.09	2.81	8.67
26	D-Glucurno-6,3-lactone	-	0.48	-
27	Heptadecanoic acid	0.70	-	-
28	Phytol	0.32	0.92	5.36
29	9,12-Octadecanoic acid	3.19	-	-
30	11,14,17-Eicosatrienoicacid,methyl ester	-	-	12.16
31	Ethyl Oleate	9.20	6.48	-
32	Linolenic acid	8.61	6.16	16.88
33	Stearic Acid	1.62	-	1.0
34	E-11,13-dimethyl-12-tetradecen acetate	-	-	1.82
35	Benzene,1,1'-(1,2-dimethyl-1,2-ethanediyl)bis	-	4.68	-
36	Etomidate	-	-	3.31
37	Eicosanoic acid	0.74	-	-

ตารางที่ 4.8 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)

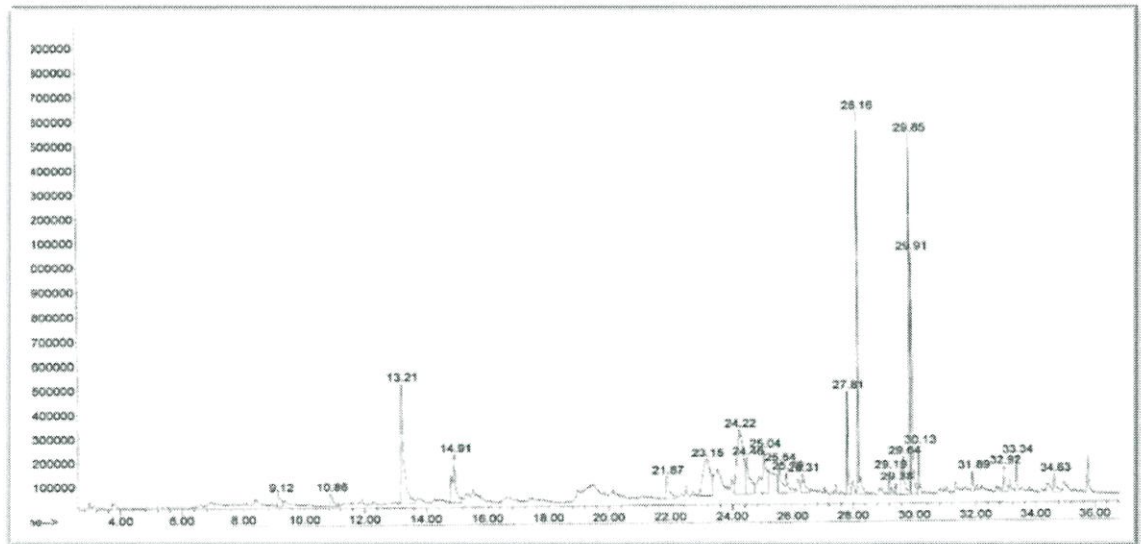
ลำดับ	Compound	ปริมาณขององค์ประกอบทางเคมี ในสารสกัดหยาบ (เปอร์เซ็นต์)		
		ส่วนกิ่ง	ส่วนดอก	ส่วนใบ
38	2-Methyl-3-(3-methyl-but-enyl)-2-(4-methyl-pent-3-enyl)-oxetane	-	-	3.13
45	1,1'-Biphenyl-3,4,4'-trimethoxy-6'-formyl	1.65	-	-
46	4,4-Dimethyl-2-[(Z)-(2-anilino-2-p-methoxyphenyl) ethyl]-2-oxazoline	-	0.90	-
47	2-Oleoylglycerol	-	-	1.88
48	Nonanic acid	-	1.92	2.73
49	Quino[2,3-b][1,5] benzodiazepin-12-one	-	1.04	-
50	1-phenylpyrano[3,4-b]indol-3-one	-	-	2.68



รูปที่ 4.2 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบส่วนดอก



รูปที่ 4.3 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบส่วนใบ



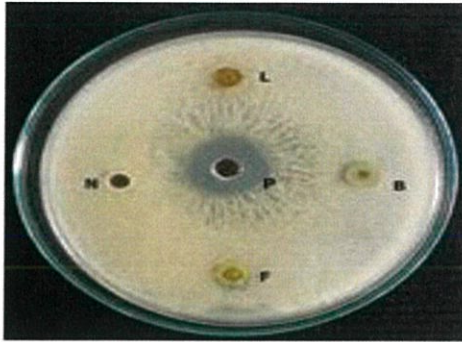
รูปที่ 4.4 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบส่วนกิ่ง

จากการวิเคราะห์ผลองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วน พบองค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกันจากสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วน 5 ชนิดในตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ Quinic acid อยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก Hexadecanoic acid อยู่ในกลุ่มเอไมด์ Phytol และ Linolenic acid เป็นกรด

ไขมัน โดยปริมาณของ Quinic acid และ 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl และในสารสกัดส่วน กิ่งพบสาร 4-Quinolinamine ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาเลเรีย และ Etomidate ที่ใช้เป็นยาสลบสำหรับการ ผ่าตัด โดยในสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS สอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกที่ เคราะห์ด้วยวิธี Folin- Ciocalteu- Colorimetric และค่าการยับยั้งอนุมูล DPPH ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (CHAKRABORTHY *et.al*, 2016) ที่รายงานผลการวิเคราะห์ องค์ประกอบทางเคมีโดยเครื่อง GC-MS พบว่าต้นพญาสัตบรรณจากประเทศอินเดียที่สกัดโดยใช้วิธี soxhlet extraction มีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายแต่มีปริมาณที่แตกต่างกันเนื่องจากความสามารถในการละลายของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายแตกต่างกันมีความสามารถในการละลายที่หลากหลายและ องค์ประกอบทางเคมีพืชเคมีที่แตกต่างกัน (PRITHA *et al*, 2006) และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบ ทางเคมีข้างต้นนั้น ส่วนกิ่งมีองค์ประกอบทางเคมี Dehydroacetic acid Stearic Acid และ methyl(methyl-0-methyl- α -d-mannopyranoside)- urinate ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และ ส่วน ใบมี Stearic Acid Campesterol และ Stigmasterol ที่อยู่ในกลุ่มสารสเตียรอยด์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อ แบคทีเรียได้ (Ouattara *et al*, 2011) โดยปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของทั้ง 2 ส่วนสอดคล้องกับผล การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดังที่แสดงในตารางที่ 4.9

4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ

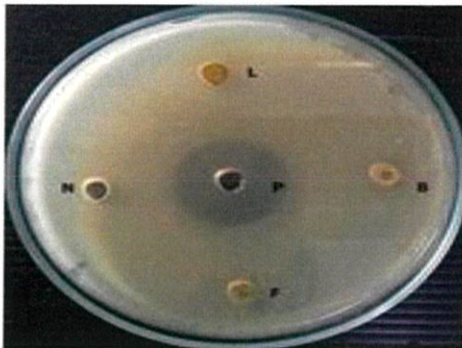
จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนของต้นพญาสัตบรรณเบื้องต้น กับเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* TISTR 1469, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR781, *Escherichia coli* ATCC 25299, *Bacillus cereus* TISTR 5040, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 โดยใช้วิธี Agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบ ทั้ง 3 ส่วน ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ไม่ออกฤทธิ์การยับยั้ง ดังรูปที่ 4.5



Salmonella typhimurium



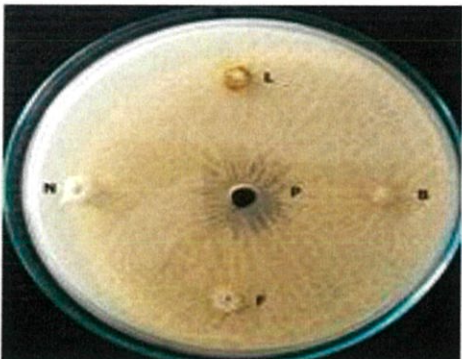
Bacillus cereus



Escherichia coli



Micrococcus luteus



Pseudomonas aeruginosa



Staphylococcus aureus

รูปที่ 4.5 บริเวณการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตรของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วน ส่วนใบ (L) ส่วนดอก (F) และส่วนกิ่ง (B) N : negative control : ethanol 95% และ P: positive control : Ciprofloxacin 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.8.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณด้วยวิธี Agar well diffusion

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดหยาบเอทานอล 95% จากต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนใบ ส่วนดอก และส่วนกิ่งในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ *Salmonella typhimurium* TISTR 1469 *Pseudomonas aeruginosa* TISTR781 *Escherichia coli* ATCC 25299 *Bacillus cereus* TISTR 5040 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบแต่ละส่วนตั้งแต่ 50 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณแต่ละส่วนมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 แกรมบวก และแกรมลบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังที่แสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนของต้นพญาสัตบรรณ

เชื้อที่ทดสอบ/สารสกัดหยาบ	Positive control	ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
		ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)		
		50	100	200
<i>S. typhimurium</i>				
ส่วนใบ	19.51±2.43 ^{ab}	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
ส่วนดอก	22.94±2.06 ^b	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
ส่วนกิ่ง	20.87±1.72 ^a	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
<i>P. aeruginosa</i>				
ส่วนใบ	17.46±0.84 ^a	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
ส่วนดอก	20.13±2.71 ^{ab}	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
ส่วนกิ่ง	19.12±0.55 ^b	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งที่เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (n= 5)

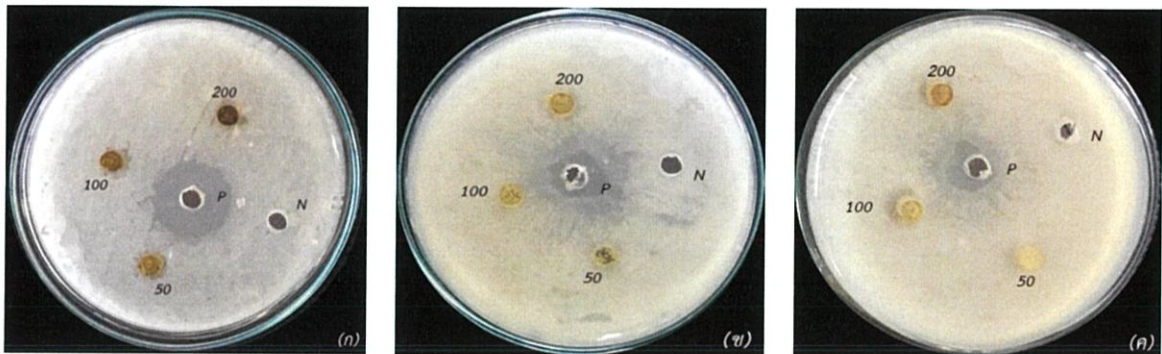
ตารางที่ 4.9 (ต่อ) บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนของต้นพญาสัตบรรณ

เชื้อที่ทดสอบ/สารสกัดหยาบ	ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
	Positive control	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)		
		50	100	200
<i>E. coli</i>				
ส่วนใบ	23.43±0.57 ^a	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
ส่วนดอก	24.89±0.72 ^a	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
ส่วนกิ่ง	22.52±2.15 ^a	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
<i>S. aureus</i>				
ส่วนใบ	21.12±2.08 ^a	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
ส่วนดอก	22.94±20.6 ^a	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
ส่วนกิ่ง	20.87±1.72 ^a	7.95±1.21 ^a	8.23±3.07 ^a	8.92±2.76 ^a
<i>M. luteus</i>				
ส่วนใบ	16.99±1.89 ^a	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
ส่วนดอก	18.11±2.10 ^a	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
ส่วนกิ่ง	19.02±1.5 ^a	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00

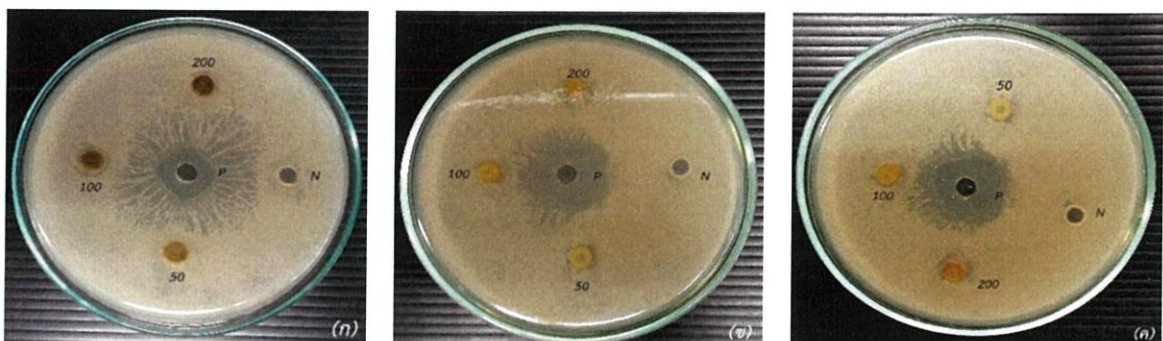
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (n= 5)

จากการนำสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วนข้างต้นมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่า ไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. typhimurium* *P. aeruginosa* *E. coli* และ *M. luteus* พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ส่วนไม่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด ในขณะที่สารสกัดส่วนใบและกิ่งมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *B. cereus* โดยสารสกัดส่วนกิ่งมีประสิทธิภาพการยับยั้งดีที่สุดตั้งแต่ความเข้มข้น 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 7.6 9.8 และ 9.03 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดส่วนใบที่

ความเข้มข้น 200 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.67 และ 6.8 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดส่วนกิ่งมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.95 8.23 และ 8.92 ตามลำดับ ดังที่แสดงในรูป 4.6

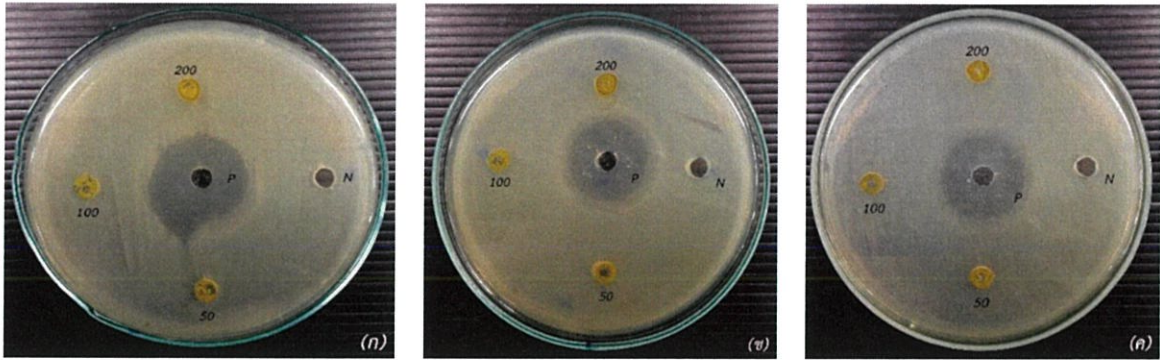


Salmonella typhimurium

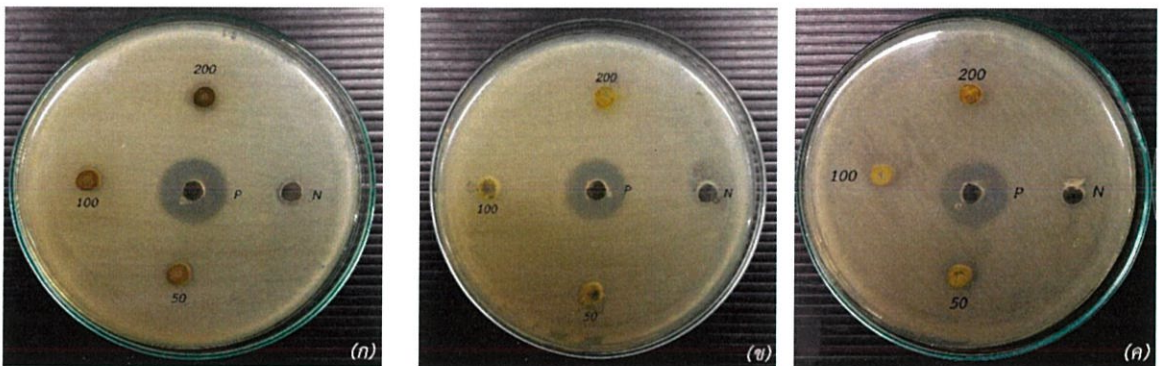


Pseudomonas aeruginosa

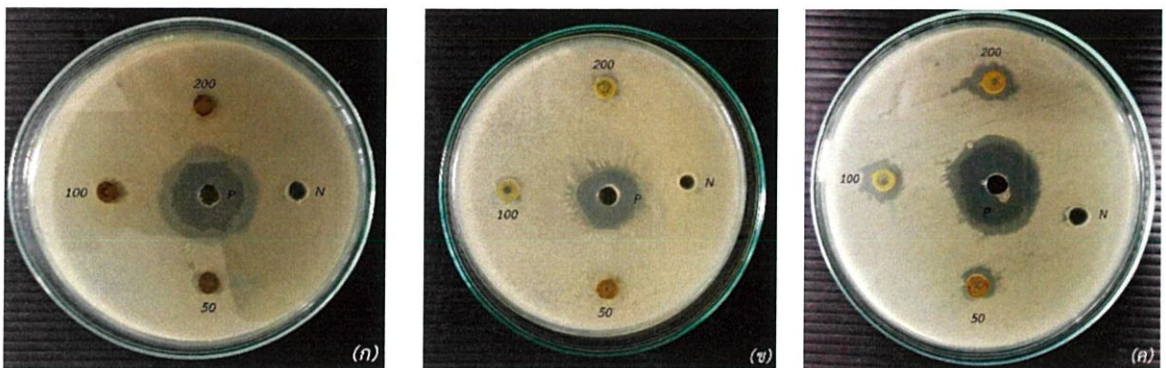
รูปที่ 4.6 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหยาดต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วนที่ความเข้มข้น 50 100 และ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนใบ (ก) ส่วนดอก (ข) และส่วนกิ่ง (ค)
N : negative control : ethanol 95% และ P: positive control : Ciprofloxacin 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



Escherichia coli

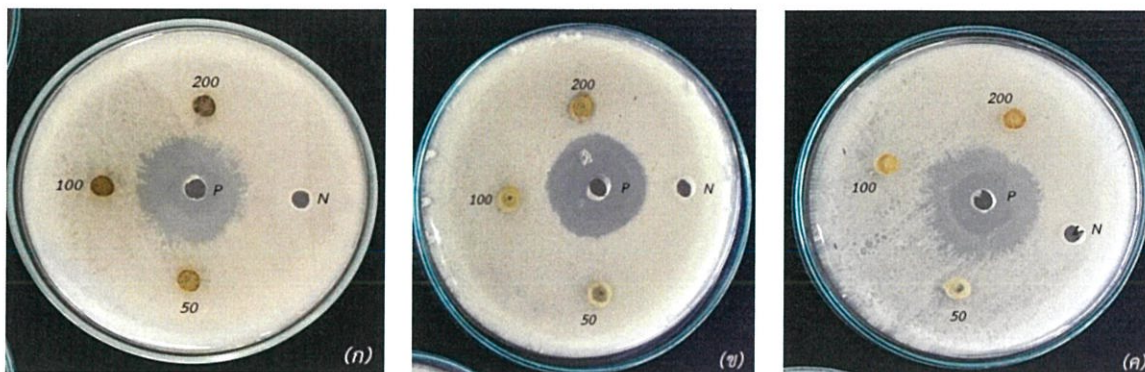


Bacillus cereus



Staphylococcus aureus

รูปที่ 4.6 (ต่อ) บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหยาดต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วนที่ ความเข้มข้น 50 100 และ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนใบ (ก) ส่วนดอก (ข) และส่วนกิ่ง (ค) N : negative control : ethanol 95% และ P: positive control : Ciprofloxacin 20 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร



Micrococcus luteus

รูปที่ 4.6 (ต่อ) บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วนที่ความเข้มข้น 50 100 และ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนใบ (ก) ส่วนดอก (ข) และส่วนกิ่ง (ค) N : negative control : ethanol 95% และ P: positive control : Ciprofloxacin 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนใบ ส่วนดอก และส่วนกิ่ง โดยสารสกัดหยาบส่วนกิ่งออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* และเชื้อ *B. cereus* ที่ความเข้มข้น 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บริเวณการยับยั้งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.95 8.23 8.92 7.60 9.78 และ 9.03 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Khanam et al (2015) รายงานว่าจากการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดเมทานอลส่วนใบจากต้นพญาสัตบรรณสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* *S. aureus* และ *B. cereus* และสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Hussain et al (2010) ที่รายงานว่าจากการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดเมทานอลต้นพญาสัตบรรณสามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ และต่างจากรายงานของ Antony et al (2012) ที่รายงานว่าสารสกัดจากต้นพญาสัตบรรณไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. typhimurium* อาจเนื่องมาจากเชื้อแต่ละชนิดมีความไวต่อตัวทำละลายที่แตกต่างกันออกไป โดยความสามารถการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดนั้นอาจเกิดจากสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเช่น แทนนิน สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ (Ouattara et al, 2011) โดยที่สารประกอบฟีนอลิกเป็นปัจจัยสำคัญของการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Iqbal et al, 2015) นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียยังขึ้นอยู่กับตัวทำละลาย โครงสร้างและองค์ประกอบย่อยทางเคมีของแต่ละส่วนของพืชเช่นกัน (Antony et al, 2012)

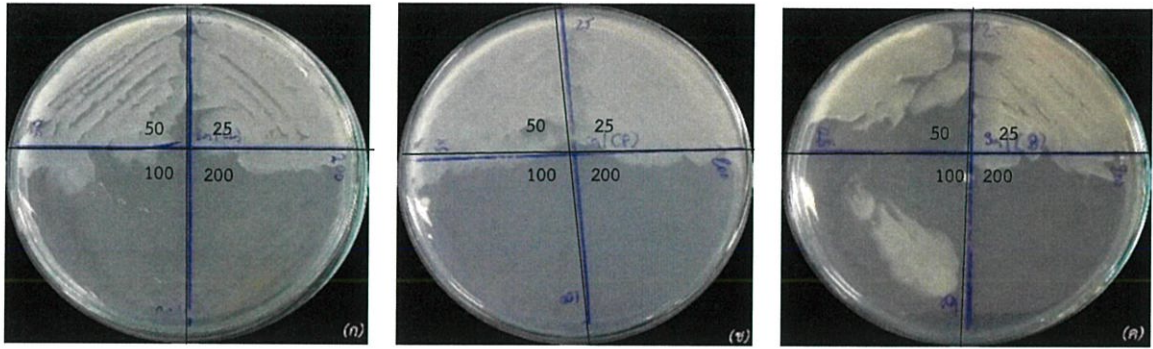
4.8.2 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal concentration โดยวิธี Broth Dilution)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) โดยวิธี broth dilution พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ส่วนนั้นละลายได้ไม่ดีในอาหาร NB ทำให้ไม่สามารถอ่านค่า MIC ได้จากการดูความขุ่นของสารสกัดที่มีเชื้อแบคทีเรียผสมอยู่ได้หลังจากนำไปบ่มที่บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำหลอดเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัดหยาบแต่ละส่วนของขั้นตอน MIC มาซัดลงบนอาหาร NA เพื่อดูผลการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด ได้ผลดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.7

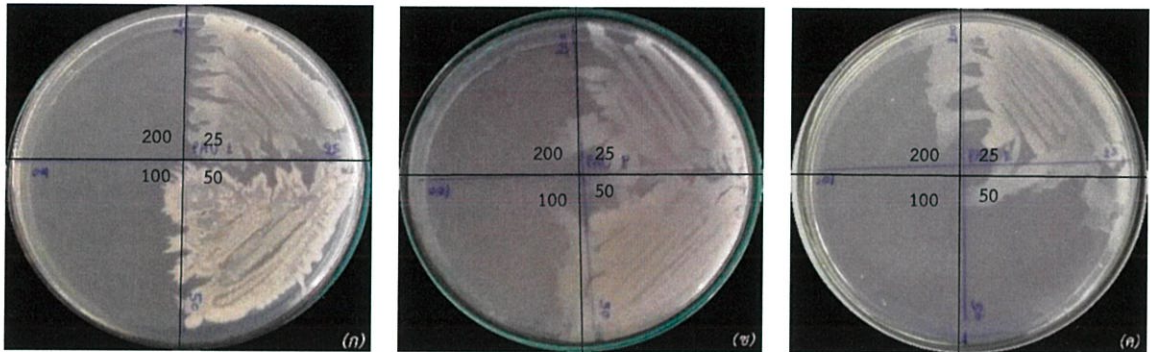
ตารางที่ 4.10 ผลการหาค่าความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal concentration โดยวิธี Broth Dilution)

เชื้อทดสอบ	ค่า MBC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	ส่วนใบ	ส่วนดอก	ส่วนกิ่ง
<i>S. typhimurium</i>	100	100	200
<i>P. aeruginosa</i>	200	100	100
<i>S. aureus</i>	200	-	200
<i>M. luteus</i>	100	200	200
<i>E. coli</i>	50	50	50
<i>B. cereus</i>	50	50	25

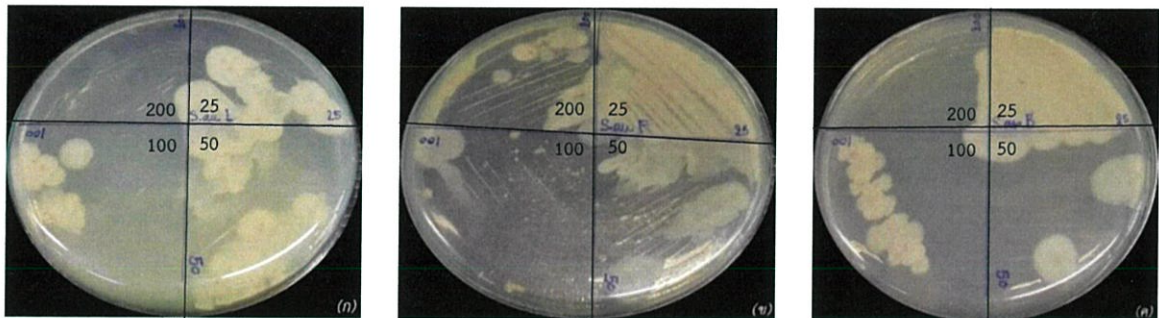
หมายเหตุ - ความเข้มข้นที่ใช้ทดลองที่ไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (≤ 200 mg/ml)



S. typhimurium

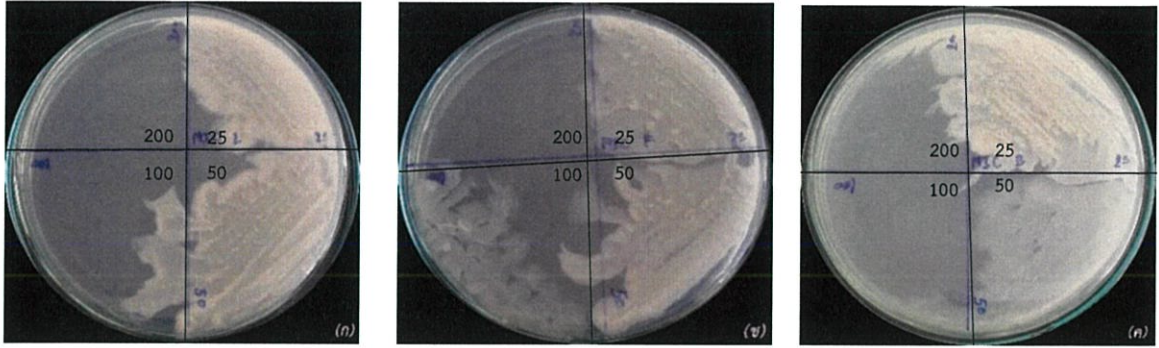
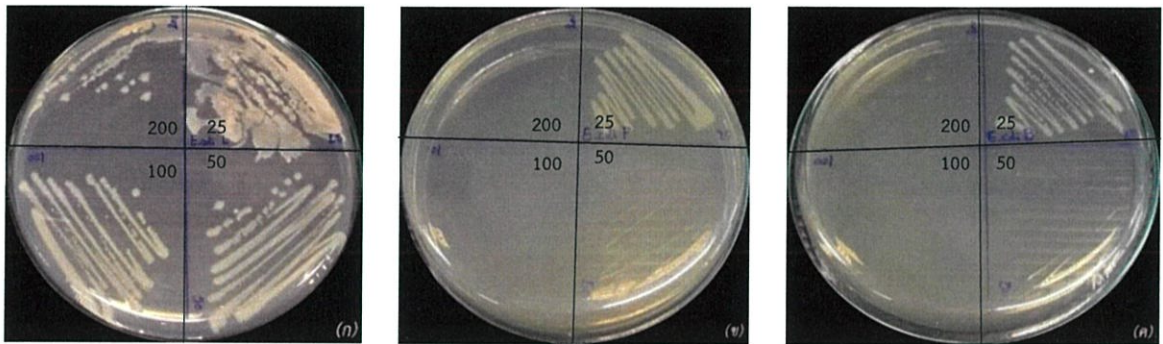
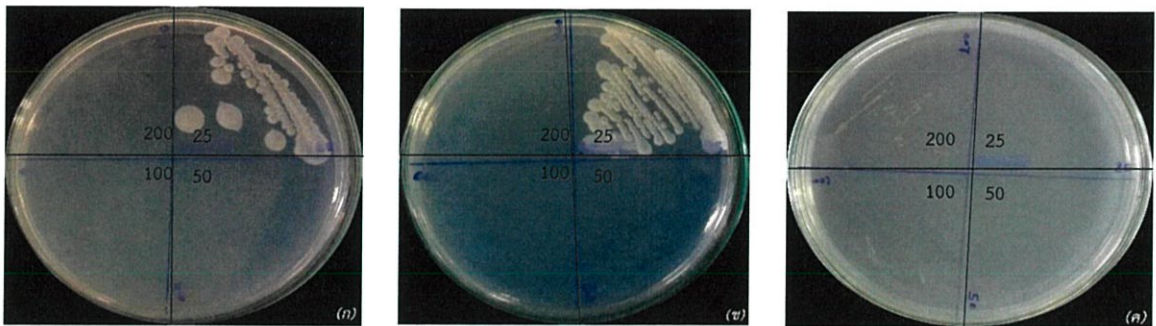


P. aeruginosa



S. aureus

รูปที่ 4.7 ความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาดต้นพญาสัตบรรณ ทั้ง 3 ส่วน ส่วนใบ (ก) ส่วนดอก (ข) และ ส่วนกิ่ง (ค) ที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

*M. luteus**E. coli**B. cereus*

รูปที่ 4.7 (ต่อ) ความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาดต้นพญาสัตบรรณ ทั้ง 3 ส่วน ส่วน ใบ (ก) ส่วนดอก (ข) และ ส่วนกิ่ง (ค) ที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 พบว่าสารสกัดส่วนใบและส่วนดอก สามารถฆ่าเชื้อ *S. typhimurium* และ *P. aeruginosa* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และส่วนกิ่งที่ความเข้มข้น 200 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดส่วนใบและส่วนกิ่งสามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดส่วนใบและ

ส่วนกิ่งสามารถฆ่าเชื้อ *M. luteus* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และส่วนดอกได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดส่วนกิ่งและส่วนดอกสามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดส่วนใบและส่วนดอกสามารถฆ่าเชื้อ *B. Cereus* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและส่วนกิ่งที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรได้ ดังที่แสดงในรูปที่ 4.8 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaushik *et al* (2014) ที่รายงานว่าสารสกัดส่วนกิ่งมีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุดต่อเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* เมื่อเทียบกับสารสกัดจากเมทานอลและบิวทานอล

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณโดยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลายโดยสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนใบ ส่วนดอก และส่วนกิ่ง พบว่าสารสกัดหยาบส่วนดอกมีปริมาณสารสกัดหยาบมากที่สุดมีร้อยละผลผลิตเท่ากับ 10.48 รองลงมาเป็นส่วนกิ่งและส่วนใบเท่ากับ 9.68 และ 7.80 ตามลำดับ จากการนำสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วนมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางเคมีได้แก่ ฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก แทนนิน แอนโทไซยานิน และหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการวิเคราะห์ปริมาณ ฟลาโวนอยด์พบว่าส่วนกิ่งปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดมีค่าเทียบเท่ากับ 118.60 มิลลิกรัมควอซิตินต่อกรัมสารสกัด รองลงมาเป็นส่วนดอก และ ส่วนกิ่ง โดยมีค่าเทียบเท่ากับ 59.60 และ 10.40 มิลลิกรัมควอซิตินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ส่วนปริมาณแอนโทไซยานินรวมพบว่าส่วนดอกให้ปริมาณแอนโทไซยานินรวมมากที่สุดเท่ากับ 14.86 มิลลิกรัมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตรสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัดส่วนใบและส่วนดอกเท่ากับ 9.60 และ 4.23 มิลลิกรัมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อลิตรสารสกัดตามลำดับ เมื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากพบว่าส่วนกิ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดเท่ากับ 0.19 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือสารสกัดส่วนดอกและส่วนใบเท่ากับ 0.14 และ 0.07 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด สำหรับปริมาณแทนนินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณมากที่สุดที่ส่วนกิ่งมีค่าเทียบเท่ากับ 210.25 มิลลิกรัมกรดแทนนิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ รองลงมาเป็นส่วนใบ และส่วนดอก โดยมีค่าเทียบเท่ากับ 60.25 และ 0.91 มิลลิกรัมกรดแทนนิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อหาฤทธิ์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระพบว่าส่วนกิ่งมีฤทธิ์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.99 รองลงมาเป็นส่วนดอกและส่วนใบมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.72 และ 2.79 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC-MS ของสารสกัดหยาบเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ของต้นพญาสัตบรรณทั้ง 3 ส่วนซึ่งแต่ละส่วนมีองค์ประกอบหลักของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกันโดยส่วนใบมีองค์ประกอบทางสารเคมีหลักคือ Linolenic acid 16.88 เปอร์เซ็นต์ 11,14,17-

Eicosatrienoic acid,methyl ester 12.16 เปอร์เซ็นต์ Undecano-4-lactone 11.21 เปอร์เซ็นต์ Hexadecanoic acid 8.67 เปอร์เซ็นต์ และ ส่วนดอกมีองค์ประกอบทางสารเคมีหลักคือ Tran-linalool oxide 11.56 เปอร์เซ็นต์ Heptanoic acid 8.56 เปอร์เซ็นต์ Ethyl Oleate 6.48 เปอร์เซ็นต์ และ Linolenic acid 6.16 เปอร์เซ็นต์ และส่วนกึ่งมีองค์ประกอบทางสารเคมีหลักคือ methyl(methyl-0-methyl- α -d-mannopyranoside)urate 13.12 เปอร์เซ็นต์ 2-Furancarboxal-dehyde,5-(hydroxy methyl) 10.33 เปอร์เซ็นต์ Hexadecanoic acid 10.09 เปอร์เซ็นต์ Ethyl Oleate 9.20 เปอร์เซ็นต์ Linolenic acid 8.61 เปอร์เซ็นต์ และ Quinic acid 8.44 เปอร์เซ็นต์ และองค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกันจากสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนมี 5 ชนิดได้แก่ 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ Quinic acid อยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก Hexa- decanoic acid อยู่ในกลุ่มเอไมด์ Phytol และ Linolenic acid เป็นกรดไขมัน จากผลการศึกษาพบว่าตัวทำลายของแต่ละส่วนจากต้น พญาสัตบรรณเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบทั้งสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี Agar well diffusion พบว่า สารสกัดหยาบจากทั้ง 3 ส่วนมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ โดยสารสกัดหยาบส่วนกิ่งออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกโดยที่ความเข้มข้น 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร *S. aureus* มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 7.95 8.23 และ 8.92 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเชื้อ *B. cereus* มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 7.60 9.78 และ 9.03 มิลลิเมตร ตามลำดับ และส่วนใบที่ความเข้มข้น 200 และ 100 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.67 และ 6.8 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดทั้ง 3 ส่วนมาหาค่า ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้พบว่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดส่วนกิ่งที่สามารถ ฆ่าเชื้อ *B. cereus* ได้เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สารสกัดส่วนใบ และส่วน ดอกที่สามารถฆ่าเชื้อ *B. cereus* และ *E.coli* ได้เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดส่วน ดอกที่ความเข้มข้นที่ความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ใช้ในการทดลอง (200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่สามารถฆ่า เชื้อ *S. aureus*

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบทำให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นที่เป็นประโยชน์ ในการวิจัยครั้งต่อไปควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่จำเพาะต่อแต่ละส่วน และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ เช่นความเป็นพิษต่อเซลล์มาเลเรีย รวมทั้งการนำสารสกัดหยาบมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะต่อพาราไซด์ เพื่อเป็นข้อมูลที่สนับสนุนการพัฒนาสมุนไพรมาใช้แทนยาแผนปัจจุบันในการรักษาโรคต่อเนื่องจากเคยมีรายงานวิจัยที่ระบุว่าสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาเลเรียในเซลล์เม็ดเลือดแดง

เอกสารอ้างอิง

- ชนิษฐา แพบขุนทด ปนิตา เย็นใจ และศิริพร เตชะกระโทก. 2558. "การศึกษาสารแทนนินจากส่วนต่างๆของทับทิม." *ปริญาครุศาสตรบัณฑิต โปรแกรมวิชาเคมี คณะครุศาสตร์, มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา*
- จันทร์เพ็ญ โคตรภูธร. 2559. "การสกัดสารพฤษเคมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเพกา." *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเคมีศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยบูรพา*
- Akoachere, J. F. T., Tanih, N. F., Ndip, L. M. and Ndip, R. N. (2009). Phenotypic characterization of *Salmonella typhimurium* isolates from food-animals and abattoir drains in Buea, Cameroon. *Journal of health, population, and nutrition*, 27(5), 612.
- Alonso-Gutierrez, J., Chan, R., Batth, T. S., Adams, P. D., Keasling, J. D., Petzold, C. J. and Lee, T. S. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production. *Metabolic engineering*, 19, 33-41.
- Antony, M., James, J., Misra, C. S., Sagadevan, L. D. M., Veettil, A. T. and Thankamani, V. (2012). Anti mycobacterial activity of the plant extracts of *Alstonia scholaris*. *International journal of current pharmaceutical research*, 4(1), 40-42.
- Argudin, M. A., Fetsch, A., Tenhagen, B. A., Hammerl, J. A., Hertwig, S., Kowall, J. and Mendoza, M. C. (2010). High heterogeneity within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates, defined by Cfr9I macrorestriction-pulsed-field gel electrophoresis profiles and *spa* and *SCCmec* types. *Applied and environmental microbiology*, 76(3), 652-658.
- Aylott, R.G. (2003). The Product and Its Manufacturer in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd edn., 2889–2893

- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F and Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
- Bone, K. and Mills, S. (2013). Principles and Practice of Phytotherapy."44. in Modern Herbal Medicine. Elsevier Health Sciences.
- Chusri, S., Siriyong, T., Na-Phatthalung, P. and Voravuthikunchai, S. P. (2014). Synergistic effects of ethnomedicinal plants of Apocynaceae family and antibiotics against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7(6), 456-461.
- Clausen, T. P., Provenza, F. D., Burritt, E. A., Reichardt, P. B., & Bryant, J. P. (1990). Ecological implications of condensed tannin structure: a case study. *Journal of Chemical Ecology*, 16(8), 2381-2392.
- Daramola, B. and Adegoke, G. O. (2011). Bitter Kola (*Garcinia kola*) seeds and health management potential. In *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* (pp. 213-220).
- Dhruti, M., Bhavika, P. and Meonis, P. (2016). Studies on phytochemical constituents and antioxidant activity of *Alstonia scholaris*. *International Journal of Life Sciences*, 4(4), 529-538.
- Drobniewski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical microbiology reviews*, 6(4), 324-338.
- Fabricant, D. S. and Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental health perspectives*, 109 (Suppl 1), 69.

- Flórez-Fernández, N. and Muñoz, M. J. G. (2018). Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Carbohydrates. In *Water Extraction of Bioactive Compounds* (pp. 317-331).
- Ganjewala, D. and Gupta, A. K. (2013). Study on Phytochemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Properties of Different Parts of *Alstonia scholaris* Linn. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 3(2), 379.
- Glencross, B. (2015). Understanding the nutritional and biological constraints of ingredients to optimize their application in aquaculture feeds. In *Aquafeed Formulation*. (pp. 33-73)
- Greenblatt, C. L., Baum, J., Klein, B. Y., Nachshon, S., Koltunov, V. and Cano, R. J. (2004). *Micrococcus luteus*-survival in amber. *Microbial ecology*, 48(1), 120-127.
- Güçlü-Üstündağ, Ö. and Mazza, G. (2008). Extraction of saponins and cyclopeptides from cow cockle seed with pressurized low polarity water. *LWT-Food Science and Technology*, 41(9), 1600-1606.
- Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M. and Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1), 43-53.
- Heldt, H. W. and Heldt, F. (2005). Phenylpropanoids comprise a multitude of plant secondary metabolites and cell wall components. *Plant Biochemistry (3rd eds)*. Elsevier Academic, New York, 448.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z. and Zhang, Y. (2009). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and cancer*, 62(1), 1-20.
- Hussain, A., Zaman, M. K. and Ramteke, A. M. (2010). Antibacterial activity of trunk bark of *Alstonia scholaris*. *Asian J Pharm Clin Res*, 3(4), 46-47.

- Iqbal, E., Salim, K. A. and Lim, L. B. (2015). Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *Journal of King Saud University-Science*, 27(3), 224-232.
- Iqbal, E., Salim, K. A. and Lim, L. B. (2015). Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *Journal of King Saud University-Science*, 27(3), 224-232.
- Islam, F., Islam, S., Nandi, N. C. and Satter, M. A. (2013). Essential oil composition from the flowers of *Alstonia scholaris* of Bangladesh. *International Food Research Journal*, 20(6), 3185.
- Iwahara, K., Hirata, M., Honda, Y., Watanabe, T., & Kuwahara, M. (2000). Free-radical polymerization of acrylamide by manganese peroxidase produced by the white-rot basidiomycete *Bjerkandera adusta*. *Biotechnology Letters*, 22(17), 1355-1361.
- Joshi, R., Rana, A. and Gulati, A. (2015). Studies on quality of orthodox teas made from anthocyanin-rich tea clones growing in Kangra valley, India. *Food chemistry*, 176, 357-366.
- Kathirvel, A. and Sujatha, V. (2016). Phytochemical studies, antioxidant activities and identification of active compounds using GC-MS of *Dryopteris cochleata* leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S1435-S1442.
- Kaur, S. and Mondal, P. (2014). Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants. *J Microbiol Exp*, 1(1), 00005.

- Kaushik, P., Kaushik, D., Sharma, N. and Rana, A. C. (2011). *Alstonia scholaris*: It's Phytochemistry and pharmacology. *Chronicles of young scientists*, 2(2), 71.
- Kay, C. D., Pereira-Caro, G., Ludwig, I. A., Clifford, M. N. and Crozier, A. (2017). Anthocyanins and flavanones are more bioavailable than previously perceived: a review of recent evidence. *Annual review of food science and technology*, 8, 155-180.
- Khanam, Z., Wen, C. S. and Bhat, I. U. H. (2015). Phytochemical screening and antimicrobial activity of root and stem extracts of wild *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali). *Journal of King Saud University-Science*, 27(1), 23-30.
- Khyade, M. S., Kasote, D. M. and Vaikos, N. P. (2014). *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. and *Alstonia macrophylla* Wall. ex G. Don: A comparative review on traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology*, 153(1), 1-18.
- Lakhanpal, P., & Rai, D. K. (2007). Quercetin: a versatile flavonoid. *Internet Journal of Medical Update*, 2(2), 22-37.
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC international*, 88(5), 1269-1278.
- Ma, C. H., Liu, T. T., Yang, L., Zu, Y. G., Chen, X., Zhang, L. and Zhao, C. (2011). Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of essential oil and biphenyl cyclooctene lignans from *Schisandra chinensis* Baill fruits. *Journal of Chromatography A*, 1218(48), 8573-8580.
- Malmberg, C. G. and Maryott, A. A. (1956). Dielectric constant of water from 00 to 1000 C. *Journal of research of the National Bureau of Standards*, 56(1), 1-8.

- Misra, C. S., Pratyush, K., Sagadevan, L. D. M., James, J., Veettil, A. K. T. and Thankamani, V. (2011). A comparative study on phytochemical screening and antibacterial activity of roots of *Alstonia scholaris* with the roots, leaves and stem bark. *International Journal of Research in Phytochemistry and pharmacology*, 1(2), 77-82.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2), 211-219.
- Ouattara, L., J. Koudou, C. Zongo, N. Barro, A. Savadogo, I. H. N. Bassole, A. S. Ouattara. and Alfred S. Traore. "Antioxidant and antibacterial activities of three species of *Lannea* from Burkina Faso." *J Appl Sci* 11, no. 2 (2011): 157-62.
- Panche, A. N., Diwan, A. D. and Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.
- Peter, K. V. and Shylaja, M. R. (2012). Introduction to herbs and spices: definitions, trade and applications. In *Handbook of Herbs and Spices (Second Edition)*, Volume 1 (pp. 1-24).
- Pratap, B., Chakraborty, G. S. and Mogha, N. (2013). Complete aspects of *Alstonia scholaris*. *Int J Pharm Tech Res*, 5(1), 17-26.
- puechkaset.com. 2561. ต้นพญาสัตบรรณ. [Online]. Available : www.puechkaset.com
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M. and Latha, L. Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1).
- Shahidi, F. and Chandrasekara, A. (2015). The use of antioxidants in the preservation of cereals and low-moisture foods. In *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (pp. 413-432).

- Sparg, S., Light, M. E., & Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of ethnopharmacology*, 94(2-3), 219-243.
- Subraya, C. K. and Gupta, D. (2012). Antioxidant anti-inflammatory activity of *Alstonia scholaris* R. Br. stem bark extract. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(2), 55-57.
- W. Walter and Baumgarten E. D.C. (1987). *Organic Experiments* 6th ed. Linstromberg Heath and Company, 69-81
- Wu, W. and Jin, S. (2005). PtrB of *Pseudomonas aeruginosa* suppresses the type III secretion system under the stress of DNA damage. *Journal of bacteriology*, 187(17), 6058-6068.
- Zygmunt, B. and Namisnik, J. (2003). Preparation of samples of plant material for chromatographic analysis. *Journal of chromatographic science*, 41(3), 109-116.
- ชายชัย เอกลักษณ์. 2561. ต้นพญาสัตบรรณ. เข้าสืบค้นเมื่อ 12 พฤษภาคม 2561. [Online]. Available : <https://sites.google.com/site/chaychayxeklaksn/sarwc-phrrn-mi/sarwc-tnmi>
- วินัย ตะห์ลัน. 2561. โภชนาการพื้นฐานเพื่อการมีสุขภาพ สมบูรณ์สูงสุด. เอกสารประกอบการบรรยาย. เรียบเรียง เพื่อใช้ในการเรื่องเล่าของกลุ่มวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ. เข้าสืบค้นเมื่อ 12 พฤษภาคม 2561. [Online]. Available : <https://goo.gl/vr9o3P>.
- Jessie Szalay. 2018. Carotenoids. เข้าสืบค้นเมื่อ 12 พฤษภาคม 2561. [Online] . Available : <https://www.livescience.com/52487-carotenoids.html>

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร Nutrient agar , NA

Beef extract	3.00	กรัม
Peptone	5.00	กรัม
NaCl	15.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม
Distilled Water	1000.00	
มิลลิลิตร		

วิธีการเตรียม

1. เตรียมปริมาณสารที่ต้องการ
2. ละลายส่วนประกอบต่างๆในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ต้มจนส่วนประกอบต่างๆละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

สูตรอาหาร Muller Hinton Agar (MHA)

Muller Hinton Agar (MHA) เป็นอาหารสูตร สำเร็จรูป โดยการเตรียมใช้ปริมาตรของอาหาร 38 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1ลิตร

สารอาหารภายในประกอบด้วย

Beef, infusion from	300.00	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Casein acid hydrolysate	17.5	กรัม
Agar	17.00	กรัม

Distilled Water	1000.00	มิลลิลิตร
-----------------	---------	-----------

เตรียมโดยทำการชั่งอาหารปริมาณ 38 กรัม ละลายในน้ำกลั่นโดยใช้ปริมาตร 38 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่ Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายมาตรฐาน McFarland No.5

0.048 M BaCl ₂	0.5	มิลลิลิตร
---------------------------	-----	-----------

0.18 M H ₂ SO ₄	99.5	มิลลิลิตร
---------------------------------------	------	-----------

สารละลายมาตรฐาน McFarland No.5 สามารถเตรียมได้โดยใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาณ 9.5 มิลลิลิตร ผสมกับแบเรียมคลอไรด์ความเข้มข้น ร้อยละ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. เตรียมกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 1 เตรียมได้โดยการเติมน้ำกลั่น ลงในขวดปรับปริมาตร เล็กน้อย และทำการปิเปต กรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ ทำการปรับปริมาตร ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
2. เตรียมแบเรียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยการชั่งสารแบเรียมคลอไรด์ 1 กรัม ละลายใน น้ำกลั่นปริมาตร เล็กน้อย และ ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
3. นำสารในข้อ 1 และ 2 ผสม ใน หลอดทดลอง ฝาเกลียว

หมายเหตุ : หลังจากเตรียมเสร็จแล้วให้พันฝาเกลียวด้วยพาราฟิล์ม และเก็บ ให้พ้นแสง แบเรียมคลอไรด์ จะเกิดการตกตะกอน ควรนำมา วอเท็กซ์ ก่อนนำมาใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic)

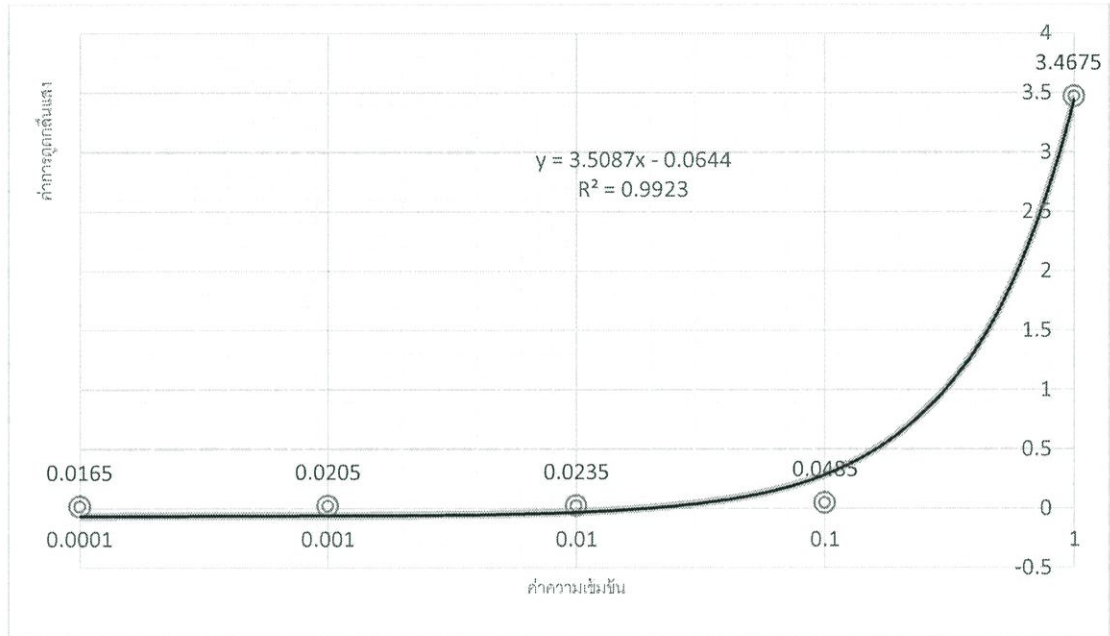
การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน โดยมีหลักการคือ สารประกอบฟีนอลิกจะทำปฏิกิริยากับ Folin – Ciocalteu reagent เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

1. สารเคมี
 - 1.1 Folin-Ciocalteu's reagent
 - 1.2 โซเดียมคาร์บอเนต (NaCO_3) ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์
 - 1.3 สารละลายแกลลิก
2. การเตรียมกราฟมาตรฐานแกลลิก
 - 2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานแกลลิก ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
 - 2.2 นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1 0.1 0.01 และ 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ
 - 2.3 เตรียมสารมาตรฐานแกลลิก ความเข้มข้นต่างๆ ลงใน well plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
 - 2.4 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
 - 2.5 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสม และบ่มที่ อุณหภูมิห้อง 30 นาที
 - 2.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร
 - 2.7 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณแกลลิกในหน่วยไมโครกรัม
3. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิก
 - 2.8 เตรียมสารสกัดหยาบความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
 - 2.9 บีบสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครกรัมลงใน well plate
 - 2.10 บีบสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 10 5 2.5 1.25 0.625 และ 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม
 - 2.11 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 80 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในแต่ละหลุม Well plate

2.12 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลุม well plate

2.13 บ่มเป็นเวลา 30 นาที และตรวจค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ DPPH Radical Scavenging Assay

1. การเตรียมสารละลายตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ DPPH Radical Scavenging Assay
 - 1.1 เตรียมสารละลายตัวอย่างในเอทานอล 3 ส่วน ได้แก่ กิ่ง ใบ และดอกของต้น พญาสัตบรรณ
 - 1.2 เตรียมหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด โดยเตรียมเอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 1 หลอด และปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดที่เหลืออีก 9 หลอด
 - 1.3 ทำการระบุความเข้มข้นของสารละลายที่มีสารสกัดอยู่ และนำมาเจือจางลดความเข้มข้น ลงทีละครึ่งหรือวิธี two-fold dilution สารละลายความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. การเตรียมสารละลาย DPPH ใน Absolute Ethanol

โดยการชั่ง DPPH 0.039 กรัม ละลายใน Absolute Ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายความเข้มข้น DPPH 1000 ไมโครโมล นำมาเจือจางเพื่อลดความเข้มข้น ครึ่งหนึ่งโดยใช้ปิเปตดูดสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมลงใน Absolute Ethanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 500 ไมโครโมล

หมายเหตุ: 1. เตรียมสารละลาย DPPH ทันทีก่อนนำมาใช้

2. การคำนวณความเข้มข้นของ DPPH (น้ำหนักโมเลกุลของ DPPH = 394.33)

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักสาร (กรัม)} &= 1 \times 10^{-4} \text{ โมลต่อลิตร} \times 394.33 \text{ กรัมต่อโมล} \\ &= 0.039 \text{ กรัมต่อลิตร} \end{aligned}$$

3. การเตรียมสารละลายวิตามินอี (Alpha-tocopherol)

เตรียมสารละลายวิตามินอี หรือ Alpha-tocopherol ความเข้มข้น 500 ไมโครโมล โดยทำการชั่งวิตามินอี 0.0043 กรัม ละลายใน Absolute Ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตาราง ค-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณ

ความเข้มข้นของสารสกัด หยาบ (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ร้อยละของปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ DPPH		
	กิ่ง	ใบ	ดอก
10	84.13±1.47 ^c	81.94±0.62 ^e	80.26±0.17 ^e
5	82.64±0.17 ^c	78.57±0.30 ^d	60.02±0.75 ^d
2.5	82.44±0.52 ^c	67.26±0.60 ^c	44.24±2.27 ^c
1.25	73.61±1.64 ^b	38.49±0.17 ^b	36.90±0.60 ^b
0.625	16.17±6.11 ^a	22.22±1.72 ^a	30.06±2.44 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรเดียวกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น

ร้อยละ 95

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยใช้สารละลายควอซิตินเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์มาตรฐาน ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้การวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

1. สารเคมี

- 1.1 สารละลายเมทานอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์
- 1.2 สารละลายโซเดียมไนไตรต์ (NaNO_2) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์
- 1.3 สารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์
- 1.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 M

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานควอซิติน

- 2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานควอซิตินเข้มข้นเริ่มต้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 2.2 นำมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1000, 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 2.3 ปิเปตสารละลายมาตรฐานควอซิตินที่ละลายในเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ใส่ลงหลอดทดลอง 250 ไมโครลิตร
- 2.4 เติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร
- 2.5 เติมสารละลายโซเดียมไนไตรต์ (NaNO_2) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร รอ 5 นาที
- 2.6 เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร รอ 6 นาที

2.7 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 275 ไมโครลิตร

2.8 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์

2.9 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณสารละลายควอซีตินในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

3.1 ชั่งสารสกัดหยาบ 1 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2 ปิเปตสารสกัดปริมาตร 250 ไมโครลิตร

3.3 เติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร

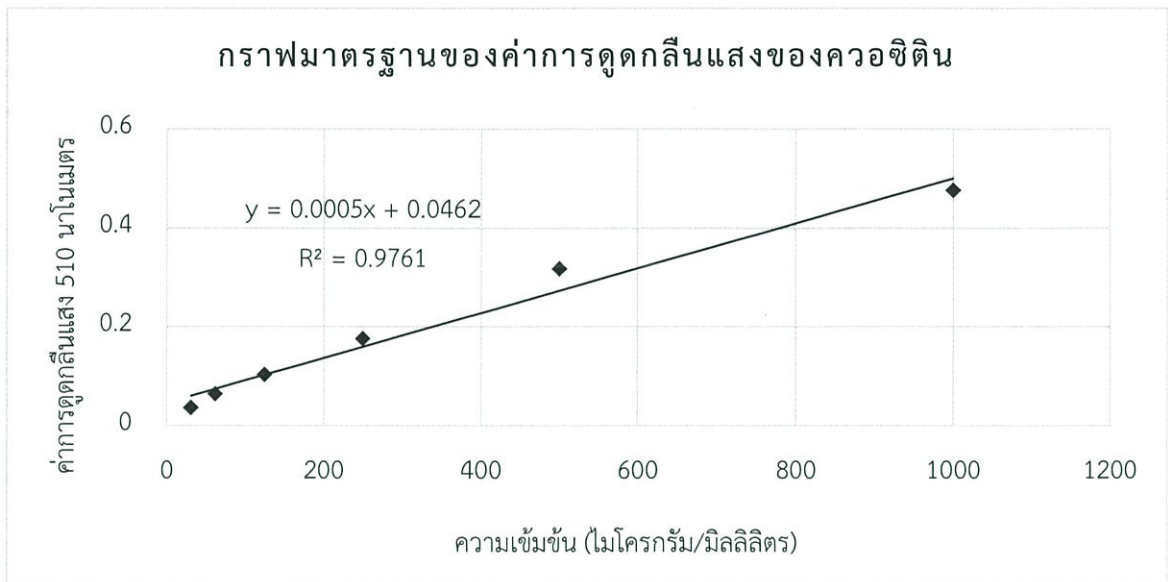
3.4 เติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร รอ 5 นาที

3.5 เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร รอ 6 นาที

3.6 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 275 ไมโครลิตร

3.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์

3.8 รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของควอซีตินต่อกรัมของสารสกัด



รูปที่ ง-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณสารละลายควอซิตินในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบของส่วนต่างๆจากต้นพญาสัตบรรณ จะวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Denis นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดต่อกรัมของสารสกัด (mg of tannic acid equivalent) (TAE/g of extract)

1. สารเคมี

- 1.1 สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30
- 1.2 สารละลาย Folin-Denis reagent
- 1.3 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 35
- 1.4 สารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแทนนิก

- 1.5 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก โดยนำมาชั่ง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30 เป็นตัวทำละลาย
- 1.6 ทำการเจือจางสารละลายกรดแทนนิกแบบ two-flow dilution ที่ระดับความเข้มข้น 1000 500 250 125 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 1.7 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร
- 1.8 เติมสารละลาย Folin-Denis reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
- 1.9 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 35
- 1.10 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
- 1.11 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร
- 1.12 สารละลายมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแทนนิกกับค่าการดูดกลืนแสงของกรดแทนนิก จะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง หาสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมด

1.13 เตรียมสารสกัดหยาบ โดยนำแต่ละส่วนของสารสกัดมาชั่ง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30 เป็นตัวทำละลาย ดูดมาใช้ 50 ไมโครลิตร

1.14 เติมน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 7.5 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ฉ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานินทั้งหมด

ใช้วิธี pH differential

โดยใช้ระบบ 2 บัฟเฟอร์ คือ 0.025 M potassium chloride (KCl) ที่ pH 1.0 และ 0.4 M sodium acetate (CH₃COONa) ที่ pH 4.5

1. สารเคมี

- 1.1 โดยใช้ระบบ 2 บัฟเฟอร์ คือ 0.025 M potassium chloride (KCl) ที่ pH 1.0
- 1.2 sodium acetate (CH₃COONa) 0.4 M ที่ pH 4.5
- 1.3 potassium chloride หรือ sodium acetate

2. การวิเคราะห์สารประกอบแอนโทไซยานิน

- 1.4 นำสารละลายของสารสกัด ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ซึ่งสารสกัด 40 มิลลิกรัมละลายในน้ำ 1 มิลลิลิตร)
- 1.5 เจือจางสารสกัดตัวอย่าง 1 ส่วนใน 9 ส่วนของสารละลายบัฟเฟอร์ โดยวิธี pH differential โดยใช้ 2 ระบบ บัฟเฟอร์ คือ 0.025 M potassium chloride (KCl) ที่ pH 1.0 และ 0.4 M sodium acetate (CH₃COONa) ที่ pH 4.5 ปริมาตร 270 ไมโครลิตรของตัวอย่าง
- 1.6 ผสมกับ potassium chloride หรือ sodium acetate ปริมาตร 270 ไมโครลิตร
- 1.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และ 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์

จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณความแตกต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสง

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 1.0}} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 4.5}}$$

$$\text{ปริมาณ Anthocyanin (mg/l)} = \frac{A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000}{E \times l}$$

เมื่อ A คือ ความแตกต่างของ Absorbance ที่ pH ต่างกัน

MW คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอนโทไซยานิน (449.2)

DF คือ dilution factor E คือ Cyaniding-3-glucoside molar absorbance (26,900)

ตาราง ฉ-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของสารประกอบแอนโทไซยานินจากส่วนต่างๆของต้น
พญาสัตบรรณ

สารสกัดหยาบ	ปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานิน (Mg Cyaniding-3-glucoside / l สารสกัด)
กิ่ง	2.67±2.24 ^a
ใบ	9.52±3.78 ^b
ดอก	15.47±2.26 ^c

หมายเหตุ : ตัวอักษรเดียวกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ

ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ภาคผนวก ข

ผลการทดลอง

1. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar well diffusion

ตารางที่ ข-1 ผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อแบคทีเรีย	การทดสอบ		บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					เฉลี่ย
			ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ5	
<i>E. coli</i>	กึ่ง		6	6	6	6	6	6
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	24.45	24.38	23.35	20.38	20.05	22.52
		ใบ	23.62	22.98	22.95	24.33	23.28	23.43
		ดอก	24.22	24.66	24.60	26.11	24.88	24.89
<i>S. aureus</i>	กึ่ง		11.38	10.42	6	6	6	10.90
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	22.42	19.98	22.65	20.8	18.52	20.87
		ใบ	21.08	23.38	20.52	18.02	22.58	21.11
		ดอก	20.28	25.35	22.78	24.55	21.72	22.93

ตารางที่ ข-1 (ต่อ) ผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อแบคทีเรีย	การทดสอบ		บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					เฉลี่ย
			ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ5	
<i>S. typhimurium</i>	กึ่ง		6	6	6	6	6	6
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	22.42	19.98	22.65	20.8	18.52	20.87
		ใบ	21.08	23.38	20.48	22.58	18.02	21.10
		ดอก	20.28	25.35	22.78	24.55	21.72	22.93
<i>B.cereus</i>	กึ่ง		11.18	8.85	6	6	6	10.01
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	20.3	17.45	18.25	18.08	17.72	18.36
		ใบ	18.02	17.45	17.98	18.78	19.17	18.28
		ดอก	18.88	19.08	18.12	16.35	17.98	18.08

ตารางที่ ข-1 (ต่อ) ผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อแบคทีเรีย	การทดสอบ		บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					เฉลี่ย
			ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ5	
<i>P. aeruginosa</i>	กึ่ง		6	6	6	6	6	6
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	19.55	17.65	20.82	19.32	18.28	19.12
		ใบ	16.87	17.03	17.40	17.07	18.92	17.45
		ดอก	18.67	19.47	24.60	17.55	20.37	20.13
<i>M.luteus</i>	กึ่ง		6	6	6	6	6	6
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	19.67	17.20	20.75	17.57	19.63	18.96
		ใบ	19.35	15.75	18.32	14.63	16.92	16.99
		ดอก	16.62	21.13	16.28	19.46	17.05	18.10

ตารางที่ ข-2 ผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อแบคทีเรีย	การทดสอบ		บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					เฉลี่ย
			ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ5	
<i>E. coli</i>	กึ่ง		6	6	6	6	6	6
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	24.45	24.38	23.35	20.38	20.05	22.52
		ใบ	23.62	22.98	22.95	24.33	23.28	23.43
		ดอก	24.22	24.66	24.60	26.11	24.88	24.89
<i>S. aureus</i>	กึ่ง		11.95	11.22	6	6	6	11.58
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	22.42	19.98	22.65	20.8	18.52	20.87
		ใบ	21.08	23.38	20.52	18.02	22.58	21.11
		ดอก	20.28	25.35	22.78	24.55	21.72	22.93

ตารางที่ ข-2 (ต่อ) ผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อแบคทีเรีย	การทดสอบ		บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					เฉลี่ย
			ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ5	
<i>S. typhimurium</i>	กึ่ง		6	6	6	6	6	6
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	22.42	19.98	22.65	20.8	18.52	20.87
		ใบ	21.08	23.38	20.48	22.58	18.02	21.10
		ดอก	20.28	25.35	22.78	24.55	21.72	22.93
<i>B.cereus</i>	กึ่ง		11.18	8.85	6	6	6	6
	ใบ		6	6	7.58	8.62	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	20.3	17.45	18.25	18.08	17.72	18.36
		ใบ	18.02	17.45	17.98	18.78	19.17	18.28
		ดอก	18.88	19.08	18.12	16.35	17.98	18.08

ตารางที่ ข-2 (ต่อ) ผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อแบคทีเรีย	การทดสอบ		บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					เฉลี่ย
			ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ5	
<i>P. aeruginosa</i>	กึ่ง		6	6	6	6	6	6
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	19.55	17.65	20.82	19.32	18.28	19.12
		ใบ	16.87	17.03	17.40	17.07	18.92	17.45
		ดอก	18.67	19.47	24.60	17.55	20.37	20.13
<i>M.luteus</i>	กึ่ง		6	6	6	6	6	6
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	19.67	17.20	20.75	17.57	19.63	18.96
		ใบ	19.35	15.75	18.32	14.63	16.92	16.99
		ดอก	16.62	21.13	16.28	19.46	17.05	18.10

ตารางที่ ข-3 ผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อแบคทีเรีย	การทดสอบ		บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					เฉลี่ย
			ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ5	
<i>E. coli</i>	กึ่ง		6	6	6	6	6	6
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	24.45	24.38	23.35	20.38	20.05	22.52
		ใบ	23.62	22.98	22.95	24.33	23.28	23.43
		ดอก	24.22	24.66	24.60	26.11	24.88	24.89
<i>S. aureus</i>	กึ่ง		6	6	6	6	6	6
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		10.18	10.45	12.02	6	6	10.88
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	22.42	19.98	22.65	20.8	18.52	20.87
		ใบ	21.08	23.38	20.52	18.02	22.58	21.11
		ดอก	20.28	25.35	22.78	24.55	21.72	22.93

ตารางที่ ข-3(ต่อ) ผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อแบคทีเรีย	การทดสอบ		บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					เฉลี่ย
			ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ5	
<i>S. typhimurium</i>	กึ่ง		6	6	6	6	6	6
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	22.42	19.98	22.65	20.8	18.52	20.87
		ใบ	21.08	23.38	20.48	22.58	18.02	21.10
		ดอก	20.28	25.35	22.78	24.55	21.72	22.93
<i>B.cereus</i>	กึ่ง		10.62	8.52	9.92	10.13	6	9.79
	ใบ		6	6	8.62	9.82	7.95	8.79
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กึ่ง	20.3	17.45	18.25	18.08	17.72	18.36
		ใบ	18.02	17.45	17.98	18.78	19.17	18.28
		ดอก	18.88	19.08	18.12	16.35	17.98	18.08

ตารางที่ ข-3(ต่อ) ผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อแบคทีเรีย	การทดสอบ		บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					เฉลี่ย
			ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ5	
<i>P. aeruginosa</i>	กิ่ง		6	6	6	6	6	6
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กิ่ง	19.55	17.65	20.82	19.32	18.28	19.12
		ใบ	16.87	17.03	17.40	17.07	18.92	17.45
		ดอก	18.67	19.47	24.60	17.55	20.37	20.13
<i>M.luteus</i>	กิ่ง		6	6	6	6	6	6
	ใบ		6	6	6	6	6	6
	ดอก		6	6	6	6	6	6
	เอทานอล 95%		6	6	6	6	6	6
	ยาปฏิชีวนะ ไซโปรฟลอกซาซิน	กิ่ง	19.67	17.20	20.75	17.57	19.63	18.96
		ใบ	19.35	15.75	18.32	14.63	16.92	16.99
		ดอก	16.62	21.13	16.28	19.46	17.05	18.10

2. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Broth dilution (MIC), (MBC)

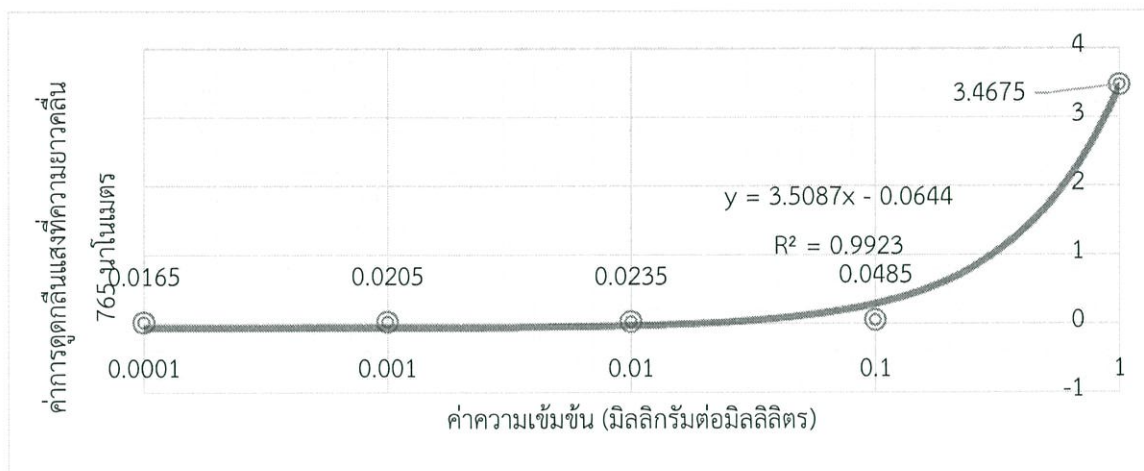
ตารางที่ ข-4 ผลการหาค่าความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal concentration โดยวิธี Broth Dilution)

สารสกัด \ เชื้อ			<i>E. coli</i>	<i>B.cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M.luteus</i>
กิ่ง	ความเข้มข้น	200	P	N	P	P	N	P
		100	P	N	N	P	N	N
		50	P	N	N	N	N	N
		25	N	N	N	N	N	N
ใบ	ความเข้มข้น	200	P	P	P	P	P	P
		100	P	P	N	P	P	P
		50	P	P	N	N	N	N
		25	N	N	N	N	N	N
ดอก	ความเข้มข้น	200	P	P	N	P	P	P
		100	P	P	N	P	P	N
		50	P	P	N	N	N	N
		25	N	N	N	N	N	N

หมายเหตุ : P คือ มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

N คือ ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

3. การหารปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณ



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของกรดแกลลิกสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

ตารางที่ ข-5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

ความเข้มข้นกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 765 นาโนเมตร	3.4675	0.0485	0.0235	0.0205	0.0165

ตารางที่ ข-6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดหยาบจากต้นพญาสัตบรรณ

สารสกัด หยาบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 765 นาโนเมตร			ค่าการดูดกลืน แสงเฉลี่ย	ปริมาณฟีนอลิก (mgGAE/100 g dry weight)
	1	2	3		
กิ่ง	0.432	0.423	0.471	0.442	44.2
ใบ	0.184	0.220	0.169	0.191	19.2
ดอก	0.628	0.601	0.545	0.591	59.2

4. การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณ

ตารางที่ ข-7 การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากกิ่ง ใบ และดอกของต้นพญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด (mg/ml) ความเข้มข้น	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร				
	10	5	2.5	1.25	0.625
กิ่ง	0.059	0.059	0.058	0.095	0.292
	0.051	0.058	0.058	0.085	0.295
	0.050	0.058	0.061	0.086	0.258
เฉลี่ย	0.05333	0.05833	0.05900	0.08867	0.28167
ใบ	0.258	0.207	0.100	0.071	0.060
	0.278	0.206	0.110	0.072	0.059
	2.285	0.211	0.112	0.074	0.036
เฉลี่ย	0.264	0.208	0.112	0.072	0.060
ดอก	0.066	0.116	0.141	0.212	0.233
	0.066	0.104	0.172	0.214	0.244
	0.067	0.132	0.179	0.210	0.228
เฉลี่ย	0.066	0.114	0.164	0.212	0.235

ตารางที่ ข-8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของวิตามินอี (Positive control)

วิตามินอี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร
ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	0.0595

ตารางที่ ข-9 ค่าร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี

วิตามินอี	ร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ
ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	82.29167

ตารางที่ ข-10 เปอร์เซ็นต์ของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วน กิ่ง ใบ และดอกของต้น
พญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด (mg/ml) ความเข้มข้น	ร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ				
	10	5	2.5	1.25	0.625
กิ่ง	82.44	82.44	82.74	71.73	13.09
	84.82	82.74	82.74	74.70	12.20
	85.12	82.74	81.84	74.41	23.21
เฉลี่ย	84.12	82.64	82.44	73.61	16.16
ใบ	82.14	78.87	67.26	38.29	23.21
	82.44	78.57	66.67	38.69	23.21
	81.25	78.27	67.86	38.39	20.24
เฉลี่ย	81.94	78.57	67.26	38.45	22.22

ตารางที่ ข-10(ต่อ) เปอร์เซ็นต์ของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วน กิ่ง ใบ และดอกของต้น
พญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

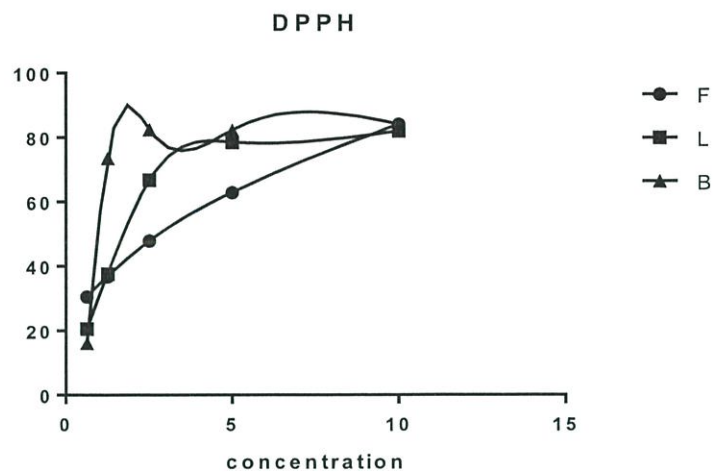
สารสกัด (mg/ml) ความเข้มข้น	ร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ				
	10	5	2.5	1.25	0.625
ดอก	80.36	59.23	43.75	36.90	30.65
	80.36	60.12	42.26	36.31	27.38
	80.06	60.71	46.73	37.50	32.14
เฉลี่ย	80.26	60.02	44.24	36.90	30.05

ตารางที่ ข-11 ค่าเฉลี่ยร้อยละของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วน กิ่ง ใบ และดอกของ
ต้นพญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด (mg/ml) ความเข้มข้น	ร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ				
	10	5	2.5	1.25	0.625
กิ่ง	84.127	82.2917	82.4405	73.6111	16.1706
ใบ	81.9444	78.57143	66.78571	37.67857	20.65476
ดอก	84.10714	62.91667	47.91667	36.9048	30.6548

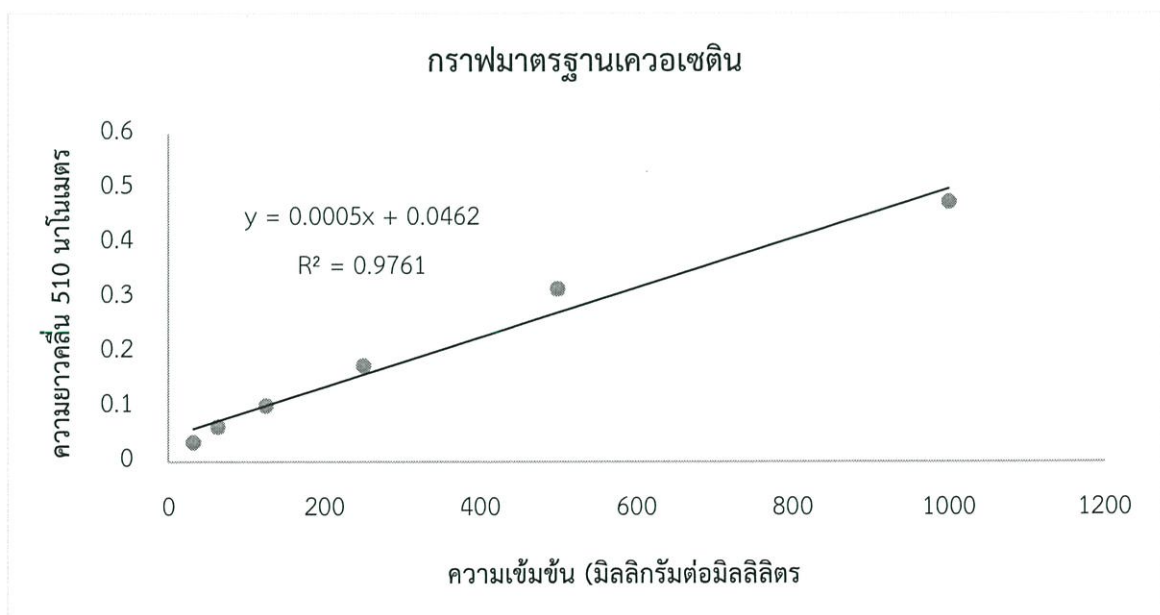
ตารางที่ ข-12 แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระครึ่งหนึ่งจากปริมาณทั้งหมด (IC_{50}) ของสารสกัดหยาบส่วน
กิ่งใบ และดอกของต้นพญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆของผักตบชวา	IC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
กิ่ง	0.955
ใบ	1.720
ดอก	2.778



รูปที่ ช-2 กราฟแสดงกราฟค่า IC_{50} ที่ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระครั้งหนึ่งจากปริมาณทั้งหมดของสารสกัดหยาดส่วน กิ่ง(B) ใบ(L) และดอก(F) ของต้นพญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากโปรแกรม GraphPad Prism

5. การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาดจากต้นพญาสัตบรรณ



รูปที่ ช-3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร กับปริมาณเนื้อสารของควอเซตินในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ตารางที่ ข-13 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบ กิ่ง ใบ และดอกของต้นพญาสัตบรรณ ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

สารสกัดหยาบ (1mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร			
	1	2	3	เฉลี่ย
กิ่ง	0.105	0.106	0.107	0.106
ใบ	0.078	0.074	0.076	0.076
ดอก	0.041	0.041	0.038	0.040

ตารางที่ ข-14 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในหน่วยมิลลิกรัมของควาซีตินต่อกรัมของสารสกัด (mg of -quercetin equivalents (QE/g of extract) ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของสารจากส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดหยาบ (1mg/ml)	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัมของควาซีตินต่อกรัมของสารสกัด)			
	1	2	3	เฉลี่ย
กิ่ง	117.6	119.6	121.6	118.6
ใบ	63.6	55.6	59.6	59.6
ดอก	10.4	10.4	16.4	12.4

จากสมการกราฟมาตรฐาน

$$y = 0.0005x + 0.0462 \quad \text{เช่น กิ่ง ซ้ำที่1 ค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ}$$

$$R^2 = 0.9761 \quad y = 0.0005x + 0.0462$$

$$x = 119.6$$

ในสมการสารสกัดหยาบความเข้มข้น 1 mg/ml มีฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ mgQE.g^{-1}

สารสกัดตัวอย่าง 1 mg มีค่า มิลลิกรัมของควาซีติน mg

สารสกัดตัวอย่าง 1000 mg มิลลิกรัมของควาซีติน เท่ากับ $(\times 1000 \text{ mg})/1\text{mg} = \text{mgQE.g}^{-1}$

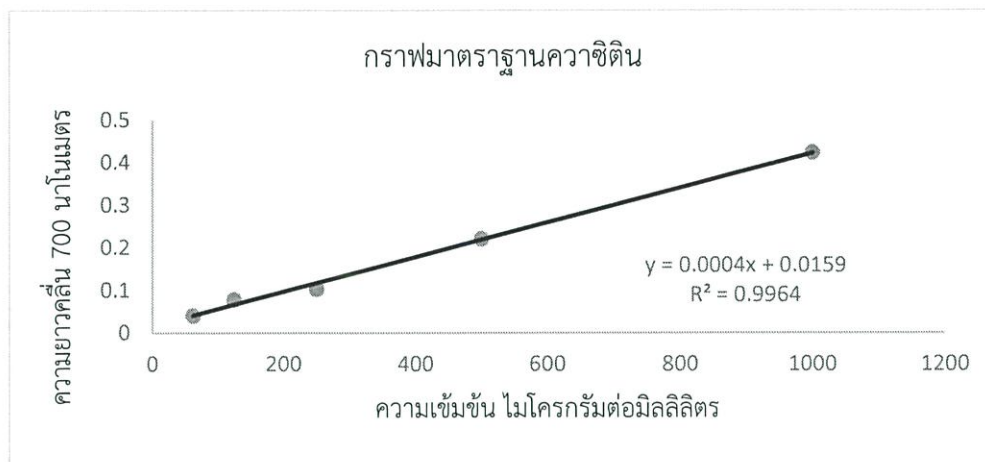
ดังนั้นพบว่า สารสกัดตัวอย่าง 1000 mg มีค่ามิลลิกรัมของควาซีตินต่อกรัมของสารสกัด เท่ากับ มิลลิกรัมของควาซีตินต่อกรัมของสารสกัด

ตารางที่ ข-15 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในหน่วยมิลลิกรัมของควาซีตินต่อกรัมของสารสกัด (mg of quercetin equivalents (QE/100 g of extract) ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร จากส่วนต่างๆของต้นพญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร

สารสกัดหยาบ (1mg/ml)	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัมของควาซีตินต่อ100 กรัมน้ำหนักแห้ง)			
	1	2	3	เฉลี่ย
กิ่ง	11760	11960	12160	11860
ใบ	6360	5560	5960	5960
ดอก	1040	1040	1640	1040

6. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากต้นพญาสัตบรรณ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากผักตบชวา โดยวิธี Folin-Denis (Kathirvel และ Sujatha, 2012) โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร โดยใช้กรดแทนนิกเป็นสารละลายมาตรฐาน โดยรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัด (mg of tannic acid equivalent (TAE)/g of extract) และใช้เอทานอลร้อยละ 30 เป็นแบลนด์ (blank) จากผลการทดลองจะพบว่าส่วนรากมีปริมาณแทนนินสูงสุด



รูปที่ ข-4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรกับปริมาณเนื้อสารของกรดแทนนิกในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ข-16 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรของสารสกัดจากส่วนต่างๆของต้น พญาสัตบรรณ

สารสกัด (1 mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร			เฉลี่ย
	1	2	3	
กิ่ง	0.097	0.053	0.103	0.084
ใบ	0.042	0.046	0.032	0.040
ดอก	0.011	0.019	0.013	0.014

ตารางที่ ข-17 ปริมาณสารแทนนินในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัด (mg of tannic acid equivalents (TAE)/g of extract) ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จากส่วนต่างๆของต้น พญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจากสมการกราฟมาตรฐาน

สารสกัด (1 mg/ml)	ปริมาณสารแทนนิน (มิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัด)			เฉลี่ย
	1	2	3	
กิ่ง	202.75	92.75	214.75	171.08
ใบ	65.25	75.25	40.25	60.25
ดอก	12.25	7.75	7.25	0.92

จากสมการกราฟมาตรฐาน $y = 0.0004x + 0.0159$ $R^2 = 0.9964$

เช่น กิ่งเฉลี่ยมีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.084

$$0.084 = 0.0004x + 0.0159$$

$$x = (0.084 - 0.0159) / 0.0004$$

$$x = 92.75$$

ในสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1 mg/ml มีแทนนินทั้งหมด เท่ากับ mgTAE.g⁻¹

สารสกัดตัวอย่าง 1 mg มีค่ามิลลิกรัมของกรดแทนนิก เท่ากับ mg

สารสกัดตัวอย่าง 1000 mg มีค่ามิลลิกรัมของกรดแทนนิก เท่ากับ (mg × 1000 mg)/1

mg จะได้ เท่ากับ mgTAE.g⁻¹

ดังนั้นสารสกัดตัวอย่าง 1000 mg ค่ามิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัดเท่ากับ มิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมของสารสกัด

ตารางที่ ข-18 ปริมาณสารแทนนินในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg of tannic acid equivalents (TAE)/100 g dry weight) ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จากส่วนต่างๆของต้น พญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจากสมการกราฟมาตรฐาน

สารสกัด (1 mg/ml)	ปริมาณสารแทนนิน (มิลลิกรัมของกรดแทนนิกต่อ100 กรัม น้ำหนักแห้ง)			เฉลี่ย
	1	2	3	
กิ่ง	20275	9275	21775	17108.33
ใบ	4025	7525	6525	6025
ดอก	1225	775	725	908.33

7. การวิเคราะห์หาสารประกอบแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากต้นพญาสัตบรรณ โดยใช้วิธี pH differential

ตารางที่ ข-19 ค่าการดูดกลืนแสงของ KCl pH 1.0 ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

สารสกัดหยาบ	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ5	เฉลี่ย
กิ่ง	0.337	0.36	0.295	0.326	0.294	0.3224
ใบ	0.592	0.487	0.521	0.556	0.477	0.5266
ดอก	0.876	0.97	0.931	0.943	0.961	0.9362

ตารางที่ ข-20 ค่าการดูดกลืนแสงของ KCl pH 1.0 ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

สารสกัดหยาบ	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ5	เฉลี่ย
กิ่ง	0.293	0.313	0.254	0.297	0.253	0.282
ใบ	0.332	0.268	0.297	0.311	0.267	0.295
ดอก	0.658	0.736	0.734	0.723	0.735	0.7172

ตารางที่ ข-21 ค่าการดูดกลืนแสงของ CH₃COONa pH 4.5 ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

สารสกัดหยาบ	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ5	เฉลี่ย
กิ่ง	0.285	0.302	0.311	0.303	0.292	0.2986
ใบ	0.234	0.264	0.236	0.241	0.253	0.2456
ดอก	0.677	0.724	0.693	0.722	0.733	0.7098

ตารางที่ ข-22 ค่าการดูดกลืนแสงของ CH₃COONa pH 4.5 ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

สารสกัดหยาบ	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ5	เฉลี่ย
กิ่ง	0.273	0.277	0.269	0.271	0.273	0.2726
ใบ	0.117	0.133	0.119	0.122	0.129	0.124
ดอก	0.38	0.411	0.387	0.4	0.413	0.3982

สูตรการคำนวณ $A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 1.0}} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 4.5}}$

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานิน (mg/l)} = \frac{A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000}{E \times l}$$

เมื่อ A คือ ความแตกต่างของ Absorbance ที่ pH 1 และ pH 4.5

MW คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอนโทไซยานิน (449.2)

DF คือ dilution factor

e คือ cyanidin-3-glucoside molar absorbance (26,900)

ตารางที่ ข-23 ค่าเฉลี่ยการหาสารประกอบแอนโทไซยานิน (mg cyanidin-3-glucoside/l crude extract)

สารสกัดหยาบ	กิ่ง	ใบ	ดอก
เฉลี่ย	9.60	14.86	4.23

ภาคผนวก ซ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. การศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ

1.1 การศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นอาหารเบื้องต้น
(Agar well diffusion)

ตารางที่ ซ-1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B.cereus* จากสารสกัดหยาบจากต้นพญาสัตบรรณ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
ใบ	200	5	7.6767	1.67036	.74701	5.6026	9.7507	6.00	9.82
	100	5	6.8400	1.20684	.53972	5.3415	8.3385	6.00	8.62
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	18.3598	1.12863	.50474	16.9584	19.7612	17.45	20.30
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	8.9753	4.92519	.98504	6.9423	11.0083	6.00	20.30
กิ่ง	200	5	9.0362	1.86828	.83552	6.7164	11.3560	6.00	10.62
	100	5	9.7866	6.98380	3.12325	1.1151	18.4581	6.00	22.08
	50	5	7.6066	2.34948	1.05072	4.6893	10.5239	6.00	11.18
	Ciprofloxacin	5	18.2796	.68644	.30699	17.4273	19.1319	17.45	19.17
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	10.1418	5.35720	1.07144	7.9305	12.3531	6.00	22.08
ดอก	200	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	100	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	18.0830	1.07870	.48241	16.7436	19.4224	16.35	19.08
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	8.4166	4.95248	.99050	6.3723	10.4609	6.00	19.08

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ใบ	Between Groups	560.098	4	140.025	126.825	.000
	Within Groups	22.082	20	1.104		
	Total	582.180	24			
กิ่ง	Between Groups	455.770	4	113.943	9.780	.000
	Within Groups	233.021	20	11.651		
	Total	688.791	24			
ดอก	Between Groups	583.996	4	145.999	627.362	.000
	Within Groups	4.654	20	.233		
	Total	588.650	24			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ใบ				
Duncan ^a				
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
50	5	6.0000		
Ethanol	5	6.0000		
100	5	6.8400	6.8400	
200	5		7.6767	
Ciprofloxacin	5			18.3598
Sig.		.246	.223	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.				

กึ่ง			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Ethanol	5	6.0000	
50	5	7.6066	
200	5	9.0362	
100	5	9.7866	
Ciprofloxacin	5		18.2796
Sig.		.122	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

ดอก			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200	5	6.0000	
100	5	6.0000	
50	5	6.0000	
Ethanol	5	6.0000	
Ciprofloxacin	5		18.0830
Sig.		1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

ตารางที่ ซ-2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E.coli* จากสารสกัดหยาบจากต้น
พญาสัตบรรณที่ความเข้มข้นต่างๆ

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimu m	Maximu m
						Lower Bound	Upper Bound		
ใบ	200	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	100	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	23.4330	.57048	.25513	22.7247	24.1413	22.95	24.33
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	9.4866	7.12080	1.42416	6.5473	12.4259	6.00	24.33
กิ่ง	200	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	100	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	22.5232	2.15361	.96312	19.8491	25.1973	20.05	24.45
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	9.3046	6.80262	1.36052	6.4967	12.1126	6.00	24.45
ดอก	200	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	100	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	24.8962	.72310	.32338	23.9984	25.7940	24.22	26.12
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	9.7792	7.71999	1.54400	6.5926	12.9659	6.00	26.12

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ใบ	Between Groups	1215.638	4	303.909	4669.145	.000
	Within Groups	1.302	20	.065		
	Total	1216.940	24			
กิ่ง	Between Groups	1092.065	4	273.016	294.322	.000
	Within Groups	18.552	20	.928		
	Total	1110.617	24			
ดอก	Between Groups	1428.265	4	357.066	3414.477	.000
	Within Groups	2.091	20	.105		
	Total	1430.357	24			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กิ่ง			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200	5	6.0000	
100	5	6.0000	
50	5	6.0000	
Ethanol	5	6.0000	
Ciprofloxacin	5		22.5232
Sig.		1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

ใบ			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200	5	6.0000	
100	5	6.0000	
50	5	6.0000	
Ethanol	5	6.0000	
Ciprofloxacin	5		23.4330
Sig.		1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

ดอก			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200	5	6.0000	
100	5	6.0000	
50	5	6.0000	
Ethanol	5	6.0000	
Ciprofloxacin	5		24.8962
Sig.		1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

ตารางที่ ซ-3 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.typhimurium* จากสารสกัดหยาบจากต้นพญาสัตบรรณที่ความเข้มข้นต่างๆ

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
ใบ	200	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	100	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	23.4350	.57130	.25549	22.7256	24.1444	22.95	24.33
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	9.6890	7.05262	1.41052	6.7778	12.6002	6.00	24.33
กิ่ง	200	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	100	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	20.8730	1.72420	.77109	18.7321	23.0139	18.52	22.65
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	8.9746	6.11254	1.22251	6.4515	11.4977	6.00	22.65
ดอก	200	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	100	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	24.896	.72310	.32338	23.9984	25.7940	24.22	26.12
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	9.7792	7.71999	1.5440	6.5926	12.9659	6.00	26.12

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ใบ	Between Groups	1182.231	4	295.558	513.321	.000
	Within Groups	11.516	20	.576		
	Total	1193.746	24			
กิ่ง	Between Groups	884.825	4	221.206	372.042	.000
	Within Groups	11.891	20	.595		
	Total	896.716	24			
ดอก	Between Groups	1428.265	4	357.066	3414.477	.000
	Within Groups	2.091	20	.105		
	Total	1430.357	24			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ใบ			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
50	5	6.0000	
Ethanol	5	6.0000	
100	5	6.4900	
200	5	6.5200	
Ciprofloxacin	5		23.4350
Sig.		.333	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

กิ้ง			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200	5	6.0000	
100	5	6.0000	
50	5	6.0000	
Ethanol	5	6.0000	
Ciprofloxacin	5		20.8730
Sig.		1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

ดอก			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200	5	6.0000	
100	5	6.0000	
50	5	6.0000	
Ethanol	5	6.0000	
Ciprofloxacin	5		24.8962
Sig.		1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

ตารางที่ ซ-4 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.auroginosa* จากสารสกัดหยาบจากต้น
พญาสัตบรรณที่ความเข้มข้นต่างๆ

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimu m	Maximu m
						Lower Bound	Upper Bound		
ใบ	200	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	100	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	17.456 5	.83849	.37498	16.4154	18.4977	16.87	18.92
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	8.2913	4.68962	.93792	6.3555	10.2271	6.00	18.92
กิ่ง	200	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	100	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	19.123 3	1.22099	.54604	17.6073	20.6394	17.65	20.82
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	8.6247	5.38072	1.0761 4	6.4036	10.8457	6.00	20.82
ดอก	200	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	100	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	20.129 6	2.70542	1.2099	16.7704	23.4888	17.55	24.60
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	8.8259	5.87317	1.1746	6.4016	11.2502	6.00	24.60

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ใบ	Between Groups	525.009	4	131.252	933.436	.000
	Within Groups	2.812	20	.141		
	Total	527.821	24			
กิ่ง	Between Groups	688.888	4	172.222	577.607	.000
	Within Groups	5.963	20	.298		
	Total	694.852	24			
ดอก	Between Groups	798.582	4	199.646	136.383	.000
	Within Groups	29.277	20	1.464		
	Total	827.860	24			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ใบ			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200	5	6.0000	
100	5	6.0000	
50	5	6.0000	
Ethanol	5	6.0000	
Ciprofloxacin	5		17.4565
Sig.		1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

ดอก			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200	5	6.0000	
100	5	6.0000	
50	5	6.0000	
Ethanol	5	6.0000	
Ciprofloxacin	5		20.1296
Sig.		1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

กิ่ง			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200	5	6.0000	
100	5	6.0000	
50	5	6.0000	
Ethanol	5	6.0000	
Ciprofloxacin	5		19.1233
Sig.		1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

ตารางที่ ซ-5 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.aureus* จากสารสกัดหยาบจากต้น
พญาสัตบรรณที่ความเข้มข้นต่างๆ

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimu m	Maximu m
						Lower Bound	Upper Bound		
ใบ	200	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	100	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	21.116 3	2.07741	.92904	18.5368	23.6957	18.02	23.38
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	9.0233	6.22919	1.24584	6.4520	11.5945	6.00	23.38
กิ่ง	200	5	8.9298	2.76467	1.23640	5.4970	12.3626	6.00	12.02
	100	5	8.2332	3.06893	1.37247	4.4226	12.0438	6.00	11.95
	50	5	7.9598	2.70526	1.20983	4.6008	11.3188	6.00	11.38
	Ciprofloxacin	5	20.873 0	1.72420	.77109	18.7321	23.0139	18.52	22.65
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	10.399 2	5.84054	1.16811	7.9883	12.8100	6.00	22.65
ดอก	200	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	100	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	22.936 4	2.06050	.92148	20.3780	25.4948	20.28	25.35
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	9.3873	6.96524	1.39305	6.5122	12.2624	6.00	25.35

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ใบ	Between Groups	914.005	4	228.501	264.738	.000
	Within Groups	17.262	20	.863		
	Total	931.268	24			
กิ่ง	Between Groups	709.274	4	177.319	32.413	.000
	Within Groups	109.412	20	5.471		
	Total	818.686	24			
ดอก	Between Groups	1147.367	4	286.842	337.806	.000
	Within Groups	16.983	20	.849		
	Total	1164.349	24			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ใบ			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200	5	6.0000	
100	5	6.0000	
50	5	6.0000	
Ethanol	5	6.0000	
Ciprofloxacin	5		21.1163
Sig.		1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

กิ่ง			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Ethanol	5	6.0000	
50	5	7.9598	
100	5	8.2332	
200	5	8.9298	
Ciprofloxacin	5		20.8730
Sig.		.083	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

ดอก			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200	5	6.0000	
100	5	6.0000	
50	5	6.0000	
Ethanol	5	6.0000	
Ciprofloxacin	5		22.9364
Sig.		1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

ตารางที่ ซ-6 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M.luteus* จากสารสกัดหยาบจากต้น
พญาสัตบรรณที่ความเข้มข้นต่างๆ

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimu m	Maximu m
						Lower Bound	Upper Bound		
ใบ	200	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	100	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	16.993 0	1.89910	.84930	14.6350	19.3510	14.63	19.35
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	8.1986	4.55435	.91087	6.3187	10.0785	6.00	19.35
กิ่ง	200	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	100	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	19.023 0	1.55644	.69606	17.0904	20.9556	17.20	20.75
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	8.6046	5.35445	1.07089	6.3944	10.8148	6.00	20.75
ดอก	200	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	100	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	50	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Ciprofloxacin	5	18.109 0	2.10135	.93975	15.4998	20.7182	16.28	21.13
	Ethanol	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Total	25	8.4218	5.01736	1.00347	6.3507	10.4929	6.00	21.13

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ใบ	Between Groups	483.384	4	120.846	167.535	.000
	Within Groups	14.426	20	.721		
	Total	497.811	24			
กิ่ง	Between Groups	678.394	4	169.599	350.047	.000
	Within Groups	9.690	20	.485		
	Total	688.084	24			
ดอก	Between Groups	586.512	4	146.628	166.031	.000
	Within Groups	17.663	20	.883		
	Total	604.174	24			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ใบ			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200	5	6.0000	
100	5	6.0000	
50	5	6.0000	
Ethanol	5	6.0000	
Ciprofloxacin	5		16.9930
Sig.		1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

ดอก			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200	5	6.0000	
100	5	6.0000	
50	5	6.0000	
Ethanol	5	6.0000	
Ciprofloxacin	5		18.1090
Sig.		1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

กิ่ง			
Duncan ^a			
ความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
200	5	6.0000	
100	5	6.0000	
50	5	6.0000	
Ethanol	5	6.0000	
Ciprofloxacin	5		19.0230
Sig.		1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.			

2. การศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาดจากต้นพญาสัตบรรณ

ตารางที่ ข-7 แสดงร้อยละของคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาดส่วน กิ่ง ใบ และดอกของต้นพญาสัตบรรณ

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
กิ่ง	0.625	3	16.1706	6.11629	3.53124	.9769	31.3644	12.20	23.21
	1.25	3	73.6111	1.63916	.94637	69.5392	77.6830	71.73	74.70
	2.5	3	82.4405	.51549	.29762	81.1599	83.7210	81.85	82.74
	5	3	82.6389	.17183	.09921	82.2120	83.0657	82.44	82.74
	10	3	84.1270	1.46812	.84762	80.4800	87.7740	82.44	85.12
	Total	15	67.7976	27.10626	6.99881	52.7867	82.8086	12.20	85.12
ใบ	0.625	3	22.2222	1.71830	.99206	17.9537	26.4907	20.24	23.21
	1.25	3	38.4921	.17183	.09921	38.0652	38.9189	38.39	38.69
	2.5	3	67.2619	.59524	.34366	65.7833	68.7406	66.67	67.86
	5	3	78.5714	.29762	.17183	77.8321	79.3108	78.27	78.87
	10	3	81.9444	.61954	.35769	80.4054	83.4835	81.25	82.44
	Total	15	57.6984	24.25311	6.26213	44.2675	71.1293	20.24	82.44
ดอก	0.625	3	30.0595	2.43612	1.40649	24.0079	36.1112	27.38	32.14
	1.25	3	36.9048	.59524	.34366	35.4261	38.3834	36.31	37.50
	2.5	3	44.2460	2.27310	1.31238	38.5993	49.8927	42.26	46.73
	5	3	60.0198	.74899	.43243	58.1592	61.8804	59.23	60.71
	10	3	80.2579	.17183	.09921	79.8311	80.6848	80.06	80.36
	Total	15	50.2976	18.66477	4.81922	39.9614	60.6338	27.38	80.36

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
กิ่ง	Between Groups	10201.401	4	2550.350	299.713	.000
	Within Groups	85.093	10	8.509		
	Total	10286.494	14			
ใบ	Between Groups	8227.372	4	2056.843	2700.109	.000
	Within Groups	7.618	10	.762		
	Total	8234.989	14			
ดอก	Between Groups	4853.139	4	1213.285	503.585	.000
	Within Groups	24.093	10	2.409		
	Total	4877.232	14			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กิ่ง				
Duncan ^a				
ค่าความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0.625	3	16.1706		
1.25	3		73.6111	
2.5	3			82.4405
5	3			82.6389
10	3			84.1270
Sig.		1.000	1.000	.515
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

ใบ						
Duncan ^a						
ค่าความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0.625	3	22.2222				
1.25	3		38.4921			
2.5	3			67.2619		
5	3				78.5714	
10	3					81.9444
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.						
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.						

ดอก						
Duncan ^a						
ค่าความเข้มข้น	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0.625	3	30.0595				
1.25	3		36.9048			
2.5	3			44.2460		
5	3				60.0198	
10	3					80.2579
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.						
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.						

3. การหาพหุคูณเคมี

ตารางที่ ข-8 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากส่วน ใบ กิ่ง และดอก จากต้น พญาสัตบรรณ

Descriptives								
Phenolic								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ใบ	3	.0734	.00747	.00431	.0548	.0919	.07	.08
กิ่ง	3	.1449	.00727	.00420	.1268	.1630	.14	.15
ดอก	3	.1875	.01207	.00697	.1575	.2174	.17	.20
Total	9	.1352	.05057	.01686	.0964	.1741	.07	.20

ANOVA					
Phenolic					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.020	2	.010	117.672	.000
Within Groups	.001	6	.000		
Total	.020	8			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Phenolic				
Duncan ^a				
สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
ใบ	3	.0734		
กิ่ง	3		.1449	
ดอก	3			.1875
Sig.		1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

ตารางที่ ซ-9 แสดงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบส่วน ใบ กิ่ง และดอก จากต้นพญาสัตบรรณ

Descriptives								
Flavonoid								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ใบ	3	99.0000	5.00000	2.88675	86.5793	111.4207	94.00	104.00
กิ่ง	3	174.0000	2.50000	1.44338	167.7897	180.2103	171.50	176.50
ดอก	3	9.0000	4.33013	2.50000	-1.7566	19.7566	4.00	11.50
Total	9	94.0000	71.63274	23.87758	38.9382	149.0618	4.00	176.50

ANOVA					
Flavonoid					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	40950.000	2	20475.000	1228.500	.000
Within Groups	100.000	6	16.667		
Total	41050.000	8			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Flavonoid				
Duncan ^a				
สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
ดอก	3	9.0000		
กิ่ง	3		99.0000	
ใบ	3			174.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

ตารางที่ ข-10 แสดงปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาดส่วน ใบ กิ่ง และดอก จากต้น พญาสัตบรรณ

Descriptives								
Tannin								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ใบ	3	60.2500	18.02776	10.40833	15.4666	105.0334	40.25	75.25
กิ่ง	3	171.0833	68.25198	39.40530	1.5360	340.6307	92.75	217.75
ดอก	3	.9167	11.40541	6.58492	-27.4159	29.2493	-12.25	7.75
Total	9	77.4167	82.90657	27.63552	13.6890	141.1443	-12.25	217.75

ANOVA					
Tannin					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	44761.167	2	22380.583	13.131	.006
Within Groups	10226.833	6	1704.472		
Total	54988.000	8			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Tannin			
Duncan ^a			
สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ดอก	3	.9167	
ใบ	3	60.2500	
กิ่ง	3		171.0833
Sig.		.129	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.			

ตารางที่ ซ-11 แสดงปริมาณสารประกอบแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดหยาบส่วน ใบ กิ่ง และดอก จากต้นพญาสัตบรรณ

Descriptives								
Antocyanin								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ใบ	5	9.5201	3.77920	1.69011	4.8276	14.2126	5.34	15.37
กิ่ง	5	2.6723	2.24390	1.00350	-.1139	5.4585	.17	5.34
ดอก	5	15.4659	2.25506	1.00849	12.6659	18.2659	13.19	18.21
Total	15	9.2194	6.02068	1.55453	5.8853	12.5536	.17	18.21

ANOVA					
Antocyanin					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	409.870	2	204.935	25.194	.000
Within Groups	97.611	12	8.134		
Total	507.481	14			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Antocyanin				
Duncan ^a				
สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
กิ่ง	5	2.6723		
ใบ	5		9.5201	
ดอก	5			15.4659
Sig.		1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.				



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ

วันที่ 12 เดือน กรกฎาคม พ.ศ 2561

ข้าพเจ้า นางสาวกุศลิน แสนศักดิ์ รหัสประจำตัว 57050804
นายเข้มหัตต์ เลิศธนกุล รหัสประจำตัว 57050806

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา
ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบต้นพญาสัตบรรณ
ชื่อภาษาอังกฤษ PHYTOCHEMICAL SCREENING AND BIOACTIVITIES OF CRUDE EXTRACT
FRON *Alstonia scholaris*

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่มีได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อน
เรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่ม
โครงการพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว
โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.00 %

ลงชื่อ.....*กุศลิน แสนศักดิ์*.....

(นางสาวกุศลิน แสนศักดิ์)

นักศึกษา

ลงชื่อ.....*เข้มหัตต์ เลิศธนกุล*.....

(นายเข้มหัตต์ เลิศธนกุล)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษของ
นักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้
เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....*สุทธิจิต ศรีวัชรกุล*.....

อาจารย์ที่ปรึกษา