

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากมะเขือเทศสีดาที่สร้าง
สารเมตาบอไลต์มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง

IDENTIFICATION OF ISOLATED BACTERIA FROM
Lycopersicon esculentum MILL. PRODUCING HIGH
ANTIOXIDANT ACTIVITY METABOLITES

ชลธิชา ขุนมงคล
ชลธิชา อองลา

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากมะเขือเทศสีดาที่สร้าง
สารเมตาบอไลต์มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง

IDENTIFICATION OF ISOLATED BACTERIA FROM
Lycopersicon esculentum MILL. PRODUCING HIGH
ANTIOXIDANT ACTIVITY METABOLITES

ชลธิชา ขุนมงคล

ชลธิชา อ่องลา

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

IDENTIFICATION OF ISOLATED BACTERIA FROM
Lycopersicon esculentum MILL. PRODUCING HIGH
ANTIOXIDANT ACTIVITY METABOLITES

CHONTHICHA KHUNMONGKOL

CHONTHICHA ONGLA



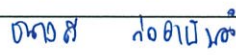
SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงการพิเศษ การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากมะเขือเทศสีดาที่สร้างสารเมตาบอไลต์มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง
 Identification of Isolated Bacteria from *Lycopersicon esculentum* Mill. Producing High Antioxidant Activity Metabolites

ชื่อนักศึกษา นางสาวชลธิชา ขุนมงคล รหัสนักศึกษา 57050816
 นางสาวชลธิชา อ่องลา รหัสนักศึกษา 57050817

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต
 ภาควิชา ชีววิทยา
 ปีการศึกษา 2560
 อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ธนาวัตี ก่ออานันต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินตามัย ประธานกรรมการ	
ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการ	
อ.ธนาวัตี ก่ออานันต์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากมะเขือเทศสีดาที่สร้างสารเมตาบอไลต์มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	
	Identification of Isolated from <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. Producing Antioxidant Activity Metabolites	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชลธิชา ขุนมงคล	รหัสนักศึกษา 57050816
	นางสาวชลธิชา อ่องลา	รหัสนักศึกษา 57050817
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	
ปีการศึกษา	2560	
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ธนาวัต ก่ออานันต์	

บทคัดย่อ

การศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียจากผลมะเขือเทศสีดา สารสกัดจากมะเขือเทศราชินี มะเขือเทศสีดา และมะเขือเทศฮอลแลนด์ ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากมะเขือเทศสีดาจำนวน 6 ไอโซเลต เพราะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Production medium สกัดสารจากแบคทีเรียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน อะซิโตน และเอทานอลความเข้มข้น 95% ด้วยเครื่องอัลตราโซนิก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที พบว่า ไอโซเลต TM 8 สามารถสร้างสารเมตาบอไลต์และการกำจัดอนุมูลอิสระมากที่สุด สารสกัดภายนอกเซลล์มีค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดประมาณ 33.50 ± 0.63 mg GAE/mg การสกัดสารเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ด้วยตัวทำละลายอะซิโตนมีค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าประมาณ 36.08 ± 2.08 mg GAE/mg ในทำนองเดียวกันค่าการดับจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายนอกเซลล์ ที่ระดับความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ มีค่า 50.35 ± 0.03 % และค่าการดับจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดภายในเซลล์มีค่า 47.20 ± 0.36 % เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารฟีนอลิกที่สกัดสารจากมะเขือเทศ 3 สายพันธุ์ พบว่ามะเขือเทศราชินีที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 95% มีค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่า โดยมีค่าประมาณ 51.58 ± 3.46 mg GAE/mg นอกจากนี้สารสกัดจากมะเขือเทศนี้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้ ขณะที่การเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากมะเขือเทศราชินีและมะเขือเทศสีดาที่สกัดด้วยอะซิโตนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ เช่น *Bacillus subtilis* ได้

คำสำคัญ : มะเขือเทศ, ฟีนอลิก, อนุมูลอิสระ, สารสกัดมะเขือเทศ, การเสริมฤทธิ์

Title	Identification of Isolated Bacteria from <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. Producing High Antioxidant Activity Metabolites	
Students	Miss Chonthicha Khunmongkol	Student ID 57050816
	Miss Chonthicha Ongla	Student ID 57050817
Degree	Bachelor of Science	
Department	Microbiology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut' Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2017	
Advisor	Thanawadee Korarnan	

Abstract

The study bacteria were isolated from Seeda Tomato. Extracts of Seeda tomato, Cherry tomato and Holland tomato capable of high antioxidant activity. It found that the bacteria 6 isolated from Seeda Tomato, the were cultured on production medium. The extraction from bacteria with solvent, hexane, acetone and ethanol 95% by Ultra Sonic at 40 ° C for 30 minutes. That isolate TM 8 can be metabolized and eliminated the freest radicals. Outside the cell extract content phenolic total is 33.50 ± 0.63 mg GAE / mg. Extraction of metabolites with in the cell with acetone has a total phenolic content than 36.08 ± 2.08 mg GAE / mg. Similarly, the antioxidant activity DPPH radicals outside the cell extract. At the concentration of 200 ug / mL with $50.35 \pm 0.03\%$. And the antioxidant activity DPPH radicals in the cell extract is $47.20 \pm 0.36 \%$. When compared with the quantity of phenolic compounds on the extraction of from tomato, 3 species. It found Seeda tomato were extracted with ethanol 95% is higher than the total phenolic. The value of 51.58 ± 3.46 mg GAE / mg. In addition, the tomato extract can inhibit the growth of *Escherichia coli*. The synergistic effects of the extract, Seeda tomato and cherry tomato extracted with acetone can inhibit the growth of bacterial spores, such as *Bacillus subtilis*.

Keyword : Tomato, Phenolics, Antioxidant activity, Tomato extract, The synergistic

กิตติกรรมประกาศ

การดำเนินงานในการทำโครงการพิเศษนี้ ได้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากผู้มีพระคุณ อาจารย์ธนาวดี ก่ออานันต์ ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ซึ่งมอบความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในการทำโครงการพิเศษครั้งนี้ รวมทั้งการแนะนำความรู้ แนวคิด ข้อมูล เทคนิค และประสบการณ์ในการทำงาน อันจะเป็นประโยชน์ที่สามารถนำไปปรับใช้ได้ ในอนาคต นอกจากนี้ยังขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำและให้การช่วยเหลือทั้งในด้านอุปกรณ์ตลอดจนวิธีการใช้เครื่องมือต่างๆ คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำโครงการพิเศษครั้งนี้ไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ชลธิชา ขุนมงคล

ชลธิชา อ่องลา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฎ
สัญลักษณ์.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	1
1.3 ขอบเขตโครงการ.....	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	2
2.1 มะเขือเทศ.....	2
2.1.1 ลักษณะของมะเขือเทศ.....	2
2.1.2 พันธุ์ของมะเขือเทศ.....	2
2.1.3 มะเขือเทศราชินี.....	3
2.1.4 มะเขือเทศสีดา.....	3
2.1.5 ประโยชน์ของมะเขือเทศ.....	4
2.2 แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในพืช.....	4
2.2.1 เอนโดไฟต์ที่เป็นแบคทีเรีย.....	5
2.2.2 ราเอนโดไฟต์.....	6
2.3 แบคทีเรียก่อโรค.....	6
2.3.1 <i>Escherichia coli</i>	6
2.3.2 <i>Bacillus subtilis</i>	7
2.3.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.3.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ.....	8
2.4.1 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ.....	9

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5 สารประกอบฟีนอล.....	9
2.5.1 โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล.....	10
2.5.2 แหล่งที่พบ.....	10
2.5.3 สรรพคุณของสารประกอบฟีนอล.....	10
2.6 สารสกัดจากมะเขือเทศ.....	10
2.7 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	11
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	13
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	13
3.1.1 วัสดุ.....	13
3.1.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	13
3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	13
3.1.4 เชื้อแบคทีเรีย.....	14
3.2 วิธีการทดลอง.....	14
3.2.1 การถ่ายเชื้อแบคทีเรียจากหัวเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์.....	14
3.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย.....	14
3.2.3 การเตรียมหัวเชื้อและการหมัก.....	15
3.2.4 การสกัดสารจากแบคทีเรียและมะเขือเทศ.....	16
3.2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (Total phenolic content).....	17
3.2.6 การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical).....	19
3.2.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากมะเขือเทศ.....	21
3.2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	23
4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียและศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหาร NA.....	23
4.2 ผลการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	24
4.3 ผลการศึกษาการหมักเพื่อการสกัดสารจากแบคทีเรียและมะเขือเทศ.....	27

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content).....	28
4.5 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical).....	32
4.6 ผลการศึกษาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากมะเขือเทศ.....	36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	38
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	38
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	39
เอกสารอ้างอิง.....	40
ภาคผนวก.....	43
ภาคผนวก ก.....	44
ภาคผนวก ข.....	46
ภาคผนวก ค.....	47
ภาคผนวก ง.....	52
ภาคผนวก จ.....	63
ภาคผนวก ฉ.....	105
ภาคผนวก ช.....	110

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงการเจือจางสารละลายมาตรฐานแกลลิกให้มีความเข้มข้นในช่วง 20-200 ไมโครกรัมต่อลิตร.....	18
4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียและศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหาร Nutrient agar.....	23
4.2 ลักษณะของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	25
4.3 แสดงน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้งหมด 3 ชนิด.....	27
4.4 แสดงน้ำหนักสารสกัดของมะเขือเทศสายพันธุ์ต่างๆ ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด.....	28
4.5 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต ที่ความเข้มข้น 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	29
4.6 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน.....	30
4.7 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดมะเขือเทศ 3 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดสารแตกต่างกัน.....	30
4.8 แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ที่ความเข้มข้น 200 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	33
4.9 แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน.....	34
4.10 แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน.....	35
4.11 แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดมะเขือเทศ 3 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 200 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้งหมด 2 ชนิด.....	36
4.12 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> และ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ของสารสกัดจากมะเขือเทศ 3 สายพันธุ์.....	37
4.13 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จากฤทธิ์ผสมของสารสกัดจากมะเขือเทศทั้งหมด 3 สายพันธุ์.....	37
ผ-1 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.8 – 8.0.....	45

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ผ-2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานกรด แกลลิกที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	48
ผ-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดภายนอกเซลล์	52
ผ-4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดภายในเซลล์ที่ สกัดด้วยเฮกเซน.....	53
ผ-5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดภายในเซลล์ที่ สกัดด้วยอะซีโตน.....	54
ผ-6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดภายในเซลล์ที่ สกัดด้วยเอทานอล 95%.....	55
ผ-7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดมะเขือเทศ ด้วยอะซีโตน.....	56
ผ-8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดมะเขือเทศด้วย เอทานอล 95%.....	56
ผ-9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดภายนอกเซลล์.....	57
ผ-10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดภายในเซลล์ที่ สกัดด้วยเฮกเซน.....	58
ผ-11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดภายในเซลล์ที่ สกัดด้วยอะซีโตน.....	59
ผ-12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดภายในเซลล์ที่ สกัดด้วยเอทานอล 95%.....	60
ผ-13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดมะเขือเทศ ด้วยอะซีโตน.....	61
ผ-14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดมะเขือเทศด้วย เอทานอล 95%.....	62
ผ-15 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอก เซลล์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	63
ผ-16 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอก เซลล์ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	65

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ผ-31 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมลอิสระของสารสกัด ภายในเซลล์ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วยเฮกเซน.....	95
ผ-32 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมลอิสระของสารสกัด เชื้อเหตที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วยอะซีโต.....	97
ผ-33 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมลอิสระของสารสกัด เชื้อเหตที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วยเอทานอล 95%.....	99
ผ-34 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมลอิสระของสารสกัด เชื้อเหตที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วยอะซีโตน.....	101
ผ-35 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมลอิสระของสารสกัด เชื้อเหตที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วยเอทานอล 95%.....	103

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 มะเชื้อเทศราชนี.....	3
2.2 มะเชื้อเทศสีดา.....	3
2.3 ลักษณะของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียเอนโดไฟต์	5
2.4 <i>Escherichia coli</i>	7
2.5 <i>Bacillus subtilis</i>	7
2.6 <i>S. aureus</i> แบบย้อมสีเทิจ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด.....	8
2.7 การย้อมติดสีแกรมของ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.8 Structures of common phenolic compounds.....	10
4.1 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต ที่ความเข้มข้น 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	31
4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกันที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	32
ผ-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	48
ผ-2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> จากสารสกัดมะเชื้อเทศฮอลแลนด์ (a), สารสกัดมะเชื้อเทศราชนี (b) และสารสกัดมะเชื้อเทศสีดา (c).....	105
ผ-3 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> จากสารสกัดมะเชื้อเทศฮอลแลนด์ (a), สารสกัดมะเชื้อเทศราชนี (b) และสารสกัดมะเชื้อเทศสีดา (c).....	105
ผ-4 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> จากสารสกัดมะเชื้อเทศฮอลแลนด์ (a), สารสกัดมะเชื้อเทศราชนี (b) และสารสกัดมะเชื้อเทศสีดา (c).....	106
ผ-5 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>P.aeruginosa</i> จากสารสกัดมะเชื้อเทศฮอลแลนด์ (a), สารสกัดมะเชื้อเทศราชนี (b) และสารสกัดมะเชื้อเทศสีดา (c).....	106
ผ-6 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> จากส่วนผสมสารสกัดมะเชื้อเทศฮอลแลนด์และราชนี (a), สารสกัดมะเชื้อเทศราชนีและสีดา (b), สารสกัดมะเชื้อเทศราชนี ฮอลแลนด์ และสีดา (c).....	107
ผ-7 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> จากส่วนผสมสารสกัดมะเชื้อเทศฮอลแลนด์และราชนี (a), สารสกัดมะเชื้อเทศราชนีและสีดา (b), สารสกัดมะเชื้อเทศราชนี ฮอลแลนด์ และสีดา (c).....	107

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ผ-8 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> จากส่วนผสมสารสกัดมะเขือเทศฮอลแลนด์และราซินี (a), สารสกัดมะเขือเทศราซินีและสีดา (b), สารสกัดมะเขือเทศราซินี ฮอลแลนด์ และสีดา (c).....	108
ผ-9 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>P. aeruginosa</i> จากส่วนผสมสารสกัดมะเขือเทศฮอลแลนด์และราซินี (a), สารสกัดมะเขือเทศราซินีและสีดา (b), สารสกัดมะเขือเทศ ราซินี ฮอลแลนด์ และสีดา (c).....	108
ผ-10 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> (a), <i>B. subtilis</i> (b), <i>S. aureus</i> (c) และ <i>P. aeruginosa</i> (d) ของตัวควบคุมเชิงลบ (Phosphate buffer).....	109
ผ-11 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> (a), <i>B. subtilis</i> (b), <i>S. aureus</i> (c) และ <i>P. aeruginosa</i> (d) ของตัวควบคุมเชิงบวก (Streptomycin).....	109
ผ-12 มะเขือเทศพันธุ์ฮอลแลนด์ พันธุ์สีดา และพันธุ์ราซินี.....	109

สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
TM	มะเขือเทศ
NA	อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar
PCA	อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar
%	เปอร์เซ็นต์
g	กรัม
μ g	ไมโครกรัม
ml	มิลลิลิตร
SE	Standard error
cm	เซนติเมตร

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

แบคทีเรียในธรรมชาติมีหลากหลายสายพันธุ์ อาจพบได้ในส่วนต่าง ๆ ของต้นพืช แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช พบว่าการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างสารเมตาบอไลต์ที่มีประโยชน์ทางการแพทย์ เกษษวิทยา การเกษตร และอุตสาหกรรมต่าง ๆ นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียอีกหลากหลายสายพันธุ์ที่สามารถต้านทานเชื้อก่อโรคในพืชได้ โดยแบคทีเรียเหล่านี้อาจจะมีสารที่กระตุ้นการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหรือยับยั้งศัตรูพืชทางอ้อม

งานวิจัยที่น่าสนใจศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่แยกได้จากมะเขือเทศ เนื่องจากมะเขือเทศเป็นผักและผลไม้ที่ปลูกกันอย่างแพร่หลาย เป็นแหล่งวิตามินเกลือแร่ และประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (Yi และคณะ, 2015 การศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์ในการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ สารสกัดจากมะเขือเทศในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่สำคัญอื่น ๆ ในผักและผลไม้

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดมะเขือเทศ
- 1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด
- 1.2.3 เพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากมะเขือเทศ

1.3 ขอบเขตโครงการ

- 1.3.1 คัดแยกแบคทีเรียและมะเขือเทศที่ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง
- 1.3.2 ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด
- 1.3.3 ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดมะเขือเทศ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 เป็นแนวทางในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากมะเขือเทศ
- 1.4.2 นำไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรม และอื่น ๆ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะเขือเทศ

มะเขือเทศ (ชื่อวิทยาศาสตร์: *Lycopersicon esculentum* Mill.) เป็นพืชที่ได้รับความนิยมในการบริโภค จัดอยู่ในตระกูล Solanaceae พืชในตระกูลนี้เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น มันฝรั่ง ยาสูบ และพริก พืชทั้งหมดในตระกูลนี้มีประมาณ 2,000 ชนิด ประเทศบริเวณอเมริกา ยุโรป และประเทศไทยนิยมบริโภคมะเทศมาก (นิรกรพันธุ์,2538)

2.1.1 ลักษณะของมะเขือเทศ

มะเขือเทศเป็นพืชล้มลุกอายุเพียง 1 ปี ลำต้นตั้งตรง มีลักษณะเป็นพุ่ม มีขนอ่อน ๆ ปกคลุม ใบเป็นใบประกอบ ออกสลับกัน ใบย่อยมีขนาดไม่เท่ากัน บางใบเล็กเรียวยาว บางใบกลมใหญ่ ปลายใบแหลม ขอบใบเป็นหยักลึกคล้ายฟันเลื่อยมีขนอ่อน ๆ ออกดอกเป็นช่อหรือดอกเดี่ยว บริเวณซอกใบ ดอกมีสีเหลือง มีกลีบเลี้ยงสีเขียวประมาณ 5-6 กลีบ ผลเป็นผลเดี่ยว มีขนาดรูปร่างและสีต่างกัน ซึ่งมีขนาดเล็กประมาณ 3 เซนติเมตร จนถึงใหญ่ประมาณ 10 เซนติเมตร รูปร่างมีทั้งกลมกลมแบน หรือกลมรี ผิวนอกกลีบเป็นมัน ผลดิบมีสีเขียว หรือเขียวอมเทา เมื่อสุกจะมีสีเหลือง สีส้ม หรือสีแดง เนื้อภายในฉ่ำด้วยน้ำมีรสเปรี้ยว เมล็ดมีเป็นจำนวนมาก ผลของมะเขือเทศจะฉ่ำน้ำมีรูปร่างและขนาดแตกต่างกันตามสายพันธุ์ มะเขือเทศมีหลายพันธุ์ เช่น พันธุ์สีดา พันธุ์ฮอลแลนด์ พันธุ์ราชินี พันธุ์โรมาเรดเพียร์ เป็นต้น (นิรกรพันธุ์,2538)

2.1.2 พันธุ์ของมะเขือเทศ

พันธุ์มะเขือเทศสามารถแบ่งออกได้ 2 ประเภทคือ แบ่งตามลักษณะการเจริญเติบโตของลำต้น และการเกิดช่อดอกและอีกประเภทหนึ่งคือ แบ่งการตามใช้ประโยชน์ ซึ่งการแบ่งแต่ละประเภทมีหลักเกณฑ์ดังต่อไปนี้คือ

การแบ่งพันธุ์มะเขือเทศตามลักษณะการเจริญเติบโตของลำต้น และการเกิดช่อดอก การแบ่งด้วยวิธีนี้สามารถแบ่งมะเขือเทศออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่คือ

พันธุ์พุ่ม หรือพันธุ์ไม่ทอดยอด (Determinate type) เป็นพันธุ์ซึ่งมีลำต้นลักษณะเป็นพุ่ม ช่อดอกเกิดได้ทุก 2 ข้อของลำต้น และส่วนปลายจะกลายเป็นช่อดอกแทน และมีมะเขือเทศพันธุ์นี้ส่วนมากจะออกดอกในเวลาใกล้เคียงกัน ดังนั้นการเก็บเกี่ยวจึงทำได้สะดวก คือสามารถเก็บได้พร้อมกันตัวอย่างมะเขือเทศพันธุ์พุ่ม

พันธุ์เลื้อยหรือพันธุ์ทอดยอด (Indeterminate type) เป็นพันธุ์ที่มีลำต้นเลื้อย ไม่มีดอกที่ปลายยอด ตามปกติต้นจะทอดยอดออกไปเรื่อย ๆ นอกจากในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเท่านั้นยอดจะชะงักการเจริญเติบโต ช่อดอกเกิดทุก ๆ 3 ข้อ การปลูกมะเขือเทศพันธุ์นี้ต้องทำค้ำโดยใช้ไม้ปักหรือเชือกพลาสติกขึงเพื่อค้ำเพื่อช่วยให้ผลมีคุณภาพดีขึ้น ไม่เปื้อนดิน ไม่ถูกทำลายจาก

ความชื้น โรคและแมลงในดินแต่ในบางแห่งที่มีค่าจ้างแรงงานสูง และต้องลงทุนสูงในการทำค้างที่ปล่อยให้เลื้อยไปตามดิน โดยไม่ทำค้างแต่ใช้วัสดุคลุมดินแทน เช่น ฟางข้าวเพื่อป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นกับผลของมะเขือเทศ ปรากฏว่าใช้ได้ผลดีเช่นกันตัวอย่างมะเขือเทศพันธุ์เลื้อยได้แก่ พันธุ์สีดา ฟลอราเทลและอื่น ๆ (นิรกรพันธุ์,2538)

2.1.3 มะเขือเทศราชินี

มะเขือเทศราชินี เป็นมะเขือเทศที่ผลเล็ก รสชาติหวาน เนื้อแน่นมีกลิ่นหอม และมีสารบีตา-แคโรทีน วิตามินซี และวิตามินอีสูง นอกจากนี้ในมะเขือเทศราชินีจะเป็นแหล่งไลโคปีนแล้ว ในมะเขือเทศราชินียังมีสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ที่จะช่วยป้องกันโรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือดได้เป็นอย่างดีซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย



รูปที่ 2.1 มะเขือเทศราชินี

ที่มา : <https://th.wikipedia.org/wiki/มะเขือเทศราชินี>

2.1.4 มะเขือเทศสีดา

มะเขือเทศสีดา ปลูกได้ตลอดปีแต่ให้ผลดกในช่วงฤดูหนาว โดยระยะเวลาการเก็บเกี่ยวประมาณ 70-90 วัน มีคุณค่าทางโภชนาการคือ มีวิตามินเอ วิตามินซี โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียม นอกจากนี้ยังมีสารไลโคปีนที่ช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์ในร่างกาย



รูปที่ 2.2 มะเขือเทศสีดา

ที่มา : <https://www.srscorporation.net/content/5990/มะเขือเทศสีดา>

2.1.5 ประโยชน์ของมะเขือเทศ

ช่วยบำรุงผิวพรรณให้ชุ่มชื้นสดใส ไม่แห้งกร้าน มีสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยลดและชะลอการเกิดริ้วรอยแห่งวัย น้ำมะเขือเทศช่วยเพิ่มความสดชื่นให้แก่ร่างกาย ช่วยเสริมคุ้มกันของร่างกายให้แข็งแรง มีวิตามินเอซึ่งมีส่วนช่วยบำรุงสายตา มะเขือเทศ มีบีตาแคโรทีน และฟอสฟอรัสในปริมาณมาก มะเขือเทศช่วยในการรักษาสิว ด้วยการนำน้ำมะเขือเทศมาพอกผิวหนัง หรือผ่านบาง ๆ แล้วนำมาแปะหน้าก็ได้ ช่วยทำให้ผิวหนังเต่งตึงสดใส ด้วยการนำน้ำมะเขือเทศมาพอกผิวหนัง หรือผ่านบาง ๆ แล้วนำมาแปะหน้าก็ได้ มะเขือเทศใช้น้ำมาทำเป็นน้ำผลไม้ โดยน้ำผลไม้ที่ขึ้นชื่อก็คือ น้ำมะเขือเทศคอกเทล เป็นที่นิยมนำมาทำเป็นอาหารได้หลายเมนู เช่น ข้าวผัด ซุป ยำต่าง ๆ เป็นต้น ช่วยโหรงกายสามารถต่อสู้กับโรคหอบหืดได้มากถึง 45% ช่วยป้องกันโรคมองเสื่อม หรืออัลไซเมอร์ ช่วยรักษาโรคตับอักเสบ โรคเลือดออกตามไรฟัน ช่วยป้องกันการแข็งตัวของหลอดเลือด มะเขือเทศมีฤทธิ์ในการช่วยขับปัสสาวะ ช่วยรักษาโรคความดันโลหิตสูง ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจ ช่วยลดความเสี่ยงจากการเกิดภาวะเส้นเลือดตีบ การเกิดโรคหัวใจวาย สำหรับผู้ที่สูบบุหรี่เป็นประจำ ช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจขาดเลือด ช่วยในระบบย่อยในกระเพาะอาหารและช่วยในการขับถ่าย อุจจาระได้สะดวก ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา หรือเชื้อราที่ปาก ช่วยลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ ช่วยลดความเสี่ยงจากโรคมะเร็งต่อมลูกหมากในเพศชายได้ถึง 45% หากรับประทานมะเขือเทศเป็นประจำ ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งรังไข่ ในเพศหญิง (นิรกรพันธุ์, 2538)

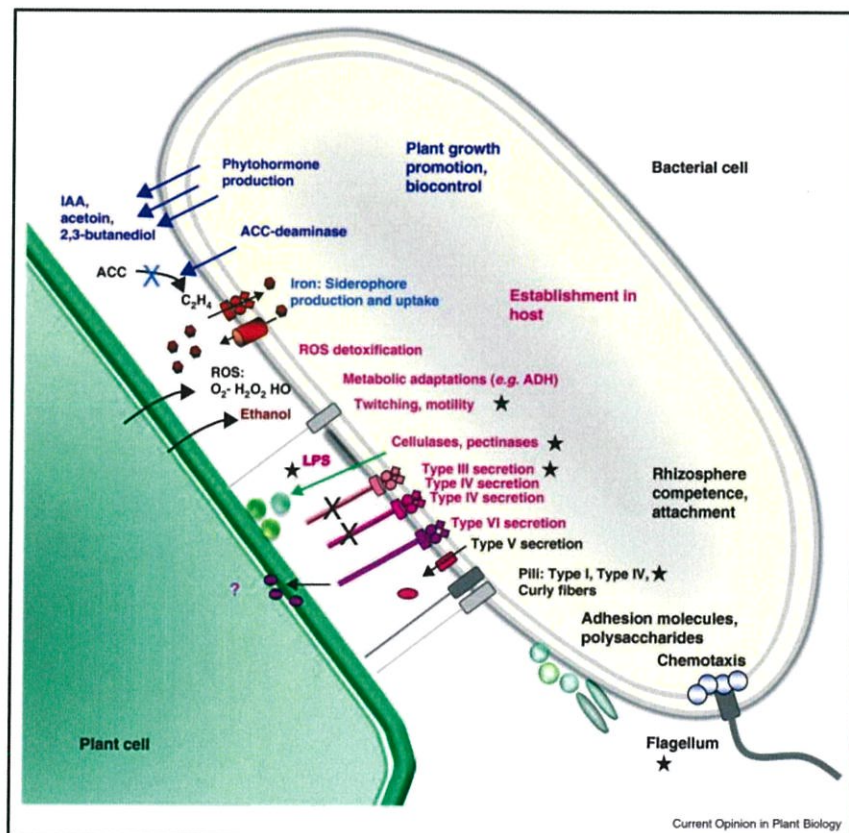
2.2 แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในพืช

จุลินทรีย์ที่อาศัยในเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโฮสต์โดยไม่ทำอันตรายหรือส่งผลเสียต่อ โฮสต์นั้นสามารถพบได้ทุกส่วนของพืชทุกวงศ์ทั่วโลก เป็นได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา การอยู่ร่วมกัน ของเอนโดไฟต์และต้นพืชจะช่วยให้ทั้งพืชและเอนโดไฟต์ได้ประโยชน์ร่วมกัน โดยพืชให้สารอาหารกับเอนโดไฟต์ใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนเอนโดไฟต์ช่วยปกป้องพืชจากจุลินทรีย์ก่อโรค ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุ และอาหาร ช่วยการเจริญเติบโต และทำให้พืชทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปได้ดีขึ้น (Martinez-Klimov et al., 2017) ดังนั้นจึงทำให้เชื่อว่าต้นพืชที่มีเอนโดไฟต์อยู่จะเจริญเติบโต และแข็งแรงกว่าต้นพืชที่ไม่มีเอนโดไฟต์ จากสารที่เอนโดไฟต์สร้างขึ้นซึ่งเรียกว่า สารทุติยภูมิ เป็นสารที่สามารถนำมาใช้ในทางเภสัชกรรม การแพทย์ รวมทั้งอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม ตัวอย่างสารที่เอนโดไฟต์สร้างขึ้นได้และมีประโยชน์ทางการแพทย์ ได้แก่ แพคลิแทกเซล (paclitaxel) ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งที่เรารู้จักซึ่งตั้งเดิมสกัดได้จากพืช สารต้านอนุมูลอิสระ สารกตภูมิคุ้มกัน สารที่มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด สารต้านไวรัส รา และแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เป็นต้น (Sun et al., 2014; Jia et al., 2016; Martinez-Klimova et al., 2017) จึงทำให้เอนโดไฟต์ เป็นแหล่งสำคัญทางธรรมชาติแหล่งหนึ่งที่นักวิจัยให้ความสนใจในค้นหาสารออกฤทธิ์ต่าง ๆ รวมทั้งสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Porrás-Alfaro and Bayman, 2011; Mousa and Raizada, 2013) ซึ่งปัจจุบันปัญหาเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ

เป็นปัญหาระดับโลกที่มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ รวมทั้งในประเทศไทย ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมหาศาล (สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข, 2555)

2.2.1 เอนโดไฟต์ที่เป็นแบคทีเรีย

เอนโดไฟติก แบคทีเรีย (endophytic bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้ชีวิตทั้งหมดหรือบางช่วงอยู่ในเนื้อเยื่อพืชแล้วให้ประโยชน์แก่พืชอาศัย โดยไม่ทำอันตรายหรือก่อให้เกิดโรคแก่พืช แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชที่มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับพืชและได้รับประโยชน์ ในแง่มีการแข่งขัน แย่งแหล่งคาร์บอนหรืออาหารน้อย และพืชอาศัยช่วยป้องกันสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ให้แก่แบคทีเรีย (Reinhold-Hurek and Hurek, 1998) ในปัจจุบันมีการศึกษาเอนโดไฟติกแบคทีเรียในพืช โดยใช้วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล พบว่ามีความหลากหลายทางสปีชีส์ของเอนโดไฟติกแบคทีเรียในพืช และยังพบว่าเอนโดไฟติกแบคทีเรียช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและผลผลิตที่ยั่งยืน จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ละลายฟอสเฟต และช่วยหาไนโตรเจนในรูปที่เป็นประโยชน์ให้กับพืช (assimilable nitrogen) (de Matos Nogueira et al., 2001) ตัวอย่าง เอนโดไฟติกแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในการให้ไนโตรเจน แก่พืช ได้แก่ *Serratia marcescens* อาศัยอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ (Jame et al., 2000; Ladha et al., 1995)



รูปที่ 2.3 ลักษณะของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียเอนโดไฟต์ (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011)

2.2.2 ราเอนโดไฟต์

เชื้อราเอนโดไฟต์ คือ เชื้อราที่ช่วงหนึ่งของ ชีวิตหรือตลอดชีวิตสามารถอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชได้ ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์ต่อพืชอาศัยแบบพึ่งพาอาศัย ซึ่งกันและกัน (mutualism) แบบภาวะเป็นกลาง (neutralism) และแบบปรสิต (parasitism) (Rodriguez et al., 2008) บทความนี้ให้นิยามของเชื้อราเอนโดไฟต์ ในแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน โดยเชื้อราได้รับ สารอาหารจากพืช และพืชได้รับประโยชน์จากเชื้อรา คือ เพิ่มศักยภาพในการต้านทานต่อสภาพความเครียด ทั้งที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต รวมถึงการส่งเสริม การเจริญเติบโต อย่างไรก็ตาม เชื้อราเอนโดไฟต์ อาจมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ในพืชชนิดหนึ่ง แต่เป็นปรสิตต่อพืชอีกชนิดหนึ่งได้ เช่น เชื้อรา *Colletotrichum magna Jenkins and Winstead* ดำรงชีพแบบปรสิตในพืชวงศ์แตง ซึ่งทำให้เกิด โรคแอนแทรกโนส (anthracnose) ในขณะที่ดำรงชีพ แบบเอนโดไฟต์ในมะเขือเทศ โดยไม่ทำให้มะเขือเทศ เกิดโรค เป็นต้น (Rodriguez et al., 2008) ดังนั้น การใช้เชื้อราเอนโดไฟต์เพื่อควบคุมโรคพืชจึงจำเป็นต้องพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของชนิดเชื้อรา และพืชเป้าหมาย

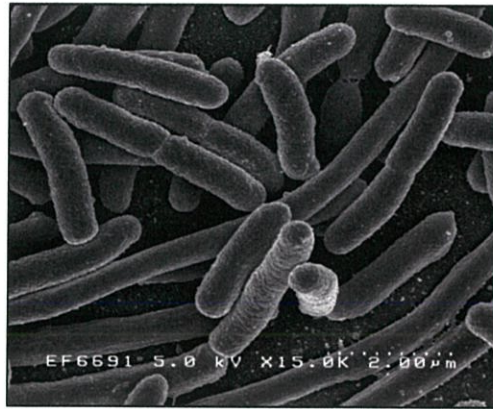
เชื้อราเอนโดไฟต์ยังมีคุณสมบัติเด่น คือ การดำรงชีพอยู่ในเนื้อเยื่อพืชได้เป็นระยะเวลานาน เช่น เชื้อราเอนโดไฟต์ *H. chaetospira* อาศัยอยู่ในราก ของผักกาดขาวปลีได้อย่างน้อย 32 วัน และยังคง กระตุ้นให้พืชมีความต้านทานต่อโรคใบจุดที่เกิดจาก เชื้อแบคทีเรีย *P. syringae pv. maculicola* และเชื้อรา *A. brassicae* ได้ (Morita et al., 2003) ซึ่งการที่เชื้อรา เอนโดไฟต์เจริญอยู่ในพืชอาศัยได้เป็นระยะเวลานาน และยังคงมีการแสดงออกของการควบคุมโรค ทำให้ สามารถลดต้นทุนการผลิตพืช ด้วยการลดความถี่ ในการใช้เชื้อราเอนโดไฟต์ได้

2.3 แบคทีเรียก่อโรค

แบคทีเรียก่อโรคมายังถึงกลุ่มหนึ่งของแบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้ แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ และบางชนิดยังเป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ด้วย แต่แบคทีเรียบางชนิดก็ทำให้เกิดโรคได้

2.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli หรือเรียกโดยย่อว่า *E. coli* (อี. โคลิ) เป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม เป็นตัวชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ มีอยู่ตามธรรมชาติในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์ แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดอาการท้องเสียบ่อยที่สุด ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ทำให้ถ่ายอุจจาระเหลว หรือเป็นน้ำ แต่อาการมักไม่รุนแรง เพราะทั้งเด็ก และผู้ใหญ่มักมีภูมิคุ้มกันอยู่บ้างแล้ว เนื่องจาก ได้รับเชื้อนี้เข้าไปทีละน้อยอยู่เรื่อย ๆ เชื้อนี้มักปนเปื้อนมากับอาหาร น้ำ หรือ มือของผู้ประกอบอาหาร ปกติเชื้อเหล่านี้อาจพบในอุจจาระได้อยู่แล้วแม้จะไม่มีอาการอะไร มีลักษณะเป็นรูปท่อน ติดสีแดง เป็นแกรมลบ และเป็น Facultative aerobe

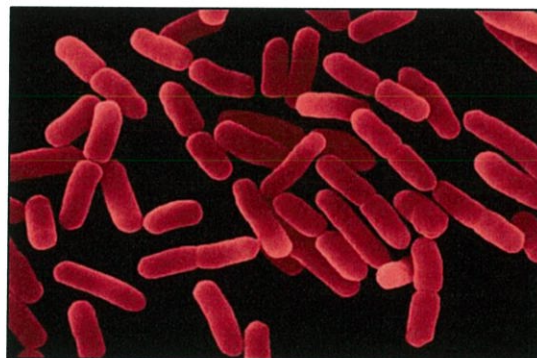


รูปที่ 2.4 *Escherichia coli*

ที่มา : https://th.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli

2.3.2 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรีย (bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ย้อมติดสีแกรมบวก (gram positive bacteria) อยู่ในวงศ์ Bacillaceae สามารถสร้างแคปซูล (capsule) สร้างสปอร์ (bacterial spore) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดี แหล่งที่อยู่อาศัยพบได้ทั่วไปในดิน เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้เพื่อควบคุมและป้องกันโรคพืชจากแบคทีเรียชนิดอื่นได้หลายชนิด เช่น *Erwinia sp.*, *Alternaria sp.* และเชื้อรา (mold) เช่น *Fusarium* เป็นต้น



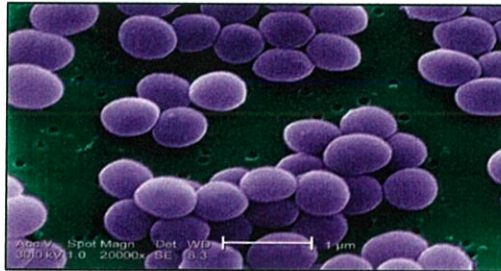
รูปที่ 2.5 *Bacillus subtilis*

ที่มา : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/6203/bacillus-subtilis>

2.3.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียชนิด facultative anaerobic แกรมบวก รูปร่างกลม เป็นแบคทีเรียก่อโรคชนิดหนึ่ง เมื่อ *S. aureus* ปนเปื้อนลงไปในอาหาร จะสร้าง

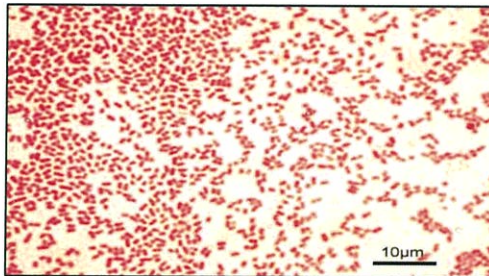
สารพิษที่เรียกว่าเอนเทอโรทอกซินซึ่งแบ่งออกเป็น 8 ชนิด ได้แก่ ชนิด A, B, C1, C2, C3, D, E และ H สารพิษนี้ทนต่อความร้อนได้ดีมาก ทำให้ผู้บริโภคเกิดอาหารเป็นพิษ หลังจากรับประทานอาหารที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนเข้าไปประมาณ 1-6 ชั่วโมง



รูปที่ 2.6 *S. aureus* แบบย้อมสีเทีจ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด
ที่มา : https://th.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus

2.3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง aerobic เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Pseudomonadaceae สามารถเคลื่อนที่ได้โดย flagellum 1 เส้นที่ติดอยู่ตรงหัวปกติจะพบกระจายในดิน น้ำ ขยะ หรือในพืช และเป็น normal flora ในลำไส้คน สามารถทำให้เกิดโรคได้ รวมทั้งสัตว์ แมลงและต้นไม้



รูปที่ 2.7 การย้อมติดสีแกรมของ *Pseudomonas aeruginosa*
ที่มา : https://th.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือโมเลกุลของสารที่สามารถจับกับตัวรับและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลสารอื่นๆได้ ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังตัวออกซิไดซ์ ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งสารอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่และทำลายเซลล์ของ

ร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้ายุติปฏิกิริยาถูกโอซิเหล่านี้ด้วยการเข้าจับกับสารอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงถือเป็นตัวรีดิวซ์ อาทิ ไธออล กรดแอสคอร์บิก และโพลีฟีนอล

แม้ว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นสิ่งสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต หากแต่ก็ยังเกิดโทษเช่นกัน ดังนั้นพืชและสัตว์จึงรักษาสมดุลด้วยระบบอันซับซ้อนของปฏิกิริยาโดยสารต้านอนุมูลอิสระดังเช่น กลูตาไธโอน วิตามินซี และวิตามินอี เช่นเดียวกับเอนไซม์อย่างตัวเร่งปฏิกิริยาและเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ รวมถึงเพอรอกซิเดสต่างๆ ระดับสารต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำหรือเอนไซม์ที่ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มากเกินไป จะยังผลให้เกิดภาวะออกซิเดชันที่มากเกินไป (oxidative stress) นำมาซึ่งการทำลายหรือสร้างความเสียหายแก่เซลล์ได้

2.4.1 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ

สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ primary หรือ natural antioxidants และ secondary หรือsynthetic antioxidants

1. primary or natural antioxidants เป็นกลุ่มที่ทำหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาถูกโอซิโดยไปทำปฏิกิริยากับอนุมูลของไขมัน ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเสถียร สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้จะมีฟีนอลิก (phenolic) เป็นโครงสร้างหลัก (Hurrell, 2003) ซึ่งได้แก่

1.1 antioxidants minerals ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์ที่ต้านการออกซิเดชัน โดยพบว่าไม่ส่งผลกระทบต่อโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น คาร์โบไฮเดรต ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้ได้แก่ selenium, copper, iron, zinc และ manganese

1.2 antioxidants vitamins มีความจำเป็นต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายประกอบด้วย วิตามินซี วิตามินอี และวิตามินบี

1.3 phytochemicals เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่ไม่ใช่ทั้งวิตามินและแร่ธาตุ

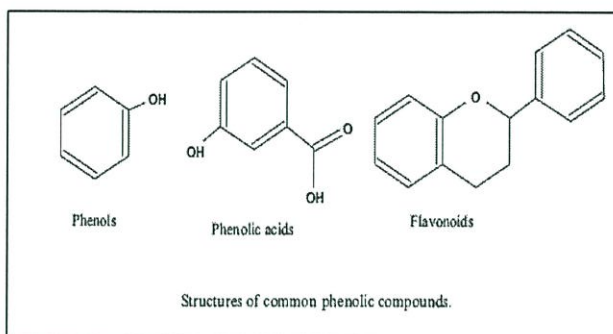
2. secondary or synthetic antioxidants เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่ทำหน้าที่จับกับอนุมูลอิสระและหยุดปฏิกิริยาถูกโอซิ สารเหล่านี้ประกอบด้วย Butylated hydroxyl anisole (BHA) Butylated hydroxytoluene (BHT) Propyl gallate (PG) metal chelating agent (EDTA) Tertiary butyl hydroquinone (TBHQ) และ Nordihydro guaretic acid (NDGA)

2.5 สารประกอบฟีนอล

สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) หรือสารประกอบฟีนอล เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดธัญพืช ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในการเจริญเติบโต สารประกอบฟีนอล มีโภชนาเภสัช ซึ่งสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพคือ มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สามารถละลายได้ในน้ำ

2.5.1 โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล

สารประกอบฟีนอล มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวน ที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซิน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ต่ออยู่ สารประกอบฟีนอลพื้นฐาน คือ สารฟีนอล (phenol) ในโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซิน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่



รูปที่ 2.8 Structures of common phenolic compounds

ที่มา : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenolic-compound>

2.5.2 แหล่งที่พบ

สารประกอบฟีนอล พบอยู่ในส่วนของช่องว่างภายในเซลล์ (cell vacuole) ในส่วนต่างๆ ของพืช เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในกระบวนการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของพืชแต่ละชนิด

2.5.3 สรรพคุณของสารประกอบฟีนอล

ประโยชน์ต่อสุขภาพ สารประกอบฟีนอลหลายชนิดมีฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันและเป็นสารต้านการกลายพันธุ์ (antimutagens) มีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพ สามารถป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง โดยสารประกอบฟีนอล จะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ (free radical) และไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ โดยใช้ตัวเองเป็นตัวรับอนุมูลอิสระ (free radical) ทำให้ยับยั้งปฏิกิริยาถูกโซ่ที่มีอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุ แต่สารต้านอนุมูลอิสระจะถูกทำลาย

2.6 สารสกัดจากมะเขือเทศ

ปัจจุบันยาด้านจุลชีพที่สังเคราะห์ขึ้นก่อให้เกิดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์แก่ผู้ป่วยที่ได้รับยา และพฤติกรรมการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสมส่งผลให้เชื้อก่อโรคหลายชนิดมีแนวโน้มดื้อยาเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โรคติดต่อจากเชื้อดื้อยาหลายชนิดจึงเป็นปัญหาทางการแพทย์ในการ

พัฒนาด้วยยาและแนวทางป้องกันการดื้อยาของเชื้อมากยิ่งขึ้น (Boucher et al., 2009) ปัจจุบันจึงมีการศึกษาผลของการต้านจุลชีพของสารสกัดที่ได้จากผักผลไม้และพืชสมุนไพร ซึ่งจะพบได้จำนวนมากและหลากหลายชนิดในประเทศไทยเพื่อประยุกต์ใช้แทนยาปฏิชีวนะโดยจะเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่ง (Selvamohan T et al., 2012) โดยเฉพาะผักผลไม้ที่มีวิตามินซีสูง และนิยมรับประทานสดหรือคั้นเป็นน้ำผลไม้ เช่น ฝรั่ง ส้ม องุ่น และเลมอน ซึ่งพบว่าวิตามินซีและสารไฟโตเคมิคอล เช่น สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอล สามารถออกฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ก่อโรคได้ (Oikeh El et al., 2016) สารสกัดจากมะเขือเทศ มีสารไลโคปีน (Lycopene) ที่มีสรรพคุณต้านอนุมูลอิสระ และช่วยในการป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์ มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา และแบคทีเรีย อุดมไปด้วยวิตามินเอ, วิตามินบี, วิตามินซี และวิตามินอี ที่มีคุณสมบัติช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้ผิว อีกทั้งยังป้องกันการเกิดริ้วรอยได้ด้วย มะเขือเทศมีกรดอ่อน ๆ ช่วยทำความสะอาดรูขุมขน ช่วยสมานผิวลดการเกิดสิว กระชับรูขุมขนให้ละเอียดและเล็กลง ลดริ้วรอยเหี่ยวย่นได้เป็นอย่างดี

ผลมะเขือเทศอุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการ ประกอบไปด้วยวิตามินและสารประกอบที่เป็นสารพฤกษเคมีหลายชนิดโดยเฉพาะวิตามินซีพบปริมาณ 12.7 มิลลิกรัมต่อผลมะเขือเทศสด 100 กรัม ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) มีการรายงานพบว่า วิตามินซีที่พบในผักผลไม้หลายชนิดมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบและมีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ 7 สารประกอบพฤกษเคมีที่สำคัญในมะเขือเทศคือกลุ่มของฟลาโวนอลที่พบได้ที่ผิวของผลมะเขือเทศ โดยเฉพาะไลโคปีนมีปริมาณ 2,573 ไมโครกรัมต่อผลมะเขือเทศสด 100 กรัม เป็นสารที่พบได้ ในมะเขือเทศมากกว่าผักผลไม้ชนิดอื่น

2.7 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) คือ สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง เช่น มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ของมะเร็งเต้านม มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค เป็นต้น และสารนั้นจะต้องไม่มีผลทางลบต่อร่างกาย หรือมีผลข้างเคียงน้อยมาก เพราะเมื่อสารนั้นถูกนำมาแปรรูปให้เป็นส่วนประกอบของยา ย่อมไม่ต้องการให้ยาามีผลกับส่วนที่ดีของร่างกาย ยกเว้น เชื้อโรค หรือส่วนเกิน (มะเร็ง) ที่เราต้องการขจัดเท่านั้น สารใดก็ตามถ้ามีผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการ เราก็จะจัดสารนั้นให้อยู่ในพวกสารพิษ (toxic substance)

ในการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จะต้องอาศัยเครื่องมือในการทดสอบฤทธิ์ และวิธีการการแยกสารให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาว่าองค์ประกอบใดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนั้นอาจยังต้องมีการปรับปรุงโครงสร้างของสารบางส่วนเพื่อให้สารนั้นมีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น ดังนั้นหน่วยปฏิบัติการวิจัยทรัพยากรธรรมชาติ (Bioresources Research Unit; BRU) และห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioassay Research Facility Laboratory) แห่งศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จึงได้ร่วมมือกันวิจัยเพื่อใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นแนวทางในการ

หาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ห้องปฏิบัติการฯ ทำการตรวจสอบอยู่ในปัจจุบันมีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (anti-malaria) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer) ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (anti-fungus) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และฤทธิ์ต้านวัณโรค (anti-tuberculosis)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Khiralla และคณะ (2015) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่ได้ จากราเอนโดไฟต์ที่สกัดได้จากพืชสมุนไพรทางยาใน วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย ปีที่ 11 ฉบับที่ 2 วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม 2560 โดยหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก ทั้งหมดทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric และหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical scavenging method จากการทำให้หลอดทดลอง พบว่า ราเอนโดไฟต์ ที่คัดแยกได้ 21 ไอโซเลต ราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม *Aspergillus sp.* จากเมล็ดลูกชืด (*Trigonella foenum-graecum seeds*) ให้สารฟีนอลิกปริมาณมากที่สุด 89.9 ± 7.1 มิลลิกรัมเทียบเท่ากับกรดแกลลิกต่อกรัม (GAE/g) และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่าความเข้มข้นที่สารมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ที่ 50% (Inhibitory Concentration-IC50) เท่ากับ 18.0 ± 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นิรมล และคณะ (2560) ทดสอบความไวของเชื้อต่อสารสกัดผลมะเขือเทศ ด้วยวิธี Broth Tube Dilution โดยเจือจางสารสกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เต็มเชื้อที่มีความเข้มข้นมาตรฐานลงในหลอดที่ความเข้มข้นของสารสกัดต่าง ๆ บ่มเชื้อข้ามคืน อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งความขุ่นในการเจริญของเชื้อ แสดงเป็นค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration) ผลการศึกษา พบว่าสารสกัดผลมะเขือเทศราซินีและผลมะเขือเทศสีดาด้วยน้ำปราศจากเชื้อแสดงฤทธิ์ยับยั้ง *S. pyogenes* ได้ใกล้เคียงกัน มีค่า MIC เท่ากับ 25 และ 22.5 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดผลมะเขือเทศสีดาด้วยเอทานอลยับยั้ง *S. pyogenes* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 0.3 กรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *C. tropicalis* โดย มีค่า MIC เท่ากับ 0.6, 0.7 และ 0.83 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดมะเขือเทศราซินีด้วยเอทานอลแสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง *P. aeruginosa* และ *S. pyogenes* มีค่า MIC เท่ากับ 0.6 และ 0.7 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ประสิทธิภาพในการสกัดผลมะเขือเทศสุกสดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งจุลชีพก่อโรคที่สำคัญบางชนิดได้ดีและหลากหลายกว่าการสกัดด้วยน้ำ

Yu และคณะ (2010) ได้ศึกษาเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากมะเขือเทศพบว่ามีสารต้านเชื้อรา *Alternaria solani* ได้ เซลล์เจริญได้ดีที่สุดที่สภาวะ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างมีค่าประมาณ 7 โดยใช้อัตราส่วนการเติมหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 2 อาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องมีองค์ประกอบของสารสกัดจากยีสต์ประมาณ 12 กรัมต่อลิตร และ CaCl_2 ปริมาณ 7 กรัมต่อลิตร

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุ

1. มะเขือเทศพันธุ์ฮอลแลนด์
2. มะเขือเทศพันธุ์สีดา
3. มะเขือเทศพันธุ์ราชินี

3.1.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. เอทานอลความเข้มข้น 95% (RCI-Labscan, Thailand)
2. อะซีโตน (RCI-Labscan, Thailand)
3. เฮกเซน (RCI-Labscan, Thailand)
4. กรดแอสคอร์บิก (Fisher Chemical, UK)
5. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, USA)
6. Folin-Ciocalteu phenol reagent (Sigma-Aldrich, USA)
7. กรดแกลลิก (SRL, India)
8. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (Ajax Finechem, USA)
9. สีย้อมคริสตัลไวโอเลต
10. สีย้อมซาฟรานิน
11. สารละลายแกรมไอโอดีน
12. อาหารเลี้ยงเชื้อ Production medium (ภาคผนวก ก)
13. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (ภาคผนวก ก)
14. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (ภาคผนวก ก)
15. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ก)

3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องอัลตราโซนิก (Crest, New York)
2. ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, Germany)
3. เครื่องเขย่า (Oskon, U.S.A)
4. ตู้อบลมร้อน (ConthermThermotec2000, Germany)
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (TOMY รุ่น ES-315, Japan)
6. ตู้เขี่ยเชื้อ (Holten Lamina, Denmark)
7. เครื่องเหวี่ยงแยก (Falcon 6/300, U.K)
8. เครื่องระเหยสารแบบหมุน (Heidoph, Germany)

9. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Unico รุ่น UV-2800A, USA)
10. ฟลาสก์รูปخمพู่ (SCHOTT, Germany)
11. ปีกเกอร์ (SCHOTT, Germany)
12. กระจกตวง
13. จานเพาะเชื้อ
14. 96-well plate (Thermofisher, USA)
15. ออโต้ปีเปต (Witeg, Germany)
16. สไลด์ (Pearl, China)
17. เครื่องชั่ง (Sartorius, Germany)
18. ข้อนตักสาร
19. แ่งแก้วคนสาร
20. ลวดเขี่ยเชื้อ
21. ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.4 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษาเป็นเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากผลมะเขือเทศสีดาโดยนักศึกษาศาสนาบัณฑิตเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังจำนวนทั้งหมด 6 ไอโซเลต

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การถ่ายเชื้อแบคทีเรียจากหัวเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

3.2.1.1 นำลวดเขี่ยเชื้อเผาไฟให้ปลายลวดร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อ รอให้เย็นแตะโคโลนีของเชื้อที่คัดเลือกได้ลากลงบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) ด้วยวิธีการ Cross streak plate

3.2.1.2 นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.1.3 นำเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วเก็บรักษาด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 20 แล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดสอบต่อไป

3.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย

3.2.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหาร NA โดยการ cross streak ลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะสี รูปร่าง ขอบ ขนาด และผิวหน้าของโคโลนี

3.2.2.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธีการย้อมแกรม (Gram's stain) ตามวิธีการดังนี้

1. ทำความสะอาดสไลด์ให้ปราศจากไขมัน ทดสอบว่าสไลด์นั้นไม่มีไขมันติดอยู่ โดยการหยดน้ำลงบนสไลด์ น้ำจะแผ่กระจาย
2. ใช้ลวดเย็บเย็บจุ่มน้ำและแตะลงบนสไลด์ 1-2 ลูบ และใช้ลูปที่เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้ออื่นแล้วเย็บเย็บที่เจริญบนอาหารแข็งให้ติดลวดเย็บเย็บเล็กน้อย แตะเชื้อลงบนหยดน้ำสเมียร์ให้เชื้อกระจายเป็นวงเล็ก ๆ ทั้งรอยสเมียร์ให้แห้งและตรึงเซลล์ด้วยการผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง
3. หยดสีกคริสตัลไวโอเลตลงบนรอยสเมียร์ให้ท่วม ทั้งไว้นาน 1 นาที
4. เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ทิ้งและชะด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์ทิ้งไว้นาน 1 นาที
5. เทสารละลายไอโอดีนทิ้งและชะล้างด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา (ไม่ควรเกิน 20 วินาที) ล้างน้ำทันทีโดยให้น้ำผ่านเบาๆ
6. ชับด้วยกระดาษแล้วย้อมทับด้วยสีซาฟานินโอไฮดให้ท่วมรอยสเมียร์ ทั้งไว้นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างน้ำและทิ้งไว้ให้แห้ง
7. นำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.2.3 การเตรียมหัวเชื้อและการหมัก

3.2.3.1 นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากลงบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) ด้วยวิธีการ Cross streak plate เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว

3.2.3.2 เตรียมหัวเชื้อในอาหาร Nutrient broth (NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเย็นตัวลง ถ่ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวจากอาหาร Nutrient agar (NA) ลงไปหนึ่งโคโลนี นำไปบ่มในเครื่องเขย่า 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.3.3 เตรียมอาหาร Production medium ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเย็นตัวลง ดูดหัวเชื้อจากอาหาร Nutrient broth (NB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่า 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.2.3.4 นำหัวเชื้อที่เหลือจากอาหาร Nutrient broth (NB) ไปหาจำนวนเซลล์เริ่มต้น โดยนำมาทำการเจือจางแบบ Serial dilution ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-6} จากนั้น

เลือกความเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-4} ถึง 10^{-6} ไปเพาะเลี้ยงลงในอาหาร Nutrient agar (NA) ด้วยวิธีการ Spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนี

3.2.3.5 การเก็บเกี่ยวเชื้อ นำเชื้อที่ผ่านการหมักครบ 72 ชั่วโมง ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอนและส่วนใสออกจากกัน นำส่วนใสที่ได้เก็บในขวดฝาเกลียวปิดให้สนิทเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่เพื่อทำการทดสอบต่อไป

3.2.4 การสกัดสารจากแบคทีเรียและมะเขือเทศ

3.2.4.1 การสกัดสารจากแบคทีเรีย

1. นำตะกอนเซลล์ที่อบแล้วซึ่งน้ำหนัก จากนั้นนำมาบดทำให้ละเอียดและสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอล เฮกเซน และอะซีโตน ตามลำดับ สกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิค ครั้งละ 15 นาที สกัด 3 ครั้ง นำมาเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนใสเก็บในตู้เย็น

2. นำส่วนใสที่แยกได้จากข้อ 1 มาระเหยแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (evaporator)

3. เก็บสารสกัดที่ได้ใส่ขวดสีชา หุ้มด้วยฟอยล์เจาะรูให้ทั่วเพื่อให้ตัวทำละลายที่เหลือระเหยจนหมด นำไปชั่งหาน้ำหนักของสารสกัดที่ได้และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อทำการทดสอบในขั้นต่อไป

3.2.4.2 การสกัดสารจากมะเขือเทศ

1. นำมะเขือเทศมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวทำละลายลงไป ใช้แท่งแก้วคนสารบดเบาๆ ให้มะเขือเทศเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปวางลงในเครื่องอัลตราโซนิคที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารสกัดที่ได้มารองและเก็บไว้ในขวดฝาเกลียวปิดให้สนิท สกัด 3 ชั่วโมง แยกตัวทำละลายออกจากกากมะเขือเทศด้วยกรวยกรองบุชเนอร์

2. ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (evaporator)

3. เก็บสารสกัดที่ได้ใส่ขวดสีชา หุ้มด้วยฟอยล์เจาะรูให้ทั่วเพื่อให้ตัวทำละลายที่เหลือระเหยจนหมด นำไปชั่งหาน้ำหนักของสารสกัดที่ได้และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อทำการทดสอบในขั้นต่อไป

3.2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

นำสารสกัดภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่ดัดแปลงมาจาก Kalken และคณะ(2015) ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

3.2.5.1 เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร โดยปิเปตสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรที่หุ้มด้วยฟอยล์กันแสง

3.2.5.2 เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยมวลต่อปริมาตร โดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 3.75 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

3.2.5.3 สารสกัดภายนอกเซลล์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดแกลลิก 0.001 กรัม (1,000 ไมโครกรัม) แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2. เจือจางให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 20-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3.1)

3. ปิเปตสารสกัดภายนอกเซลล์ ปริมาตร 18.18 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate ปิเปตสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 90.91 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม

4. ปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 90.91 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ปิเปตน้ำกลั่น ปริมาตร 0.080 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที (ห่อเพลทด้วยฟอยล์กันแสง)

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ

6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีหน่วยเป็นไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

ตารางที่ 3.1 แสดงการเจือจางสารละลายมาตรฐานแกลลิกให้มีความเข้มข้นในช่วง 20-200 ไมโครกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	สารละลายกรดแกลลิก (ml)	เอทานอลเข้มข้น 95% (ml)
1,000	-	-
200	0.20	0.80
180	0.18	0.82
160	0.16	0.84
140	0.14	0.86
120	0.12	0.88
100	0.10	0.90
80	0.08	0.92
60	0.06	0.94
40	0.04	0.96
20	0.02	0.98
0	-	1

3.2.5.4 สารสกัดภายในเซลล์

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดแกลลิก 0.001 กรัม (1,000 ไมโครกรัม) แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารสกัดภายในเซลล์ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเอทานอล ปิเปตสารสกัดภายในเซลล์ ปริมาตร 18.18 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate

3. ปิเปตสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 90.91 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม

4. ปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 90.91 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม

5. ปิเปตน้ำกลั่น ปริมาตร 0.080 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที (ห่อเพลทด้วยฟอยล์กันแสง)

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีหน่วยเป็นไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

3.2.5.5 สารสกัดมะเขือเทศ

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดแกลลิก 0.001 กรัม (1,000 ไมโครกรัม) แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2. เจือจางให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 20-140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 3.2

3. เตรียมสารสกัดมะเขือเทศความเข้มข้น 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเอทานอล ปิเปตสารสกัดภายในเซลล์ ปริมาตร 18.18 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate

4. ปิเปตสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 90.91 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม

5. ปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 90.91 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม

6. ปิเปตน้ำกลั่น ปริมาตร 0.080 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที (ห่อเพลทด้วยฟอยล์กันแสง)

7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ

8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีหน่วยเป็นไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

3.2.6 การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical)

นำสารสกัดภายนอกและภายในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตมาทำการประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยดูความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดัดแปลงมาจาก Pieniz และคณะ (2015) มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

3.2.6.1 เตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสาร DPPH มา 0.0059 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรที่หุ้มฟอยล์กันแสง

3.2.6.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดแอสคอร์บิก 0.001 กรัม (1,000 ไมโครกรัม) แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร (โดยเป็นสารมาตรฐานที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ)

3.2.6.3 สารสกัดภายนอกเซลล์

1. เตรียมสารละลายสารสกัดภายนอกเซลล์ ความเข้มข้น 200 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทานอล
2. ปิเปตสารสกัดภายนอกเซลล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน 96-well plate
3. ปิเปตสารละลาย DPPH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที (ห่อเพลทด้วยฟอยล์กันแสง)
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% Inhibition)

3.2.6.4 สารสกัดภายในเซลล์

1. เตรียมสารละลายสารสกัดภายในเซลล์ ความเข้มข้น 200 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทานอล
2. ปิเปตสารสกัดภายในเซลล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน 96-well plate
3. ปิเปตสารละลาย DPPH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาที (ห่อเพลทด้วยฟอยล์กันแสง)
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% Inhibition)

3.2.6.5 สารสกัดมะเขือเทศ

1. เตรียมสารละลายสารสกัดมะเขือเทศ ความเข้มข้น 200 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทานอล
2. ปิเปตสารสกัดภายในเซลล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน 96-well plate
3. ปิเปตสารละลาย DPPH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที (ห่อเพลทด้วยฟอยล์กันแสง)
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% Inhibition)

$$\% \text{ Inhibition} = [A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}] \times 100$$

กำหนดให้ A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของสารละลาย DPPH
 A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของสารละลาย DPPH
 กับสารสกัด

3.2.7 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากมะเขือเทศ

วิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุดคือ Disc diffusion method โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Kirby-Bauer โดยเป็นที่ยอมรับขององค์การอาหารและยา มีวิธีการดังนี้

3.2.7.1 นำเชื้อเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากลงบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) ด้วยวิธีการ Cross streak plate เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.7.2 นำเชื้อที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวมาปรับความขุ่นใน Normal saline solution ให้ขุ่นเท่ากับ McFarland standard No.0.5

3.2.7.3 เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 8.0

3.2.7.4 เตรียมยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.7.5 เตรียมตัวอย่างสารสกัดจากมะเขือเทศแต่ละชนิดความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.7.6 เตรียมตัวอย่างสารสกัดผสมฤทธิ์ของมะเขือเทศความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.7.7 ใช้สำลีพันไม้ที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่ปรับความขุ่น ป้ายให้ทั่วผิวหน้าจานเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar plate (MHA) แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นใช้คีมที่ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกระดาษกรอง antibiotic assay discs (AA discs) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาวางบนผิวหน้า MHA หยดสารสกัดมะเขือเทศ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงไปและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อที่ทำการทดสอบไปบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 20 ชั่วโมง

กรณีเป็นแบล็ก (ตัวควบคุม) จะใช้สำลีพันไม้ที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่ปรับความขุ่น ป้ายให้ทั่วผิวหน้าจานเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar plate (MHA) แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นใช้คีมที่ปราศจากเชื้อคีบแผ่นวางแผ่นกระดาษกรอง AA discs ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาวางบนผิวหน้า MHA หยดสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 8 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

กรณีใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารมาตรฐานจะใช้สำลีพันไม้ที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่ปรับความชุ่มชื้น ป้ายให้ทั่วผิวหน้าจานเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar plate (MHA) แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นใช้คีมที่ปราศจากเชื้อคีบแผ่นวางแผนกระดาษกรอง AA discs ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาวางบนผิวหน้า MHA หยดยาปฏิชีวนะสเตربتอมัยซิน ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

3.2.7.8 นำไปบ่มในตู้บ่มนาน 18 – 20 ชั่วโมง นำจานเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญอยู่โดยทั่วจานมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง (zone of inhibition) ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสรอบ AA discs

3.2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

โครงการานพิเศษนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete randomized design) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 17.0

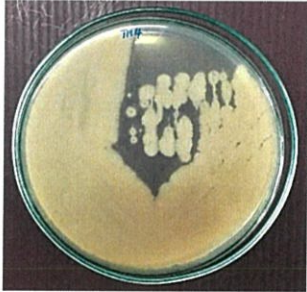
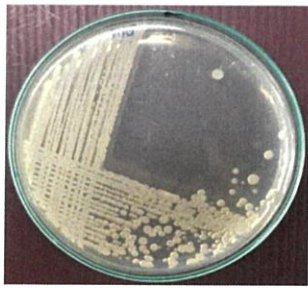

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

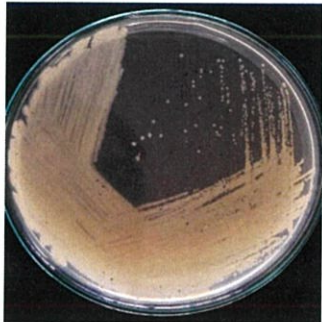
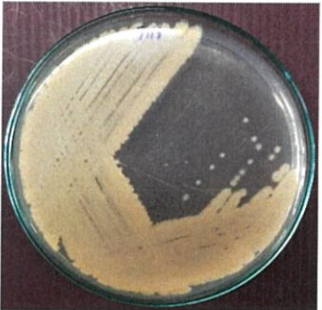

4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียและศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหาร Nutrient agar

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ สี ขนาด รูปร่าง การยกตัว ขอบ และผิวหน้าของโคโลนีบนอาหาร NA ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต โดยแสดงไว้ในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต

ไอโซเลต	รูปร่างโคโลนี	ลักษณะของโคโลนี				
		สี	รูปร่าง	การยกตัวของโคโลนี	ขอบ	ผิวหน้า
TM 4		ขาว ขุ่น	กลมยาว ขนาดใหญ่	โค้งนูนจาก ผิวหน้า อาหาร เล็กน้อย	เป็นรอย หยักไม่ สม่ำเสมอ	ผิวเรียบ มันวาว
TM 5		ขาว ขุ่น	กลม ขนาดใหญ่	โค้งนูนจาก ผิวหน้า อาหาร เล็กน้อย	เรียบ ไม่มีรอย หยัก	ผิวเรียบ มันวาว
TM 6		ขาว ขุ่น	กลมยาว ขนาดใหญ่	โค้งนูนจาก ผิวหน้า อาหาร เล็กน้อย	หยัก เล็กน้อย	ผิวเรียบ มันวาว

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต (ต่อ)

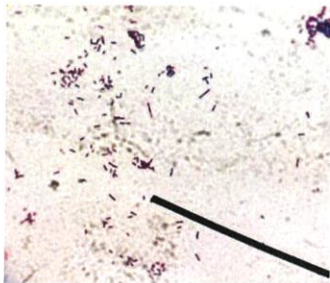
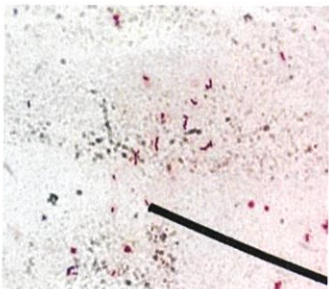
ไอโซเลต	รูปร่างโคโลนี	ลักษณะของโคโลนี				
		สี	รูปร่าง	การยกตัว ของโคโลนี	ขอบ	ผิวหน้า
TM 7		ขาว ขุ่น	กลม ขนาด เล็ก	โค้งนูนจาก ผิวหน้า อาหาร เล็กน้อย	ไม่มีรอย หยัก	ผิวเรียบ มันวาว
TM 8		ขาว ขุ่น	กลม ขนาด เล็ก	แบนราบ	เรียบไม่ มีรอย หยัก	ผิวเรียบ มันวาว
TM 9		ขาว ขุ่น	กลม ขนาด เล็ก	นูนเล็กน้อย	เรียบไม่ มีรอย หยัก	ผิวเรียบ มันวาว

4.2 ผลการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

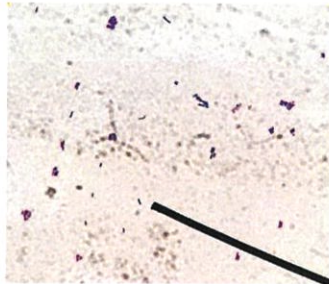
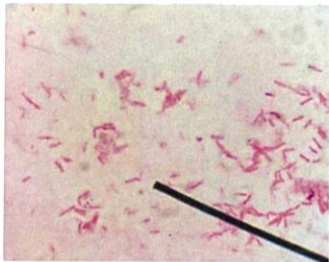
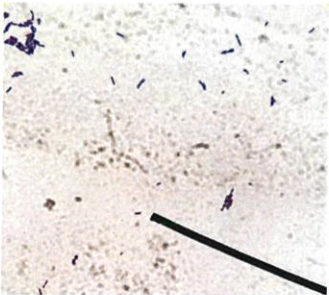
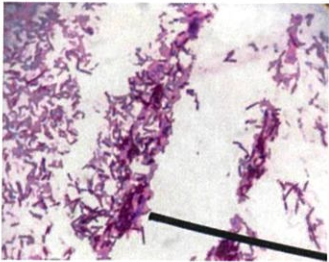
การย้อมสีแบบแกรมเป็นวิธีการเบื้องต้นในการจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ โดยการใช้สีย้อมสองชนิด สีย้อมชนิดแรกเรียกว่า Primary stain คือ คริสตัลไวโอเลต (crystal violet) มีสีม่วงหรือสีน้ำเงิน ส่วนสีที่สองเรียกว่า counter stain หรือ secondary stain คือ ซาฟรานินโอ (safranin o) มีสีแดงโดยการย้อมสีในขั้น

แรกสีคริสตัลไวโอเล็ตทุกเซลล์บนรอยสเมียร์จะติดสีม่วงหรือน้ำเงิน เนื่องจากบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังหนาจึงติดสีคริสตัลไวโอเล็ตได้ดีและเมื่อเติมสารละลายไอโอดีนลงไปจะรวมกับสีคริสตัลไวโอเล็ตกลายเป็นผลึกที่มีโครงสร้างซับซ้อน (crystal violetiodine complex) ทำให้ติดสีม่วงหรือน้ำเงินดียิ่งขึ้น ต่อมาเมื่อล้างเซลล์ด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% แบคทีเรียแกรมลบซึ่งผนังเซลล์ประกอบด้วยไขมันเป็นจำนวนมาก ไขมันจะละลายออกมาพร้อมกับแอลกอฮอล์ทำให้รูผนังเซลล์กว้างขึ้น ผลึกของสีจึงหลุดออกมากับผนังเซลล์ทำให้แบคทีเรียไม่ติดสี ส่วนแบคทีเรียที่มีไขมันในผนังเซลล์น้อยผลึกของคริสตัลไวโอเล็ตจะยังคงติดแน่นอยู่ ซึ่งต่อมาเมื่อย้อมทับด้วยสีซาฟรานินโอทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ไม่ติดสีเดิมจะติดสีแดง ในขั้นตอนนี้จึงเห็นความแตกต่างของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มได้อย่างชัดเจนจากการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต โดยวิธีการย้อมสีแบบแกรม ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ได้ผลการศึกษาดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ไอโซเลต	ลักษณะแบคทีเรีย	การติดสีแกรม	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
TM 4		แกรมบวก	รูปร่างเป็นท่อนยาว อยู่รวมกันเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย
TM 5		แกรมบวก	รูปร่างเป็นกลม อยู่รวมกันเป็นเซลล์เดี่ยวกระจัดกระจาย

ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (ต่อ)

ไอโซเลต	ลักษณะแบคทีเรีย	การติดสีแกรม	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
TM 6		แกรมบวก	รูปร่างเป็นกลม อยู่รวมกัน เป็นกลุ่มขนาดเล็ก
TM 7		แกรมลบ	รูปร่างเป็นท่อนยาว เรียงตัวกันเป็นกลุ่ม
TM 8		แกรมบวก	รูปร่างเป็นท่อนยาว อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และ เซลล์เดี่ยว
TM 9		แกรมบวก	รูปร่างเป็นท่อนยาว อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม

4.3 ผลการสกัดสารจากแบคทีเรียและมะเขือเทศ

4.3.1 การสกัดสารจากแบคทีเรีย

จากการศึกษาสภาวะในการหมักเพื่อสกัดสารจากแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร Production medium ในสภาวะการเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก และนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาอบจนมีน้ำหนักคงที่ ทำการสกัดสารโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน อะซีโตน และเอทานอล 95% โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารสกัดแบบหมุน เก็บสารสกัดในขวดสีชาที่หุ้มกระดาษอะลูมิเนียมเจาะรูด้านบน นำไปไว้ในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักสารสกัดที่ได้ จากการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต มีน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์สูงสุดเมื่อสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่เป็นอะซีโตน เอทานอล 95% และเฮกเซน ตามลำดับ โดยแสดงผลน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์แบคทีเรีย (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 แสดงน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้งหมด 3 ชนิด

ไอโซเลต	น้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์ (กรัม)		
	เอทานอล 95%	เฮกเซน	อะซีโตน
TM 4	0.0600	0.0518	0.1041
TM 5	0.0573	0.0485	0.1100
TM 6	0.0682	0.0559	0.0778
TM 7	0.0824	0.0564	0.1420
TM 8	0.0896	0.0473	0.1655
TM 9	0.0803	0.0605	0.0683

จากผลศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต TM 8 มีน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์สูงสุด 0.1655 กรัม เมื่อทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็นอะซีโตน รองลงมาเมื่อทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็นเอทานอล 95% เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต TM 8 มีน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์สูงสุด 0.0896 กรัม ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย TM 8 เมื่อสกัดด้วยเฮกเซนจะมีน้ำหนักสารสกัดภายในเซลล์น้อยที่สุด คือ 0.0473 กรัม

4.3.1 การสกัดสารจากมะเขือเทศ

จากการศึกษาการสกัดสารจากแบคทีเรียโดยใช้มะเขือเทศ 3 สายพันธุ์ คือ สีดา ฮอลแลนด์ และราชินี ด้วยวิธีการสกัดมะเขือเทศโดยใช้ตัวทำละลายอะซีโตนและเอทานอล 95%

ใช้เครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 15 นาที ทำการสกัด 3 ครั้ง จากนั้นนำมาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน เก็บสารสกัดใส่ขวดสีชาหุ้มด้วยฟรอยด์เจาะรูด้านบน นำไปไว้ในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักสารสกัดที่ได้ จากการทดลองพบว่ามะเขือเทศทั้ง 3 ชนิด มีน้ำหนักสารสกัดสูงสุดเมื่อสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่ โดยแสดงผลน้ำหนักสารสกัดมะเขือเทศดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงน้ำหนักสารสกัดของมะเขือเทศสายพันธุ์ต่างๆ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด

สายพันธุ์มะเขือเทศ	น้ำหนักสารสกัดมะเขือเทศ (กรัม)	
	อะซีโตน	เอทานอล 95%
สีดา	0.0597	0.1143
ราชินี	0.0610	0.1284
ฮอลแลนด์	0.0574	0.1062

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากมะเขือเทศทั้ง 3 สายพันธุ์ มีน้ำหนักสารสกัดที่ได้มีความใกล้เคียงกันเมื่อทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็นอะซีโตน ซึ่งมะเขือเทศพันธุ์สีดามีปริมาณสารสกัดสูงสุด คือ 0.0967 กรัม รองลงมาคือมะเขือเทศพันธุ์ฮอลแลนด์และพันธุ์ราชินี มีน้ำหนักสารสกัดเท่ากับ 0.0574 และ 0.0561 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่น้ำหนักสารสกัดที่ทำการสกัดด้วยเอทานอล 95% นั้นมีน้ำหนักของสารสกัดของมะเขือเทศพันธุ์ฮอลแลนด์สูงสุด 0.1262 กรัม รองลงมาคือมะเขือเทศพันธุ์ราชินีและพันธุ์สีดา มีน้ำหนักสารสกัดเท่ากับ 0.1184 และ 0.0943 กรัม ตามลำดับ

4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) สามารถหาได้โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu เป็นการศึกษาการเกิดสี โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยสารประกอบฟีนอลิกในสารละลายในสภาวะต่างหรือในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (pH 10) และสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ประกอบด้วยกรดฟอสโฟโมลิบดิก และกรดฟอสฟอรัสเตนติก จะถูกรีดิวซ์โดยฟีนอลิกไฮดรอกซิลกรุปในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเกิดเป็นทั้งสเตนและโมลิบดินัมบลู ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยวิธีการวิเคราะห์จะใช้กรดแกลลิกเป็นสารละลายมาตรฐานและแสดงผลในหน่วยไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง การวิเคราะห์วิธีนี้ไม่จำเพาะเจาะจงต่อสารจำพวกโพลีฟีนอลเท่านั้น แต่สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่สามารถออกซิไดซ์ตัวมันได้ ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะอยู่กับจำนวนหมู่ฟีนอลที่มีอยู่ในโมเลกุลของสารประกอบนั้น

จากการศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์จากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต หาได้จากการนำน้ำหมักที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.5

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกของสารสกัดภายในเซลล์ หาได้จากการนำเซลล์แห้งของแบคทีเรียมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน อะซีโตน และเอทานอลเข้มข้น 95% มาทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ที่ความเข้มข้น 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไอโซเลต TM 8 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 33.50 ± 0.63 และ 33.00 ± 0.86 ไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ จากผลวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากไอโซเลต TM 4, TM 5, TM 6, TM 7, TM 8 และ TM 9 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไอโซเลตที่สกัดจากอะซีโตนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด คือ TM 8 ซึ่งจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 36.08 ± 2.08 ไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง รองลงมาคือ เอทานอล 95% และเฮกเซน มีค่าเท่ากับ 31.66 ± 0.08 และ 29.25 ± 0.87 ไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ จากผลวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากไอโซเลต TM 4, TM 5, TM 6, TM 7, TM 8 และ TM 9 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต ที่ความเข้มข้น 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ไอโซเลต	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก + SE (ไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง)		ส่วนใสของอาหาร Production medium
	ความเข้มข้น 100 ($\mu\text{g/ml}$)	ความเข้มข้น 1,000 ($\mu\text{g/ml}$)	
TM 4	32.50 ± 1.25^{ab}	32.00 ± 1.12^{ab}	48.33 ± 0.72^a
TM 5	32.83 ± 1.88^{ab}	30.41 ± 0.08^b	48.25 ± 1.01^a
TM 6	29.75 ± 0.38^b	31.66 ± 0.79^{ab}	47.83 ± 0.16^a
TM 7	30.08 ± 0.22^b	30.66 ± 0.50^b	48.66 ± 0.22^a
TM 8	33.50 ± 0.63^a	33.00 ± 0.86^a	47.25 ± 0.25^a
TM 9	31.33 ± 0.14^{ab}	31.16 ± 0.08^{ab}	48.00 ± 0.28^a

หมายเหตุ a, b, c, และ d ในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน

ไอโซเลต	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก + SE (ไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง)		
	ความเข้มข้น 1,000 (µg/ml)		
	เอทานอล 95%	เฮกเซน	อะซีโตน
TM 4	29.00±0.25 ^b	26.00±0.25 ^b	31.41±0.08 ^b
TM 5	28.08±0.16 ^c	25.33±0.08 ^b	30.75±0.76 ^b
TM 6	25.75±0.14 ^d	24.75±0.76 ^b	30.58±0.16 ^b
TM 7	29.16±0.08 ^b	25.58±0.16 ^b	30.33±0.08 ^b
TM 8	31.66±0.08 ^a	29.25±0.87 ^a	36.08±2.08 ^a
TM 9	29.33±0.08 ^b	25.41±0.74 ^b	31.58±0.22 ^b

หมายเหตุ a, b, c, และ d ในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

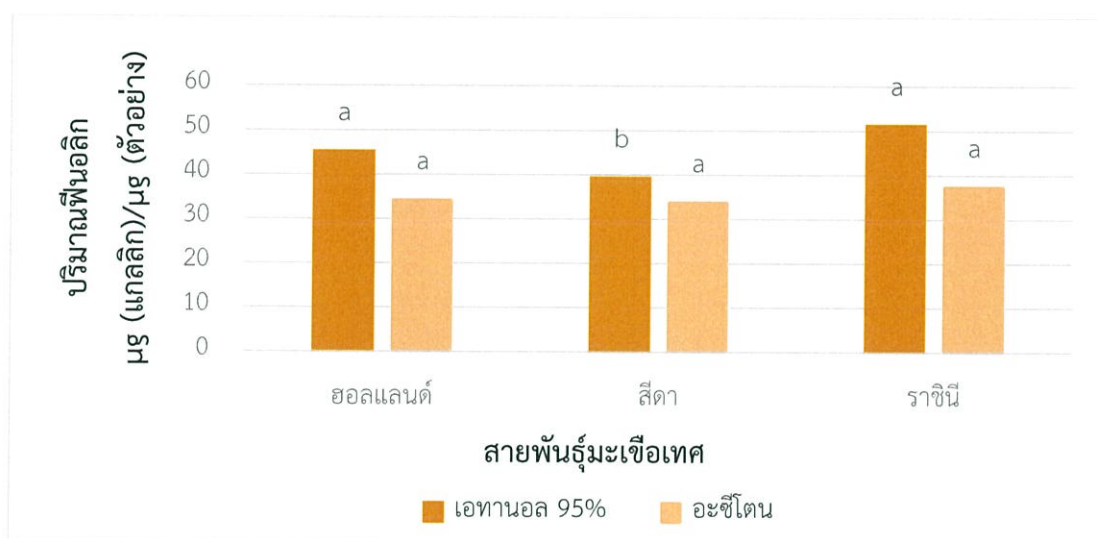
นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกของสารสกัดมะเขือเทศ โดยนำมะเขือเทศมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ อะซีโตน และเอทานอลเข้มข้น 95% มาทดสอบด้วยสารละลาย Folin-Ciocalteu ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.7 รูปที่ 4.1 และรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดมะเขือเทศ 3 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดสารแตกต่างกัน

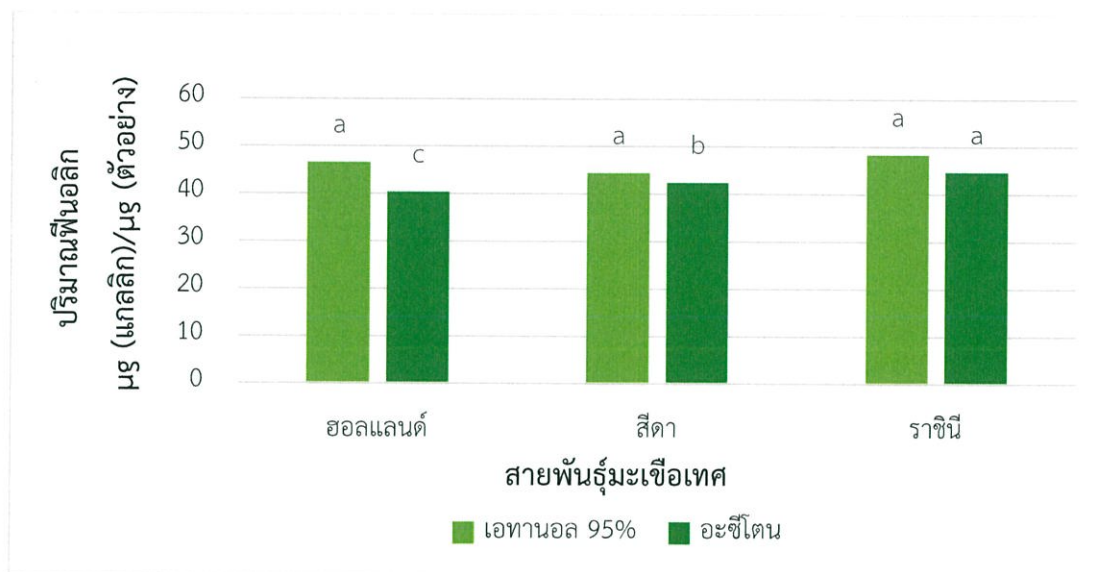
สายพันธุ์	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก + SE (ไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง)			
	ความเข้มข้น 100 (µg/ml)		ความเข้มข้น 1,000 (µg/ml)	
	เอทานอล 95%	อะซีโตน	เอทานอล 95%	อะซีโตน
ฮอลแลนด์	45.50±0.50 ^a	34.50±0.41 ^a	46.58±0.22 ^a	40.33±2.25 ^c
สีดา	39.66±0.36 ^b	34.08±0.41 ^a	44.41±0.22 ^a	42.33±1.66 ^b
ราชินี	51.58±3.46 ^a	37.66±3.77 ^a	48.33±1.90 ^a	44.66±3.88 ^a

หมายเหตุ a, b, c, และ d ในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดมะเขือเทศที่ความเข้มข้น 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดมะเขือเทศที่สกัดจากเอทานอล 95% มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด คือ มะเขือเทศพันธุ์ราซินี มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 51.58 ± 3.46 และ 48.33 ± 1.90 ไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดจากมะเขือเทศราซินีด้วยอะซีโตน มีค่าเท่ากับ 37.66 ± 3.77 และ 44.66 ± 3.88 ไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ จากผลวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากไอโซเลต TM 4, TM 5, TM 6, TM 7, TM 8 และ TM 9 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากมะเขือเทศ 3 สายพันธุ์ ที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกันที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตัวอักษรที่กราฟที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแต่ละชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%)



รูปที่ 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากมะเขือเทศ 3 สายพันธุ์ ที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกันที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตัวอักษรที่กราฟที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแต่ละชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%)

4.5 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical)

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดภายนอกเซลล์ สารสกัดภายในเซลล์ และสารสกัดมะเขือเทศนั้นเมื่อนำไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และนำไปทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด มีความสอดคล้องกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ดังนั้นเมื่อมีปริมาณฟีนอลิกมาก แสดงว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระก็จะมากตามไปด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ เมยกกลาง และคณะ (2557) ได้ทำการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มผลไม้ 10 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่วิเคราะห์ได้จะสอดคล้องกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH นอกจากนี้ยังพบอีกว่ามะเขือเทศราชินีมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mostapha และคณะ (2014) ซึ่งได้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของมะเขือเทศราชินี พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ถึง 23.53 – 53.51 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต และมะเขือเทศ พบว่าสารสกัดภายนอกเซลล์, สารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรีย และสารสกัดมะเขือเทศ สีของสารละลายผสมเปลี่ยนจากสีม่วงเข้มไปเป็นสีส้มอมเหลือง ซึ่งแสดงว่ามีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ โดยแสดงผลการทดลองในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ที่ความเข้มข้น 200 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ไอโซเลต	% Inhibition + SE		Production medium (Supernatant)
	ความเข้มข้น 200 ($\mu\text{g/ml}$)	ความเข้มข้น 2,000 ($\mu\text{g/ml}$)	
TM 4	45.05 \pm 0.03 ^b	52.33 \pm 0.36 ^d	69.00 \pm 0.05 ^b
TM 5	45.64 \pm 0.07 ^b	58.33 \pm 1.30 ^b	61.95 \pm 0.12 ^d
TM 6	43.57 \pm 0.03 ^c	55.74 \pm 0.77 ^c	61.71 \pm 0.16 ^d
TM 7	45.95 \pm 0.77 ^b	55.51 \pm 0.07 ^c	66.30 \pm 0.77 ^c
TM 8	50.34 \pm 0.03 ^a	60.05 \pm 0.73 ^a	66.79 \pm 0.02 ^c
TM 9	46.09 \pm 0.03 ^b	52.63 \pm 0.30 ^d	72.21 \pm 0.03 ^a

** ค่า % Inhibition + SE ของสารมาตรฐานแอสคอร์บิกมีค่า 65.21 \pm 0.00 %

ค่า % Inhibition + SE ของอาหาร Production medium มีค่า 60.35 \pm 0.07 %

(ตัวอักษรที่ยกกำลังที่ค่า % Inhibition + SE ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)

เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน อะซีโตน และเอทานอล 95% เมื่อทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไอโซเลต TM 8 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด โดยมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากเฮกเซนมีค่า 43.48 \pm 0.24 % ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากอะซีโตนมีค่า 47.20 \pm 0.36 % และค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากเอทานอล 95% มีค่า 44.09 \pm 0.35 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน

ไอโซเลต	% Inhibition + SE		
	ความเข้มข้น 200 (µg/ml)		
	สารสกัดด้วยเอทานอล 95%	สารสกัดด้วยเฮกเซน	สารสกัดด้วยอะซีโตน
TM 4	42.25±0.16 ^b	40.73±0.45 ^c	45.16±0.06 ^b
TM 5	43.95±0.02 ^a	42.38±0.60 ^{ab}	42.41±0.64 ^c
TM 6	42.43±0.07 ^b	41.03±0.12 ^c	42.89±0.09 ^c
TM 7	43.03±0.38 ^b	41.39±0.51 ^{bc}	42.99±0.49 ^c
TM 8	44.09±0.35 ^a	43.48±0.24 ^a	47.20±0.36 ^a
TM 9	42.27±0.21 ^b	41.55±0.80 ^{bc}	41.89±0.34 ^d

** ค่า % Inhibition + SE ของสารมาตรฐานแอสคอร์บิกมีค่า 65.21±0.00 %

(ตัวอักษรที่ยกกำลังที่ค่า % Inhibition + SE ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร พบว่าไอโซเลต TM 8 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด โดยมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากเฮกเซนมีค่า 54.42±0.02 % ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากอะซีโตนมีค่า 59.69±0.10 % และค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากเอทานอล 95% มีค่า 56.33±0.10 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.10 แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน

ไอโซเลต	% Inhibition + SE		
	ความเข้มข้น 2,000 ($\mu\text{g/ml}$)		
	สารสกัดด้วยเอทานอล 95%	สารสกัดด้วยเฮกเซน	สารสกัดด้วยอะซิโตน
TM 4	52.42 \pm 0.04 ^c	51.58 \pm 0.28 ^c	52.95 \pm 1.23 ^b
TM 5	55.13 \pm 0.03 ^b	54.78 \pm 0.12 ^b	53.19 \pm 0.03 ^b
TM 6	52.19 \pm 0.07 ^c	52.10 \pm 0.77 ^c	53.17 \pm 0.04 ^b
TM 7	50.49 \pm 0.04 ^d	50.12 \pm 0.31 ^d	50.88 \pm 0.22 ^c
TM 8	56.33 \pm 0.10 ^a	54.42 \pm 0.02 ^a	59.69 \pm 0.10 ^a
TM 9	52.94 \pm 0.27 ^c	51.99 \pm 1.09 ^c	51.26 \pm 0.08 ^c

** ค่า % Inhibition + SE ของสารมาตรฐานแอสคอร์บิกมีค่า 65.21 \pm 0.00 %

(ตัวอักษรที่ยกกำลังที่ค่า % Inhibition + SE ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะเขือเทศราชินี มีความสามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดในทุกในทุกความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ใช้ทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดของมะเขือเทศราชินีที่สกัดด้วยอะซิโตนมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระประมาณ 56.31 \pm 0.01 % และสารสกัดของมะเขือเทศที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีค่าการดักจับอนุมูลอิสระประมาณ 53.24 \pm 0.18 % ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดของมะเขือเทศราชินีที่สกัดด้วยอะซิโตนมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระประมาณ 72.29 \pm 0.81 % และสารสกัดของมะเขือเทศที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีค่าการดักจับอนุมูลอิสระประมาณ 55.57 \pm 0.12 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.11 แสดงความสามารถในการกำจัดอนุภาคลิเธอร์ของสารสกัดมะเขือเทศ 3 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 200 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด

สายพันธุ์	% Inhibition + SE			
	ความเข้มข้น 200 (µg/ml)		ความเข้มข้น 2,000 (µg/ml)	
	สารสกัดด้วย เอทานอล 95%	สารสกัดด้วย อะซีโตน	สารสกัดด้วย เอทานอล 95%	สารสกัดด้วย อะซีโตน
ฮอลแลนด์	50.29±1.11 ^b	55.92±0.23 ^b	55.35±0.06 ^c	62.84±0.10 ^b
สีดา	49.99±0.10 ^c	54.83±0.10 ^c	54.55±0.17 ^b	55.20±0.06 ^c
ราชินี	53.24±0.18 ^a	56.31±0.01 ^a	55.57±0.12 ^a	72.29±0.81 ^a

** ค่า % Inhibition + SE ของสารมาตรฐานแอสคอร์บิกมีค่า 65.21±0.00 %

(ตัวอักษรที่ยกกำลังที่ค่า % Inhibition + SE ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)

4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากมะเขือเทศ

ผลของการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรค 4 ชนิดมาใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยสารสกัดจากมะเขือเทศ 3 สายพันธุ์ คือ ฮอลแลนด์ สีดา และราชินี ที่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซีโตน พบว่ามะเขือเทศสีดาสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้ดีกว่าการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยยับยั้ง *Bacillus subtilis* ได้เล็กน้อย และค่ายับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* นี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ของสารสกัดจากมะเขือเทศพันธุ์ราชินีและพันธุ์ฮอลแลนด์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.12 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ของสารสกัดจากมะเขือเทศ 3 สายพันธุ์

พันธุ์มะเขือเทศ	Clear zone (cm.)			
	เชื้อก่อโรค			
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
ฮอลแลนด์	0.26±0.06 ^a	0.10±0.00	0.00	0.00
สีดา	1.16±0.43 ^a	0.10±0.00	0.00	0.00
ราชินี	0.30±0.10 ^a	0.10±0.00	0.00	0.00

ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญจากฤทธิ์ผสมของสารสกัดมะเขือเทศ ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดผสมของมะเขือเทศราชินีและมะเขือเทศสีดาสามารถเสริมฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ได้ โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสประมาณ 0.66±0.06 เซนติเมตร และยังไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ด้วยสารสกัดผสมของมะเขือเทศราชินีกับมะเขือเทศฮอลแลนด์ และมะเขือเทศราชินีกับมะเขือเทศฮอลแลนด์และมะเขือเทศสีดา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4.13)

ตารางที่ 4.13 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเจริญจากฤทธิ์ผสมของสารสกัดจากมะเขือเทศ ทั้งหมด 3 สายพันธุ์

พันธุ์มะเขือเทศ	Clear zone (cm.)			
	เชื้อก่อโรค			
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
ราชินี + ฮอลแลนด์	0.00	0.60±0.05 ^a	0.00	0.00
ราชินี + สีดา	0.00	0.66±0.06 ^a	0.00	0.00
ราชินี + ฮอลแลนด์ + สีดา	0.00	0.50±0.00 ^a	0.00	0.00

** ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของ Streptomycin (Positive control) ที่ยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ *P. aeruginosa* มีค่า 0.66±0.08, 1.43±0.06, 1.06±0.06 และ 0.80±0.00 เซนติเมตร ตามลำดับ

** ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของ Phosphate buffer (Negative control) ที่ยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ *P. aeruginosa* มีค่า 0.00 เซนติเมตร

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากมะเขือเทศสีดา สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลต เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วลักษณะโคโลนีของแต่ละไอโซเลตมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน จากการนำไปศึกษารูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า สามารถจัดจำแนกได้เบื้องต้นแบคทีเรียไอโซเลต TM 4, TM 5, TM 6, TM 8 และ TM 9 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกเนื่องจากติดสีม่วงของสีคริสตัลไวโอเลต และแบคทีเรียไอโซเลต TM 7 เป็นแบคทีเรียแกรมลบเนื่องจากติดสีแดงของสีซาฟานิน

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียไปหมักในอาหาร Production medium เพื่อสกัดสารจากแบคทีเรียซึ่งแบคทีเรียไอโซเลต TM 8 มีปริมาณสารสกัดที่สกัดด้วยอะซิโตน เฮกเซน และเอทานอล 95% มากที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.0896, 0.0473 และ 0.1655 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วง 0.0600 – 0.1655 กรัมต่อลิตร ในส่วนของสารสกัดจากมะเขือเทศมะเขือเทศราชินีมีปริมาณสารสกัดที่สกัดด้วยอะซิโตนและเอทานอล 95% มากที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.061 และ 0.1284 กรัมต่อลิตร รองลงมาเป็นมะเขือเทศสีดาและมะเขือเทศฮอลแลนด์ตามลำดับ โดยปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วง 0.0574 - 0.1284 กรัมต่อลิตร

การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ แบคทีเรียไอโซเลต TM 8 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด โดยปริมาณสารสกัดจะอยู่ในช่วง 33.50 – 36.08 ไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง ไอโซเลต TM 4, TM 5, TM 6, TM 7 และ TM 9 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 29.75 – 32 ไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากมะเขือเทศทั้ง 3 สายพันธุ์ มะเขือเทศราชินีมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด โดยอยู่ในช่วง 44.66 – 51.58 ไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง รองลงมาคือ มะเขือเทศฮอลแลนด์และมะเขือเทศสีดา โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 34.08 – 46.58 ไมโครกรัมแกลลิกต่อไมโครกรัมตัวอย่าง

ในการทดสอบประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต ซึ่งแบคทีเรียไอโซเลต TM 8 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระมากที่สุดในช่วง 50.34 – 60.05 % ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ เมยกกลาง และคณะ (2557) ได้ทำการศึกษหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มผลไม้ 10 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่วิเคราะห์ได้จะสอดคล้องกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

นอกจากนี้สารสกัดจากมะเขือเทศราชินีมีความสามารถในการกำจัดอนุโมลิสระสูงสุด คือ 72.29 % ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mostapha และคณะ (2014) ซึ่งได้ศึกษาความสามารถในการต้านอนุโมลิสระของมะเขือเทศราชินี พบว่ามีความสามารถสามารถในการต้านอนุโมลิสระได้ถึง 23.53 – 53.51 เปอร์เซ็นต์

ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากมะเขือเทศ มะเขือเทศทั้ง 3 สายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสองชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* ซึ่งสารสกัดจากมะเขือเทศสีดาสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้มากที่สุด เมื่อทำการนำสารสกัดจากมะเขือเทศมาผสมเพื่อส่งเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ สารสกัดจากมะเขือเทศราชินีและมะเขือเทศสีดามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* เพิ่มมากขึ้นด้วย

อย่างไรก็ตามสารสกัดจากแบคทีเรียและสารสกัดมะเขือเทศแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการเป็นแหล่งสารต้านอนุโมลิสระจากธรรมชาติ รวมทั้งสารสกัดจากมะเขือเทศยังมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้อีกด้วย ทั้งนี้ยังต้องทำการศึกษาสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมและปัจจัยต่างๆ เพื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดของแบคทีเรียให้มากขึ้น รวมถึงการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเพื่อทดสอบความปลอดภัยในการใช้สารสกัดเหล่านี้กับสิ่งมีชีวิตอื่น

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาลำดับถัดไปของสารสกัดจากแบคทีเรียและมะเขือเทศ ที่มีฤทธิ์ต้านอนุโมลิสระ และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ควรศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเพิ่มเติม และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดของแบคทีเรียให้มากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- กัญญา ธีระกุลและคณะ. (2544). จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์เจ้าพระยาฯ ระบบการพิมพ์ จำกัด กรุงเทพฯ.
- ณัฐวุฒิ รุ่งจินตามัย. (2005). เชื้อราเอนโดไฟต์ที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์ในพืชสกุล. *Garcinia* วิทยานิพนธ์. หน้า 189.
- นิรมล ธรรมวิริยสติ, นันทา คุ่มคณะ, พฤษภา อินนอก และจิราพร จรอนันต์. (2560). ฤทธิ์นอกกายของสารสกัดผลมะเขือเทศสีดาและผลมะเขือเทศราชินี. *ศรีนครินทร์เวชสาร* 32(4) : 359-65.
- เนตรนภา เมยกลาง และคณะ. (2557). การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มน้ำผลไม้. *KKU Res J (GS)* 14 (4), 67-79.
- มณีฉัตร นิรกรพันธุ์. (2538). มะเขือเทศ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์.โอ.เอส.ปรีนติ้งเฮาส์.
- สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข. (2555). รายงานพิเศษ เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ : วิกฤตและทางออกของสังคมไทย. *จุลสาร HSRI Forum* 1 : 3.
- Akinsanya, M. A., J. K. Goh, S. P. Lim and A. S. Y. Ting, 2015: Diversity, antimicrobial and antioxidant activities of culturable bacterial endophyte communities in *Aloe vera*. *FEMS microbiology letters*, 362.
- Alda LM, Gogoasa I, Bordean D, Gergen I, Alda S, Moldovan C, et al. (2009). Lycopene content of tomatoes and tomato products. *J Agroalimentary Process and Technologies*, 15: 540-2.
- Bauer, AW. WMM, Kirby. JC, Sherris. and M, Truck. (1966). "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method." *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs. (2009). An update from the infectious diseases society of America. *Clin Infect.* 48: 1-12.
- Cao, Y., Tian, B.Y., Ji, X.L., Shang, S.H., Lu, C.J., Zhang, K.Q., (2015). Associated bacteria of different life stages of *Meloidogyne incognita* using pyrosequencing-based analysis. *J. Basic Microb.* 1-11.
- De Matos Nogueira, E., F. Vinagre, H.P. Masuda, C. Vargas, V.L.M. de Padua, F.R. da Silva, R.V. dos Santos, J.I. Baldani, P.C.G. Ferreira, and A.S. Hemerley. (2001). Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. *Genet. Mol. Biol.* 24: 199-206.

- Dilis B, Trichopoulou A. (2010). Antioxidant intakes and food sources in Greek adults. *J Nutr* 140: 1274-79.
- Ericsson Y, Lundbeck H. (1955). Antimicrobial effect in vitro of the ascorbic acid oxidation. I. Effect on bacteria, fungi and viruses in pure cultures. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 37: 493-506.
- Gyaneshwar, P., E.K. James, N. Mathan, P.M. Reddy, B. Reinhold-Hurek, and J.K. Ladha. (2001). Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 183: 2634-2645.
- James, E.K., P. Gyaneshwar, W.L. Barraquio, N. Mathan and J. K. Ladha. (2000). Endophytic diazotrophs associated with rice. pp. 119 -140. In: J.K. Ladha and P.N. Reddy, eds. *The quest for nitrogen fixation in rice*. IRRI. Makati City. Philippines.
- Khiralla, A., Mohamed, I., & Thomas, J. (2015). A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants. *Asain Pacific Journal of Tropical Medicine*: 701-703.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- Li, Y.-C. and W.-Y. Tao, 2009: Effects of paclitaxel-producing fungal endophytes on growth and paclitaxel formation of *Taxus cuspidata* cells. *Plant Growth Regulation*, 58, 97-105.
- Marmur, J. (1961) A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organism. *J. Mol. Biol.*, 3, 208-218.
- Martinez - Klimova, E., Rodríguez-Peña, K. and Sánchez, S., (2017). Endophytes as sources of antibiotics *Biochem. Pharmacol.* 134: 1- 17.
- Morita, S., M. Azuma, T. Aoba, H. Satou, K. Narisawa, and T. Hashiba. (2003). "Induced systemic resistance of Chinese cabbage to bacterial leaf spot and *Alternaria* leaf spot by the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospora*." *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 71-75.
- Oikeh EI, Omoregie ES, Oviasogie FE, Oriakhi K. (2016). "Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates." *Food Sci Nutr* 4: 103-9.

- Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek. (1998). "Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. And other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function." *Crit. Rev. Plant Sci.* 17: 29-54.
- Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek, 2011: Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 435-443.
- Rodriguez, R. J., J. Henson, E. Van Volkenburgh, M. Hoy, L. Wright, F. Beckwith, Y.-O. Kim, and R. S. Redman. (2008). Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME J.* 2: 404-416.
- Selvamohan T, Ramadas VS, Kishore SS. (2012). Antimicrobial activity of selected medicinal plants against some selected human pathogenic bacteria. *J Adv Appl Sci Res* 3: 3374-81.
- Soca-Chafre, G., F. N. Rivera-Orduña, M. E. Hidalgo-Lara, C. Hernandez-Rodriguez, R. Marsch and L. B. Flores-Cotera, 2011: Molecular phylogeny and paclitaxel screening of fungal endophytes from *Taxus globosa*. *Fungal Biology*, 115, 143-156.
- Sun, K., Liu, J., Gao, Y., Jin, L., Gu, Y. and Wang, W. (2014). "Isolation, plant colonization potential, and phenanthrene degradation performance of the endophytic bacterium *Pseudomonas* sp." *Ph6-gfp, Sci. Rep.* 4: 5462.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25, 4876-4882.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol.* 67:1613-1617.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Qin, L. (2010). "Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes." *Microbiological Research*, 165(6): 437-449.
- Yukphan, P., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M., and Yamada, Y. (2004) *Asaia krungthepensis* sp.nov., an acetic acid bacterium in α -Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

1. สูตรอาหาร Nutrient agar (Formula/Litter)

Nutrient broth 8 กรัม

Agar 15 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

2. สูตรอาหาร Mueller Hinton Agar (Formula/Litter)

Mueller Hinton broth 21 กรัม

Agar 15 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

3. สูตรอาหาร Production medium (Formula/Litter)

เพปโตน (Peptone) 0.20 กรัม

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 0.10 กรัม

โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.15 กรัม

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.10 กรัม

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 0.50 กรัม

แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) 2.00 กรัม

แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4) 0.05 กรัม

กลูโคสเข้มข้นร้อยละ 40 (นึ่งแยกจากส่วนผสมอื่น) 15.0 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

4. สูตรการเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ตามวิธีของ Gomori (1995 อ้างอิงโดย Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

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

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

ตารางที่ ผ-1 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.8 – 8.0

พีเอช	สาร A (มิลลิลิตร)	สาร B (มิลลิลิตร)
5.8	4.00	46.00
6.0	6.15	43.85
6.2	9.25	40.75
6.4	13.25	36.75
6.6	18.75	31.25
6.8	24.50	25.50
7.0	30.50	19.50
7.2	36.00	14.00
7.4	40.50	9.50
7.6	43.50	6.50
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65

ภาคผนวก ข

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1. รูปร่างของโคโลนี (Colony Form)

- Punctiform โคโลนีมีขนาดเล็กมากเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร
- Circular โคโลนีกลม
- Filamentous โคโลนีประกอบด้วยเส้นสายพันกันแน่น
- Irregular โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน
- Rhizoid โคโลนีมีการแตกกิ่งก้านไม่แน่นอนและมีลักษณะคล้ายราก

2. ขอบหรือริมของโคโลนี (Colony margin or colony edge)

- Entire ขอบโคโลนีเรียบ
- Undulate ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย
- Lobate ขอบโคโลนีเป็นคลื่นเว้าและยื่นมาก
- Eroze ขอบโคโลนีเป็นหยกเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ
- Filamentous ขอบโคโลนีเป็นเส้นสายยาวไม่แน่นอน
- Curled ขอบโคโลนีเป็นเส้นซ้อนกันเป็นคลื่นและหยักในลักษณะที่ขนานกัน

3. พื้นผิวของโคโลนี (Surface Texture)

- Smooth พื้นผิวของโคโลนีเรียบ
- Rough พื้นผิวของโคโลนีขรุขระ
- Muroid พื้นผิวของโคโลนีเป็นเมือกเยิ้ม
- Rugose พื้นผิวของโคโลนีย่น
- Concentrically ringed พื้นผิวของโคโลนีเป็นวงแหวนซ้อนกันหลายชั้น

4. ความสูงหรือการยกตัวของโคโลนี (Elevation)

- Flat โคโลนีแบนราบ
- Raised โคโลนีมีความหนาสูงขึ้นมาจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเล็กน้อย
- Convex โคโลนีนูนโค้งจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเล็กน้อย
- Pulvinate โคโลนีนูนโค้งขึ้นมาจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อมาก

ภาคผนวก ค

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. สารเคมี

1.1 การเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์

1.1.1 ชั่งสาร DPPH มา 0.0059 กรัม ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

1.2.1 ชั่งกรดแกลลิกมา 0.001 กรัม ละลายเอทานอลและปรับปริมาตรให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.3 การเตรียมสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.3.1 ชั่งกรดแกลลิกมา 0.005 กรัม ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.4 การเตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร

1.4.1 ปิเปต Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรที่หุ้มด้วยฟอยล์กันแสง

1.5 การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 7.5% โดยมวลต่อปริมาตร

1.5.1 ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 3.75 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

1.5.2 เก็บสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่ได้ในขวดสีชา

1.6 การเตรียมสารละลาย McFarland standard No.05

1.6.1 ปิเปตกรดซัลฟิวริกเข้มข้นมา 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.6.2 ชั่งแบเรียมคลอไรด์มา 1 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.6.3 ปิเปตสารละลายในข้อ 1.6.1 ปริมาตร 995 มิลลิลิตร และสารละลายข้อ 1.6.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาผสมกัน

1.6.4 เก็บสารละลาย McFarland standard No.05 ที่ได้ในหลอดฝาเกลียว ปิดฝาให้สนิท กั้นระเหย แล้วเก็บในที่มืด อุณหภูมิ 2-30 องศาเซลเซียส

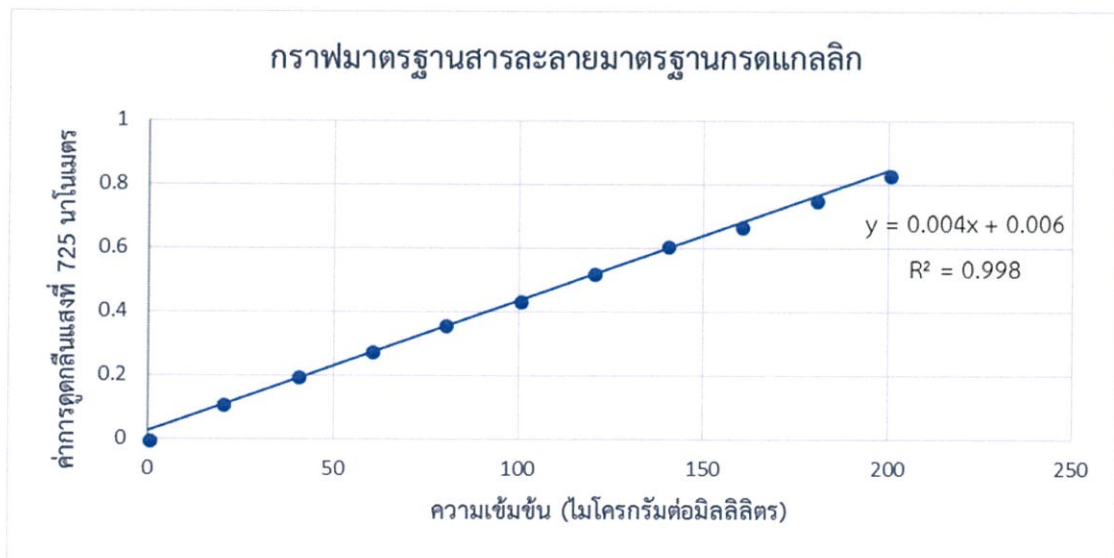
2. วิธีการวิเคราะห์

2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

2.1.1 สารสกัดภายนอกเซลล์

ตารางที่ ผ-2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
0	0
20	0.113
40	0.201
60	0.28
80	0.36
100	0.436
120	0.524
140	0.611
160	0.673
180	0.756
200	0.832



รูปที่ ผ-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตัวอย่างวิธีคำนวณ

หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต TM 5 ที่เลี้ยงในอาหาร Production medium ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ซ้ำที่ 1

ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ = 0.145

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสง (y) = 0.145

จากสมการเส้นตรง $y = 0.004x + 0.006$

แทนค่า $y =$ ลงในสมการ

$$0.145 = 0.004x + 0.006$$

จะได้ $x = 34.75$ ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิไมโครกรัมตัวอย่าง

ซ้ำที่ 2

ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ = 0.137

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสง (y) = 0.137

จากสมการเส้นตรง $y = 0.004x + 0.006$

แทนค่า $y =$ ลงในสมการ

$$0.137 = 0.004x + 0.006$$

จะได้ $x = 32.75$ ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิไมโครกรัมตัวอย่าง

ซ้ำที่ 3

ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ = 0.138

ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสง (y) = 0.138

จากสมการเส้นตรง $y = 0.004x + 0.006$

แทนค่า $y =$ ลงในสมการ

$$0.138 = 0.004x + 0.006$$

จะได้ $x = 33$ ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิไมโครกรัมตัวอย่าง

ดังนั้น สารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต TM 5 ที่เลี้ยงในอาหาร Production medium ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 33.5 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิไมโครกรัมตัวอย่าง

2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical)

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

กำหนดให้ A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของสารละลาย DPPH

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของสารละลาย DPPH กับสารสกัด

2.2.1 สารสกัดภายนอกเซลล์

วิธีการคำนวณ

หาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ไอโซเลต TM 8 ที่เลี้ยงในอาหาร Production medium ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซ้ำที่ 1

ค่าการดูดกลืนแสงของ A_{control} = 1.865

ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ = 0.859

ค่าการดูดกลืนแสงของอาหาร = 0.098

ค่าการดูดกลืนแสงของ A_{sample} = 0.761

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{1.865 - 0.761}{1.865} \right] \times 100$$

$$= 59.20 \%$$

ซ้ำที่ 2

ค่าการดูดกลืนแสงของ A_{control} = 1.865

ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ = 0.835

ค่าการดูดกลืนแสงของอาหาร = 0.098

ค่าการดูดกลืนแสงของ A_{sample} = 0.737

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{1.865 - 0.737}{1.865} \right] \times 100$$

$$= 60.48 \%$$

ซ้ำที่ 3

ค่าการดูดกลืนแสงของ A_{control}	=	1.865
ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้	=	0.835
ค่าการดูดกลืนแสงของอาหาร	=	0.098
ค่าการดูดกลืนแสงของ A_{sample}	=	0.737

$$\begin{aligned} \% \text{ Inhibition} &= \left[\frac{1.865 - 0.737}{1.865} \right] \times 100 \\ &= 60.48 \% \end{aligned}$$

แสดงว่า มีค่า % Inhibition เฉลี่ย

$$\frac{59.20 + 60.48 + 60.48}{3} = 60.05 \%$$

ดังนั้น สารสกัดภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ไอโซเลต TM 8 ที่เลี้ยงในอาหาร Production medium ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 60.05 %

ภาคผนวก ง

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

ตารางที่ ผ-3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดภายนอกเซลล์

ไอโซเลต	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร								
	ความเข้มข้น 100 ($\mu\text{g/ml}$)			ความเข้มข้น 1,000 ($\mu\text{g/ml}$)			Production medium		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
TM 4	0.132	0.132	0.132	0.130	0.143	0.129	0.200	0.194	0.204
TM 5	0.145	0.145	0.145	0.140	0.134	0.128	0.192	0.206	0.199
TM 6	0.124	0.124	0.124	0.129	0.139	0.130	0.198	0.196	0.198
TM 7	0.126	0.126	0.126	0.129	0.125	0.132	0.199	0.201	0.202
TM 8	0.133	0.133	0.133	0.128	0.127	0.128	0.194	0.194	0.197
TM 9	0.131	0.131	0.131	0.138	0.139	0.139	0.200	0.198	0.196

ตารางที่ ผ-4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดภายในเซลล์ที่สกัดด้วยเฮกเซน

ไอโซเลต	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร			
	ความเข้มข้น 1,000 ($\mu\text{g/ml}$)			Blank (เฮกเซน)
	1	2	3	
TM 4	0.112	0.109	0.109	0.069
TM 5	0.108	0.107	0.107	0.069
TM 6	0.109	0.107	0.099	0.069
TM 7	0.099	0.100	0.122	0.069
TM 8	0.125	0.125	0.123	0.069
TM 9	0.122	0.132	0.129	0.069

ตารางที่ ผ-5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดภายในเซลล์ที่สกัดด้วยอะซีโตน

ไอโซเลต	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร			
	ความเข้มข้น 1,000 (µg/ml)			Blank (อะซีโตน)
	1	2	3	
TM 4	0.131	0.132	0.132	0.072
TM 5	0.127	0.125	0.135	0.072
TM 6	0.129	0.127	0.129	0.072
TM 7	0.142	0.142	0.167	0.072
TM 8	0.128	0.127	0.127	0.072
TM 9	0.131	0.134	0.132	0.072

ตารางที่ ผ-6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดภายในเซลล์ที่สกัดด้วยเอทานอล 95%

ไอโซเลต	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร			
	ความเข้มข้น 1,000 (µg/ml)			Blank (เอทานอล 95%)
	1	2	3	
TM 4	0.120	0.123	0.123	0.064
TM 5	0.119	0.119	0.117	0.064
TM 6	0.109	0.110	0.108	0.064
TM 7	0.133	0.132	0.133	0.064
TM 8	0.123	0.123	0.122	0.064
TM 9	0.116	0.115	0.115	0.064

ตารางที่ ผ-7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดมะเขือเทศด้วยอะซีโตน

พันธุ์มะเขือเทศ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร						
	ความเข้มข้น 100 (µg/ml)			ความเข้มข้น 1,000 (µg/ml)			Blank (อะซีโตน)
	1	2	3	1	2	3	
ฮอลแลนด์	0.186	0.138	0.144	0.21	0.202	0.192	0.072
สีดา	0.139	0.139	0.139	0.243	0.231	0.232	0.072
ราชินี	0.143	0.143	0.143	0.260	0.282	0.252	0.072

ตารางที่ ผ-8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดมะเขือเทศด้วยเอทานอล 95%

พันธุ์มะเขือเทศ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร						
	ความเข้มข้น 100 (µg/ml)			ความเข้มข้น 1,000 (µg/ml)			Blank (เอทานอล 95%)
	1	2	3	1	2	3	
ฮอลแลนด์	0.184	0.184	0.184	0.194	0.192	0.191	0.064
สีดา	0.122	0.122	0.122	0.182	0.185	0.184	0.064
ราชินี	0.185	0.230	0.222	0.185	0.202	0.211	0.064

ตารางที่ ผ-9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดภายนอกเซลล์

ไอโซเลต	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร								
	ความเข้มข้น 200 (µg/ml)			ความเข้มข้น 2,000 (µg/ml)			Production medium		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
TM 4	1.124	1.122	1.122	0.99	0.997	0.974	1.124	1.122	1.122
TM 5	1.112	1.114	1.109	0.853	0.871	0.901	1.112	1.114	1.109
TM 6	1.149	1.151	1.151	0.940	0.915	0.915	1.149	1.151	1.151
TM 7	1.092	1.091	1.135	0.930	0.928	0.925	1.092	1.091	1.135
TM 8	1.024	1.023	1.025	0.859	0.835	0.835	1.024	1.023	1.025
TM 9	1.102	1.104	1.104	0.985	0.970	0.989	1.102	1.104	1.104

ตารางที่ ผ-10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดภายในเซลล์ที่สกัดด้วยเฮกเซน

ไอโซเลต	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร						
	ความเข้มข้น 200 (µg/ml)			ความเข้มข้น 2,000 (µg/ml)			Blank (เฮกเซน)
	1	2	3	1	2	3	
TM 4	1.115	1.121	1.099	0.911	0.910	0.927	0.069
TM 5	1.114	1.114	1.115	0.910	0.910	0.917	0.069
TM 6	1.144	1.140	1.144	0.825	0.826	0.826	0.069
TM 7	1.137	1.140	1.117	0.882	0.881	0.899	0.069
TM 8	1.142	1.144	1.152	0.932	0.970	0.979	0.069
TM 9	1.153	1.145	1.139	0.924	0.980	0.989	0.069

ตารางที่ ผ-11 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดภายในเซลล์ที่สกัดด้วยอะซีโตน

ไอโซเลต	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร						
	ความเข้มข้น 200 (µg/ml)			ความเข้มข้น 2,000 (µg/ml)			Blank (อะซีโตน)
	1	2	3	1	2	3	
TM 4	1.065	1.062	1.043	0.995	0.931	0.922	0.072
TM 5	1.132	1.153	1.153	0.927	0.925	0.927	0.072
TM 6	1.138	1.138	1.135	0.945	0.944	0.947	0.072
TM 7	1.177	1.175	1.160	0.878	0.879	0.882	0.072
TM 8	1.093	1.097	1.094	0.980	0.994	0.990	0.072
TM 9	1.152	1.152	1.163	0.984	0.979	0.980	0.072

ตารางที่ ผ-12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดภายในเซลล์ที่สกัดด้วยเอทานอล 95%

ไอโซเลต	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร						
	ความเข้มข้น 200 (µg/ml)			ความเข้มข้น 2,000 (µg/ml)			Blank (เอทานอล 95%)
	1	2	3	1	2	3	
TM 4	1.153	1.181	1.174	0.953	0.950	0.951	0.064
TM 5	1.148	1.109	1.131	1.011	1.012	1.015	0.064
TM 6	1.163	1.160	1.168	0.916	0.912	0.919	0.064
TM 7	1.175	1.142	1.156	0.987	0.986	0.989	0.064
TM 8	1.113	1.119	1.122	0.977	0.973	0.973	0.064
TM 9	1.168	1.124	1.170	0.937	0.936	0.952	0.064

ตารางที่ ผ-13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ของสารสกัดมะเขือเทศด้วยอะซีโตน

พันธุ์มะเขือเทศ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร						
	ความเข้มข้น 200 (µg/ml)			ความเข้มข้น 2,000 (µg/ml)			Blank (อะซีโตน)
	1	2	3	1	2	3	
ฮอลแลนด์	0.763	0.769	0.763	0.935	0.933	0.931	0.072
สีดา	0.908	0.908	0.906	0.887	0.886	0.887	0.072
ราชินี	0.571	0.597	0.598	0.899	0.892	0.891	0.072

ตารางที่ ผ-14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดมะเขือเทศด้วยเอทานอล 95%

พันธุ์มะเขือเทศ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร						
	ความเข้มข้น 200 (µg/ml)			ความเข้มข้น 2,000 (µg/ml)			Blank (เอทานอล 95%)
	1	2	3	1	2	3	
ฮอลแลนด์	0.943	0.933	0.932	0.918	0.908	0.909	0.064
สีดำ	0.996	0.999	0.995	0.896	0.899	0.895	0.064
ราชินี	0.967	1.002	1.004	0.804	0.810	0.812	0.064

ภาคผนวก จ

ผลทางสถิติในการวิเคราะห์หารสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

ตารางที่ ผ-15 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Descriptives

Phenolic

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TM 4	3	32.50000	2.179449	1.258306	27.08595	37.91405	31.000	35.000
TM 5	3	33.50000	1.089725	.629153	30.79297	36.20703	32.750	34.750
TM 6	3	29.75000	.661438	.381881	28.10690	31.39310	29.250	30.500
TM 7	3	30.08333	.381881	.220479	29.13469	31.03198	29.750	30.500
TM 8	3	32.83333	3.262795	1.883776	24.72810	40.93857	30.250	36.500
TM 9	3	31.33333	.144338	.083333	30.97478	31.69189	31.250	31.500
Total	18	31.66667	2.021938	.476575	30.66118	32.67215	29.250	36.500

ANOVA

Phenolic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	35.125	5	7.025	2.452	.094
Within Groups	34.375	12	2.865		
Total	69.500	17			

Phenolic

		N	Subset for alpha = 0.05	
isolated			1	2
Duncan ^a	TM 6	3	29.75000	
	TM 7	3	30.08333	
	TM 9	3	31.33333	31.33333
	TM 4	3	32.50000	32.50000
	TM 8	3	32.83333	32.83333
	TM 5	3		33.50000
	Sig.			.064

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-16 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายนอกเซลล์ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Descriptives

Phenolic

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					TM 4	3		
TM 5	3	32.00000	1.500000	.866025	28.27379	35.72621	30.500	33.500
TM 6	3	31.66667	1.376893	.794949	28.24628	35.08706	30.750	33.250
TM 7	3	30.66667	.877971	.506897	28.48567	32.84767	29.750	31.500
TM 8	3	30.41667	.144338	.083333	30.05811	30.77522	30.250	30.500
TM 9	3	33.16667	.144338	.083333	32.80811	33.52522	33.000	33.250
Total	18	31.65278	1.385691	.326610	30.96369	32.34187	29.750	34.250

ANOVA

Phenolic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15.101	5	3.020	2.066	.141
Within Groups	17.542	12	1.462		
Total	32.642	17			

Phenolic

	isolated	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	TM 8	3	30.41667	
	TM 7	3	30.66667	
	TM 6	3	31.66667	31.66667
	TM 4	3	32.00000	32.00000
	TM 5	3	32.00000	32.00000
	TM 9	3		33.16667
	Sig.		.169	.184

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-17 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่สกัดด้วยอะซิโตน

Descriptives

Phenolic

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TM 4	3	31.41667	.144338	.083333	31.05811	31.77522	31.250	31.500
TM 5	3	30.75000	1.322876	.763763	27.46379	34.03621	29.750	32.250
TM 6	3	30.58333	.288675	.166667	29.86622	31.30044	30.250	30.750
TM 7	3	36.08333	3.608439	2.083333	27.11947	45.04719	34.000	40.250
TM 8	3	30.33333	.144338	.083333	29.97478	30.69189	30.250	30.500
TM 9	3	31.58333	.381881	.220479	30.63469	32.53198	31.250	32.000
Total	18	31.79167	2.424219	.571394	30.58613	32.99720	29.750	40.250

ANOVA

Phenolic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	69.823	5	13.965	5.570	.007
Within Groups	30.083	12	2.507		
Total	99.906	17			

Phenolic

		N	Subset for alpha = 0.05	
isolated			1	2
Duncan ^a	TM 8	3	30.33333	
	TM 6	3	30.58333	
	TM 5	3	30.75000	
	TM 4	3	31.41667	
	TM 9	3	31.58333	
	TM 7	3		36.08333
	Sig.			.394

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-18 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่สกัดด้วยเอทานอล 95%

Descriptives

Phenolic

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TM 4	3	29.00000	.433013	.250000	27.92434	30.07566	28.500	29.250
TM 5	3	28.08333	.288675	.166667	27.36622	28.80044	27.750	28.250
TM 6	3	25.75000	.250000	.144338	25.12897	26.37103	25.500	26.000
TM 7	3	31.66667	.144338	.083333	31.30811	32.02522	31.500	31.750
TM 8	3	29.16667	.144338	.083333	28.80811	29.52522	29.000	29.250
TM 9	3	27.33333	.144338	.083333	26.97478	27.69189	27.250	27.500
Total	18	28.50000	1.882583	.443729	27.56381	29.43619	25.500	31.750

ANOVA

Phenolic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	59.458	5	11.892	180.253	.000
Within Groups	.792	12	.066		
Total	60.250	17			

Phenolic

isolate d	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Duncan ^a TM 6	3	25.75000				
TM 9	3		27.33333			
TM 5	3			28.08333		
TM 4	3				29.00000	
TM 8	3				29.16667	
TM 7	3					31.66667
Sig.		1.000	1.000	1.000	.442	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-19 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดภายในเซลล์ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วยเฮกเซน

Descriptives

Phenolic

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TM 4	3	26.00000	.433013	.250000	24.92434	27.07566	25.750	26.500
TM 5	3	25.33333	.144338	.083333	24.97478	25.69189	25.250	25.500
TM 6	3	24.75000	1.322876	.763763	21.46379	28.03621	23.250	25.750
TM 7	3	25.25000	3.250000	1.876388	17.17655	33.32345	23.250	29.000
TM 8	3	29.58333	.288675	.166667	28.86622	30.30044	29.250	29.750
TM 9	3	30.41667	1.282900	.740683	27.22977	33.60357	29.000	31.500
Total	18	26.88889	2.646060	.623682	25.57303	28.20474	23.250	31.500

ANOVA

Phenolic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	90.528	5	18.106	7.623	.002
Within Groups	28.500	12	2.375		
Total	119.028	17			

Phenolic

		N	Subset for alpha = 0.05	
isolated			1	2
Duncan ^a	TM 6	3	24.75000	
	TM 7	3	25.25000	
	TM 5	3	25.33333	
	TM 4	3	26.00000	
	TM 8	3		29.58333
	TM 9	3		30.41667
	Sig.			.375

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-20 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดมะเขือเทศที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วยอะซิโตน

Descriptives

Phenolic

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Holland	3	37.50000	6.538348	3.774917	21.25784	53.74216	33.000	45.000
Srida	3	34.08333	.721688	.416667	32.29056	35.87611	33.250	34.500
Rachinee	3	34.66667	.721688	.416667	32.87389	36.45944	34.250	35.500
Total	9	35.41667	3.667850	1.222617	32.59731	38.23603	33.000	45.000

ANOVA

Phenolic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20.042	2	10.021	.686	.539
Within Groups	87.583	6	14.597		
Total	107.625	8			

Phenolic

		N	Subset for alpha = 0.05
Tomato			1
Duncan ^a	Sirdar	3	34.08333
	Rachinee	3	34.66667
	Holland	3	37.50000
	Sig.		.330

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-21 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดมะเขือเทศที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่สกัดด้วยเอทานอล 95%

Descriptives

Phenolic

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Holland	3	45.50000	.866025	.500000	43.34867	47.65133	44.500	46.000
Srida	3	29.66667	.629153	.363242	28.10376	31.22957	29.000	30.250
Rachinee	3	51.58333	6.001736	3.465104	36.67419	66.49247	44.750	56.000
Total	9	42.25000	10.261427	3.420476	34.36237	50.13763	29.000	56.000

ANOVA

Phenolic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	768.042	2	384.021	30.997	.001
Within Groups	74.333	6	12.389		
Total	842.375	8			

Phenolic

		N	Subset for alpha = 0.05	
Tomato			1	2
Duncan ^a	Sirdar	3	29.66667	
	Holland	3		45.50000
	Rachinee	3		51.58333
	Sig.		1.000	.079

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-22 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดมะเขือเทศที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่สกัดด้วยอะซิโตน

Descriptives

Phenolic

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Holland	3	48.83333	2.254625	1.301708	43.23253	54.43413	46.500	51.000
Srida	3	57.33333	1.664582	.961047	53.19828	61.46838	56.250	59.250
Rachinee	3	64.66667	3.883727	2.242271	55.01895	74.31438	61.500	69.000
Total	9	56.94444	7.268057	2.422686	51.35772	62.53117	46.500	69.000

ANOVA

Phenolic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	376.722	2	188.361	24.636	.001
Within Groups	45.875	6	7.646		
Total	422.597	8			

Phenolic

Tomato		N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	Holland	3	48.83333		
	Srida	3		57.33333	
	Rachinee	3			64.66667
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-23 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดมะเขือเทศที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วยเอทานอล 95%

Descriptives

Phenolic

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Holland	3	46.58333	.381881	.220479	45.63469	47.53198	46.250	47.000
Srida	3	44.41667	.381881	.220479	43.46802	45.36531	44.000	44.750
Rachinee	3	48.33333	3.300884	1.905766	40.13348	56.53318	44.750	51.250
Total	9	46.44444	2.384120	.794707	44.61185	48.27704	44.000	51.250

ANOVA

Phenolic

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23.097	2	11.549	3.097	.119
Within Groups	22.375	6	3.729		
Total	45.472	8			

Phenolic

		N	Subset for alpha = 0.05
Tomato			1
Duncan ^a	Srida	3	44.41667
	Holland	3	46.58333
	Rachinee	3	48.33333
	Sig.		.054

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-24 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมลอิสระของสารสกัดภายนอกเซลล์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Descriptives

DPPH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TM 4	3	45.05667	.057735	.033333	44.91324	45.20009	44.990	45.090
TM 5	3	45.64667	.135769	.078387	45.30940	45.98394	45.520	45.790
TM 6	3	43.57667	.063509	.036667	43.41890	43.73443	43.540	43.650
TM 7	3	45.95333	1.345561	.776860	42.61078	49.29589	44.400	46.760
TM 8	3	50.34667	.055076	.031798	50.20985	50.48348	50.290	50.400
TM 9	3	46.09667	.063509	.036667	45.93890	46.25443	46.060	46.170
Total	18	46.11278	2.180593	.513971	45.02839	47.19716	43.540	50.400

ANOVA

DPPH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	77.148	5	15.430	50.221	.000
Within Groups	3.687	12	.307		
Total	80.835	17			

DPPH

Isolated	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a TM 6	3	43.57667		
TM 4	3		45.05667	
TM 5	3		45.64667	
TM 7	3		45.95333	
TM 9	3		46.09667	
TM 8	3			50.34667
Sig.		1.000	.054	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-25 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุภาคนิวเคลียร์ของสารสกัดภายนอกเซลล์ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Descriptives

DPPH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TM 4	3	52.33333	.631057	.364341	50.76570	53.90097	51.800	53.030
TM 5	3	58.33667	1.303163	.752381	55.09943	61.57390	56.940	59.520
TM 6	3	55.74333	.773649	.446667	53.82148	57.66518	54.850	56.190
TM 7	3	55.51667	.135769	.078387	55.17940	55.85394	55.390	55.660
TM 8	3	60.05333	.739008	.426667	58.21753	61.88913	59.200	60.480
TM 9	3	52.63667	.532948	.307698	51.31275	53.96058	52.230	53.240
Total	18	55.77000	2.940302	.693036	54.30782	57.23218	51.800	60.480

ANOVA

DPPH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	139.884	5	27.977	47.370	.000
Within Groups	7.087	12	.591		
Total	146.971	17			

DPPH

Isolated	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan ^a TM 4	3	52.33333			
TM 9	3	52.63667			
TM 7	3		55.51667		
TM 6	3		55.74333		
TM 5	3			58.33667	
TM 8	3				60.05333
Sig.		.638	.724	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-26 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมลอิสระของสารสกัดภายในเซลล์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วย
อะซีโตน

Descriptives

DPPH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TM 4	3	47.20667	.640104	.369564	45.61656	48.79677	46.760	47.940
TM 5	3	42.41333	.646632	.373333	40.80701	44.01966	42.040	43.160
TM 6	3	42.89333	.092376	.053333	42.66386	43.12281	42.840	43.000
TM 7	3	41.09000	.496689	.286764	39.85616	42.32384	40.750	41.660
TM 8	3	45.16333	.109697	.063333	44.89083	45.43583	45.040	45.250
TM 9	3	41.89333	.340637	.196667	41.04714	42.73952	41.500	42.090
Total	18	43.44333	2.192203	.516707	42.35318	44.53349	40.750	47.940

ANOVA

DPPH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	79.275	5	15.855	78.545	.000
Within Groups	2.422	12	.202		
Total	81.698	17			

DPPH

Isolate d	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Duncan ^a TM 7	3	41.09000				
TM 9	3		41.89333			
TM 5	3		42.41333	42.41333		
TM 6	3			42.89333		
TM 8	3				45.16333	
TM 4	3					47.20667
Sig.		1.000	.182	.215	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-27 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมลอิสระของสารสกัดภายในเซลล์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่สกัดด้วยเอทานอล 95%

Descriptives

DPPH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TM 4	3	40.73333	.781430	.451159	38.79215	42.67451	40.110	41.610
TM 5	3	42.88000	1.047903	.605007	40.27687	45.48313	41.880	43.970
TM 6	3	41.03333	.217332	.125477	40.49345	41.57322	40.800	41.230
TM 7	3	41.36000	.888426	.512933	39.15303	43.56697	40.430	42.200
TM 8	3	43.48333	.244404	.141107	42.87620	44.09047	43.270	43.750
TM 9	3	41.55333	1.392312	.803852	38.09464	45.01203	40.700	43.160
Total	18	41.84056	1.260194	.297030	41.21388	42.46724	40.110	43.970

ANOVA

DPPH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17.910	5	3.582	4.730	.013
Within Groups	9.087	12	.757		
Total	26.997	17			

DPPH

Isolated	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a TM 4	3	40.73333		
TM 6	3	41.03333		
TM 7	3	41.36000	41.36000	
TM 9	3	41.55333	41.55333	
TM 5	3		42.88000	42.88000
TM 8	3			43.48333
Sig.		.306	.064	.412

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-28 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมลอิสระของสารสกัดภายในเซลล์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วยเฮกเซน

Descriptives

DPPH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TM 4	3	44.09000	.610246	.352326	42.57407	45.60593	43.590	44.770
TM 5	3	43.95000	.034641	.020000	43.86395	44.03605	43.910	43.970
TM 6	3	42.43000	.121244	.070000	42.12881	42.73119	42.360	42.570
TM 7	3	43.03667	.674487	.389416	41.36115	44.71219	42.570	43.810
TM 8	3	42.25333	.285365	.164756	41.54445	42.96222	41.930	42.470
TM 9	3	42.27333	.376342	.217281	41.33845	43.20822	41.880	42.630
Total	18	43.00556	.862256	.203236	42.57677	43.43435	41.880	44.770

ANOVA

DPPH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.507	5	2.101	11.824	.000
Within Groups	2.133	12	.178		
Total	12.639	17			

DPPH

	Isolated	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	TM 8	3	42.25333	
	TM 9	3	42.27333	
	TM 6	3	42.43000	
	TM 7	3	43.03667	
	TM 5	3		43.95000
	TM 4	3		44.09000
	Sig.			.056

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-29 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมลอิสระของสารสกัดภายในเซลล์ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วยอะซีโตน

Descriptives

DPPH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TM 4	3	52.95667	2.132424	1.231156	47.65943	58.25390	50.510	54.420
TM 5	3	54.19333	.057735	.033333	54.04991	54.33676	54.160	54.260
TM 6	3	53.17000	.081854	.047258	52.96666	53.37334	53.080	53.240
TM 7	3	56.69333	.109697	.063333	56.42083	56.96583	56.570	56.780
TM 8	3	50.88333	.385530	.222586	49.92562	51.84104	50.560	51.310
TM 9	3	51.26000	.141774	.081854	50.90781	51.61219	51.100	51.370
Total	18	53.19278	2.122947	.500383	52.13706	54.24849	50.510	56.780

ANOVA

DPPH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	67.141	5	13.428	17.005	.000
Within Groups	9.476	12	.790		
Total	76.617	17			

DPPH

Isolated	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a TM 8	3	50.88333		
TM 9	3	51.26000		
TM 4	3		52.95667	
TM 6	3		53.17000	
TM 5	3		54.19333	
TM 7	3			56.69333
Sig.		.613	.130	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-30 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมลพิษของสารสกัดภายในเซลล์ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่สกัดด้วยเอทานอล 95%

Descriptives

DPPH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TM 4	3	52.42000	.081854	.047258	52.21666	52.62334	52.330	52.490
TM 5	3	49.13333	.109697	.063333	48.86083	49.40583	49.010	49.220
TM 6	3	54.33667	.185562	.107134	53.87570	54.79763	54.160	54.530
TM 7	3	50.49000	.081854	.047258	50.28666	50.69334	50.400	50.560
TM 8	3	51.19000	.121244	.070000	50.88881	51.49119	51.050	51.260
TM 9	3	52.94000	.476970	.275379	51.75514	54.12486	52.390	53.240
Total	18	51.75167	1.757606	.414272	50.87763	52.62570	49.010	54.530

ANOVA

DPPH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	51.912	5	10.382	206.227	.000
Within Groups	.604	12	.050		
Total	52.516	17			

DPPH

Isolated	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Duncan ^a TM 5	3	49.13333					
TM 7	3		50.49000				
TM 8	3			51.19000			
TM 4	3				52.42000		
TM 9	3					52.94000	
TM 6	3						54.33667
Sig.		1.000	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.

ตารางที่ ผ-31 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุภาคลิเธียมของสารสกัดภายในเซลล์ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วยเฮกเซน

Descriptives

DPPH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TM 4	3	54.58333	.514717	.297172	53.30471	55.86196	53.990	54.910
TM 5	3	54.78333	.219393	.126667	54.23833	55.32834	54.530	54.910
TM 6	3	59.42667	.028868	.016667	59.35496	59.49838	59.410	59.460
TM 7	3	56.12333	.540401	.312001	54.78090	57.46576	55.500	56.460
TM 8	3	52.21000	1.338058	.772528	48.88608	55.53392	51.210	53.730
TM 9	3	51.99333	1.891675	1.092159	47.29415	56.69251	50.670	54.160
Total	18	54.85333	2.714538	.639823	53.50343	56.20324	50.670	59.460

ANOVA

DPPH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	113.319	5	22.664	22.759	.000
Within Groups	11.950	12	.996		
Total	125.268	17			

DPPH

Isolated	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan ^a TM 9	3	51.99333		
TM 8	3	52.21000		
TM 4	3		54.58333	
TM 5	3		54.78333	
TM 7	3		56.12333	
TM 6	3			59.42667
Sig.		.795	.097	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-32 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมลอิสระของสารสกัดเชื้อเหตที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วยอะซีโตน

Descriptives

DPPH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Holland	3	62.84333	.184752	.106667	62.38438	63.30228	62.630	62.950
Srida	3	55.20667	.063509	.036667	55.04890	55.36443	55.170	55.280
Rachinee	3	72.29667	.817333	.471887	70.26630	74.32703	71.800	73.240
Total	9	63.44889	7.426007	2.475336	57.74075	69.15702	55.170	73.240

ANOVA

DPPH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	439.752	2	219.876	934.053	.000
Within Groups	1.412	6	.235		
Total	441.165	8			

DPPH

Tomato		N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	Srida	3	55.20667		
	Holland	3		62.84333	
	Rachinee	3			72.29667
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-33 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมลอิสระของสารสกัดเชื้อเห็ดที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วยเอทานอล 95%

Descriptives

DPPH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Holland	3	53.24333	.324705	.187469	52.43672	54.04995	52.870	53.460
Srida	3	49.99333	.109697	.063333	49.72083	50.26583	49.870	50.080
Rachinee	3	50.29667	1.112759	.642452	47.53242	53.06091	49.600	51.580
Total	9	51.17778	1.660149	.553383	49.90167	52.45388	49.600	53.460

ANOVA

DPPH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19.337	2	9.669	21.396	.002
Within Groups	2.711	6	.452		
Total	22.049	8			

DPPH

		N	Subset for alpha = 0.05	
Tomato			1	2
Duncan ^a	Srida	3	49.99333	
	Rachinee	3	50.29667	
	Holland	3		53.24333
	Sig.		.600	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-34 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุภาคของสารสกัดเชื้อเห็ดที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่สกัดด้วยอะซีโตน

Descriptives

DPPH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Holland	3	53.83333	.105040	.060645	53.57240	54.09427	53.730	53.940
Srida	3	56.31667	.028868	.016667	56.24496	56.38838	56.300	56.350
Rachinee	3	55.92667	.232881	.134454	55.34816	56.50517	55.660	56.090
Total	9	55.35889	1.163684	.387895	54.46440	56.25338	53.730	56.350

ANOVA

DPPH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.701	2	5.351	242.839	.000
Within Groups	.132	6	.022		
Total	10.833	8			

DPPH

		N	Subset for alpha = 0.05		
Tomato			1	2	3
Duncan ^a	Holland	3	53.83333		
	Rachinee	3		55.92667	
	Srida	3			56.31667
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ผ-35 แสดงผลทางสถิติในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมลอิสระของสารสกัดเชื้อเห็ดที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดด้วย
เอทานอล 95%

Descriptives

DPPH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Holland	3	54.55000	.295973	.170880	53.81476	55.28524	54.210	54.750
Srida	3	55.35333	.109697	.063333	55.08083	55.62583	55.230	55.440
Rachinee	3	60.07000	.223383	.128970	59.51509	60.62491	59.890	60.320
Total	9	56.65778	2.589927	.863309	54.66698	58.64857	54.210	60.320

ANOVA

DPPH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	53.363	2	26.681	535.292	.000
Within Groups	.299	6	.050		
Total	53.662	8			

DPPH

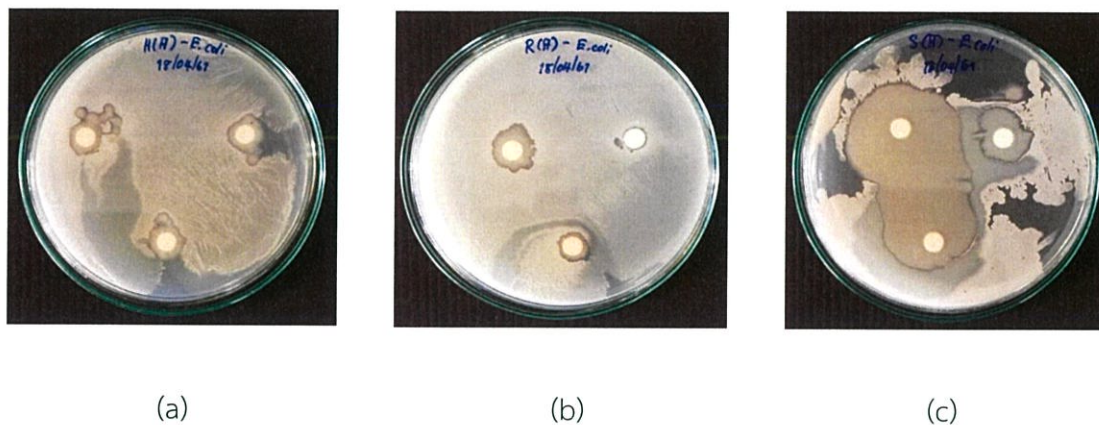
		N	Subset for alpha = 0.05		
Tomato			1	2	3
Duncan ^a	Holland	3	54.55000		
	Srida	3		55.35333	
	Rachinee	3			60.07000
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

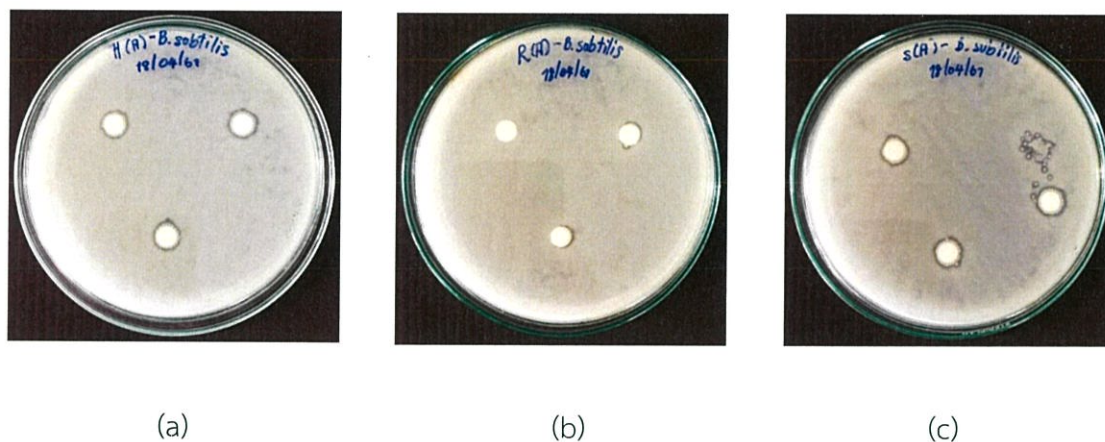
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ภาคผนวก ฉ

ผลการทดลองการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารสกัดมะเขือเทศและสายพันธุ์มะเขือเทศ



รูปที่ ผ-2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* จากสารสกัดมะเขือเทศฮอลแลนด์ (a), สารสกัดมะเขือเทศราซินี (b) และสารสกัดมะเขือเทศสีดา (c)



รูปที่ ผ-3 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* จากสารสกัดมะเขือเทศฮอลแลนด์ (a), สารสกัดมะเขือเทศราซินี (b) และสารสกัดมะเขือเทศสีดา (c)



(a)



(b)



(c)

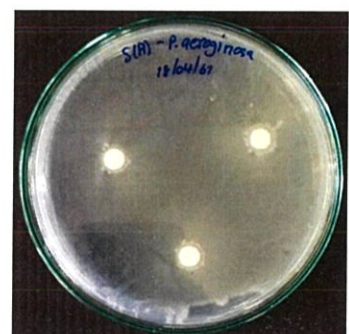
รูปที่ ผ-4 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* จากสารสกัดมะเขือเทศฮอลแลนด์ (a), สารสกัดมะเขือเทศราชินี (b) และสารสกัดมะเขือเทศสีดา (c)



(a)

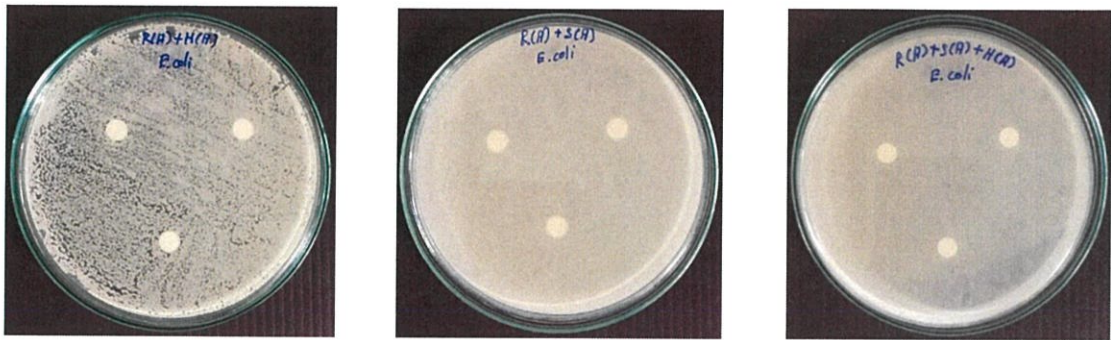


(b)



(c)

รูปที่ ผ-5 การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P.aeruginosa* จากสารสกัดมะเขือเทศฮอลแลนด์ (a), สารสกัดมะเขือเทศราชินี (b) และสารสกัดมะเขือเทศสีดา (c)



(a)

(b)

(c)

รูปที่ ผ-6 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* จากส่วนผสมสารสกัดมะเขือเทศฮอลแลนด์และราซินี (a), สารสกัดมะเขือเทศราซินีและสீดา (b), สารสกัดมะเขือเทศราซินีฮอลแลนด์ และสี้ดา (c)

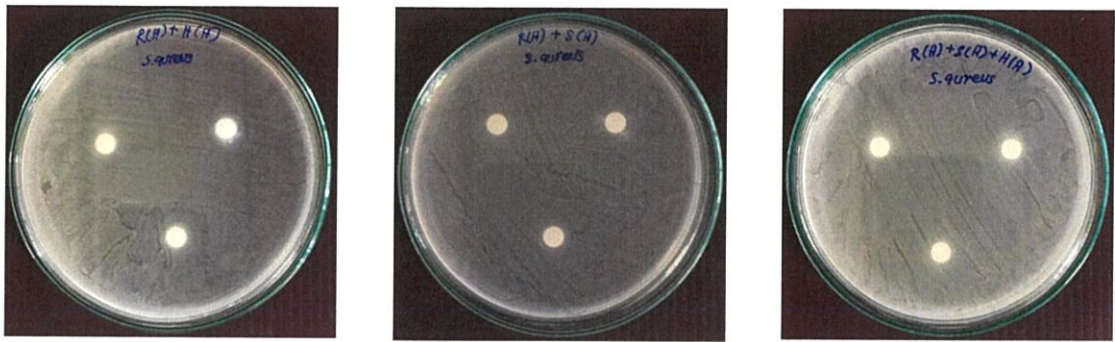


(a)

(b)

(c)

รูปที่ ผ-7 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* จากส่วนผสมสารสกัดมะเขือเทศฮอลแลนด์และราซินี (a), สารสกัดมะเขือเทศราซินีและสี้ดา (b), สารสกัดมะเขือเทศราซินีฮอลแลนด์ และสี้ดา (c)



(a)

(b)

(c)

รูปที่ ผ-8 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* จากส่วนผสมสารสกัดมะเขือเทศฮอลแลนด์และราชินี (d), สารสกัดมะเขือเทศราชินีและสีดา (e), สารสกัดมะเขือเทศราชินี ฮอลแลนด์ และสีดา (f)

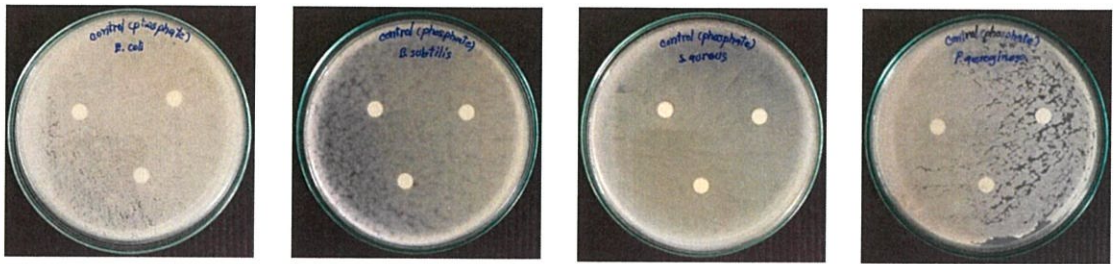


(a)

(b)

(c)

รูปที่ ผ-9 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* จากส่วนผสมสารสกัดมะเขือเทศฮอลแลนด์และราชินี (d), สารสกัดมะเขือเทศราชินีและสีดา (e), สารสกัดมะเขือเทศ ราชินี ฮอลแลนด์ และสีดา (f)



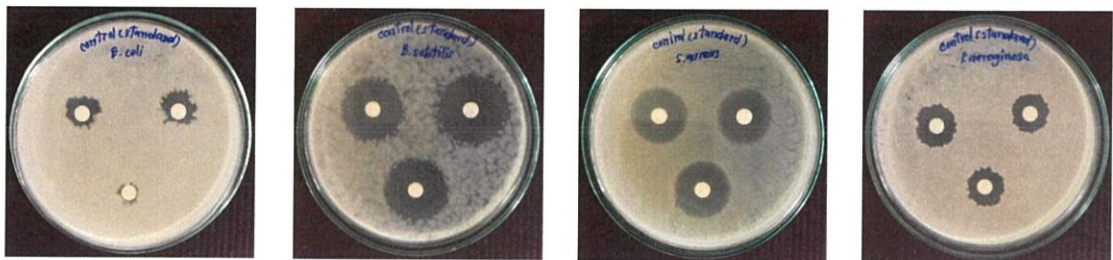
(a)

(b)

(c)

(d)

รูปที่ ผ-10 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (a), *B. subtilis* (b), *S. aureus* (c) และ *P. aeruginosa* (d) ของตัวควบคุมเชิงลบ (Phosphate buffer)



(a)

(b)

(c)

(c)

รูปที่ ผ-11 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (a), *B. subtilis* (b), *S. aureus* (c) และ *P. aeruginosa* (d) ของตัวควบคุมเชิงบวก (Streptomycin)



รูปที่ ผ-12 มะเขือเทศพันธุ์ฮอลแลนด์ พันธุ์สีดำ และพันธุ์ราชินี

ภาคผนวก ข

การจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยวิธีการวิเคราะห์ 16s rDNA

จากการนำแบคทีเรียไปทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบส 16s rDNA โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) สามารถจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย TM 21 ได้ว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Bacillus halotolerans*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus tequilensis* ที่ระดับ 99.93%

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

Chromosomal DNA was extracted from cells grown in Nutrient agar for 24h using the method described by (Marmur, 1961). The 16S rRNA gene of strain was amplified by PCR with universal primers 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGTTACCTGTTACGACTT-3'), purified by the DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Germany), sequenced and analyzed as described by (Yukphun et al., 2004). PCR condition was as follows; 94 °C for 3 min, 30 cycles of 94 °C for 60 s, 55 °C for 60 s, 72 °C for 2 min with a final extension at 72 °C for 3 min. Multiple sequence alignment was done with the program CLUSTAL X version 1.83 (Thompson et al, 1997). Alignment gaps and unidentified bases were eliminated. Distance matrices for the aligned sequences were calculated using the two-parameter method of (Kimura 1980) and identified in EzBioCloud database (Yoon et. al. 2017).

(<https://www.ezbiocloud.net/resources/16s> download.)

การวิเคราะห์ S816 ในฐานข้อมูล

The screenshot shows the EzBioCloud interface for sequence S816. The 'Sequence details' section includes:

- Full name: S816
- Length: 1,368 bp
- Orientation: Forward
- Completeness: 92.9%
- Database ver.: 201710

Below this, there is a section for 'List of hits from EzBioCloud 16S database' with a table header:

Hit taxon name	Hit strain name	Accession	Similarity	Diff/Total nt	Hit taxonomy	Completeness (%)
----------------	-----------------	-----------	------------	---------------	--------------	------------------

List of hits from EzBioCloud 16S database

Tasks	Hit taxon name	Hit strain name	Accession	Similarity	Diff/Total nt	Hit taxonomy	Completeness (%)
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus halotolerans</i>	ATCC 25096(T)	LPVF01000003	99.93	1/1368	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Bacillus	100.0
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	NRRL B-23049(T)	CP002905	99.93	1/1368	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Bacillus;Bacillus subtilis	100.0
<input type="checkbox"/>	<i>Bacillus tequilensis</i>	KCTC 13622(T)	AYT001000043	99.93	1/1368	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Bacillus	100.0

ข้อมูล Sequence ของ Isolate TM21 (Lab code S816)

ความยาวของ Sequence = 1,368 bp

TTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAG
 ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAAC
 ATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT
 AATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCT
 GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGA
 ACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
 GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGG
 CTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA
 ACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAA
 AGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG
 TGTTAGGGGGTTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC
 GGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
 TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGG
 ACGTCCCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT
 GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACT
 CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAA
 GCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGA
 ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
 CGTCACACCACGAGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGA



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 28 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2561

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว ชลธิชา นพมงคล รหัสประจำตัว 57050816

นาย/นาง/นางสาว ชลธิชา คุนงลา รหัสประจำตัว 57050817

นาย/นาง/นางสาว รหัสประจำตัว

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา วิศวกรรมศาสตร์

ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากมะเขือเทศสีดาที่สร้างสารเมทาบอลิต์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

ชื่อภาษาอังกฤษ Identification of Isolated Bacteria from Lycopersicon esculentum Mill. Producing High Antioxidant Activity Metabolites.

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่มีได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา ฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักษราวินิจฉัย 2.7 % หรือโปรแกรม Turnitin %

ลงชื่อ ชลธิชา นพมงคล

ลงชื่อ ชลธิชา คุนงลา

ลงชื่อ

(นางสาวชลธิชา นพมงคล)

(นางสาวชลธิชา คุนงลา)

()

นักศึกษา

นักศึกษา

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ศ. / รศ. / ผศ. / ดร. / อ..... ชหาวิดิ กลุณห์หัต..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ..... อภวดี ก่อตพณ..... ลงชื่อ..... ลงชื่อ.....

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม