

ฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบต้นแก้ว  
(*Murraya paniculata* L.)

BIOLOGICAL ACTIVITIES FROM ORANGE JASMINE  
(*Murraya paniculata* L.) CRUDE EXTRACT

นัชชา บุญโยประการ  
ศิริลักษณ์ อังศุสิงห์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2560

ฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบต้นแก้ว  
(*Murraya paniculata* L.)

BIOLOGICAL ACTIVITIES FROM ORANGE JASMINE  
(*Murraya paniculata* L.) CRUDE EXTRACT

นัชชา บุญโยประการ  
ศิริลักษณ์ อังศุสิงห์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2560

BIOLOGICAL ACTIVITIES FROM ORANGE JASMINE  
(*Murraya paniculata* L.) CRUDE EXTRACT

NATCHA BOONYOPRAKAN  
SIRILAK ANGSUSING


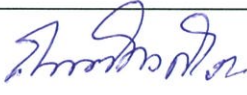

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE  
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)  
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงการพิเศษ ฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบต้นแก้ว (*Murraya paniculata* L.)  
Biological Activities From Orange jasmine  
(*Murraya paniculata* L.) Crude Extract

ชื่อนักศึกษา นายรัชชา บุญโยประการ รหัสนักศึกษา 57050839  
นางสาวศิริลักษณ์ อังศุสิงห์ รหัสนักศึกษา 57050900

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชา ชีววิทยา  
ปีการศึกษา 2560  
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.วรกฤต วรรณนทกิจ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้  
โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ประธานกรรมการ	
ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการ	
ผศ.ดร.วรกฤต วรรณนทกิจ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	ฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบต้นแก้ว ( <i>Murraya paniculata</i> L.)		
ชื่อนักศึกษา	นายรัชชา	บุญโยประการ	รหัสนักศึกษา 57050839
	นางสาวศิริลักษณ์	อังศุสิงห์	รหัสนักศึกษา 57050900
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง		
ปีการศึกษา	2560		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรกฤต วรรณทกิจ		

### บทคัดย่อ

ต้นแก้ว เป็นพืชเป็นที่ถูกนำมาใช้รักษาโรคตั้งแต่อดีต มีการนำมาประยุกต์เป็นอาหารเพื่อสุขภาพ ใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสในอาหาร และมีการนำมาใช้เป็นเครื่องสำอาง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว สารสกัดหยาบจากดอก ใบ และเปลือก ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และความเข้มข้นของสารที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) วิเคราะห์ลายพิมพ์โครมาโทแกรม และองค์ประกอบทางเคมี ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดเทียบเท่ากับ  $70.81 \pm 0.31$  มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ในขณะที่สารสกัดหยาบจากใบมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดเทียบเท่ากับ  $115.73 \pm 1.18$  มิลลิกรัมแควอซิตินต่อกรัมสารสกัด ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 มากที่สุด และสารสกัดหยาบเปลือกมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 9341, *Escherichia coli* ATCC 1261, *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp. และ Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) มากที่สุด โดยสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วน มีค่า MIC ต่อเชื้อ *M. luteus* TISTR 9341 ต่ำสุดเท่ากันที่ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อีกทั้งยังพบว่าสารสกัดหยาบใบแก้ว มีค่า MBC ต่อเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ต่ำสุดเท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบจากดอกและเปลือก มีค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 ต่ำสุดเท่ากันที่ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์ลายพิมพ์โครมาโทแกรม พบว่าสารสกัดหยาบจากดอก มีแถบสารสำคัญจำนวน 3 แถบ ตำแหน่งค่า Rf เท่ากับ 0.31, 0.43 และ 0.75 ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากใบ มีแถบสารสำคัญจำนวน 3 แถบ ตำแหน่งค่า Rf เท่ากับ 0.73, 0.82, และ 0.85 ตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากเปลือก มีแถบสารสำคัญจำนวน 3 แถบ ตำแหน่งค่า Rf เท่ากับ 0.39, 0.75 และ 0.85 ตามลำดับ นอกจากนี้การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ของสารสกัดหยาบจากดอก ใบ และเปลือก พบองค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกัน 6 ชนิด ได้แก่ 2-methoxy-4-vinylphenol, 2 H-1-benzopyran-2-one, Hexadecanoic acid,

Hexadecanamide, murrialongin และ 9-Octadecenamide จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบและเปลือกของต้นแก้วมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าสารสกัดหยาบจากดอกแก้ว ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านเภสัชกรรม การแพทย์ และทางการเกษตรต่อไป

**คำสำคัญ :** ต้นแก้ว สารสกัดหยาบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

<b>Title</b>	Biological Activities From Orange jasmine ( <i>Murraya paniculata</i> L.) Crude Extract
<b>Students</b>	Mr. Natcha Boonyoprakan Student ID 57050839 Miss Sirilak Angsusing Student ID 57050900
<b>Degree</b>	Bachelor of Science (Microbiology)
<b>Department</b>	Biology
<b>Faculty</b>	Science
<b>University</b>	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
<b>Academic Year</b>	2017
<b>Advisor</b>	Asst.Prof.Dr.Worakrit Worananthakij

### Abstract

*Murraya paniculata* (L.) have been used as medicines. It has been adjusted to application as healthy food. It has been included in a flavoring agent in foods and cosmetics. Thus, the aims of this study relate to evaluate the biological activities and analyze the chemical compositions from flower, leaves and barks crude extract. The crude extracts from flower, leaves, and barks were analyzed the antioxidant activity, total phenolic content, total phenolic content, antibacterial activity, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) chromatographic fingerprint determination and the chemical compositions. The results revealed that, the highest antioxidant activity was barks crude extract ( $IC_{50} = 1.36$  mg/ml). The highest content of phenolic was barks crude extract ( $70.81 \pm 0.31$  mgGAE/g extract) and the highest content of flavonoid was leaves crude extracts ( $115.73 \pm 1.18$  mgQUE/g extract). Leaves crude extract showed the highest antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Barks crude extracts showed the highest antibacterial activity on *Micrococcus luteus* TISTR 9341, *Escherichia coli* ATCC 1261, *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp. and Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The MIC value of all crude extracts against *M. luteus* TISTR 9341 were 12.5 mg/ml. The MBC value of leaves crude extracts against *B. subtilis* ATCC 6633 was 12.5 mg/ml. While, the MBC value of flower, bark crude extracts and MBC against *S. aureus* TISTR 1466 were 25 mg/ml. Chromatographic fingerprint of crude extracts was demonstrated 3 main bands from flower crude extracts with active ingredient at  $R_f = 0.31, 0.42, 0.75$ ; leaves crude extracts with active ingredient at  $R_f = 0.73, 0.82, 0.85$  and bark crude extracts with active ingredient at  $R_f = 0.39, 0.75, 0.85$ . In addition, the chemical composition of flower, leaves and stem barks crude extracts showed the major compound included 2 - methoxy-4 - vinylphenol, 2 H-1 - benzopyran-2 - one, Hexadecanoic acid,

Hexadecanamide, murrialongin and 9-Octadecenamide from all part crude extracts. These results indicated that leaves and bark crude extracts exhibited bioactivities higher than flower crude extract and it can be applied in pharmacy, medicine and agriculture.

**Keywords:** *Murraya paniculata* L., Crude extract, Antioxidant, Antimicrobial

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการพิเศษในหัวข้อเรื่อง ฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบต้นแก้ว (*Murraya paniculata* L.) โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากทางผู้จัดทำโครงการพิเศษได้รับความความกรุณาเป็นอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรภฤตวรรณทกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่คอยให้คำปรึกษาในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ให้ความรู้และคำแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนถึงติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินการวิจัย ให้ความเรียบร้อยและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้นด้วย นอกจากนี้ผู้จัดทำโครงการพิเศษต้องขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ประธานกรรมการสอบ และ ดร. กานต์ วงศาริยะ กรรมการสอบ ที่ให้ความกรุณาในการให้คำแนะนำ แก้ไขปรับปรุงข้อบกพร่องของโครงการพิเศษเล่มนี้ให้ถูกต้อง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชา ความรู้ และประสบการณ์ให้กับผู้จัดทำโครงการพิเศษตลอดหลักสูตรการศึกษา

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์ ช่วยเหลือ แนะนำ ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในโครงการพิเศษ

ขอขอบพระคุณ คุณอรุณรัตน์ สิงห์สุระ และคุณปริญญา วิวัฒน์ สำหรับการสนับสนุนต้นแก้วที่ใช้ในโครงการพิเศษ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัวอังศุสิงห์ และครอบครัวบุญโยประการ เป็นอย่างสูงที่มีส่วนช่วยเป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในการทำโครงการพิเศษนี้สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดี

นัชชา บุญโยประการ  
ศิริลักษณ์ อังศุสิงห์

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฎ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 แก้ว ( <i>Murraya paniculata</i> L.) .....	3
2.2 สารสกัดหยาบ.....	4
2.3 อนุมูลอิสระ.....	6
2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ.....	7
2.5 แบคทีเรียก่อโรคทั่วไป.....	9
2.6 แบคทีเรียก่อโรคในปลา.....	11
2.7 แบคทีเรียดีดื้อยา.....	11
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	12
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>16</b>
3.1 พืชที่ใช้ในการทดสอบ.....	16
3.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ.....	16
3.3 อุปกรณ์.....	16
3.4 สารเคมี.....	17
3.5 การสกัดสารสกัดหยาบและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	18
3.5.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดหยาบจากพืช.....	18
3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ.....	18
3.5.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion.....	29
3.5.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งแบคทีเรีย.....	20
3.5.5 การหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย.....	20
3.5.6 การวิเคราะห์ลายพิมพ์โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ชนิดแผ่นบาง (Thin-layer Chromatography).....	21

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ.....	21
3.5.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	21
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>22</b>
4.1 ร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบ.....	22
4.2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH .....	22
4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด .....	24
4.4 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด .....	25
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar well diffusion.....	26
4.6 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งจุลินทรีย์ และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์.....	36
4.7 ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบาง .....	38
4.8 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS).....	39
<b>บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>45</b>
5.1 สรุป.....	45
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	46
เอกสารอ้างอิง.....	47
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	55
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายเคมีที่ใช้ในการทดสอบ.....	56
ภาคผนวก ค ภาพสถานที่เก็บตัวอย่างพืช.....	58
ภาคผนวก ง ข้อมูลผลการทดสอบสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และผลการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์.....	59
ภาคผนวก จ การคำนวณและตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	66

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ร้อยละของปริมาณสารสกัด ที่ได้จากสารสกัดหยาบ.....	22
4.2 ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบ.....	23
4.3 ค่าการยับยั้งอนุมูล DPPH ที่ 50% (IC <sub>50</sub> ) ของสารสกัดหยาบ.....	23
4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบ.....	24
4.5 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบ.....	25
4.6 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ.....	26
4.7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration).....	36
4.8 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC).....	37
4.9 ผลการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS).....	39
ง.1 ค่าดูดกลืนแสงการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบดอกแก้ว.....	59
ง.2 ค่าดูดกลืนแสงการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบใบแก้ว.....	59
ง.3 ค่าดูดกลืนแสงการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว.....	60
ง.4 ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นต่างๆของกรดแอสคอร์บิก.....	60
ง.5 ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบดอกแก้ว.....	62
ง.6 ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบใบแก้ว.....	62
ง.7 ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว.....	62
ง.8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบดอกแก้ว ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใบแก้ว และเปลือกต้นแก้ว ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	63
ง.9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบ.....	63
ง.10 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	63
ง.11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	64
ง.12 ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบ.....	64
ง.13 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานควอซิทินที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	65
จ.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ของความเข้มข้นที่ต่างกัน.....	66
จ.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ของชนิดสารสกัดที่ต่างกัน.....	68

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
จ.3 การจัดกลุ่มของข้อมูลร้อยละการยับยั้งอนุโมล DPPH ของสารสกัดหยาบ ในแต่ละความเข้มข้น.....	69
จ.4 การจัดกลุ่มของข้อมูลร้อยละการยับยั้งอนุโมล DPPH ของสารสกัดหยาบ ในแต่ละชนิด.....	71
จ.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยออกแบบ การทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์.....	72
จ.6 การจัดกลุ่มของข้อมูลปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Duncan ที่ระดับ ความเชื่อมั่น.....	72
จ.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยออกแบบ การทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์.....	73
จ.8 การจัดกลุ่มของข้อมูลปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยวิธี Duncan ที่ระดับ ความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0.....	73
จ.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 1446 โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์.....	73
จ.10 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 1446 ของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0.....	74
จ.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ <i>Micrococcus luteus</i> TISTR 9341 โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์.....	75
จ.12 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Micrococcus luteus</i> TISTR 9341 ของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0.....	76
จ.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์.....	77
จ.14 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 ของ สารสกัดหยาบ ดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0.....	78
จ.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ <i>Escherichia coli</i> ATCC 1261 โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์.....	79
จ.16 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Escherichia coli</i> ATCC 1261 ของ สารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0.....	80
จ.17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853 โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์.....	81

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
จ.18 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 ของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Ducan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0.....	82
จ.19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas</i> sp. โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์.....	82
จ.20 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas</i> sp. ของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Ducan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0.....	83
จ.21 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Streptococcus</i> sp. ของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Ducan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0.....	84
จ.22 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Streptococcus</i> sp. ของสารสกัดหยาดดอก ใบและเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Ducan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0.....	85
จ.23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ MRSA โดย ออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์.....	85
จ.24 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA ของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Ducan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0.....	86

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแก้ว.....	3
2.2 ชุดชอกท์เลต.....	5
2.3 แสดงโครงสร้างของเบต้าแคโรทีน.....	7
2.4 แสดงโครงสร้างของแอสตาแซนธิน.....	8
2.5 แสดงโครงสร้างของโมเลกุลของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids).....	9
4.1 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 1466.....	28
4.2 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Micrococcus luteus</i> TISTR 9341.....	29
4.3 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	30
4.4 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> ATCC 1261.....	31
4.5 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	32
4.6 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> sp.....	33
4.7 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Streptococcus</i> sp.....	34
4.8 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ Methicilin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> .....	35
4.9 ผลวิเคราะห์ลายพิมพ์โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบ.....	38
4.10 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบดอกแก้ว.....	42
4.11 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบแก้ว.....	42
4.12 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว.....	43
ค.1 พื้นที่เก็บตัวอย่างพืช.....	58
ง.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละในการต้านอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	61
ง.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละในการต้านอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ.....	61
ง.3 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร.....	64
ง.4 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานควอซิตินและค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร.....	65

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบันโลกมีการเปลี่ยนแปลงไปสู่ยุคโลกาภิวัตน์ ความก้าวหน้าทางเศรษฐกิจและเทคโนโลยี ทำให้เกิดการขยายตัวของชุมชนเมืองและอุตสาหกรรมมากขึ้น ในขณะเดียวกันสภาพสิ่งแวดล้อมกลับเสื่อมโทรมลงเป็นอย่างมาก เกิดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมมากมาย เช่น มลพิษทางอากาศ ที่มาจากยานพาหนะ การคมนาคม รวมถึงโรงงานอุตสาหกรรม ก่อให้เกิดอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ หรืออาจก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค โดยอนุมูลอิสระจะทำลายโครงสร้างและการทำหน้าที่ของเซลล์ ทำให้เกิดความผิดปกติภายในร่างกาย (บุหรัน, 2556) นอกจากนี้สิ่งปฏิกูลและขยะมูลฝอยที่ปล่อยมาจากชุมชน โรงพยาบาล โรงงานอุตสาหกรรม รวมถึงการใช้สารกำจัดศัตรูพืชจากการทำเกษตรกรรม ก่อให้เกิดมลพิษทางน้ำและดิน ส่งผลให้มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และสารพิษ ซึ่งเป็นผลเสียต่อคุณภาพชีวิต ทำให้มีการเกิดโรคหรือการเจ็บป่วยมากขึ้น จึงต้องมีการคิดค้นวิธีการและยาในการรักษาป้องกันการเกิดโรค ซึ่งยาปฏิชีวนะเป็นสิ่งจำเป็นต่อการรักษาเป็นอย่างมาก แต่เมื่อใช้ยาในปริมาณมากเป็นระยะเวลาอันยาวนาน อาจมีการแพ้หรือมีการดื้อยาของยา และเชื้อที่ได้รับยานั้นอาจมีการพัฒนาเกิดการดื้อยาขึ้น จากรายงานของสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข เกี่ยวกับ สถานการณ์เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะในคนไทยในรอบ 10 ปี (พ.ศ. 2543-2554) พบว่า แต่ละปีมีผู้ป่วยติดเชื้อดื้อยา มากกว่า 100,000 คน เสียชีวิต 30,000 คน (ใจพร, 2555) นอกจากนี้แล้วยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะรักษาโรคในอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์อีกด้วย ซึ่งอาจเกิดการดื้อยาในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ส่งผลเสียต่อผู้บริโภค ปัจจุบันทั่วโลกจึงหันมาให้ความสนใจศึกษาและวิจัยพืชสมุนไพรเพื่อผลิตเป็นยารักษาโรคและอาหารเสริมสุขภาพกันมากขึ้น มีการเลือกใช้พืชสมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติทดแทนสารเคมีหรือยาปฏิชีวนะในคน และอุตสาหกรรมผลิตสัตว์ เนื่องจากสารจากธรรมชาติความเสี่ยงน้อยกว่ายาที่สังเคราะห์จากสารเคมี เพื่อลดผลเสียที่มีต่อสุขภาพ ลดการสูญเสียทางด้านเกษตรกรรมและทางด้านเศรษฐกิจ (นวลจันทร์, 2555)

พืชสมุนไพรประกอบด้วยสารพิษเคมีหลายชนิด อาทิ กลุ่มสารโพลีฟีนอล (polyphenol) เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สารแทนนิน (tannin) เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) แอลคาลอยด์ (alkaloids) วิตามินหลากหลายชนิด สารเคอร์คิวมิน (curcumin) และน้ำมันหอมระเหย (essential oils) ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการป้องกันโรค ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ลดการอักเสบ และต้านอนุมูลอนุมูลอิสระ (นวลจันทร์, 2555) จึงมีการวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ เพื่อความเหมาะสมในการนำไปใช้รักษาโรค

ต้นแก้ว *Murraya paniculata* (L.) ชื่อสามัญ คือ Orange jasmine จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae เป็นพืชพื้นเมืองในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นิยมปลูกเป็นไม้ประดับตกแต่ง มีการนำไปใช้รักษาโรค และประยุกต์ใช้ในการแต่งกลิ่นรสของอาหารเพื่อสุขภาพ เช่น ส่วนของเปลือกต้นแก้วสามารถใช้แก้พิษงูกัด ส่วนใบของต้นแก้ว มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีการนำใบและรากของต้นแก้วใช้ในการรักษาอาการปวดท้อง ปวดฟัน โรคเกาต์ โรคท้องร่วง โรคไขข้อ

บรรเทาอาการไอ โรคฮีสที่เรีย รักษาบาดแผล การปวดเมื่อยตามข้อและร่างกาย มีการวิจัยว่าสารสกัดจากต้นแก้วมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดที่ได้จากต้นแก้วพบว่ามีความสูง และมีฟลาโวนอยด์มากกว่า 70 ชนิด ส่งผลให้สารสกัดจากต้นแก้วสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ (Zhu et al., 2015) และพบว่าสารคูมารินในสารสกัดจากต้นแก้วยังมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Aziz et al., 2010) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นแก้วจึงได้รับการสนใจในทางการแพทย์

โครงการพิเศษนี้จึงทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหายาบจากส่วนต่างๆ ของต้นแก้ว ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั่วไป แบคทีเรียก่อโรคในปลา แบคทีเรียดื้อยา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ของสารสกัดหายาบจากส่วนต่างๆของต้นแก้ว เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ลดปัญหาการเกิดโรคติดเชื้อในปลาต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

- 1) เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดหายาบดอก ใบ และเปลือก ต้นแก้ว
- 2) เพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทั่วไป แบคทีเรียก่อโรคในปลา และแบคทีเรียดื้อยา ของสารสกัดหายาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว
- 3) เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหายาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

## 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเก็บตัวอย่าง ดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว จากบริเวณหมู่ 3 ตำบลชากไทย อำเภอลำปาง จังหวัดลำปาง และนำมาทำการสกัดเป็นสารสกัดหายาบ โดยใช้เอทานอล 70% เป็นตัวทำละลาย เพื่อทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั่วไป ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Micrococcus luteus* TISTR 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 1261, และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 แบคทีเรียก่อโรคในปลา ได้แก่ *Pseudomonas* sp. และ *Streptococcus* sp. แบคทีเรีย Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) วิเคราะห์ลายพิมพ์โครมาโทแกรมของสารสกัดหายาบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบางและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหายาบที่ได้จากส่วนต่างๆของต้นแก้ว ด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบถึงประสิทธิภาพของสารสกัดหายาบจากดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในการต้านอนุมูลอิสระ
- 2) ทราบถึงประสิทธิภาพของสารสกัดหายาบจากดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั่วไป แบคทีเรียก่อโรคในปลา และแบคทีเรียดื้อยา
- 3) ทราบถึงองค์ประกอบและปริมาณสารทางเคมีที่มีอยู่ในสารสกัดหายาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว เพื่อเป็นข้อมูลในการวางแผนทางการรักษา และป้องกันโรคติดเชื้อในปลาต่อไป

## บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 แก้ว (*Murraya paniculata* L.)

#### 2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Murraya paniculata* (L.) Jack.

วงศ์: Rutaceae

ชื่อสามัญ: Orange jasmine, Andaman satin wood,  
Chinese box tree

ชื่ออื่นๆ: กะมุNING (มลายู-ปัตตานี) แก้วขาว (ภาคกลาง)  
แก้วซีโก้ (ยะลา) แก้วพริก ตะไหลแก้ว  
(ภาคเหนือ) แก้วลาย (สระบุรี) จ้าพริก (ลำปาง)

แก้ว เป็นไม้ต้นขนาดเล็ก สูงได้ถึง 10 เมตร ไม่ผลัดใบ ใบเป็นใบประกอบ ผิวใบมัน สีเข้มและเป็นมันทั้งสองด้าน ดอก ช่อ ออกเป็นกระจุก สีขาว ร่วงง่าย มีกลิ่นหอมมาก ผลสดกลมรี หรือรูปไข่ ปลายสอบเล็กน้อย ที่เปลือกมีต่อมน้ำมันเห็นได้ชัด กว้าง 5-8 มม. ยาว 0.8-1 ซม. ผลอ่อนสีเขียว ผลสุกสีส้มแดง เมล็ดรูปไข่ปลายสอบ มีขนสั้นๆ อยู่รอบเมล็ด กว้าง 4-6 มม. ยาว 6-9 มม. สีขาวขุ่น มีจำนวน 1-2 เมล็ดต่อผล



รูปที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแก้ว: ใบ (ก) ดอก (ข) ลำต้น (ค) และต้นแก้ว (ง)

ส่วนที่นิยมนำไปใช้ในทางการแพทย์ คือ ใบ ดอก ผลสุก ก้านและราก ส่วนของก้านและใบ เก็บได้ตลอดปี สามารถใช้สดหรือตากแห้งเพื่อเก็บไว้ใช้ได้ ส่วนของราก ควรเก็บในฤดูหนาว ล้างดิน ออกให้สะอาด หั่นเป็นแผ่น ตากแห้งเก็บไว้ใช้สรรพคุณของส่วนประกอบต่างๆ ของต้นแก้ว

มีดังนี้คือ ส่วนของก้านและใบ มีรสเผ็ด ขม ใช้เป็นยาหาระงับปวด แก้ผื่นคันที่เกิดจากความชื้น แก้แผลเจ็บปวดที่เกิดจากการกระทบกระแทก ต้มอมบัวปาก แก้ปวดฟัน ส่วนของราก มีรสเผ็ด และขม ใช้แก้ปวดเอว แก้ผื่นคันเกิดจากชื้น และที่เกิดจากแมลงกัดต่อย ส่วนของใบ ใช้ขับพยาธิตัวตืด แก้โรคบิด แก้ท้องเสีย ส่วนของดอก ช่วยย่อย แก้ไขข้ออักเสบ แก้ไอ เวียนศีรษะ และผลสุก รับประทานเป็นอาหารได้ (วรพัทธ์, 2553)

## 2.2 สารสกัดหยาบ (crude extract)

สารสกัดหยาบ (crude extract) หมายถึง สารสกัดเบื้องต้นที่ได้จากสมุนไพร ซึ่งยังไม่ถึงขั้นเป็นสารบริสุทธิ์ เป็นการใช้กรรมวิธีสกัดไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง หรือต้องผ่านกรรมวิธีผลิตก่อนที่นำไปใช้งาน (อมรรัตน์ และคณะ, 2550) โดยวิธีการสกัดสารสกัดหยาบจากพืชนั้นต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นวิธีการที่ใช้ในการสกัด สารที่ต้องการสกัด หรือแม้กระทั่งการเลือกใช้ตัวทำละลายในการสกัด

### 2.2.1 การสกัดสารสำคัญจากพืช (Extraction)

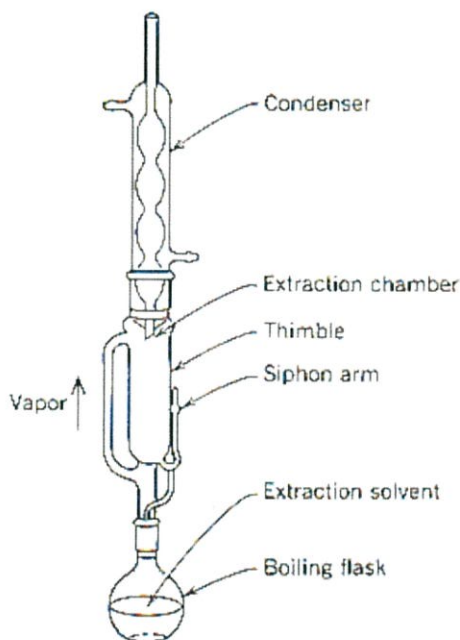
การสกัดสารสำคัญจากพืช ต้องคำนึงถึงตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คุณสมบัติของตัวทำละลายที่ดี ต้องเป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่เราต้องการสกัดได้พอดี ไม่ระเหยยากหรือง่ายเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับกับสารที่เราสกัด ไม่เป็นพิษ ราคาเหมาะสม หลักเกณฑ์เลือกตัวทำละลาย สารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติควมมีขั้วคล้ายคลึงกันละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุดในขณะละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด แรง (force) ที่เกี่ยวข้องในการละลาย โดยสารแต่ละชนิดนั้นมีขั้วแตกต่างกัน (อมรรัตน์ และคณะ, 2550) การสกัดสารจากพืชมีหลายวิธี เช่น

#### 2.2.1.1 การหมัก (Maceration)

การหมัก เป็นการสกัดแบบแช่ในตัวทำละลาย โดยการแช่ของพืชที่ต้องการสกัดกับตัวทำละลายในภาชนะปิด สกัดจนกระทั่งตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบพืชออกมาได้ เป็นเวลา 3-7 วัน หรือตามความเหมาะสม และควรเขย่าเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด หลังจากนั้นจึงกรองแยกกากสมุนไพรออกจากตัวทำละลายสกัด วิธีนี้ข้อดี คือ สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลาย (วารุณี และอัญชลี, 2546)

#### 2.2.1.2 การสกัดด้วยชุดชอกห์เลต (Sohxlet extraction)

การสกัดด้วยชุดชอกห์เลต เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยใช้ตัวทำละลายที่จุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในขวดก้นกลม (flask) ระเหยขึ้นไปกลั่นตัวลงมาใน thimble ซึ่งบรรจุพืชที่ต้องการสกัดไว้ไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extraction chamber สูงจนถึงระดับ น้ำสารสกัดจะไหลลงไปใน flask ซึ่ง flask นี้จะได้รับความร้อนจากแหล่งให้ความร้อน ตัวทำละลายเมื่อกระทบ condenser จะกลั่นตัวลงมาสกัดสารใหม่วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนด้วยจึงอาจให้สารบางชนิดสลายตัว รูปที่ 2.2 (วารุณี และอัญชลี, 2546)



รูปที่ 2.2 ชุดซอกท์เลต

ที่มา: Castro and Priego-Capote (2010)

### 2.2.1.3 การแช่สกัดต่อเนื่อง หรือการสกัดแบบไหลซึม (Percolation)

การแช่สกัดต่อเนื่อง เป็นการสกัดโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Percolator โดยนำตัวอย่างมาหมักกับตัวทำละลายให้พอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงเพื่อให้ฟองตัวเต็มที่และค่อยๆบรรจุตัวอย่างพืชลงใน Percolator จากนั้นเติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือตัวอย่างพืชประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงจึงเริ่มไซเอสารสกัดออกโดยเติมตัวทำละลายเหนือตัวอย่างพืชอย่าให้แห้ง เก็บสารละลายจนเกิดการสกัดสมบูรณ์ ปิดปากเพื่อให้สารสกัดออกมามากที่สุด นำสารสกัดที่รวมได้ทั้งหมดไปกรอง (นงลักษณ์, 2559)

### 2.2.1.4 การสกัดสารด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมด้วยในการสกัด

การสกัดสารด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมด้วยในการสกัดเป็นวิธีที่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงหรืออัลตราโซนิก (Ultrasonic) ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์หรือน้ำในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากพืช เครื่องมือชนิดนี้มีลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอกมีขนาดความยาวและมีคลื่นความถี่ที่แตกต่างกันไป โดยจะปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูงออกมาในตัวพาซึ่งในที่นี้คือน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์ กระบวนการดังกล่าวจะทำให้เกิดฟองก๊าซซึ่งเกิดการหดตัวและขยายตัว เมื่อฟองก๊าซขยายตัวจะดึงสารที่อยู่ภายในวัสดุออกมาละลายในตัวทำละลาย และในขณะที่ฟองก๊าซแตกออกจะเกิดความดันและความร้อนอย่างมากในบริเวณนั้นซึ่งจะมีผลทำให้เนื้อเยื่อของวัสดุฉีกขาดจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้สารที่ต้องการสกัดละลายในตัวทำละลายได้ดีขึ้น การสกัดด้วยวิธีนี้จะมีประสิทธิภาพดีหรือไม่ขึ้นกับปัจจัยหลายประการได้แก่ ความถี่ของคลื่นเสียงที่ใช้ ถ้าใช้ความถี่สูงจะใช้เวลาน้อยในการสกัด สมบัติที่แตกต่างกันของตัวทำละลาย ได้แก่ ความดันไอ ตัวทำละลายที่มีความดันไอสูงสามารถสกัดได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีความดันไอต่ำอุณหภูมิที่ใช้ซึ่งการสกัดเกิดได้ดีเมื่อมีอุณหภูมิสูง และความเข้มของคลื่นเสียงที่ใช้ (ดวงกมล, 2557)

## 2.2.2 การเลือกตัวทำลาย

การเลือกตัวทำลาย การเลือกตัวทำลายในการเตรียมสารสกัดขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลาย องค์ประกอบสำคัญที่ต้องการ และองค์ประกอบอื่นๆ ที่ไม่ต้องการและขึ้นกับชนิดของสารสกัดที่ต้องการเตรียมขึ้นอีก สารละลายอาจเป็นตัวทำลายเดี่ยวหรือเป็นของผสมของตัวทำลายต่างๆ ก็ได้โดยทั่วไปสารละลายควรมีสารต่างๆ ดังนี้คือ 1) มีความสามารถในการละลายองค์ประกอบสำคัญมากที่สุด และไม่ละลายหรือละลาย องค์ประกอบอื่นๆ ได้น้อย 2) สามารถหาง่าย ราคาถูก 3) ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย 4) มีความคงตัวดี 5) ไม่ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบสำคัญในพืชสมุนไพรนอกเหนือจากที่ต้องการจะทำให้เกิด 6) ไม่ระเหยง่าย หรือยากจนเกินไป และไม่ติดไฟง่าย ตัวทำลายที่นิยมใช้ในการเตรียมการสกัดพืชสมุนไพรมีหลายชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกันดังนี้ (ประทุมพร, 2560)

## 2.3 อนุมูลอิสระ (Free radicals)

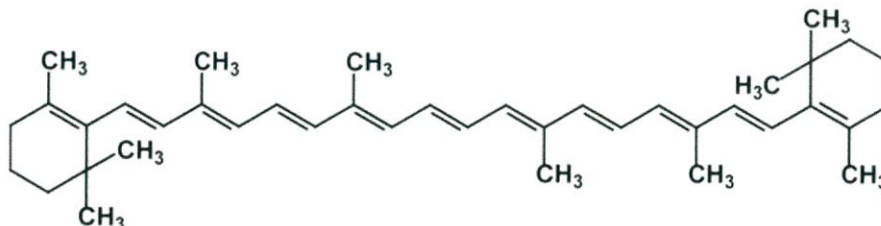
อนุมูลอิสระ (Free radicals) เป็นสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวมากกว่าหรือเท่ากับหนึ่งตัวอยู่บริเวณวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุลจึงทำให้มีความว่องไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในเซลล์ร่างกาย ซึ่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นสาเหตุของการเกิดสารอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติหรืออาจได้รับมาจากสิ่งแวดล้อม อาทิ มลภาวะในอากาศ ควีนบูทรี และแสงอัลตราไวโอเล็ต เป็นต้น แต่โดยส่วนใหญ่แล้วมักเกิดภายในเซลล์ระหว่างการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของออกซิเจนไปยังน้ำซึ่งอนุพันธ์ของออกซิเจน ที่ไวต่อปฏิกิริยา (Reactive oxygen species หรือ ROS) อาทิ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical) ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Superoxide anion) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide) ไฮโปคลอรัส (Hypochlorus) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีกลุ่มอนุพันธ์ไนโตรเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา (Reactive nitrogen species หรือ RNS) อาทิ ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide) และ เปอร์ออกซีไนเตรท์ (Peroxynitrite) เป็นต้น โดยอนุมูลอิสระทั้งกลุ่มของ ROS และ RNS เป็นแหล่งของอนุมูลอิสระที่สำคัญของร่างกาย อนุมูลอิสระส่งผลต่อร่างกายมนุษย์สองด้านคือ กลไกการทำงานของร่างกายและการก่อให้เกิดโรคนั้นคืออนุมูลอิสระจะเกิดกลไกในการควบคุมการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์หรือเป็นสารสร้างภูมิคุ้มกัน ซึ่งการผลิตอนุมูลอิสระเหล่านี้จะถูกควบคุมโดยสารต้านอนุมูลอิสระรวมถึงเอนไซม์ภายในเซลล์ อาทิ กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase) ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase) และสารประกอบมวลโมเลกุลต่ำเช่น วิตามินอีในถั่ว ธัญพืช งา ข้าวกล้อง รำ วิตามินซีในผลไม้และผักสด เป็นต้น (Evans and Halliwell, 2001) อีกทั้งอนุมูลอิสระสามารถก่อโรคต่างๆ ภายในร่างกาย อาทิ โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรครูมาตอยด์ และโรคซาร์ เป็นต้น เนื่องจากถ้าอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลภายในร่างกายอาจส่งผลทำให้การทำงานของสารชีวโมเลกุลภายในร่างกายบกพร่องได้ อาทิ เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ สร้างพันธะโควาเลนต์กับโปรตีนทำให้โปรตีนทำงานผิดปกติ เป็นต้น จึงเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหรือเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคร้ายหลายชนิดแก่ร่างกายมนุษย์ได้ (สุกัญญา, 2555)

## 2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidance)

ผัก ผลไม้ และพืชสมุนไพร ส่วนใหญ่เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ (สุกัญญา, 2555) หากร่างกายไม่สามารถควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในปริมาณปกติที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายได้ร่างกายจะมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระ 2 วิธี คือ ใช้เอนไซม์ต่างๆในร่างกาย อาทิ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase หรือ SOD) และการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระมีหน้าที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจึงส่งผลให้สามารถยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระ (Frankel and Meyer, 2000) สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติ เช่น

### 2.4.1 แคโรทีน (Carotene)

แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) แบ่งออกได้เป็นสองกลุ่ม คือ แคโรทีน (Carotene) และแซนโทฟิลล์ (Xanthophyll) ซึ่งในทางอุตสาหกรรมแคโรทีนอยด์ถูกใช้เป็นส่วนให้สีเหลืองจากธรรมชาตินิยมใช้อาหารสัตว์และอาหารบริโภค เช่น เนยเทียม เครื่องดื่ม ลูกอม ขนมอบ ผลิตภัณฑ์นม และผลิตภัณฑ์ไข่ เป็นต้น (พัชรินทร์, 2551) โดยเบต้าแคโรทีน (batacarotene) จัดอยู่ในกลุ่มแคโรทีนที่เป็นสารสีเหลืองสัมผัสได้มากในแครอทนั้นมีความสำคัญมากจึงเนื่องจากเบต้าแคโรทีนมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ อันเป็นสารเพิ่มภูมิคุ้มกันของมนุษย์ จึงทำให้ถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพของมนุษย์ (มานพ และคณะ, 2547) นอกจากนี้แคโรทีนอยด์จากธรรมชาติที่สำคัญมักพบในส่วนต่างๆของพืช อาทิ เมล็ดข้าวโพด ผลมะเขือเทศ พืชตระกูลหญ้า ใบกระถิน และดอกไม้ชนิดต่างๆ อาทิ ดอกทิวลิป ดอกดาวเรือง เป็นต้น

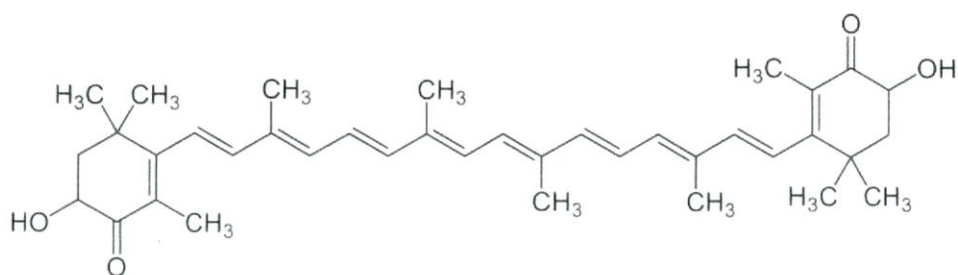


รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเบต้าแคโรทีน ( $\beta$ -carotene)

ที่มา: วรณวิมล และมารุจ (2553)

### 2.4.2 แซนโทฟิลล์ (Xanthophylls)

แซนโทฟิลล์เป็นกลุ่มอนุพันธ์ของเม็ดสีประเภทแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ซึ่งมีสีอยู่ในช่วงสีเหลืองถึงสีแดง มีโครงสร้างแบบเดียวกันกับ (batacarotene) จัดเป็นอนุพันธ์หนึ่งของแคโรทีนอยด์คือประกอบด้วย คาร์บอนจำนวน 40 อะตอม ต่อเข้าด้วยกัน แตกต่างกันที่โครงสร้างของอนุพันธ์แซนโทฟิลล์จะมีหมู่แทนที่ที่ประกอบด้วย อะตอมของออกซิเจนอยู่หมู่แทนที่ดังกล่าว อาทิ หมู่คาร์บอกซี (Carboxy-) หมู่คีโตน (Ketone) เป็นต้น ซึ่งอนุพันธ์ของแซนโทฟิลล์มีมากมาย อาทิ แอสตาแซนธิน (Astaxanthin) ลูทีน (Lutein) ไลโคปีน (Lycopene) โดยสามารถพบได้ในพวกเนื้อเยื่อพืชที่มีการสังเคราะห์แสงและไม่มีการสังเคราะห์แสง (พงค์เทพ และคณะ, 2540)



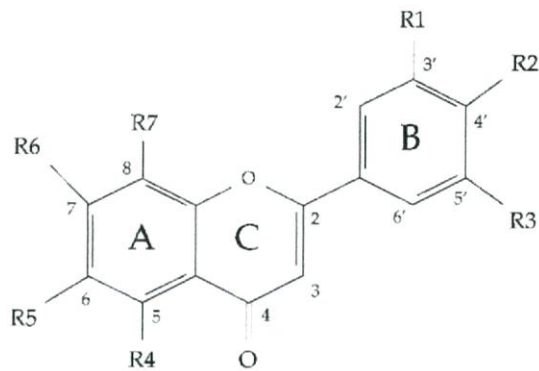
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของแอสตาแซนธิน  
ที่มา: วรณวิมล และมารุจ (2553)

### 2.4.3 แทนนิน (Tannin)

แทนนิน (Tannin) หรือสารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenols) มีโมเลกุลอยู่ระหว่าง 500 – 5,000 สามารถละลายน้ำได้มีคุณสมบัติเป็น อัลคาร์ลอย เจลลาติน และโปรตีน แทนนิน มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน มีรสฝาด จึงเป็นสารที่ให้ความฝาดในพืช พบได้ในส่วนต่างๆ ของพืชหลายชนิด สารประกอบแทนนินจัดเป็นสองประเภท คือ ไฮโดรไลเซเบิลแทนนิน (Hydrolyzable tannin) และ คอนเดนส์แทนนิน (Condensed tannin ,CT) ในพืชหลายชนิด พบว่าแทนนินมีความสามารถในการป้องกันการทำลายของแบคทีเรียและเชื้อรา และแมลงกัดกินเป็นอาหาร (ปราโมทย์ และโอภาส, 2545) ในทางการแพทย์พบว่า สารแทนนินสามารถใช้เป็นยารักษาโรคได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารแทนนินบางประเภทมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิดได้อาทิ ทีโอแกลลลิน (Theogallin) กรดแกลลิก (Gallic acid) และกรดแอลลาจิก (Ellagic acid) เป็นต้น (พีระศักดิ์, 2544)

### 2.4.4 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบโพลีฟีนอล มี 12 กลุ่มย่อย ได้แก่ ฟลาโวน (Flavone) ไอโซฟลาโวน (Isoflavone) ฟลาโวนอล (Flavonol) ฟลาวาโนน (Flavanone) ฟลาวาโนนอล (Flavanonol) ฟลาวานอล (Flavanol) ลูโคแอนโทไซยานิน (Lucoanthocyanin) แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ชาลโคน (Chalcone) ไดไฮโดรชาลโคน (Dihydrochalcone) ออโรน (Aurone) และ แซนโธน (Xanthone) ฟลาโวนอยด์เป็นรงควัตถุ (pigment) ที่มีความคงตัวต่อความร้อน และปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ได้ดีกว่าแอนโทไซยานิน (anthocyanin) แต่สามารถเปลี่ยนสีได้ง่าย เมื่อรวมตัวกับไอออนของโลหะเช่น เมื่อรวมตัวกับเหล็กจะให้สีน้ำเงินหรือสีเขียว นอกจากนั้น สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) กลุ่มที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ ได้แก่ กลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) พบได้ในแทบทุกส่วนของพืชทั้ง ราก ลำต้น ใบ ดอก และผลฟลาโวนอยด์ในพืชเป็น สารอินทรีย์ประเภทโพลีฟีนอล (polyphenol) มีโครงสร้างเป็นไดฟีนิลโพรเพน (diphenylpropane) มีการจัดเรียงตัวเป็นแบบ C6 -C3 -C6 ฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีสมบัติในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีในอาหารประเภทไขมัน และไขมันผสมน้ำ โครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะขึ้นกับหมู่ OH ที่บริเวณวงแหวน B ดังรูปที่ 2.5 (ณัฐริกา, 2549)



รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของโมเลกุลของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)  
ที่มา: ญัฐริกา (2549)

## 2.5 แบคทีเรียก่อโรคทั่วไป

แบคทีเรียก่อโรคทั่วไปมักตรวจพบอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ สัตว์ หรือมนุษย์ หรือตรวจพบปนเปื้อนในอาหาร ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์และสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคบางชนิดพบอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ มีโอกาสปนเปื้อนในวัตถุดิบและกระบวนการผลิต แม้จะผ่านกระบวนการแปรรูป บางกรณีก็ไม่อาจทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้ทั้งหมด การที่ทำให้เกิดโรคต้องมีปริมาณในระดับหนึ่งถึงทำให้เกิดโรคได้ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2556) ตัวอย่างแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เช่น

### 2.5.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram ติดสีม่วงโดยการย้อมสี Gram stain) มีลักษณะคล้าย cocci อยู่เป็นกลุ่มที่คล้าย "องุ่น" โคโลนีมักเป็นสีทองหรือสีเหลือง (aureus หมายถึงสีทองหรือสีเหลือง) สิ่งมีชีวิตเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตในรูปแบบ aerobically หรือ anaerobically (ตามหลักเกณฑ์) และที่อุณหภูมิระหว่าง 18 ถึง 40 องศาเซลเซียส การตรวจพิสูจน์ทางชีวเคมีโดยทั่วไป ได้แก่ catalase positive (เชื้อ *Staphylococcus*), coagulase positive (เพื่อแยก *S. aureus* ออกจาก *Staphylococcus* species อื่น ๆ ) Novobiocin เป็น sensitive ( เพื่อแยกออกจาก *Staphylococcus saprophyticus*) และการหมัก Mannitol เป็น positive (เพื่อแยกออกจาก *Staphylococcus epidermidis*) *S. aureus* (รวมทั้งสายพันธุ์ที่ทนต่อยา เช่น เชื้อ MRSA) (Taylor and Unakal, 2017)

### 2.5.2 *Micrococcus luteus*

*Micrococcus luteus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียในตระกูลนี้ได้รับการเสนอชื่อจากการที่มันมีขนาดเล็ก (ดังนั้นจึงหมายถึงแบคทีเรียรูปร่างที่มีขนาดเล็ก แต่เดิมนักวิชาการเคยจัดพวกสตาฟิโลคอคคัส รวมอยู่ในตระกูลไมโครคอคคัส ทั้งนี้ เนื่องจากการที่มีรูปร่างกลมและมีการเรียงตัวของเซลล์เป็น กลุ่มคล้ายกันเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ หลังจากพบพวกสตาฟิโลคอคคัส มีความสามารถที่จะใช้พวกน้ำตาลได้โดยไม่ต้องอาศัยออกซิเจนช่วย (Fermentative)

แต่พวกไมโครคอคคัสต้องอาศัยออกซิเจน (Oxidative) จึงจัดแบ่ง สตาฟิฟิลโลคอคคัส ออกจากไมโครคอคคัส พวกไมโครคอคคัสสามารถเพาะแยกได้จากสภาวะแวดล้อมทั่วไปตามผิวหนังคนและสัตว์ มีอยู่บ่อยๆว่ามันสามารถแพร่กระจายได้ในบรรยากาศจากการที่พบว่ามันปนเปื้อนบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าแบคทีเรียในตระกูลนี้มีทั้งหมด 16 สายพันธุ์ (ชาญณรงค์, ม.ป.ป)

### 2.5.3 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* เซลล์เป็นรูปท่อนตรง ขนาด  $0.3 - 2.2 \times 1.2 - 7.0$  ไมโครเมตร ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ ติดสีแกรมบวก เป็นจุลินทรีย์ Gram-positive หายใจโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย *B. subtilis* เป็น rod-shaped group สามารถที่จะผลิต robust endospore ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อ microorganism อื่นได้ มีโครงสร้าง ที่เป็นส่วน refractile สูงอยู่ตรงบริเวณ cell และ Endospores เป็น widespread มี Arrangement ทั้งแบบ chains หรือ single ซึ่ง Forms colonies ของ *B. Subtilis* จะเป็นแบบ dull และอาจมีลักษณะ wrinkled เป็นสี cream ถึง brown มี Cell shape แบบ bacillus (Danchin, 2001)

### 2.5.4 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในลำไส้เล็ก ส่วนล่างของสัตว์เลือดอุ่นรวมทั้งมนุษย์และมักถูกปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมผ่านทางอุจจาระหรือน้ำเสีย การปรากฏตัวของ *E. coli* ในน่านน้ำในสิ่งแวดล้อมได้รับการพิจารณาว่าเป็นตัวบ่งชี้มลพิษทางอุจจาระ อย่างไรก็ตามการศึกษาล่าสุดหลายฉบับได้รายงานว่าสายพันธุ์ *E. coli* บางชนิดสามารถอยู่รอดได้เป็นเวลานานและอาจสืบพันธุ์ในสภาพแวดล้อมนอกระบบทางเดินปัสสาวะ ซึ่งแสดงว่า *E. coli* สามารถอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์เจ้าถิ่นได้ในสิ่งแวดล้อม การศึกษาจำนวนมากรายงานว่าเชื้อ *E. coli* ได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมแวดล้อมที่ส่งผลต่อการอยู่รอดในระยะยาว การศึกษาเกี่ยวกับเรื่องพันธุศาสตร์ประชากรพบความหลากหลายและความซับซ้อนของสายพันธุ์ *E. Coli* ในสภาพแวดล้อมต่างๆซึ่งได้รับผลกระทบจากปัจจัยแวดล้อมหลายประการ การตรวจสอบนี้เป็นการตรวจสอบความรู้เกี่ยวกับระบบนิเวศน์ของ *E. coli* (Jang et al., 2017)

### 2.5.5 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถจำแนกได้โดยการเคลื่อนที่ ทดสอบไบโอเคมีเทส oxidase เป็น positive และ lactose nonfermenters *P. aeruginosa* อยู่ในสกุล *Pseudomonas* เรียกว่า pseudomonads มีpigments pyocyanin และ pyoverdin ทำให้โคโลนี *P. aeruginosa* เป็นสีฟ้าหรือสีเขียว *P. aeruginosa* ผลิตเอนไซม์ indophenol oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลบวกในการทดสอบ "oxidase" ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบอื่น ๆ flagella และ pili ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเชื้อ *P. aeruginosa* เช่นเดียวกับแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมหลายชนิด *P. aeruginosa* อาศัยอยู่ใน slime-enclosed biofilms ที่ช่วยในการอยู่รอด และทางการแพทย์ได้จำลองแบบ slime-enclosed biofilms ที่ป้องกัน *P. aeruginosa* จากแอนติบอดีที่ผลิตจากโฮสต์และ phagocytes ที่ก่อให้เกิดความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อโรคนี *P. aeruginosa* มีชีวิตเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่ชื้น เช่นดินและน้ำ สามารถพบได้จำนวนมากในผลไม้สดและผัก โคโลนีมีสีเขียวเรืองแสงที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส โดยมีกลิ่นหวาน (คล้ายกับองุ่น) ทำให้ง่ายต่อการจดจำในอาหารแข็งในห้องปฏิบัติการ (Li et al., 2015)

## 2.6 แบคทีเรียก่อโรคในปลา

ปลาเป็นสัตว์ที่คนส่วนใหญ่นิยมบริโภค และเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจ จึงมีการเพาะเลี้ยงปลาแบบอุตสาหกรรม ซึ่งทำให้ปลาอยู่ในสภาพที่หนาแน่น ที่เรียกว่า Intensive Aquaculture อีกทั้งการมีสุขภาพฟาร์มที่ไม่เหมาะสม สภาพอากาศที่แปรปรวน ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ปลาเครียด ภูมิคุ้มกันต่ำลง และเกิดการติดเชื้อต่างๆ ซึ่งการติดเชื้อต่างๆเหล่านั้น โรคติดเชื้อแบคทีเรียนับเป็นเชื้อที่สำคัญและพบได้มากในการเลี้ยงปลา (ชาญณรงค์, ม.ป.ป.) ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลา เช่น

### 2.6.1 *Streptococcus* sp.

*Streptococcus* sp. จากลักษณะของเซลล์ที่มาจากภาษากรีก (Streptus = pliant) ที่ให้คำอธิบายว่า แบคทีเรียรูปร่างกลมเรียงตัวเป็นสายโซ่บิดไปมา แบคทีเรียในตระกูลนี้มีทั้งหมด 19 สายพันธุ์ มีทั้งพวกที่เป็นตัวก่อโรคและพวกที่มีวงจรชีวิตที่อิสระ สายพันธุ์ต้นแบบสเตรปโตคอคคัส พัยโอจีเนส (*Streptococcus pyogenes*) ลักษณะเฉพาะของสเตรปโตคอคคัส เป็นแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม ลักษณะการเรียงตัวของเซลล์เป็นแบบสายโซ่จะสั้นหรือยาวขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ และชนิดของอาหารที่เลี้ยงโดยเฉพาะในอาหารเหลว สายโซ่จะติดต่อกันยาว ในบางครั้งอาจพบว่ามีมากกว่า 20 เซลล์เรียงต่อกัน เป็นพวกที่มีความต้องการออกซิเจนน้อย (Microaerophilic) ไม่สร้างสปอร์ (ชาญณรงค์, ม.ป.ป.)

### 2.6.2 *Pseudomonas* sp.

*Pseudomonas* sp. จัดอยู่ใน family Micrococcaceae ติดสีแกรมลบ มักอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ รูปร่างเป็นแท่งหรือยาวโค้งเล็กน้อย ต้องการอากาศ เคลื่อนที่ได้โดยใช้ polar flagella ใช้สารประกอบอินทรีย์ในการเจริญ จึงจัดเป็นพวก Chemoorganotrophs มีเมตาบอลิซึมอย่างเดียวคือ respiratory ไม่มี fermentative ไม่ตรึงไนโตรเจน สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เจริญได้ในอุณหภูมิตั้งแต่ 4-43 องศาเซลเซียส (มัทนา, ม.ป.ป.)

## 2.7 แบคทีเรียดื้อยา

การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลกระทบต่อทั่วโลกในปัจจุบัน ซึ่งไม่เป็นผลดีต่อทั้งสุขภาพและเศรษฐกิจ โดยการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย เกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียมีวิธีการต่างๆ ในการปรับตัวต่อยาปฏิชีวนะ เพื่อที่จะขจัดหรือลดประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ ซึ่งการดื้อยาอาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติของเชื่อนั้นๆ หรือเกิดภายใต้ความกดดันของยาปฏิชีวนะ (วีรวรรณ, 2549) ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียดื้อยา เช่น

### 2.7.1 Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

MRSA เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram ติดสีม่วงโดยการย้อมสี Gram stain) เป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ก่อโรคได้ซึ่งเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขทั่วโลกส่งผลให้เกิดภาวะป่วยเป็นโรคและการเสียชีวิต และค่าใช้จ่ายในการดูแลสุขภาพที่สูงขึ้น ในปี.ศ 2005 มีผู้ติดเชื้อ MRSA 94360 รายในสหรัฐอเมริกาทำให้มีผู้เสียชีวิตมากกว่า 18,000 รายต่อปี MRSA แพร่กระจายเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา โดยมีการหลุดรอดออกมาจากโรงพยาบาลที่มีการติดเชื้อ MRSA ตั้งแต่ปี.ศ 2004 เชื้อ Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* นั้นทำให้เกิดการติดเชื้อมากกว่าโรคอื่น ๆ รวมกัน และมีผู้เสียชีวิตมากกว่าโรคเอดส์เป็นจำนวนมาก (Green et al., 2012)

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.8.1 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสมุนไพโร

ธีรวุฒิ และรัชณี (2550) ศึกษาสารสกัดเอทานอลของสมุนไพโรไทยต่างๆ จำนวน 25 ชนิดจากพืชวงศ์ 5 เบื้องต้นพบว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิดนั้น สมุนไพโรในวงศ์ Combretaceae กับ Caesalpinaceae แสดงประสิทธิภาพยับยั้งสูง โดยสมุนไพโรในวงศ์ Combretaceae มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus* กับ *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น ส่วนสมุนไพโรวงศ์ Caesalpinaceae มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด แต่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเช่นเดียวกัน สมุนไพโรไทยเกือบทุกชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อนำสมุนไพโรไทยในวงศ์ Combretaceae และวงศ์ Caesalpinaceae การสกัดด้วยเมทานอลพบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี โดยพบว่าสมุนไพโรไทยในวงศ์ Combretaceae มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก สมุนไพโรไทยวงศ์ Caesalpinaceae มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทุกประเภทแต่จะมี ประสิทธิภาพสูงมากในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ในสารสกัดเมทานอล พบว่า เชื้อ *S. aureus* ฝางให้ค่า MIC เท่ากับ 6.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *B. cereus* แสมสารให้ค่า MIC เท่ากับ 3.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

มณฑินี และคณะ (2558) ศึกษาสารสกัดจากสมุนไพโร 3 ชนิด ได้แก่ กะเพรา โหระพา และ ตะไคร้ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 % ซึ่งผลที่ได้จะอยู่ในรูปของสารสกัดหยาบ จากนั้นจึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพโรในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ด้วยวิธี Agar well diffusion จากการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากผลของสารสกัดหยาบจากกะเพรา โหระพา และตะไคร้ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 15.6 มิลลิเมตร และ 9.5 มิลลิเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบในสารสกัดหยาบโดยใช้เครื่อง gas chromatography – mass spectrometry พบว่าปริมาณสาร eugenol และสาร linalool ที่มีในสารสกัดหยาบจากกะเพรามากที่สุด และ สรุปผลการวิจัยว่า สารสกัดหยาบจากกะเพรามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. fumigatus* ดีที่สุดรองลงมาคือ สารสกัดสมุนไพโรจากโหระพาและตะไคร้

ทัศนีย์ และจิตรา (2559) ศึกษาการยับยั้งเจริญเติบโตของเชื้อ *Aromonas hydrophila* จากสารสกัดสมุนไพโรไทย 7 ชนิด ได้แก่ ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ชิง (*Zingiber officinale*) กระเทียม (*Allium sativum*) มะกรูด (*Citrus hystrix*) ฟ้าทะลายโจร (*Andropogon paniculata*) กะเพรา (*Ocimum sanctum*) และทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ เอทานอล และเมทานอล ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพโร ด้วยวิธี Agar well diffusion และ Borth dilution พบว่า สมุนไพโรไทยที่นำมาวิจัย มีผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสเฉลี่ยมากที่สุด คือ ขมิ้นชัน ที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสเท่ากับ  $2.93 \pm 0.60$  เซนติเมตร ค่าความเข้มข้นต่ำสุด ที่ ผลการจากศึกษาพบว่า ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ที่ใช้เอทานอลเป็น ตัวทำละลายมีค่า MBC สูงที่สุดเท่ากับ 7.81 ส่วนในพันส่วน (ppt)

วัชรินทร์ และคณะ (2559) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ได้แก่ ขมิ้นชัน ชุมเห็ดเทศ จันทน์แดง จันทน์แปดกลีบ ผาง พริกไทยดำ ฟ้าทะลายโจร ยี่หระ สมอไทย และ อบเชย โดยใช้ 95% เอทานอลเป็นตัวสกัด ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* ATCC 25922 โดยวิธี agar well diffusion พบว่า สารสกัด สมุนไพรไทยทุกชนิดสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ สารสกัดสมุนไพรไทย 7 ชนิด สามารถยับยั้ง *B. cereus* ได้ สารสกัดสมุนไพรไทย 5 ชนิดยับยั้งเชื้อได้ทุกชนิด โดยสารสกัดจากผางแสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด เมื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้ (MBC) โดยวิธี broth dilution พบว่าผางมีค่า MIC เท่ากับ MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* และ *E. coli* ATCC 25922 คือ 8, 2 และ 1 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

### 2.8.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากต้นแก้ว

Rohman and Riyanto (2005) ทำการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเอทานอลจากใบแก้ว ในหลอดทดลองโดยใช้วิธี linoleic-thiocyanate และ DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) สารสกัดจากใบแก้วผสมด้วย เอทานอล เจือจางความเข้มข้นเป็น 1%, 5% และ 10% และพิจารณาประสิทธิภาพของสารต่อต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีการ linoleic-thiocyanate ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเอทานอลที่มีความเข้มข้น 1% 5% และ 10% แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีการดูดกลืนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0,05$ ) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลที่มีความเข้มข้นความแตกต่างกัน โดยวัดด้วยวิธี DPPH และผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบแก้วพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 126.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าวิตามินอีประมาณ 15 เท่า ( $IC_{50}$  เท่ากับ 8.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของใบแก้วอาจเป็นผลมาจากสารประกอบฟลาโวนอยด์

Aziz *et al.* (2010) ทำการแยกสาร auraptene, trans-gleinadiene, 5,7-dimethoxy-8-(3-methyl-2-oxo-butyl) coumarin และ toddalenone จากสารสกัดใบแก้ว ที่ใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน ได้แก่ คลอโรฟอร์ม บีโตรีเลียม อีเทอร์ และเมธานอล การวิจัยพบว่าเฉพาะสารสกัดจากคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Saccharomyces cerevisiae* มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 9 และ 8 มิลลิเมตร ตามลำดับ และยังพบอีกว่า trans-gleinadiene มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus cereus* ซึ่งสรุปได้ว่า trans-gleinadiene, auraptene และ 5,7-dimethoxy-8-(3-methyl-2-oxo-butyl) และ coumarin ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพดีจากสารสกัดคลอโรฟอร์ม

Sudaram *et al.* (2011) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย รา และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้นแก้ว โดยเชื้อที่ใช้ทดสอบมีความแตกต่างกัน ได้แก่ *E.coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes* และ *Shigella flexneri* ใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 300-500 มิลลิกรัม คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อรา ของสารสกัดต้นแก้วใช้ตัวทำละลาย เอทานอลและเฮกเซน โดยวิธี agar well diffusion พบว่าที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม มีผลในการยับยั้งเชื้อ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม มีร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 67.77

Gautam *et al.* (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์การลดน้ำตาลในเลือดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบแก้ว ในหนูที่เป็นเบาหวาน โดยใช้สารสกัดใบแก้วที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว ใช้สารสกัดรักษาเบาหวานในหนูเป็นเวลา 21 วัน คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด บ่งชี้ได้จาก hepatic lipid peroxidation (LPO), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) และ catalase (CAT) ในการวิจัยพบว่า สารสกัดใบแก้ว สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด คลอเรสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และระดับไขมันในหนูที่เป็นเบาหวานได้อย่างมีนัยสำคัญและยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นยา หรืออาหารเสริมทางด้านโรคเบาหวานต่อไป

Rodriguez *et al.* (2012) ศึกษาสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบแก้ว วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยใช้เครื่อง gas chromatography-mass spectrometry พบองค์ประกอบทางเคมี 18 ชนิด คิดเป็น 95.1 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำมันหอมระเหย มีส่วนประกอบที่มีโครงสร้างเป็น beta-caryophyllene 30 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย โดยวิธี peroxide, thiobarbituric acid and p-anisidine methods พบว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า butylated hydroxyanisole และ butylated hydroxytoluene แต่ น้อยกว่า propyl gallate นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ยับยั้ง *Klebsiella pneumoniae* และ *Bacillus subtilis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Menezes *et al.* (2014) ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ของสารสกัดหยาบใบแก้ว โดยใช้การสกัดใช้น้ำผสมเอทานอลเป็นตัวทำละลายในอัตราส่วน 1:1 ใช้เวลาในการสกัด 72 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด คือ 66.5- 398.8 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดคือ 0.3-31.1 มิลลิกรัมควอซิตินต่อกรัมสารสกัด และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E.coli*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Shigella flexneri* และ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นมากกว่า 1.024 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Zhu *et al.* (2015) ศึกษาสารสกัดจากแก้ว โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ ของสารสกัดจากแก้ว ด้วยวิธี reducing, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil radical (DPPH<sup>•</sup>) scavenging, superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) scavenging, hydroxyl radical (HO<sup>•</sup>) scavenging และ hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) scavenging โดยใช้เครื่อง UV-vis spectrophotometer การศึกษาพบว่า สารสกัดจากต้นแก้ว มีปริมาณฟลาโวนอยด์ อยู่มากถึง 375 มิลลิกรัมรูทีนต่อกรัมสารสกัด มีฤทธิ์ของ reducing, lipid peroxidation inhibition และ HO<sup>•</sup> scavenging activities ของสารสกัด เท่ากับ 0.26, 0.023 และ 0.302 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ฤทธิ์ของสารเหล่านี้มีค่าสูงกว่า trolox (สารมาตรฐาน) แสดงถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> O<sub>2</sub><sup>-</sup> และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ของสารสกัดจากแก้ว (MPE) เท่ากับ 0.93, 0.581 และ 0.47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่าใกล้เคียงกับ Trolox ผลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากแก้ว มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระที่ดี

Bovornvattanangkul and Jiraungkoorskul (2016) ได้ศึกษาเกี่ยวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากสารสกัดใบแก้ว โดยการสกัดใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ระยะเวลาใน

การสกัดอยู่ที่ 0.5, 1, 3, 5, และ 24 ชั่วโมง การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ใช้วิธี cytotoxicity test ยับยั้ง *Artemia salina* ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 0, 5, 50, 100, 500, 2,500 and 5,000 ppm ซึ่งจะวิเคราะห์ค่า  $LC_{50}$  และ  $LC_{90}$  ที่ได้ภายใต้ 24 ชั่วโมง พบว่า สารประกอบฟีนอลิกในแต่ละช่วงเวลามีค่าเท่ากับ  $134.71 \pm 3.46$ ,  $136.08 \pm 7.47$ ,  $124.86 \pm 10.61$ ,  $146.66 \pm 9.01$  และ  $129.65 \pm 3.5$  มิลลิกรัมกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าชั่วโมงที่ 5 ของการสกัด ให้สารประกอบฟีนอลิกที่สูงที่สุด ในขณะที่ค่า  $LC_{50}$  และ  $LC_{90}$  เท่ากับ 2,572.03 และ 4,565.79 ppm ตามลำดับ

Dosoky et al. (2016) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด น้ำมันหอมระเหยจากใบแก้ว โดยใช้เครื่อง gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียใช้วิธี microbroth dilution test เพื่อยับยั้ง *Caenorhabditis elegans* และ *Artemia salina* องค์ประกอบทางเคมีที่พบในสารสกัด ได้แก่ methyl palmitate (11.1%), isospathulenol (9.4%), (E,E)-geranyl linalool (5.3%), benzyl benzoate (4.2%), selin-6-en-4-ol (4.0%), bata-caryophyllene (4.0%), germacrene B (3.6%), germacrene D (3.4%), และ gamma-elemene (3.2%) ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* ของสารสกัด MIC เท่ากับ 313 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฤทธิ์ยับยั้ง *A. salina*  $LC_{50}$  เท่ากับ 41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และฤทธิ์ยับยั้ง *C. elegans* มีค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ 37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Patel and Sharma (2016) ทำการศึกษาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ของสารสกัด ใบและลำต้นของแก้ว โดยมีเมทานอลเป็นตัวทำละลาย ทดสอบกับเชื้อก่อโรคในพืช *Xanthomonas citri* ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยใช้ยาปฏิชีวนะ Kanamycin เป็น positive control สารสกัด ใบแก้วที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 25 มิลลิเมตร และยาปฏิชีวนะ Kanamycin มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 32 มิลลิเมตร ฤทธิ์ของสารสกัดใบแก้ว มีความใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน ดังนั้นสารสกัดจากแก้วจึงเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการป้องกัน และกำจัดโรคพืช

Neta (2017) ได้ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา แบคทีเรีย ความเป็นพิษ และศึกษาช่วงเวลาในการฆ่าเชื้อเชื้อรา แบคทีเรีย ของน้ำมันหอมระเหยของต้นแก้ว beta -caryophyllene รวมทั้งองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย โดยทดสอบพิษของ *M. paniculata* และ bata-caryophyllene (7.8-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยวิธี MTT assay กับไฟโบรบลาสต์และเซลล์ตับ เปรียบเทียบความเข้มข้นที่น้อยที่สุดและช่วงเวลาการฆ่าเชื้อในเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus parasiticum* วัดสารต้านอนุมูลอิสระโดยการตรวจ DPPH และ ABTS วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี GC / MS ซึ่งพบสารประกอบ 13 ชนิด และพบว่า bata-caryophyllene เป็นสารประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียปานกลาง และมีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่รุนแรง และพบว่าน้ำมันหอมระเหยและ bata-caryophyllene มีการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (*S. aureus*) อย่างรวดเร็วในเวลา 4 ชม. และเชื้อรา *F. solani* ในเวลา 2-4 ชั่วโมง น้ำมันหอมระเหยเป็นพิษด้านเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า เมื่อเทียบกับไฟโบรบลาสต์ ในขณะที่ bata -caryophyllene มีความเป็นพิษต่ำ

## บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 พืชที่ใช้ในการทดสอบ

ต้นแก้วที่นำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพนำมาจาก บริเวณพื้นที่หมู่ 3 ตำบลชากไทย อำเภอเขาคิชฌกูฏ จังหวัดจันทบุรี ละติจูด 12°47'18.1"N ลองจิจูด 102°03'26.9"E โดยเก็บตัวอย่างในช่วงวันที่ 22-25 พฤศจิกายน 2560 ในการเก็บตัวอย่างจะคัดเลือกลักษณะดอก ใบ และเปลือก ที่ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป ปราศจากสิ่งเจือปนอื่น ต่อจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด และผึ่งให้แห้งโดยหลีกเลี่ยงจากการนำไปตากแดด จากนั้นเก็บไว้ในที่พ้นแสงเพื่อใช้ในการดำเนินงานวิจัยต่อไป

### 3.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

#### 3.2.1 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั่วไป

*Bacillus subtilis* ATCC 6633

*Escherichia coli* ATCC 1261

*Micrococcus luteus* TISTR 9341

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Staphylococcus aureus* TISTR 1466

#### 3.2.2 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลา

*Pseudomonas* sp.

*Streptococcus* sp.

#### 3.2.3 เชื้อแบคทีเรียดื้อยา

Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

### 3.3 อุปกรณ์

#### 3.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบ

3.3.1.1 ตู้อบลมร้อน

3.3.1.2 เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ

3.3.1.3 เครื่องปั่น

3.3.1.4 กระจกบอทดวง

3.3.1.5 ขวดโหลพลาสติกสำหรับหมัก

3.3.1.6 ถาดสแตนเลส

3.3.1.7 ขวดแก้วสีชาสำหรับเก็บตัวอย่าง

#### 3.3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.3.2.1 เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท

3.3.2.2 หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

- 3.3.2.3 หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร
- 3.3.2.4 หลอดทดลองแก้ว
- 3.3.2.5 ไมโครปิเปต
- 3.3.2.6 ปิเปตแก้ว
- 3.3.2.7 ไมโครเวลเฟลท
- 3.3.2.8 ขวดปรับปริมาตร
- 3.3.2.9 ปีกเกอร์แก้ว
- 3.3.2.10 เครื่องเขย่า
- 3.3.2.11 แท่งคนสาร

### 3.3.3 อุปกรณ์ที่ใช้กับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

- 3.3.3.1 หม้อนึ่งอัตโนมัติ
- 3.3.3.2 ตู้ปลอดเชื้อ
- 3.3.3.3 ตู้บ่มเชื้อ
- 3.3.3.4 จานเลี้ยงเชื้อ
- 3.3.3.6 ไม้พันสำลี
- 3.3.3.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.3.3.8 จุกคอร์กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร
- 3.3.3.9 เวอร์เนียคาลิเปอร์
- 3.3.3.10 ไมโครเวลเฟลท
- 3.3.3.11 ออโตปิเปต
- 3.3.3.12 แท่งแก้วรูปตัวแอล

## 3.4 สารเคมี

- 3.4.1 เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 และ 99.99 (absolute ethanol)
- 3.4.2 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO)
- 3.4.3 กรดแอสคอบิก หรือวิตามินซี
- 3.4.4 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- 3.4.5 Folin-Ciocalteu reagent
- 3.4.6 โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{NaCO}_3$ )
- 3.4.7 กรดแกลลิก
- 3.4.8 โซเดียมไนไตรต์ ( $\text{NaNO}_2$ )
- 3.4.9 อลูมิเนียมคลอไรด์ ( $\text{AlCl}_3$ )
- 3.4.10 โซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ )
- 3.4.11 เควอซิทิน
- 3.4.12 โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ )
- 3.4.13 แบเรียมคลอไรด์ ( $\text{BaCl}_2$ )
- 3.4.14 ยาปฏิชีวนะแวนโคไมซิน (vancomycin)
- 3.4.15 ยาปฏิชีวนะสเตรปโตไมซิน (streptomycin)

- 3.4.16 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด Trypticase Soy Agar (TSA)  
 3.4.17 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด Tryptic Soy Broth (TSB)  
 3.4.18 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด Mueller-Hinton agar (MHA)  
 3.4.19 คลอโรฟอร์ม (CHCl<sub>3</sub>)  
 3.4.20 เมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.99

### 3.5 การสกัดสารสกัดหยาบและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

#### 3.5.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดหยาบจากพืช

นำตัวอย่างใบ ดอก เปลือกต้นแก้ว มาทำการล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง หลังจากนั้นตากในที่ร่มจนแห้ง จากนั้นนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่ เมื่อได้ตัวอย่างอบแห้งแล้ว นำไปปั่นจนละเอียดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปสกัดต่อไป โดยขั้นตอนการสกัด จะนำตัวอย่างดอกและใบแก้วบดละเอียดจำนวน 200 กรัม เปลือกต้นแก้วบดละเอียดจำนวน 125 กรัม ห่อด้วยผ้าขาวบางทำเป็นลูกประคบ ลูกละ 50 กรัม ใส่ลงในขวดโหลพลาสติกสำหรับหมัก จากนั้นเติมตัวทำละลายปริมาตร 1.6 ลิตร (อัตราส่วน ตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 ต่อ 8 ) โดยตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ เอทานอล 70% ทำการเขย่าให้เข้ากันและบ่มในที่มืดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และทำการเขย่าวันละ 2 ครั้ง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้กรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1 โดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ แล้วนำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary Evaporator) โดยใช้อุณหภูมิ water bath 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างพืชที่จะทำการสกัดไปแช่ตัวทำละลาย เพื่อทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง เมื่อได้สารสกัดหยาบแล้วนำไปชั่งน้ำหนักคำนวณหาร้อยละของปริมาณสารสกัดที่ได้ (%yield) (จารวี และสุบงกช, 2555) สารสกัดหยาบที่ได้เก็บใส่ขวดสีขาวห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดย %yield คำนวณได้จาก

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{weight of extract recovered}}{\text{weight of fresh dry plant}} \times 100$$

#### 3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ

##### 3.5.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging

การเตรียมสารสกัดหยาบจากแต่ละส่วนของต้นแก้ว โดยใช้ Dimethyl Sulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลายสารสกัด ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63 และ 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ absolute ethanol ในการเจือจาง แล้วปิเปตสารสกัดที่ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96 ไมโครเวลเพลท นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ในการทดลองใช้ absolute ethanol เป็น Blank และใช้กรดแอสคอบิกเป็นสารมาตรฐาน คำนวณหาร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH (สุธีรา และประสพอร, 2559)

$$\text{ร้อยละการยับยั้งอนุโมลอิสระ} = \frac{\text{Abs. control} - \text{Abs. sample}}{\text{Abs. control}} \times 100$$

นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า Inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) หรือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้สารอนุโมลอิสระลดลงร้อยละ 50 โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism

### 3.5.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

ซึ่งตัวอย่างสารสกัดหยาบจากแต่ละส่วนของต้นแก้ว 10 มิลลิกรัม ละลายใน DMSO 1 มิลลิลิตร จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารสกัดหยาบจากดอกแก้ว ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางสารสกัดหยาบจากใบ และเปลือกต้นแก้ว ให้ได้ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารสกัดมา 120 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง และเติม 7.5% NaCO<sub>3</sub> ปริมาตร 480 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ทำการปิเปตสารละลายที่ได้ลงใน 96 ไมโครเวลเพลท บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก รายงานผลเป็นหน่วยมิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (Baba and Malik, 2015)

### 3.5.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric

เตรียมสารสกัดหยาบจากแต่ละส่วนของต้นแก้ว ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร และเติม 5% NaNO<sub>2</sub> ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 10% AlCl<sub>3</sub> ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที แล้วเติม 1 M NaOH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอซิดิน วิธีการดัดแปลงมาจากวิธีของ John *et al.* (2014)

## 3.5.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion

### 3.5.3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

เตรียมสารสกัดหยาบจากดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายสารสกัด

### 3.5.3.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

แบคทีเรียก่อโรคทั่วไป ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Micrococcus luteus* TISTR 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 1261, และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลา ได้แก่ *Pseudomonas* sp. และ *Streptococcus* sp. แบคทีเรีย Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

### 3.5.3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย โดยการนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว tryptic Soy Broth (TSB) สำหรับแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทำการ streak ลงบนอาหารแข็ง Trypticase Soy Agar (TSA) บนเพลท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง แล้วเตรียมสารละลายเชื้อใน 0.85% Normal saline solution โดยปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 ต่อมาร่วมไม้พันสำลีปราศจากเชื้อในแบคทีเรียที่ปรับความเข้มข้นแล้วบดสำลีกับผนังหลอดทดลองให้หมด นำไม้พันสำลีมาทำการ swab ลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ที่เตรียมไว้สำหรับแบคทีเรีย หลังจากนั้นจะหลุมโดยใช้ที่จุกค็อกเบอร์ 4 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ลงบนอาหารแข็งจานละ 5 หลุม หยดสารสกัดที่ต้องการทดสอบลงในหลุมๆละ 40 ไมโครลิตร ใช้ DMSO เป็น negative control และใช้ยาปฏิชีวนะ vancomycin เป็น positive control สำหรับเชื้อแกรมบวก ใช้ยา streptomycin เป็น positive control สำหรับเชื้อแกรมลบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดบริเวณโซนใสที่เกิดขึ้นรอบหลุม (inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ หน่วยเป็นมิลลิเมตร วิธีการดัดแปลงมาจากวิธีของ Padalia and Chanda (2015)

### 3.5.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งแบคทีเรีย

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ทำได้โดยนำสารสกัดหยาดส่วนต่างๆของต้นแก้วมาทำการเจือจางด้วยอาหารเหลวแบบ two-fold dilution ให้ได้ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 และ, 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมน้ำใน 96 ไมโครเวลเพลทหลุมละ 100 ไมโครลิตร และเติมอาหารเหลวหลุมละ 95 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเชื้อที่ใช้ทดสอบหลุมละ 5 ไมโครลิตร ทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (Karaman *et al.*, 2003) เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำ 96 ไมโครเวลเพลท ที่บ่มไว้มาหยดสาร resazurin หลุมละ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งค่า MIC ได้จากการสังเกตสีของ resazurin หากมีการเปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นสีชมพูแสดงว่าไม่เกิดการยับยั้ง ถ้าไม่มีการเปลี่ยนสีจากสีชมพูแสดงว่าเกิดการยับยั้งแบคทีเรีย (Kumara *et al.*, 2018) โดยหลุมที่มีเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตจะรีดิวซ์ resazurin ที่มีสีน้ำเงินไปเป็น resorufin สีชมพู (Elshikh *et al.*, 2016)

### 3.5.5 การหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย

การหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ทำได้โดยนำสารสกัดที่ได้ผลการยับยั้งในวิธี MBC จากการทดลองข้อที่ 3.5.4 ไปทำการ Spread plate บนอาหารแข็ง TSA สำหรับแบคทีเรีย แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โดยค่า MBC คือความเข้มข้นที่ทำให้แบคทีเรียไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Karaman *et al.*, 2003)

### 3.5.6. การวิเคราะห์หลายพิมพ์โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ชนิดแผ่นบาง (Thin-layer Chromatography)

การเตรียมสารละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ Mobile phase โดยนำ  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$  และ  $\text{H}_2\text{O}$  มาผสมกันในอัตราส่วน 80 ต่อ 18 ต่อ 2 มิลลิลิตร (Nostro *et al.*, 2000) จากนั้นเทสารละลาย Mobile phase ลงในแท่ง TLC โดยให้ความสูงของตัวทำละลายประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายอิมตัว ใช้เวลาประมาณ 1.30 นาที และเตรียมตัดแผ่น TLC เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 10×10 เซนติเมตร ใช้ดินสอดสีเส้นตรงขนานกับกระดาษ โดยให้อยู่ห่างจากขอบกระดาษล่าง 1 เซนติเมตร (จุดเริ่มต้น) และใช้ดินสอดสีเส้นตรงขนานกับกระดาษอีก 1 เส้น ห่างจากขอบบน 0.5 เซนติเมตร (จุด solvent front) ต่อจากนั้นทำการจุดสารสกัดหยาดที่จุดเริ่มต้น โดยแต่ละจุดห่างกัน 1 เซนติเมตร แล้วนำแผ่น TLC ไปใส่ลงในแท่ง TLC ที่มีเตรียมสาร Mobile phase รอให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงเส้น solvent front จึงนำแผ่น TLC ออกมาผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปตรวจผลโดยการส่องผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ต และนำไปใส่ลงในแท่งที่มีไอระเหยของไอโอดีน โดยทิ้งไว้ไม่เกิน 30 นาที สังเกตแถบการเคลื่อนที่ของสาร คำนวณหาค่า Rf จากสมการ

$$Rf = \frac{\text{ระยะที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

### 3.5.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาด

นำสารสกัดหยาดที่ได้จากข้อ 3.5.1 มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS) (Hewlett Packard 247 HP6890/5973) ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ทำการวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ DB-5 ขนาด 30 m. × 250  $\mu\text{m}$ . × 0.25  $\mu\text{m}$  อุณหภูมิ เริ่มต้น 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จนกระทั่งถึง 150 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จนกระทั่งอุณหภูมิสุดท้ายเป็น 260 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิของสารที่เข้าเท่ากับ 250 องศาเซลเซียส ช่วงมวลในการวิเคราะห์ 30-500 atomic mass unit (Yang *et al.*, 2009)

### 3.5.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยมีการวางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่ม (completely randomized design ; CRD) และวิเคราะห์ผลการศึกษาโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan's Multiple-Range Test. (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics

## บทที่ 4

# ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

### 4.1 ร้อยละของปริมาณสารสกัดที่ได้ (%yield)

การนำส่วนประกอบของต้นแก้ว 3 ส่วน ได้แก่ ดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ทำให้แห้งและบดละเอียด จำนวน 200, 200 และ 125 กรัม ตามลำดับ มาทำการสกัดสารสกัดหยาบ โดยใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอล 70% พบว่าสารสกัดหยาบจากดอก มีร้อยละของปริมาณสารสกัดที่ได้ (%yield) มากที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดหยาบจากใบ และเปลือกต้นแก้ว โดยมีค่า %yield เท่ากับ 89.35%, 31.38% และ 3.68% ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ร้อยละของปริมาณสารสกัด ที่ได้จากสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

สารสกัดหยาบ	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ปริมาณสารสกัดหยาบ(กรัม)	ร้อยละของปริมาณสารสกัดที่ได้
ดอกแก้ว	200.00	178.69	89.35
ใบแก้ว	200.00	62.75	31.38
เปลือกต้นแก้ว	125.00	4.60	3.68

จากการสกัดหยาบ พบว่า %yield ของสารสกัดหยาบดอกแก้วมีปริมาณมากที่สุด เนื่องจากส่วนของดอกแก้วมีส่วนประกอบของไข (wax) พบได้ในธรรมชาติ โดยส่วนมากแล้วพบว่า wax เป็นสารเคลือบผิวในพืช ผัก หรือผลไม้ เพื่อลดการสูญเสียน้ำป้องกันการเหี่ยวของพืช (สายสนม และคณะ, 2532) wax เป็นสารในกลุ่มลิพิดเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง ทำให้น้ำและเอทานอลระเหยออกได้ยาก (Rout et al., 2010) สารสกัดหยาบดอกแก้วจึงมี %yield สูง ในขณะที่สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้วมี %yield น้อยที่สุด เนื่องจากเปลือกต้นแก้วมีความแข็งกว่าดอกและใบ ผงของเปลือกต้นแก้วที่นำมาบดละเอียดมีส่วนที่ใหญ่กว่าดอกและใบ พื้นที่ผิวในการสัมผัสกับตัวทำละลายจึงน้อยกว่าส่วนของดอกและใบ ส่งผลให้ปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้น้อยที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ ธีรวิทย์ และ รัชณี (2550) รายงานว่าปริมาณสารสกัดที่ได้ขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวในการสัมผัสตัวทำละลายของตัวอย่างพืชที่นำมาสกัด เมื่อพื้นที่ผิวสัมผัสน้อยปริมาณที่ได้จึงน้อยด้วยเช่นกัน ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไม่ขึ้นอยู่กับ %yield แต่ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่พบในสารสกัด

### 4.2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenging activity on DPPH radical)

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว โดยวิธี DPPH radical scavenging ใช้ความเข้มข้นที่ 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มี absolute ethanol เป็น positive control และ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็น negative control เมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท และคำนวณร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบ ทั้ง 3 ชนิด ดังในตารางที่ 4.2 พบว่า สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH มากที่สุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดหยาบใบ และดอกแก้ว ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 3.15 และ 7.37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่า  $IC_{50}$  ได้จากการคำนวณโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ		
	สารสกัดหยาบดอกแก้ว	สารสกัดหยาบใบแก้ว	สารสกัดหยาบ เปลือกต้นแก้ว
0.31	4.91 ± 0.40 <sup>Aa</sup>	21.86 ± 0.67 <sup>Ab</sup>	25.37 ± 0.29 <sup>Ac</sup>
0.63	7.33 ± 0.94 <sup>Ba</sup>	30.15 ± 0.40 <sup>Bb</sup>	34.06 ± 0.65 <sup>Bc</sup>
1.25	17.34 ± 0.11 <sup>Ca</sup>	43.34 ± 0.11 <sup>Cb</sup>	48.12 ± 0.40 <sup>Cc</sup>
2.5	20.46 ± 0.88 <sup>Da</sup>	48.12 ± 1.73 <sup>Db</sup>	60.42 ± 0.83 <sup>Dc</sup>
5	36.84 ± 0.58 <sup>Ea</sup>	62.01 ± 0.77 <sup>Eb</sup>	72.34 ± 0.61 <sup>Ec</sup>
10	55.39 ± 0.98 <sup>Fa</sup>	63.93 ± 1.15 <sup>Fb</sup>	77.50 ± 0.86 <sup>Fc</sup>
20	65.20 ± 0.99 <sup>Ga</sup>	73.74 ± 0.29 <sup>Gb</sup>	84.70 ± 0.19 <sup>Gc</sup>

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

: ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กในแนวนอนที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (n=3)

: ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ในแนวตั้งที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (n=3)

จากผลการวิเคราะห์ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH ระหว่างสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว พบว่าสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทุกความเข้มข้น

ตารางที่ 4.3 ค่าการยับยั้งอนุมูล DPPH ที่ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) ของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

สารสกัดหยาบ	ค่า $IC_{50}$ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ดอกแก้ว	7.37
ใบแก้ว	3.15
เปลือกต้นแก้ว	1.36

จากผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH พบว่า สารสกัดหยาบจากเปลือกแก้ว แสดงค่า  $IC_{50}$  ต่ำที่สุด ซึ่งการที่ค่า  $IC_{50}$  ต่ำ แสดงถึงการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง เป็นผลให้สารสกัดหยาบเปลือกแก้ว มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูล DPPH สูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบใบและดอกแก้ว มีฤทธิ์ต้าน

อนุมูล DPPH ต่ำสุด โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับความสามารถในการถ่ายโอนไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอน ของสารสกัดแต่ละชนิด ซึ่งเป็นผลมาจาก สารเมตาโบไลต์ในพืช เช่น สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ที่มีอยู่ในสารสกัด (Nisa *et al.*, 2013) จึงอาจเป็นไปได้ว่าเปลือกและใบของต้นแก้วมืองค์ประกอบทางเคมีที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนของดอกแก้ว และนอกจากนี้พบว่าฤทธิ์การยับยั้งอนุมูล DPPH มีแนวโน้มสูงขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ

#### 4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งใช้สารสกัดหยาบดอกแก้ว ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาบใบและเปลือกต้นแก้ว ที่ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มี DMSO เป็นตัวทำละลาย เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเวลเพลท จากนั้นนำค่าที่วัดได้ทำการคำนวณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบเทียบกับสมการจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (รูปภาคผนวก ง.3) พบว่าสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้วมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบใบและดอกแก้ว โดยมีค่าเทียบเท่ากับ  $70.81 \pm 0.31$ ,  $61.03 \pm 0.47$  และ  $50.78 \pm 0.27$  มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

สารสกัดหยาบ	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด)
ดอกแก้ว	$50.78 \pm 0.27^a$
ใบแก้ว	$61.03 \pm 0.47^b$
เปลือกต้นแก้ว	$70.81 \pm 0.31^c$

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $n=3$ )

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบใบแก้ว สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chaveerach *et al.* (2016) ที่รายงานว่าสารสกัดส่วนเปลือกและใบของพืชมีองค์ประกอบทางเคมีที่จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งสารสกัดจากใบและเปลือกต้นแก้วพบว่ามีสารกลุ่มนี้ในปริมาณสูง ทำให้สารสกัดหยาบใบและเปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้งานวิจัยของ Altemimi *et al.* (2017) รายงานว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในสารสกัด เมื่อสารสกัดมีปริมาณฟีนอลิกมากส่งผลให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้วที่มีปริมาณสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบใบและดอกแก้ว

ดังนั้นจากผลการทดลองที่พบว่า สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเป็นผลมาจากการที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด

สารประกอบฟีนอลิก เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่พบโดยทั่วไปตามธรรมชาติ ในพืชหลากหลายชนิดและส่วนมากพบในพืชผลไม้ที่มีสี หรือมีรงควัตถุอยู่มาก ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีบทบาทสำคัญในการป้องกันพืชจากการเกิดโรค (Doughari, 2012) จากผลการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดหยาบใบและเปลือกต้นแก้วมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัดหยาบดอกแก้ว แสดงให้เห็นว่าเป็นผลมาจากส่วนของใบและเปลือกมีสีที่เข้ม มีปริมาณ pigment อยู่มากทำให้พบสารประกอบฟีนอลิกมาก ในสารสกัดหยาบใบและเปลือกต้นแก้ว

#### 4.4 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid content)

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่มีในสารสกัดหยาบ ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric โดยใช้สารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเวลเพลท แล้วนำค่าที่วัดได้ทำการคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบเทียบกับสมการของกราฟมาตรฐานเคอเวอซิดิน (รูปภาคผนวก ง.4) พบว่าสารสกัดหยาบใบแก้ว มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากเปลือกและดอกแก้ว โดยมีค่าเทียบเท่ากับ  $115.73 \pm 1.18$ ,  $101.94 \pm 0.73$  และ  $38.28 \pm 0.13$  ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วน มีปริมาณฟลาโวนอยด์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

สารสกัดหยาบ	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมเคอเวอซิดินต่อกรัมสารสกัด)
ดอกแก้ว	$38.28 \pm 0.13^a$
ใบแก้ว	$115.73 \pm 1.18^c$
เปลือกต้นแก้ว	$101.94 \pm 0.73^b$

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $n=3$ )

จากผลวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่มีในสารสกัดหยาบ พบว่าสารสกัดหยาบใบแก้วมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sayar *et al.* (2014) ที่รายงานว่าการสกัดที่ได้จากใบแก้ว มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูง ซึ่งส่งผลให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัด ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช คุณลักษณะของสารพฤกษศาสตร์ในพืชนั้น และประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (Adaramola *et al.*, 2016) และนอกจากนี้สาเหตุที่สารสกัดหยาบใบแก้วมีปริมาณฟลาโวนอยด์

สูงที่สุด เนื่องมาจากองค์ประกอบภายในเซลล์มีโครงสร้างที่สามารถสร้างและเก็บสะสมสารต่างๆ ไปได้มาก (ปิยนันท์ และคณะ, ม.ป.ป.)

ฟลาโวนอยด์ เป็นสารประกอบสำคัญที่อยู่ในกลุ่มของ polyphenol และพบอยู่ทั่วไปใน ส่วนต่างๆของพืช และส่วนมากพบอยู่ในส่วนของรงควัตถุของพืช (Doughari, 2012) ซึ่งสอดคล้องกับ ผลการวิเคราะห์ของสารสกัดหยาบใบแก้ว ที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด เพราะมีปริมาณเมล็ดสี หรือมีปริมาณรงควัตถุมาก อีกทั้งยังมีงานวิจัยของ วาทีณี (2559) รายงานว่ามีสารฟลาโวนอยด์ บางชนิดเท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นจากผลการทดลองการที่พบว่าสารสกัดหยาบใบแก้ว มี ปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดหยาบ เปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดหยาบใบแก้ว เนื่องจากความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ของสารสกัดหยาบเกิดจากฤทธิ์ของฟลาโวนอยด์บางชนิดเท่านั้น ไม่ใช่ฤทธิ์ของสารฟลาโวนอยด์ ทั้งหมดที่พบในสารสกัดหยาบ

#### 4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบดอกแก้ว ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในการยับยั้ง การเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั่วไป 5 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Micrococcus luteus* TISTR 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 1261, และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 แบคทีเรียก่อโรคในปลา 2 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas* sp. และ *Streptococcus* sp. และ แบคทีเรีย Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) โดยใช้สารสกัดหยาบ ที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดที่ได้จากส่วนประกอบของพืชที่ต่างกัน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรียก่อโรคทั่วไป แบคทีเรียก่อโรคในปลา และแบคทีเรียดื้อยา ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

เชื้อทดสอบ	ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)			
	Positive control	ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)		
		100	200	300
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 1466	17.34 ±0.01	-	10.77±0.06 <sup>a</sup>	10.94±0.04 <sup>a</sup>
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	-	-	10.77±0.06 <sup>a</sup>	10.94±0.04 <sup>a</sup>
สารสกัดหยาบใบแก้ว	-	9.86±0.05 <sup>b</sup>	13.85±0.01 <sup>c</sup>	16.96±0.04 <sup>c</sup>
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	-	9.08±0.04 <sup>a</sup>	11.11±0.04 <sup>b</sup>	15.07±0.04 <sup>b</sup>
<i>Micrococcus luteus</i> TISTR 9341	23.49 ±0.67	-	9.42±0.20 <sup>a</sup>	10.08±0.06 <sup>a</sup>
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	-	-	9.42±0.20 <sup>a</sup>	10.08±0.06 <sup>a</sup>
สารสกัดหยาบใบแก้ว	-	9.03±0.07 <sup>a</sup>	10.06±0.43 <sup>b</sup>	11.20±0.19 <sup>b</sup>
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	-	9.93±0.04 <sup>b</sup>	11.51±0.04 <sup>c</sup>	13.47±0.09 <sup>c</sup>

ตารางที่ 4.6 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว (ต่อ)

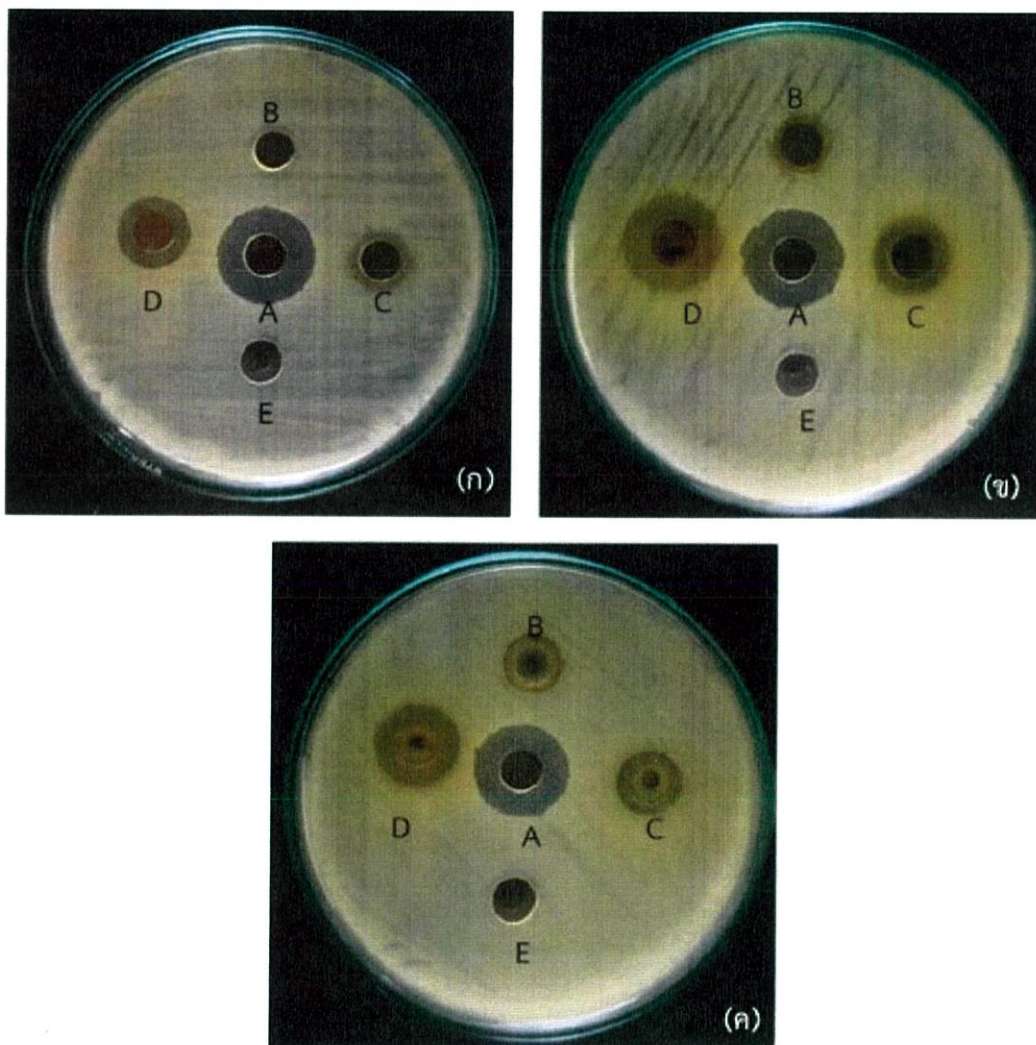
เชื้อทดสอบ	ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)			
	Positive control	ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)		
		100	200	300
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	14.67 ±0.98			
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	-	10.71±0.60 <sup>a</sup>	11.91±0.61 <sup>a</sup>	
สารสกัดหยาดใบแก้ว	13.81±0.02 <sup>b</sup>	13.80±0.06 <sup>c</sup>	14.61±0.32 <sup>b</sup>	
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	10.20±0.30 <sup>a</sup>	12.29±0.21 <sup>b</sup>	12.79±0.67 <sup>a</sup>	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 1261	13.78 ±0.14			
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	-	-	-	
สารสกัดหยาดใบแก้ว	-	-	8.94±0.05 <sup>a</sup>	
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	-	-	9.94±0.05 <sup>b</sup>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	11.78 ±0.70			
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	-	-	-	
สารสกัดหยาดใบแก้ว	-	-	13.42±0.06	
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	-	-	-	
<i>Pseudomonas sp.</i>	9±0.30			
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	-	-	-	
สารสกัดหยาดใบแก้ว	-	-	-	
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	-	9.58±0.22	10.92±0.23	
<i>Streptococcus sp.</i>	22.43 ±0.53			
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	-	-	-	
สารสกัดหยาดใบแก้ว	-	8.97±0.01 <sup>a</sup>	10.31±0.02 <sup>a</sup>	
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	-	11.99±0.07 <sup>b</sup>	14.17±0.08 <sup>b</sup>	
Methicilin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	20.41 ±0.75			
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	-	-	-	
สารสกัดหยาดใบแก้ว	-	-	15.02±0.19 <sup>a</sup>	
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	13.20±0.82	18.63±0.33	18.59±0.40 <sup>b</sup>	

หมายเหตุ : เครื่องหมาย – หมายถึง ไม่เกิดการยับยั้ง

: ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (n=9)

#### 4.5.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 ของ สารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

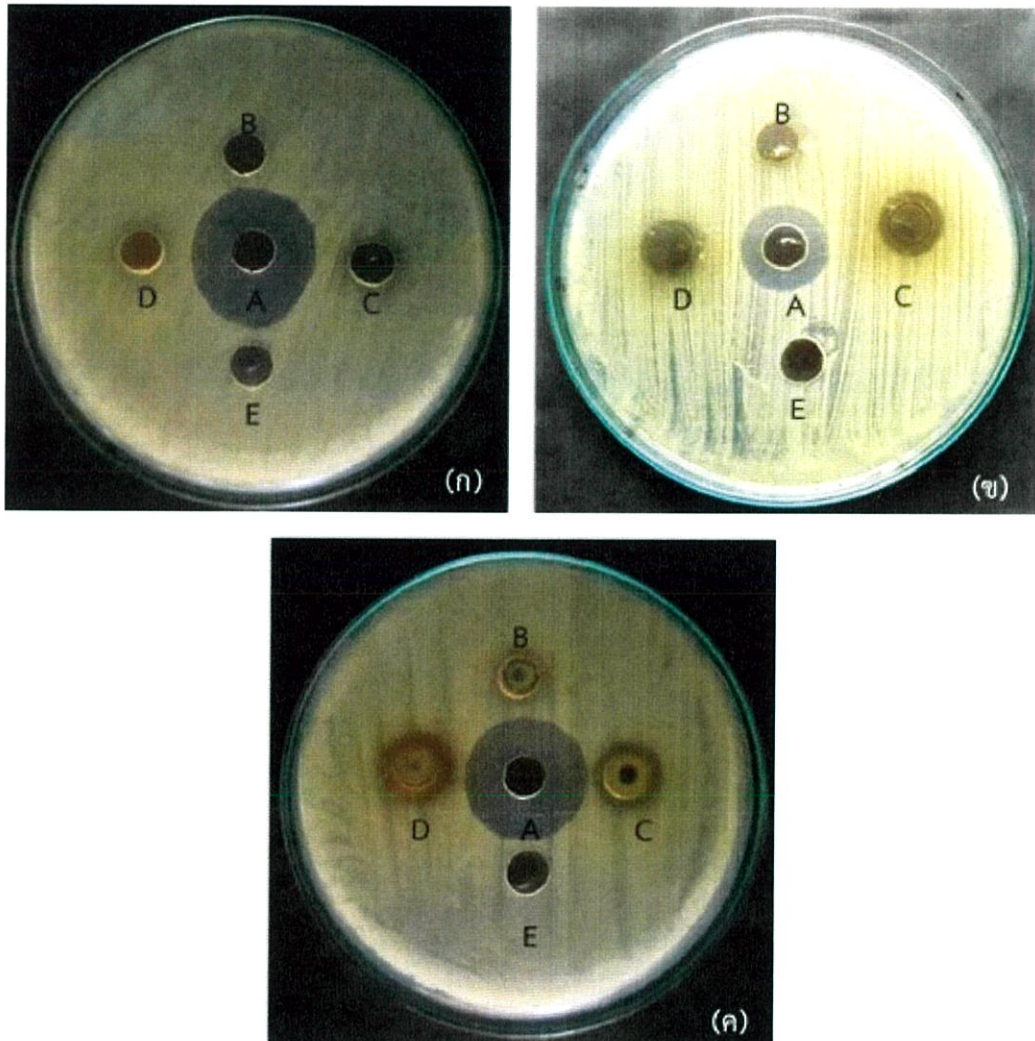
จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 ของสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว พบว่า สารสกัดหยาบดอกแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 200-300 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 10.77-10.94 มิลลิเมตร ในขณะที่สารสกัดหยาบใบและเปลือกต้นแก้ว มีฤทธิ์ยับยั้งทุกความเข้มข้น โดยสารสกัดหยาบใบแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 9.86-16.96 และ 9.08-15.07 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 สารสกัดหยาบดอกแก้ว (ก) สารสกัดหยาบใบแก้ว (ข) สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว (ค) positive control (vancomycin) : A, ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : B, ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : C, ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : D และ negative control (Dimethyl Sulfoxide) : E

#### 4.5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 9341 ของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

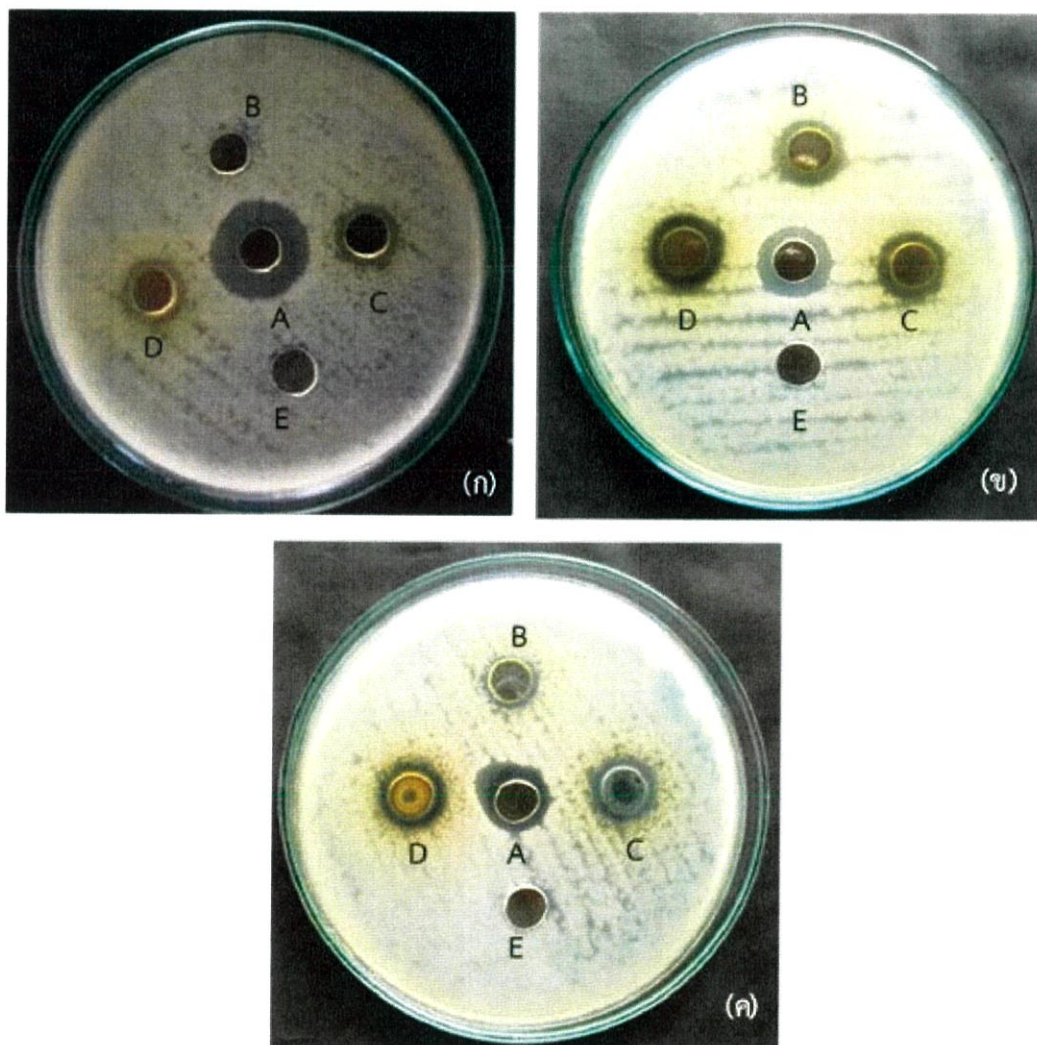
จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *M. luteus* TISTR 9341 ของสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว พบว่า สารสกัดหยาบดอกแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 200-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 9.42-10.08 มิลลิเมตร ในขณะที่สารสกัดหยาบใบและเปลือกต้นแก้ว มีฤทธิ์ยับยั้งทุกความเข้มข้น โดยสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบใบแก้ว บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 9.93-13.47 และ 9.03-11.20 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 9341 สารสกัดหยาบดอก แก้ว (ก) สารสกัดหยาบใบแก้ว (ข) สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว (ค) positive control (vancomycin) : A, ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : B, ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : C, ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : D และ negative control (Dimethyl Sulfoxide) : E

#### 4.5.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ของ สารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

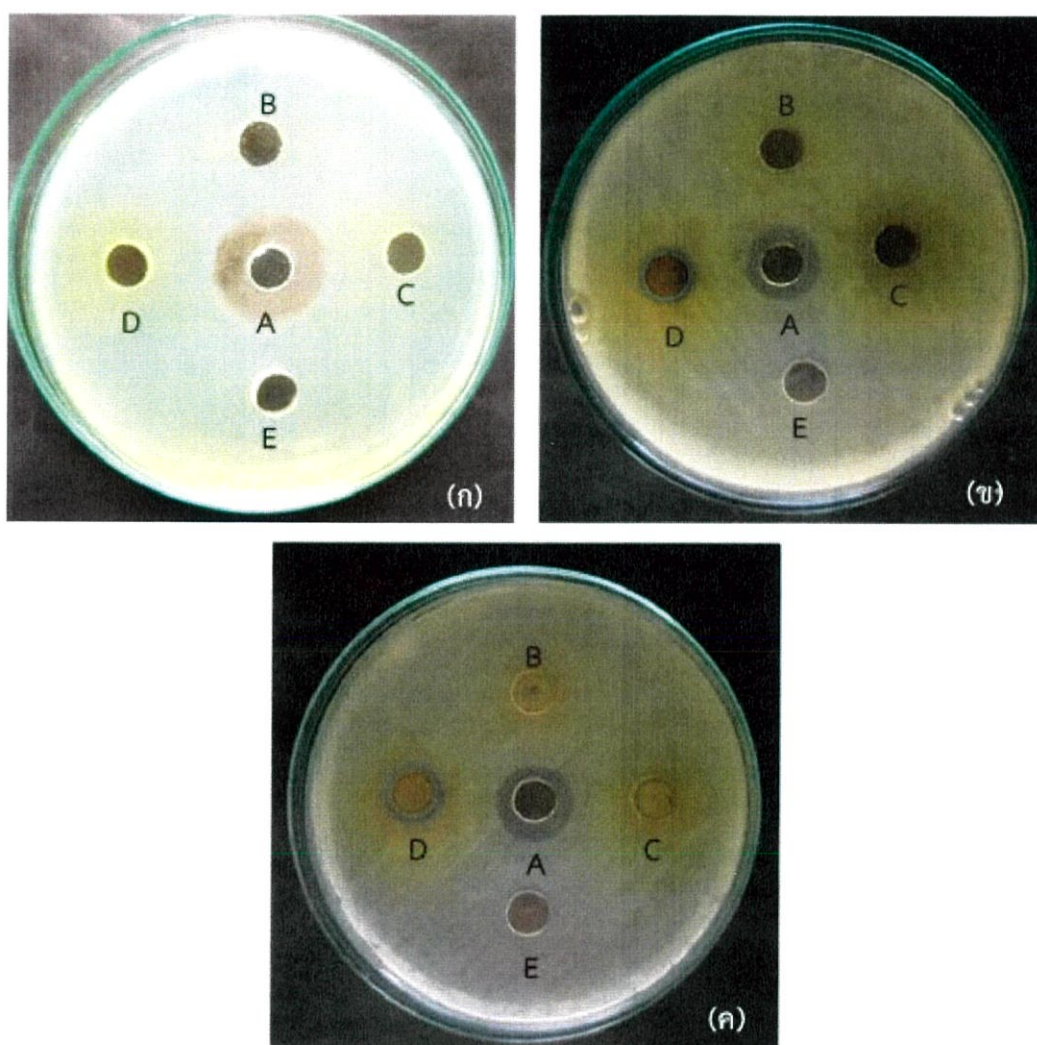
จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ของสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว พบว่า สารสกัดหยาดดอกแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 200-300 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 10.71-11.91 มิลลิเมตร ในขณะที่สารสกัดหยาดใบและเปลือกต้นแก้ว มีฤทธิ์ยับยั้งทุกความเข้มข้น โดยสารสกัดหยาดใบแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดหยาดเปลือกแก้ว บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 13.81-14.61 และ 10.20-12.79 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 สารสกัดหยาดดอกแก้ว (ก) สารสกัดหยาดใบแก้ว (ข) สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว (ค) positive control (vancomycin) : A, ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : B, ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : C, ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : D และ negative control (Dimethyl Sulfoxide) : E

#### 4.5.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 1261 ของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

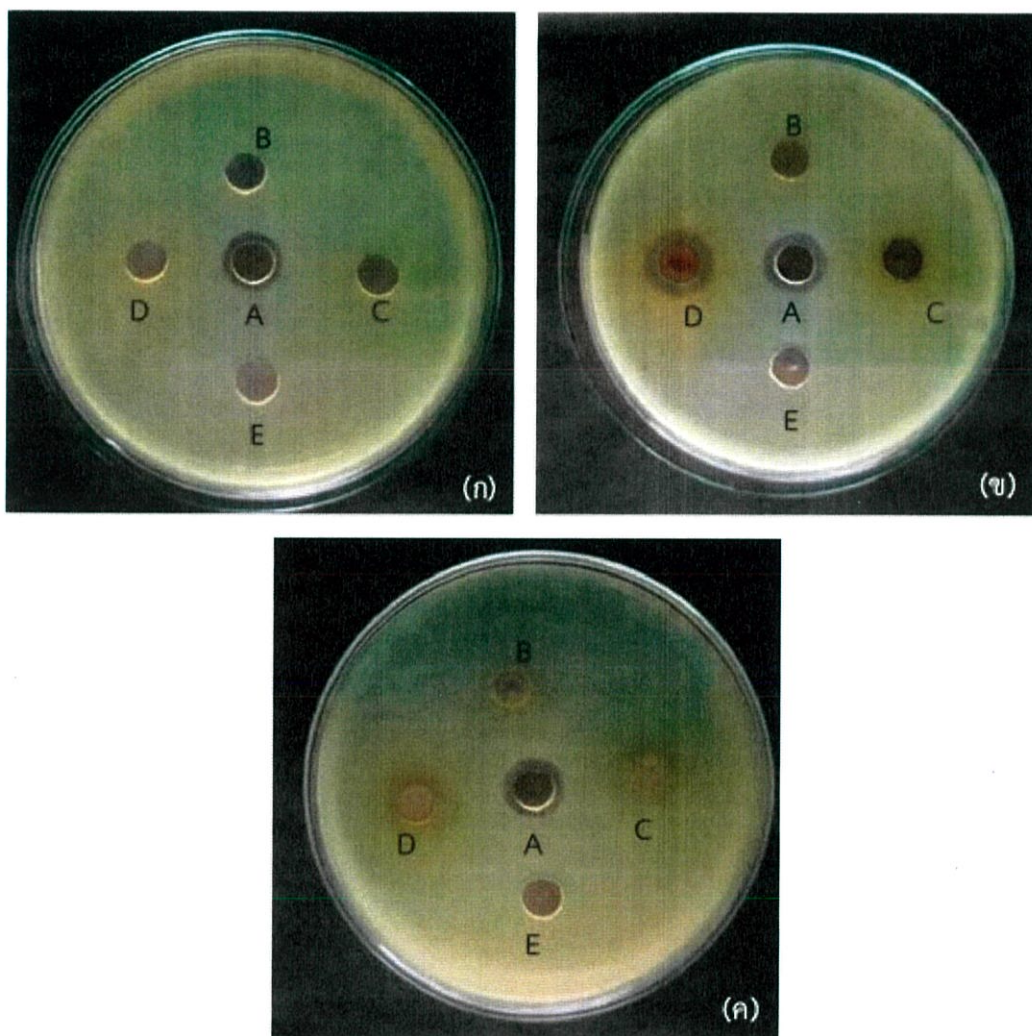
จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 1261 ของสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว พบว่า สารสกัดหยาบดอกแก้วไม่มีฤทธิ์ยับยั้งทุกความเข้มข้น ในขณะที่สารสกัดหยาบใบและเปลือกต้นแก้ว มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบใบแก้ว โดยมีการยับยั้งเท่ากับ 9.94 และ 8.94 ตามลำดับ ดังแสดงใน รูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 1261 สารสกัดหยาบดอกแก้ว (ก) สารสกัดหยาบใบแก้ว (ข) สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว (ค) positive control (streptomycin) : A, ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : B, ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : C, ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : D และ negative control (Dimethyl Sulfoxide) : E

#### 4.5.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

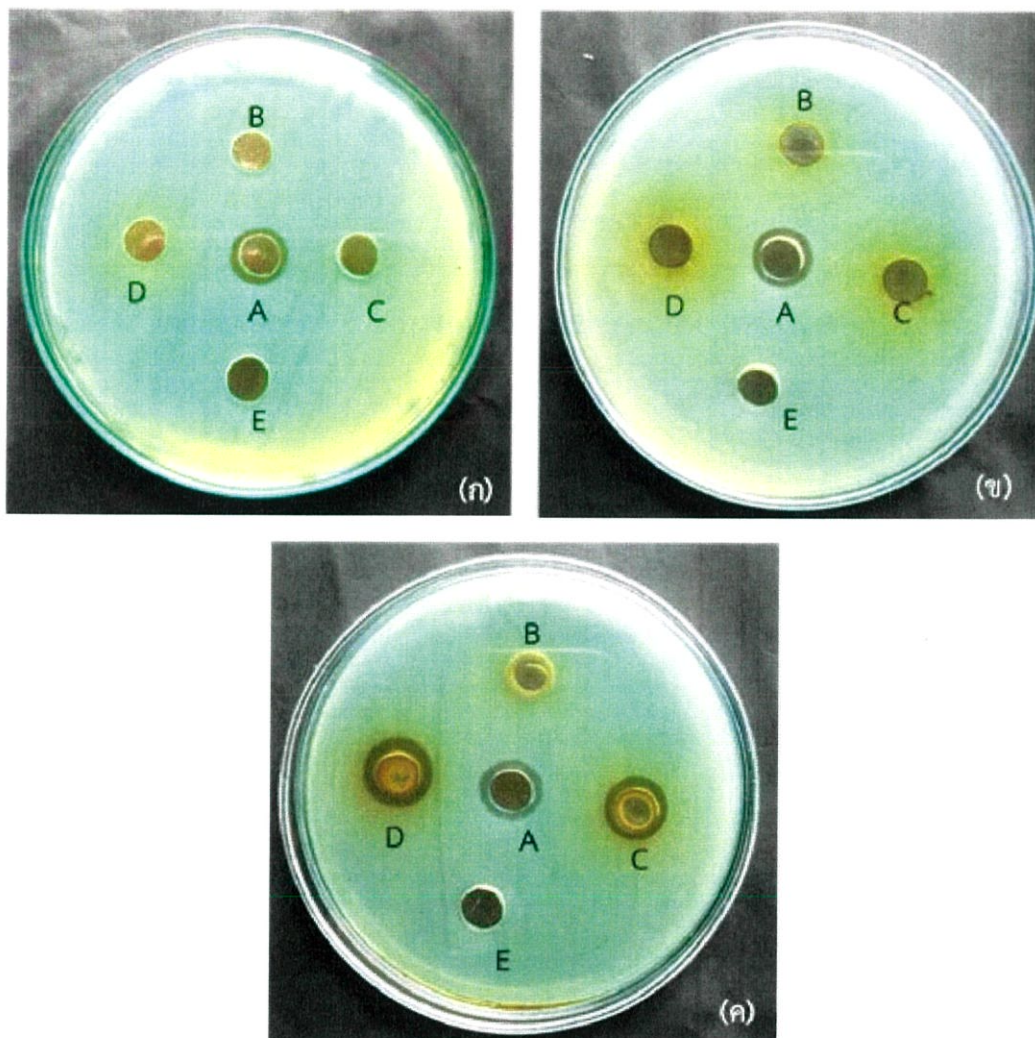
จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว พบว่าสารสกัดหยาดดอกและเปลือกต้นแก้ว ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งทุกความเข้มข้น ในขณะที่สารสกัดหยาดใบแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13.42 มิลลิเมตร ดังแสดงใน รูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 สารสกัดหยาดดอกแก้ว (ก) สารสกัดหยาดใบแก้ว (ข) สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว (ค) positive control (streptomycin) : A, ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : B, ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : C, ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : D และ negative control (Dimethyl Sulfoxide) : E

#### 4.5.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* sp. ของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

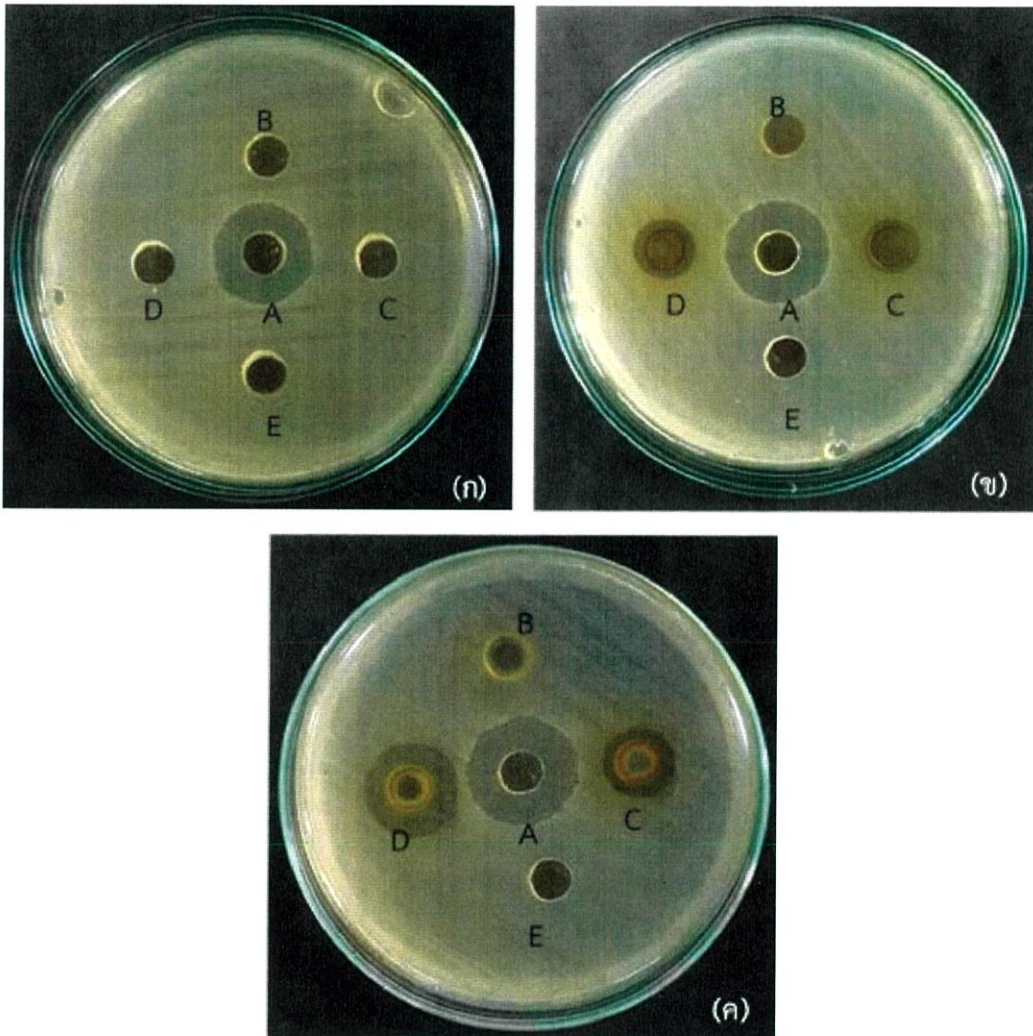
จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* sp. ของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว พบว่าสารสกัดหยาดดอกและใบแก้ว ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งทุกความเข้มข้น ในขณะที่สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 200-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 9.58-10.92 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. สารสกัดหยาดดอกแก้ว (ก) สารสกัดหยาดใบแก้ว (ข) สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว (ค) positive control (streptomycin) : A, ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : B, ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : C, ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : D และ negative control (Dimethyl Sulfoxide) : E

#### 4.5.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

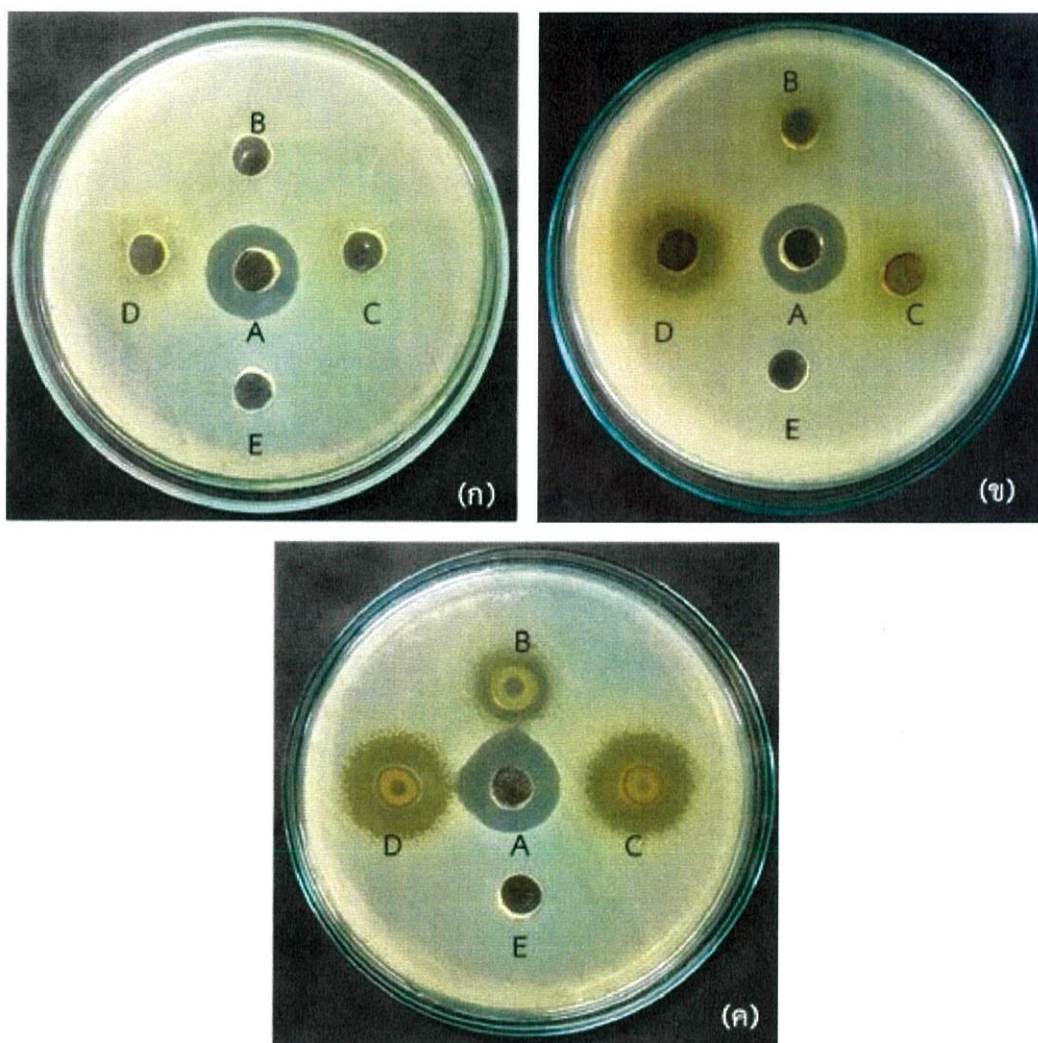
จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว พบว่าสารสกัดหยาบดอกแก้ว ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งทุกความเข้มข้น ในขณะที่สารสกัดหยาบ ใบและเปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 200-300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดหยาบ เปลือกต้นแก้วฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบใบแก้ว บริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 11.99-14.17 และ 8.97-10.31 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus* sp. สารสกัดหยาบดอกแก้ว (ก) สารสกัดหยาบใบแก้ว (ข) สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว (ค) positive control (vancomycin) : A, ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : B, ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : C, ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : D และ negative control (Dimethyl Sulfoxide) : E

#### 4.5.8 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA ของสารสกัดหยาดดอก ใบแก้ว และเปลือกต้นแก้ว พบว่าสารสกัดหยาดดอกแก้ว ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งทุกความเข้มข้น ในขณะที่สารสกัดหยาดใบแก้ว มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บริเวณยับยั้งเท่ากับ 15.02 มิลลิเมตร และสารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งทุกความเข้มข้น โดยบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 13.20-18.59 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* สารสกัดหยาดดอกแก้ว (ก) สารสกัดหยาดใบแก้ว (ข) สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว (ค) positive control (vancomycin) : A, ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : B, ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : C, ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร : D และ negative control (Dimethyl Sulfoxide) : E

#### 4.6 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งแบคทีเรีย และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย

จากการทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) พบว่าสารสกัดหยาดดอกแก้ว มีค่า MIC ต่อเชื้อ *M. luteus* TISTR 9341 ต่ำสุดเท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาดใบแก้ว มีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466, *M. luteus* TISTR 9341 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ต่ำสุด เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้วมีค่า MIC ต่อเชื้อ *M. luteus* TISTR 9341 ต่ำสุด เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และจากการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย (MBC) พบว่า สารสกัดหยาดดอกแก้ว มีค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ต่ำสุดเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดหยาดจากใบแก้ว มีค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ต่ำสุดเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้วมีค่า MBC ต่อเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ต่ำสุดเท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

เชื้อทดสอบ	ค่า MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารสกัดหยาด		
	ดอกแก้ว	ใบแก้ว	เปลือกต้นแก้ว
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 1466	25	12.5	25
<i>Micrococcus luteus</i> TISTR 9341	12.5	12.5	12.5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	25	12.5	25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 1261	25	25	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	50	25	25
<i>Pseudomonas</i> sp.	25	25	25
<i>Streptococcus</i> sp.	50	50	50
Methicilin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	100	100	100

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั่วไป 5 ชนิด แบคทีเรียก่อโรคในปลา 2 ชนิด และแบคทีเรียดื้อยา 1 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้ทุกชนิด โดยที่สารสกัดหยาดใบและเปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่า สารสกัดหยาดดอกแก้ว ซึ่งเป็นไปตามผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาดใบและเปลือกต้นแก้ว ที่พบว่ามียปริมาณสูงกว่าสารสกัดหยาดดอกแก้ว สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gautam *et al.* (2012) รายงานว่าสารสกัดหยาดใบแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมลบและแกรมบวก ซึ่งฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบ

ทางเคมีที่อยู่ในสารสกัด เช่น สารอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน เป็นต้น การยับยั้งแบคทีเรียของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ซึ่งฟลาโวนอยด์ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก โดยมีกลไกการยับยั้งแบคทีเรียดังนี้คือ สารประกอบฟีนอลิกจะเข้าไปทำให้ส่วนประกอบในไซโทพลาซึมของแบคทีเรียรั่วไหลออกมา เช่น โปรตีน กลูตาเมต หรือ โฟสเฟต และโพสเฟต เป็นผลทำให้ไปหยุดการทำงานของเซลล์เพปติโดไกลแคนที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ หรือสร้างความเสียหายให้แก่เยื่อหุ้มเซลล์ (Sayar *et al.*, 2014) งานวิจัยของ Abdulhadi-Noaman *et al.* (2012) รายงานว่าส่วนประกอบของต้นแก้ว ได้แก่ ดอก ใบ ราก และลำต้น อุดมไปด้วยองค์ประกอบทางเคมีหลายประเภท โดยมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ ยาปฏิชีวนะ ต้านมะเร็ง โรควิบาหวาน เป็นต้น

ตารางที่ 4.8 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

เชื้อทดสอบ	ค่า MBC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารสกัดหยาบ		
	ดอกแก้ว	ใบแก้ว	เปลือกต้นแก้ว
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 1466	25	25	25
<i>Micrococcus luteus</i> TISTR 9341	100	50	50
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	25	12.5	25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 1261	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas</i> sp.	>100	>100	>100
<i>Streptococcus</i> sp.	>100	>100	>100
Methicilin Resistant	>100	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)			

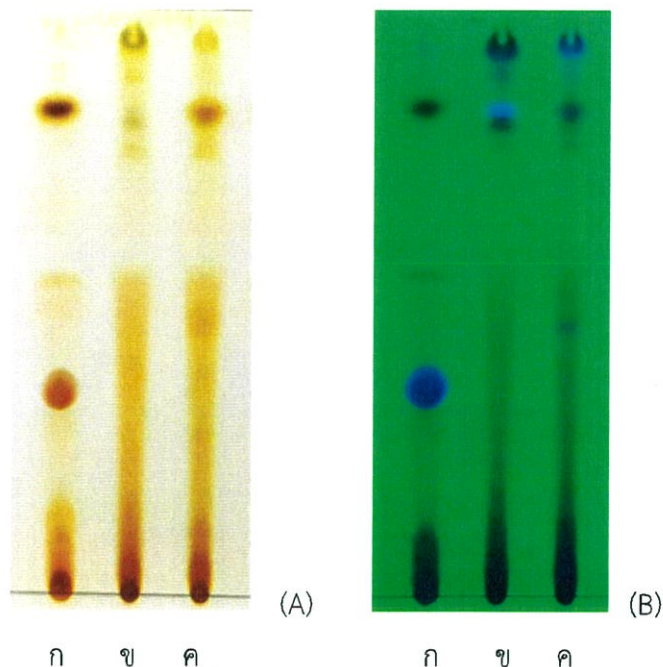
อย่างไรก็ตาม จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบดอก ใบแก้ว และเปลือกต้นแก้ว พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ส่วนมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นเพปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์หนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ แต่ไม่มีความซับซ้อนมากเท่าแบคทีเรียแกรมลบ สารสกัดจึงเข้าไปยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้ง่าย ตัวเซลล์จึงเกิดความเสียหาย โดยแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นเพปติโดไกลแคนที่บางกว่า แต่มีเมมเบรน 2 ชั้น ซึ่งเมมเบรนชั้นนอกมีไขมันมากกว่า เมมเบรนชั้นนอกทำหน้าที่กั้นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญของผนังเซลล์ไม่ให้ออกจากช่องว่างเพอริพลาสมิก และกั้นสารจากภายนอกไม่ให้ไปทำลายเซลล์ ดังนั้นผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจึงถูกทำลายง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (นงลักษณ์ และปรีชา, 2552) นอกจากนี้ผลการทดสอบการหาค่า MIC และ MBC พบว่าฤทธิ์ของสารสกัดหยาบใบแก้วสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466, *M. luteus* TISTR 9341 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ได้ดี โดยมีค่า MIC ต่ำสุดที่ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า

MBC ต่อเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ที่ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สาเหตุเนื่องมาจากสารสกัดหยาบใบแก้ว มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด และมีสารประกอบฟีนอลิกสูงเป็นลำดับที่สองรองลงมา จากสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์แบคทีเรียได้มาก

นอกจากนี้จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบใบแก้ว มีบริเวณการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 มากกว่า positive control และสารสกัดหยาบส่วนเปลือกต้นแก้ว มีบริเวณการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* sp. มากกว่า positive control เช่นกัน อาจเป็นผลมาจากสารสกัดหยาบใบแก้วและสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้วมีสารออกฤทธิ์ที่จำเพาะต่อเชื้อ 2 ชนิดนี้ มากกว่ายา streptomycin ที่ใช้เป็น positive control

#### 4.7 ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบาง (Thin-layer Chromatography)

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์โครมาโทแกรม ของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 80 : 18 : 2 พบว่าลายพิมพ์โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบดอกแก้ว แสดงแถบของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ 3 แถบ ตำแหน่งค่า Rf เท่ากับ 0.31, 0.43 และ 0.75 ตามลำดับ สารสกัดหยาบใบแก้ว แสดงแถบของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ 3 แถบ ตำแหน่งค่า Rf เท่ากับ 0.73, 0.82, และ 0.85 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว แสดงแถบของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ 3 แถบ ตำแหน่งค่า Rf เท่ากับ 0.39, 0.75 และ 0.85 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปภาพที่ 4.9



รูปที่ 4.9 ผลวิเคราะห์ลายพิมพ์โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบดอก ใบแก้ว และเปลือกต้นแก้ว ลายพิมพ์โครมาโทแกรมผ่านการย้อมด้วยไอโอดีน (A) ลายพิมพ์โครมาโทแกรมตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (B) สารสกัดหยาบดอกแก้ว : ก สารสกัดหยาบใบแก้ว : ข สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว : ค

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วน สังเกตได้ว่าลายพิมพ์โครมาโทแกรมที่ได้ มีทั้งส่วนที่เหมือน (ค่า Rf ใกล้เคียงกัน) และแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างพืชแต่ละส่วนที่นำมาสกัดเป็นสารสกัดหยาบนั้น มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน และมีสารแต่ละชนิดในปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารสกัดแต่ละชนิด ทำให้การออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rojas *et al.* (2006) รายงานว่า สารสกัดต่างชนิดกัน ส่งผลให้ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ไม่เท่ากัน เพราะส่วนประกอบและชนิดของพืชที่แตกต่างกันไปจะมีสารทุติยภูมิที่แตกต่างกัน นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าสารสำคัญที่ได้จากการสกัดนั้นมีระยะเวลาเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน เนื่องจากสารที่มีขั้วน้อยจะละลายได้ดีในวัฏภาคเคลื่อนที่ แต่ถูกดูดซับด้วยวัฏภาคนิ่งได้น้อย สารจึงสามารถเคลื่อนที่ไปได้ดี ด้วยระยะที่มากกว่าสารที่มีขั้วสูงจึงละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้น้อย แต่การดูดซับบนวัฏภาคนิ่งได้ดีจึงเคลื่อนที่ไปได้ช้า (ชยาภรณ์, 2560)

เมื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ลายพิมพ์โครมาโทแกรมของผ่านการย้อมด้วยไอระเหยของไอโอดีน และลายพิมพ์โครมาโทแกรมตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) สังเกตได้ว่าแถบสารสำคัญของลายพิมพ์โครมาโทแกรมตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แสดงแถบได้ชัดเจนกว่าลายพิมพ์โครมาโทแกรมของผ่านการย้อมด้วยไอระเหยของไอโอดีนเล็กน้อย จากรายงานของ รัชฎาวรรณ และคณะ (2548) กล่าวถึงการตรวจสอบลายพิมพ์โครมาโทแกรมของสารทุติยภูมิ ซึ่งอธิบายว่า การตรวจสอบภายใต้แสง UV จะแสดงคุณสมบัติอย่างหยาบของสารสกัดทุติยภูมิที่เกี่ยวกับการดูดกลืนแสงในช่วง UV ส่วนวิธีอบด้วยเกล็ดไอโอดีนเป็นการตรวจสอบคุณสมบัติการเป็น lipid และ hydrophobic ดังนั้นสารสำคัญที่แยกได้จากสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว จึงเป็นไปได้เป็นสารทุติยภูมิ ที่อยู่ในช่วงการดูดกลืนแสงของ UV และมีคุณสมบัติเป็น lipid และ hydrophobic

#### 4.8 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดสารสกัดหยาบดอก ใบ แก้ว และเปลือกต้นแก้ว โดยใช้เครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) แสดงผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)

ลำดับที่	สารประกอบทางเคมี	ปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบ (%)		
		ดอก	ใบ	เปลือก
1	2-methoxy-4-vinyl-phenol	3.178	1.404	4.691
2	Ethyl bata D-Riboside	-	-	1.082
3	2,6-dimethyl-3-(methoxymethyl)-p-benzoquinone	-	1.166	1.130

ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) (ต่อ)

ลำดับที่	สารประกอบทางเคมี	ปริมาณขององค์ประกอบทางเคมี ในสารสกัดหยาบ (%)		
		ดอก	ใบ	เปลือก
4	Ethyl alpha-D-glucopyranoside	5.988	-	-
5	Naphthalene	-	1.000	-
6	Ethyl bata D-Riboside	-	-	14.100
7	1 - pentaleneacetaldehyde	-	-	2.583
8	9,12-octadecadienoic acid	-	-	2.851
9	2H-1-benzopyran-2-one	54.955	1.002	10.961
10	Hexadecanoic acid	5.029	1.981	5.908
11	phytol	-	3.560	1.635
12	Linoleic acid ethyl ester	-	-	6.830
13	9,12,15-octadecatrienoic acid	-	3.487	-
14	Ethyl oleate	-	-	7.726
15	Hexadecanamide	1.415	0.839	1.215
16	Octadecanoic acid	-	-	1.422
17	Murralonginol	-	-	0.715
18	7-methoxy-8-(2-oxo-3-methylbutyl) coumarin	-	1.330	-
19	Murrialongin	1.119	5.151	2.905
20	Murpanidin benzoate	1.118	11.023	-
21	10-(2-propynyl)-9(10H)-acridinone	-	-	2.212
22	9-Octadecenamide	15.442	11.418	12.412
23	Octadecanamide	3.365	1.325	-
24	Hexadecanamide	-	-	3.207
25	1,3-dioxo-2,4,6-trisilacyclohexane	-	5.565	-
26	3-methoxy-6-bromo-1,2,4-triazine 1- oxide	3.602		
27	5,6-dimethyl-2- (1(trimethylsilyl)propenine-2-yl) pyrazine)	-	-	6.696

ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) (ต่อ)

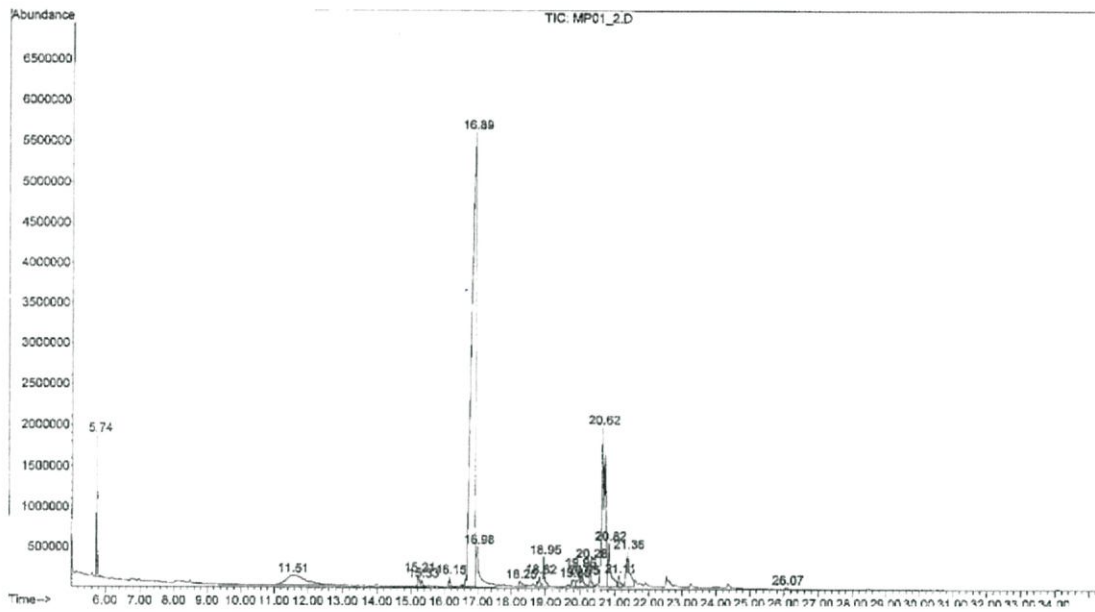
ลำดับที่	สารประกอบทางเคมี	ปริมาณขององค์ประกอบทางเคมี ในสารสกัดหยาบ (%)		
		ดอก	ใบ	เปลือก
28	Phenol	-	28.013	-
29	Ethyl isothiocyanate	-	1.327	-
30	1-octadecene	-	-	1.431
31	5,7-dimethoxy-8-(2'-keto-3-methylbutyl)	-	1.065	-
32	Isomurralonginol isovalerete	-	-	1.083
33	Octadecenoic acid	-	-	1.055
34	2H-1-benzopyran-2-one	-	3.559	-
35	12-azabicyclo[9.2.2] petadeca-1(14),11(15)-dien-13-one	-	-	2.144
36	Isomexoticin	-	4.181	-
37	2,4-dinitro-6-(2-butyl) -phenyl-.beta.,.beta.-dimethylacrylsaeureester	-	4.781	-

#### 4.8.1 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบดอกแก้ว

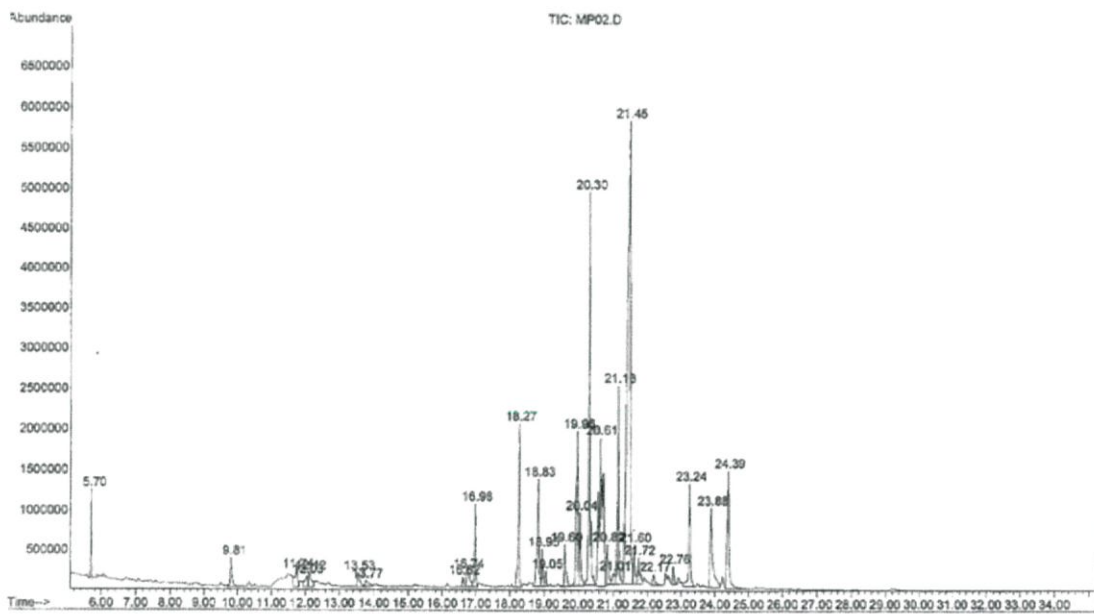
จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบดอกแก้วด้วยเครื่อง GC-MS พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีหลัก ได้แก่ 2-methoxy-4-vinylphenol 3.178%, 2H-1-benzopyran-2-one 54.955%, Hexadecanoic acid 5.029%, Hexadecanamide 1.415%, 9-Octadecenamide, 15.442% และ 3-methoxy-6-bromo-1,2,4-triazine 1-oxide 3.602% ในน้ำหนักที่ 5.74, 16.89, 16.98, 18.95, 20.62 และ 21.36 ตามลำดับ (รูปที่ 4.10)

#### 4.8.2 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบแก้ว

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบแก้วด้วยเครื่อง GC-MS พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีหลัก ได้แก่ 2-methoxy-4-vinylphenol 1.404%, 2,6-dimethyl-3-(methoxymethyl)-p-benzoquinone 1.166%, Hexadecanoic acid 1.981%, phytol 3.560%, 9,12,15-octadecatrienoic acid 3.487%, Murrialongin 5.151%, Murpanidin benzoate 11.023%, 9-Octadecenamide 11.418%, 1,3-dioxo-2,4,6-trisilacyclohexan 5.565%, Phenol 28.013%, 2H-1-benzopyran-2-one 3.559%, Isomexoticin 4.181% และ 2,4-dinitro-6-(2-butyl) -phenyl 4.781% ในน้ำหนักที่ 5.7, 9.81, 16.98, 18.28, 18.82, 19.96, 20.30, 20.6, 21.13, 21.45, 23.24, 23.88 และ 24.36 ตามลำดับ (รูปที่ 4.11)



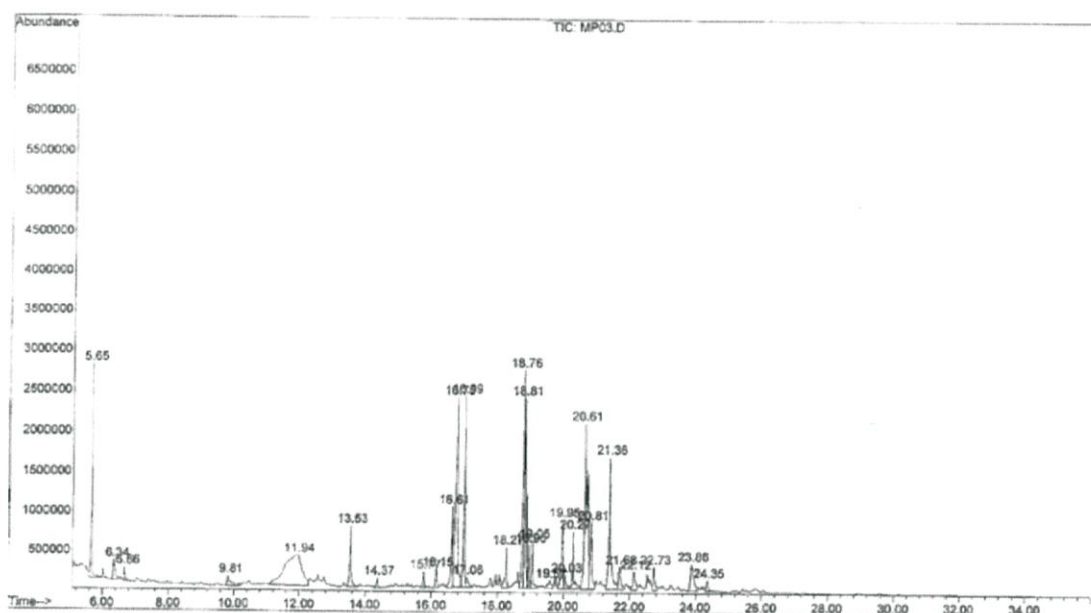
รูปที่ 4.10 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาดดอกแก้ว



รูปที่ 4.11 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาดใบแก้ว

#### 4.8.3 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้วด้วยเครื่อง GC-MS พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีหลัก ได้แก่ 2-methoxy-4-vinylphenol 4.691%, Ethyl .beta.-d-ribose 14.100%, 9,12-octadecadienoic acid 2.851%, 2H-1-benzopyran-2-one 10.961%, Hexadecanoic acid 5.908%, Linoleic acid ethylester 6.830%, Ethyl oleate 7.726%, 9-Octadecenamide 12.412% และ 5,6-dimethyl-2-(1(trimethylsilyl)propenine-2-yl) pyrazine 6.696% ในเวลาที่ 5.65, 11.94, 16.61, 16.75, 16.99, 18.76, 18.81, 20.61 และ 21.36 ตามลำดับ (รูปที่ 4.12)



รูปที่ 4.12 โครมาโตแกรมองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ โดยจัดจำแนกตามกลุ่ม มีดังนี้

1) สารประกอบฟีนอลิก พบ 3 ชนิด ได้แก่ Phenol, Phytol และ 2-methoxy-4-vinylphenol ซึ่ง Phenol อยู่ในกลุ่มสารประกอบพื้นฐานที่อยู่ในกลุ่มฟีนอลิก สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกแกรมลบ (Sabbineni, 2016) อีกทั้งยังมีงานวิจัยของ Burri *et al.* (2017) รายงานว่าสารสกัดส่วนใบมีองค์ประกอบ Phenol สูงทั้งนี้ทำให้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง สาร phytol เป็นสารอินทรีย์ที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นอะโรมาติก อยู่ในกลุ่มฟีนอลิก จึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งแบคทีเรียได้ดี นอกจากนี้สามารถยับยั้งการอักเสบ อากาศแพ้ และยังเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เป็นอย่างดี (Chaveerach *et al.*, 2016) และสาร 2-methoxy-4-vinylphenol เป็นสารประกอบฟีนอลิก มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งแบคทีเรียและยับยั้งอาการอักเสบ (Ravikumar *et al.*, 2012)

2) Coumarin พบ 6 ชนิด ได้แก่ 2H-1-benzopyran-2-one, murrialongin, Murrialonginol, 7-methoxy-8-(2-oxo-3-methylbutyl), Murrialongin, 5,7-dimethoxy-8-(2'-keto-3-methylbutyl) และ Isomurrialonginol isovalerete coumarin (Faisal *et al.*, 2014 ;

Han *et al.*, 1996) โดยสาร coumarin ในใบแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย สามารถต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งยังมีฤทธิ์ยับยั้งไวรัส และกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย (Aziz *et al.*, 2010 ; Rajasekaran *et al.*, 2011 ; Alyshev *et al.*, 2006 ; Kosai and Jiraungkoorskul, 2015)

3) Hexadecanoic acid หรือ palmitic acid เป็นกรดไขมันอิ่มตัว มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (Hashem *et al.*, 2016 ; McGaw *et al.*, 2002) งานวิจัยของ Huang *et al.* (2011) รายงานว่า palmitic acid มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

4) Hexadecanamide หรือ palmitamide งานวิจัยของ Premjanu and Jaynthy (2015) รายงานว่าสารชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

5) Ethyl bata-riboside งานวิจัยของ Oladimeji *et al.* (2016) รายงานว่า สาร Ethyl Ethyl bata-riboside ที่ได้จากสารสกัดใบโปตางสีเหลือง มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะเชื้อ *Pseudomonas sp.* แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก

จากผลการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนของต้นแก้ว พบองค์ประกอบที่เหมือนกัน จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ 1) สาร 2-methoxy-4-vinylphenol 2) สาร 2H-1-benzopyran-2-one 3) สาร Hexadecanoic acid 4) สาร Hexadecanamide 5) สาร murrialongin และ 6) สาร 9-Octadecenamide จากคุณสมบัติของสารข้างต้นทำให้สารสกัดหยาบที่ได้จากดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งแบคทีเรีย

จากผลการวิจัย พบว่า สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบใบแก้ว น้อยที่สุดคือสารสกัดหยาบดอกแก้ว อีกทั้งยังพบว่าสารสกัดหยาบใบและเปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดหยาบดอกแก้ว เนื่องจากสารสกัดหยาบเปลือก และใบต้นแก้ว มีสาร phytol, 2-methoxy-4-vinylphenol, coumarin, palmitic acid และ palmitamide อยู่ โดยพบสาร phenol เฉพาะในสารสกัดหยาบใบแก้ว ในขณะที่สารสกัดหยาบดอกแก้ว พบเพียงสาร 2-methoxy-4-vinylphenol, coumarin, palmitic acid และ palmitamide ซึ่งมีสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดดอกแก้วเพียงชนิดเดียว อีกทั้งยังพบว่าสารประกอบที่อยู่ในกลุ่ม coumarin ในสารสกัดหยาบดอกแก้วมี 2 ชนิด สารสกัดหยาบใบแก้วมี 5 ชนิด และสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้วมี 4 ชนิด จึงทำให้สารสกัดหยาบดอกแก้วมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุด นอกจากนี้พบว่า สาร Ethyl bata-riboside ที่พบเฉพาะในสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะเชื้อ *Pseudomonas sp.* แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นอาจเป็นสาเหตุให้สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากดอกและใบแก้ว

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาดดอก ใบแก้ว และเปลือกต้นแก้ว พบว่า สารสกัดหยาดดอกแก้วมีค่าร้อยละของปริมาณสารสกัดที่ได้ (%yield) มากที่สุดเท่ากับ 89.35% รองลงมาคือ สารสกัดใบและสารสกัดเปลือกต้นแก้ว โดยมี %yield เท่ากับ 31.38% และ 3.68% ตามลำดับ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging พบว่า สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH ดีที่สุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดหยาดใบและดอกแก้ว โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 3.15 และ 7.37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดหยาด โดยวิธี Folin–Ciocalteu reagent พบว่าสารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้วมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาดใบและดอกแก้ว โดยมีค่าเทียบเท่ากับ  $70.81 \pm 0.31$ ,  $61.03 \pm 0.47$  และ  $50.78 \pm 0.27$  มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric พบว่า สารสกัดหยาดใบแก้ว มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาดจากเปลือกและดอกแก้ว โดยมีค่าเทียบเท่ากับ  $115.73 \pm 1.18$ ,  $101.94 \pm 0.73$  และ  $38.28 \pm 0.13$  ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาดดอก ใบแก้ว และเปลือกต้นแก้ว ด้วยวิธี Agar well diffusion ในแบคทีเรียก่อโรคทั่วไป 5 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาดใบแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 สูงที่สุด ในขณะที่สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 9341, *Escherichia coli* ATCC 1261 สูงที่สุด

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลา 2 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* sp., และเชื้อ *Streptococcus* sp. สูงที่สุดทั้ง 2 ชนิด โดยมีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่า สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ได้ดีที่สุด โดยมีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) พบว่า สารสกัดหยาดทั้ง 3 ส่วน คือ สารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว มีค่า MIC ต่อเชื้อ *M. luteus* TISTR 9341 ต่ำสุดเท่ากันที่ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อีกทั้งสารสกัดหยาดใบแก้วยังมีค่า MIC ต่อเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* TISTR 1466 ต่ำสุดเท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) สารสกัดหยาดใบแก้ว มีค่า MBC ต่อเชื้อ *B. subtilis*

ATCC 6633 ต่ำสุดเท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดหยาบจากดอก และเปลือกต้นแก้ว มีค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 ต่ำสุดเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นอกจากนี้การวิเคราะห์ลายพิมพ์โครมาโทแกรมด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบาง พบว่าลายพิมพ์โครมาโทแกรม ของสารสกัดหยาบดอกแก้ว มีแถบสารสำคัญจำนวน 3 แถบ ตำแหน่งค่า Rf เท่ากับ 0.31, 0.43 และ 0.75 ตามลำดับ สารสกัดหยาบใบแก้ว มีแถบสารสำคัญจำนวน 3 แถบ ตำแหน่งค่า Rf เท่ากับ 0.73, 0.82, และ 0.85 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว มีแถบสารสำคัญจำนวน 3 แถบ ตำแหน่งค่า Rf เท่ากับ 0.39, 0.75 และ 0.85 ตามลำดับ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC-MS ของสารสกัดหยาบดอก ใบแก้ว และเปลือกต้นแก้ว พบว่า มีองค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกัน จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ 2-methoxy-4-vinylphenol, 2 H-1 - benzopyran-2 - one , Hexadecanoic acid, Hexadecanamide, murrialongin และ 9-Octadecenamide ซึ่งคุณสมบัติขององค์ประกอบเหล่านี้ส่งผลให้สารสกัดทั้ง 3 ส่วนสามารถต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย โดยสารสกัดแต่ละส่วนมีองค์ประกอบทางเคมีหลายประเภทแตกต่างกัน และปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่ไม่เท่ากัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าส่วนของพืชที่แตกต่างกัน เป็นปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งแบคทีเรีย

การศึกษาในครั้งนี้ เป็นผลดีต่อการเลือกใช้ยาหรืออาหารเสริมจากธรรมชาติ แทนการสังเคราะห์จากสารเคมี ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ทางด้านเภสัชกรรม การแพทย์ และเกษตรกรรมต่อไป

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในด้านอื่นด้วย เช่น ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง หรือทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด

5.2.2 สามารถใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระวิธีอื่นที่ เพิ่มเติมจากในการวิจัยนี้ เช่น วิธี FRAP, ORAC และ ABTS

5.2.3 ควรมีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นนอกจากแบคทีเรีย เช่น ยีสต์ รา ปรสิต เป็นต้น

## เอกสารอ้างอิง

- จารวี สุขประเสริฐ และสุบงกช ทรัพย์แดง. 2555. การศึกษาผลของตัวทำลายลายในการสกัด สมุนไพรที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย. *กรมวิทยาศาสตร์บริการ*. 1(1), 99-109
- ใจพร พุ่มคำ. 2555. อาหารไม่ปลอดภัย ผลจากการใช้ยาปฏิชีวนะ. *วารสารอาหารและยา*
- ชยาภรณ์ วงศ์ศิริเดชชัย. 2560. สมบัติการเป็นพรีไบโอติกของโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก กากกาแฟ ด้วยแมนนาเนสจาก *Bacillus sp. GA2(1)*. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
- ชาญณรงค์ รอดคำ. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์. *Bacterial Diseases of Fish*. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 18
- ณัฐริกา ศิลาฉาย. 2549. ฟลาโวนอยด์ในใบชา หน้าที่ การใช้ประโยชน์ และการวิเคราะห์. *วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม*. 2(1)
- ดวงกมล เรืองงาม. 2557. การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง*. 23 (2)
- ทัศนีย์ นวลชัย และจิตรา ดวงแก้ว. 2559. ผลของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งเจริญเติบโต ของ เชื้อ *Aromonas hydrophila*. *แก่นเกษตร* 44. ฉบับพิเศษ 1.
- ธีรวิภา หวังอำนาจพร และรัชณี ไสยประจง. 2550. ความสามารถในการต้านจุลินทรีย์และต้านสาร อนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2552. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- นงลักษณ์ ห้วยหงษ์ทอง. 2559. การทดสอบสารพิษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรไทยบาง ชนิดที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน. สาขาวิชาเคมีศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
- นวลจันทร์ พารักษา. 2555. ศักยภาพและทิศทางการสมุนไพรในปศุสัตว์. *แก่นเกษตร*. 40(2), 110-113
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. 2556. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 21(3)
- ประทุมพร ปลอดภัย. 2560. การพัฒนาชีวภัณฑ์สารสกัดหยาบสมุนไพรผสมอนุภาคนาโนโคโตซาน เพื่อควบคุมโรคเน่าเละของผักคะน้า. สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตรคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
- ปราโมทย์ แผงคำและ โอภาส พิมพ์า. 2545. บทบาทของสารประกอบแทนนินในพืช โปรตีนอาหาร สัตว์สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง. *จดหมายข่าวโคนม*. 6(2), 11-129
- ปียนันท์ ชมนาวัง, อาภาภรณ์ พันผาด, ชไมพร เบิกบานดี, ปิยะฉัตร วิริยะอาไพวงศ์ และชาญณรงค์ ชมนาวัง. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์. การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชให้สีธรรมชาติ. ทรัพยากร ไทย : หวนดูทรัพย์สิ่งสินตน. การประชุมวิชาการชมรมคณะปฏิบัติการวิทยาการ อพ.สธ. ครั้งที่ 7. หน้า 359-365
- พงศ์เทพ อันตะริกานนท์, สุริยา สาสนรักกิจ, อัญชญา พัฒนสุพงษ์, จารุ วรรณ โควสุรัตน์, ณัฐพร พันธุ์นาวัน, สยาม ลินสวัสดิ์ และ สุมาลี แสนพลเมือง. 2540. การผลิตสารแซนโทฟิลจาก ดอกดาวเรืองเพื่ออุตสาหกรรม. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

- พัชรินทร์ ระวียัน. 2551. ผลของสารต้านอนุมูลอิสระต่ออายุการเก็บรักษาและความคงตัวของสีผสมอาหารจากแคโรทีนอยด์ที่สกัดจากน้ำมันปาล์มดิบ. **รายงานฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย**. 82
- พีรศักดิ์ วรสุนทรโรสถ. 2544. ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 3 พืชที่ให้สีย้อม และแทนนิน. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.). ห้างหุ้นส่วนจำกัด กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชวนพิมพ์
- มณฑินี จุลละนันท์, กัลยา หาญพิชญาชัย และชุลีวัลย์ ธีญญศิรินนท์. 2558. ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus fumigatus*. **วารสารวิชาการสาธารณสุข**. 25(6)
- มัทนา แสงจินดาวงษ์. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์. ผลิตภัณฑ์ประมง 311 (จุลชีววิทยาประมง). ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- มานพ เจริญไชยตระกูล, ศิริพร ลิ่มศิริวัลลภ และ ธีรภัทร สุทธิเจริญ. 2547. การสกัดเบต้าแคโรทีนด้วยตัวทำละลายที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต. **วิศวกรรมสาร มก.** 18(53), 85-91
- รัชฎาวรรณ เดชมณี, สุดฤดี ประเทืองวงศ์, วิชัย ไชยสิทธิ์ตัน และ สมชัย พรบันลือลาภ. 2548. แถบ Thin - layer Chromatography ของสารทุติยภูมิที่ผลิตโดย *Bacillus firmus* และการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43**. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 313-320
- วรพัทธ์ เกียรติรัมย์. 2553. สมุนไพรพืชล้านนา เล่ม 1. เชียงใหม่ : สุทินการพิมพ์
- วรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์ และมารุจ ลิ้มปะวัตมณะ. 2553. แอสตาแซนธิน คุณค่าที่มากกว่าความเป็นสี. **วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม**. 5
- วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, พัชรี กัมมารเจษฎากุล และอิสยา จันทรวิธานุชิต. 2559. ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* ATCC 25922. **วารสาร มฉก.วิชาการ**. 19(38)
- วาทีณี เสลร์ราษฎร์. 2559. การสกัด การตรวจสอบสารพิษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อแบคทีเรียของทุเรียนเทศ. สาขาวิชาเคมีศึกษา มหาวิทยาลัยบูรพา
- วารุณี นาเจริญ และ อัญชลี เลขนอก. 2546. การศึกษาการสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากยอดและเปลือกของแคบ้าน. โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา.
- วีรวรรณ รุวีระ. 2549. การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย. **สงขลานครินทร์เวชสาร**. 24(5)
- สายสนม ประดิษฐ์ดวง, เนื่อทอง วนานุวัธ และมณี แสงเงิน. 2532. การนำไคร่าข้าวมาใช้ประโยชน์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร.
- สุกัญญา เขียวสะอาด. 2555. กะเพราภักการต้านอนุมูลอิสระ *Ocimum sanctum* Linn. and Free Radical Scavenging Activity. **วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง**. 21(2)
- สุธีรา มณีฉาย และประสพอร รินทอง. 2559. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากถั่วแระและดอกส้มป่อย. **วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น**. 44(1), 142-152

- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2556. มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค. คู่มือการปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข. ฉบับที่ 364
- อมรรตน์ สีสุกอง, กัลยาภรณ์ จันตรี, ศรีสุดา หาญภาคภูมิ, นาฏลดา อ่อนวิมล และทิวมา นวลบุญ. 2550. การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากวัชพืชท้องถิ่นในจังหวัดนนทบุรี. โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
- Abdulhadi-Noaman, Y., Ng, M. K., Cheah, Y.K., Yeap, S.K. and Alitheen, N.B. 2012. Bioactivity studies and chemical constituents of *Murraya paniculata* (Linn) Jack. **International Food Research Journal**. 19(4), 1307-1312
- Abyshev, A. Z., Gindin, V.A., Semenov, E.V., Agaev, E.M., Abdulla-zade, A. A. and Guseinov A.B. 2006. STRUCTURE AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF 2 H-1 - BENZOPYRAN-2 - ONE (COUMARIN) DERIVATIVES. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. 40(11)
- Adaramola, B. and Onigbinde, A. 2016. Effect of Extraction Solvent on the Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Capacity Of Clove Bud. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**. 11(3), 33-38
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharloue, A., Watson, D.G. and Lightfoot, D. A. 2017. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. **MDPI**. 6(42)
- Aziz, S. S. S. A., Sukari, M. A., Rahmani, M., Kitajima, M., Aimi, N. and Ahpandi N.J. 2010. COUMARINS FROM MURRAYA PANICULATA (RUTACEAE) (Koumarin daripada *Murraya Paniculata* (Rutaceae)). **The Malaysian Journal of Analytical Sciences**. 4(1), 1-5
- Baba, Sh.A. and Malik, Sh.A. 2015. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii*. **Journal of Taibah University for Science**. 9, 449–454
- Bovornvattanangkul, T. and Jiraungkoorskul, W. (2016). Evaluation of total phenolic compound and cytotoxic activity of *Murraya paniculata*. **International Food Research Journal**. 23(3), 1207-1211
- Burri, S.C.M., Ekholm, A., Hakansson, A., Tornberg, E., and Rumpunen. K. 2017. Antioxidant capacity and major phenol compounds of horticultural plant materials not usually used. **Journal of Functional Foods**. 38, 119–127
- Castro, M.D. and Priego-Capote, F. 2010. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography**. 1217, 2383–2389
- Chaveerach, A., Lertsatitthanakorn, P., Tanee, T., Puangjit, N., Patarapadungkit, N. and Sudmoon, R. (2016). Chemical Constituents, Antioxidant Property, Cytotoxicity and Genotoxicity of *Tiliacora Triandra*. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**. 8(5), 722-729
- Danchin, A. 2001. *Bacillus subtilis*. **Encyclopedia of Genetics**. 135-144

- Dosoky, N.S., Satyal, P., Gautam, T.P. and Setzer, W.N. 2016. Composition and Biological Activities of *Murraya paniculata* (L.) Jack Essential Oil from Nepal. **Medicines**. 3(7)
- Doughari, J.H. 2012. Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents. **Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**.
- Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop P., McGaw, M., Marchant, R. and Banat, I.M. 2016. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnol Lett**. 38, 1015–1019
- Evans, P. and Halliwell B. 2001. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **Br. J. Nutr**. 85, S67-S74.
- Faisal, M., Sarker, Md.MH., Rahman, A., Hossain, A.I., Rahman, Sh., Bashar, ABM.A., Jahan, R. and Rahmatullah, M. 2014. *Murraya paniculata* (L.) Jack: A Potential Plant for Treatment of Toothache. **Journal of Dentistry, Oral Disorders & Therapy**.
- Frankel, E.N. and Meyer A.B.S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 80(13), 1925-1941
- Gautam, M. K., Gupta, A., Rao, C. V. and Goel R. K. 2012. Antihyperglycemic and antioxidant potential of *murraya paniculata* linn. Leaves: a preclinical study. **Journal of Pharmacy Research**. 5(3), 1334-1337
- Green, B.N., Johnson, C.D., Egan, J.T., Rosenthal Erin, M. Griffith, A. and Evans, M.W. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview for manual therapists. **Journal of Chiropractic Medicine**. 11, 64–76
- Han, B.H., Takeatsu, K., and Pui-hay, B.P. 1996. **International Collation Of Traditional And Folk Medicine**. World Scientific. 1, 238
- Hashem, E.Z., Khodadadi, M., Asadi, F., Koohi, M.K. and Mohsen. 2016. The Antioxidant Activity of Palmitoleic Acid on the Oxidative Stress Parameters of Palmitic Acid in Adult Rat Cardiomyocytes. **Ann Mil Health Sci Res**. 14(3)
- Huang, C.B., Altimova, Y., Myers, T.M. and Ebersole, J.L. 2011. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. **National institutes of health**. 56(7), 650–654
- Jang, J., Hur, HG., Sadowsky, MJ., Byappanahalli, MN., Yan, T. and Ishii, S. 2017. Environmental *Escherichia coli*. **ecology and public health implications-a review**. 123(3), 570-581
- John, B., Sulaiman, C.T., George, S. and Reddy, V.R.K. 2014. TOTAL PHENOLICS AND FLAVONOIDS IN SELECTED MEDICINAL PLANTS FROM KERALA. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 6(1), 406-408

- Karaman, I., Sahin, F., Gulluce, M., Ogutcu, H., sengul, M. and Adiguzel, A. 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethanopharmacology**. 85, 231-235
- Kosai, P. and Jiraungkoorskul W. 2015. Review of Hypoglycemic Activity of *Murraya paniculata* Linn. **Advances in Environmental Biology**. 9(3), 466-472
- Kumara, K., Giribhattanavara, P., Sagarb, C. and Patil, S. 2018. A rapid and simple resazurin assay to detect minimum inhibitory concentrations of first-line drugs for Mycobacterium tuberculosis isolated from cerebrospinal fluid. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. 12, 157-161
- Li, H., Li, X. and Yu, J. 2015. Autoinducer-2 regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation and virulence production in a dose-dependent manner. **BMC Microbiology**. 15(192)
- McGaw, L.J., Jager, A.K. and Staden, Jv. 2002. Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. **SOUTH AFRICAN JOURNAL OF BOTANY**. 68, 417-423
- Menezes, I.R.A., Santana, T.I., Varela, V.J.C., Saraiva, R.A., Matias, E.F.F., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M. and Rocha, J.B.T. 2014. Chemical composition and evaluation of acute toxicological, antimicrobial and modulatory resistance of the extract of *Murraya paniculata*. **Pharmaceutical Biology**. 26, 1-7.
- Neta, M.C.S., Vittorazzi, C., Guimaraes, A.C., Martins, J.D.L., Fronza, M., Endringer, D.C. and Scherer R. 2017. Effects of  $\beta$ -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. **PHARMACEUTICAL BIOLOGY**. 55(1), 190-197
- Nisa, H., Kamili, A.N., Bandh, S.A., Amin, S., Lone, B.A. and Parray, J.A. 2013. Phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant efficacy of different extracts of *Rumex dentatus* L. - A locally used medicinal herb of Kashmir Himalaya. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. 3(6), 434-440
- Nostro A., German, M.P., Angelo, V., Marino, A. and Cannatelli, M.A. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. **Lett Appl Microbiol**. 30(5), 379-84.
- Oladimeji, a., Olawale, H., Stanlinus, N., Njinga, b. and Unwam-Abasi C.U. 2016. Isolation, Characterization and Antimicrobial Analysis of Ethyl succinate and Ethyl  $\beta$ -riboside from *Acalypha wilkesiana* var. golden-yellow (Muell & Arg.). **African Journal of Pharmacology and Therapeutics**. 5(3), 136-141
- Padalia, H. and Chanda S. 2015. Antimicrobial Efficacy of Different Solvent Extracts of *Tagetes erecta* L. Flower, Alone and in Combination with Antibiotics. **Applied Microbiology: Open Access**. 1(1)

- Patel, S. and Sharma A. 2016. Antibacterial Activity of Methanolic Extract of Medicinal Plant *Murraya paniculata* (Linn.) against *Xanthomonas citri*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 5(9), 198-20
- Premjanu, N., and Jaynthy C. 2015. Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Lanea corammendalica*. **International Journal of ChemTech Research**. 7(1), 369-374
- Rajasekaran, S., Rao, G.K., Sanjay, P.P., and Ranjan, A. 2011. Design Synthesis Antibacterial and invitro Antioxidant activity of substituted 2HBenzopyran-2-one derivatives. **International Journal of ChemTech Research**. 3(2), 555-559
- Ravikumar, VR., Gopal, V., and Sudha T. 2012. Analysis of Phytochemical Constituents of Stem Bark Extracts of *Zanthoxylum Tetraspermum* Wight & Arn. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**. 3(4), 0975-8585
- Rodriguez, E.J., Ramis-Ramos, G., Heyden YV, Simo-Alfonso EF, Lerma-García MJ, Saucedo-Hernandez, Y., Monteagudo, U. Morales, Y., Holgado, B. and Herrero-Martinez, JM. 2012. Chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of the essential oil of *Murraya paniculata* leaves from the mountains of Central Cuba. **US National Library of Medicine National Institutes of Health**. 7(11), 1527-30
- Rohman, A., and Riyanto, D.S. 2005, Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kemuning (*Murraya paniculata* (L) Jack) secara in vitro. **Majalah Farmasi Indonesia**. 16(3), 136-140
- Rojas, J.J., Ochoa, V.J., Ocampo, S. A. and Munoz, J.F. 2006. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 6(2)
- Rout, P.K., Rao, Y. and Naik, S. 2010. Liquid CO<sub>2</sub> extraction of *Murraya paniculata* Linn. flower. **Industrial Crops and Products**. 31, 338-342
- Sabbineni, J. 2016. Phenol-An effective antibacterial Agent. **Research & Reviews: Journal of Medicinal & Organic Chemistry**. 3(2)
- Sayar, K., Paydar, M. and Pinguan-Murphy, B. (2014). Pharmacological Properties and Chemical Constituents of *Murraya paniculata* (L.) Jack. **Med Aromat Plants**. 3(4)
- Sundaram, M., Sivakumar, Karthikeyan, Bhuvaneshwari, Aishwarya, Thirumalai and Pennarasi. 2011. Studies on *in vitro* Antibacterial, Antifungal Property and Antioxidant Potency of *Murraya paniculata*. **Pakistan Journal of Nutrition**. 10(10), 925-929

- Taylor, TA., and Unakal CG. 2017. *Staphylococcus aureus*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
- Yang, J.F., Yang, Ch.H., Chang, H.W., Y, Ch.S., Lin, Ch.W. and Chuang. L.Y. 2009. Antioxidant and antibacterial properties of *Pericarpium trichosanthis* against nosocomial drug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in Taiwan. **Journal of Medicinal Plants Research**. 3(11), 982-991
- Zhu, C., Lei, Z. and Luo, Y. 2015. Studies on antioxidative activities of methanol extract from *Murraya paniculata*. **Food Science and Human Wellness**. 4, 108–114

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. สูตรอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA)

Acid hydrolysate of casein	17.50 กรัม
Starch	1.50 กรัม
Agar	17.00 กรัม

ปรับค่าพีเอช (pH) ให้อยู่ในช่วง  $7.4 \pm 0.2$

ทำการชั่งส่วนประกอบของอาหารดังอัตราส่วนข้างต้น โดยทำการละลายส่วนประกอบต่างๆ ของอาหารในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วทำการให้ความร้อนด้วยวิธีการต้มจนกระทั่ง ส่วนประกอบต่างๆ ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงนำไปทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

#### 2. สูตรอาหาร Trptic Soy Agar (TSA)

Pancreatic Digest of Casein	15.00 กรัม
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5.00 กรัม
Sodium Chloride	5.00 กรัม
Agar	15.00 กรัม

ปรับค่าพีเอช (pH) ให้อยู่ในช่วง  $7.3 \pm 0.2$

ทำการชั่งส่วนประกอบของอาหารดังอัตราส่วนข้างต้น โดยทำการละลายส่วนประกอบต่างๆ ของอาหารในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และเติมเกลือ NaCl เป็นลำดับสุดท้าย แล้วทำการให้ความร้อนด้วยวิธีการต้มจนกระทั่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงนำไปทำการ ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

#### 3. สูตรอาหาร Trptic Soy Agar (TSB)

Pancreatic Digest of Casein	15.00 กรัม
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5.00 กรัม
Sodium Chloride	5.00 กรัม

ปรับค่าพีเอช (pH) ให้อยู่ในช่วง  $7.3 \pm 0.2$

ทำการชั่งส่วนประกอบของอาหารดังอัตราส่วนข้างต้น โดยทำการละลายส่วนประกอบต่างๆ ของอาหารในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และเติมเกลือ NaCl เป็นลำดับสุดท้าย แล้วทำการให้ความร้อนด้วยวิธีการต้มจนกระทั่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงนำไปทำการ ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข

### การเตรียมสารละลายเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

#### 1. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

1. เตรียมสารละลาย DPPH ใน Absolute Ethanol โดยทำการชั่ง DPPH ปริมาณ 0.00197 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร จะได้สารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์

2. เตรียมสารละลายตัวอย่างในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 2.5 1.25 0.63 และ 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. เตรียมสารละลายกรดแอสคอร์บิกใน Absolute Ethanol ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 0.08 0.06 0.04 0.02 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

#### 2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents)

##### 2.1 สารเคมี

2.1.1 Folin-Ciocalteu reagent

2.1.2 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้นร้อยละ 7.5

2.1.3 สารละลายกรดแกลลิก

##### 2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

2.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้นเริ่มต้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.2 นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.025 0.05 0.1 0.15 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.3 ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม

2.2.4 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

2.2.5 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 30 นาที

2.2.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท

2.2.7 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัม

#### 3. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid contents)

##### 3.1 สารเคมี

3.1.1 สารละลายโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_2$ ) ความเข้มข้นร้อยละ 5

3.1.2 สารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ ( $AlCl_3$ ) ความเข้มข้นร้อยละ 10

3.1.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

### 3.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานควอซิทิน

3.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานควอซิทินความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.2 เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.3 ปิเปตสารละลายมาตรฐานควอซิทินที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง

3.2.4 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร

3.2.5 ใส่สารละลายโซเดียมไนเตรท ( $NaNO_2$ ) ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 5 นาที

3.2.6 เติมสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ ( $AlCl_3$ ) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 6 นาที

3.2.7 ใส่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

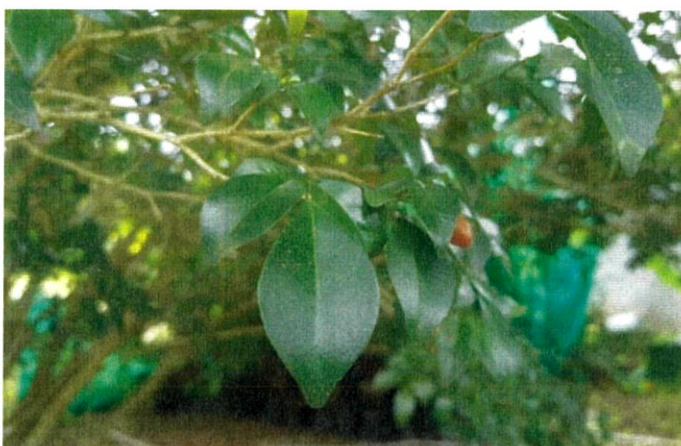
3.2.8 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 550 ไมโครลิตร

3.2.9 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยา ไมโครเพลท

1.2.10 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของควอซิทินในหน่วยมิลลิกรัม

## ภาคผนวก ค

### ภาพสถานที่เก็บตัวอย่างพืช



#### รูปภาคผนวก ค.1 พื้นที่เก็บตัวอย่างพืช

พื้นที่การเก็บตัวอย่างต้นแก้ว จากบริเวณหมู่ 3 ตำบลชากไทย อำเภอเขาคิชฌกูฏ จังหวัดจันทบุรี มีลักษณะภูมิประเทศที่อุดมสมบูรณ์ บริเวณล้อมรอบด้วยสวนผลไม้ มีการดูแลรดน้ำเป็นประจำ

## ภาคผนวก ง

ข้อมูลผลการทดสอบสมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ผลการวิเคราะห์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และผลการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์

### 1. ข้อมูลผลการทดสอบสมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบ ดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

ตารางภาคผนวก ง.1 ค่าดูดกลืนแสงการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบดอกแก้ว

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0.31	0.495	0.498	0.499	0.497
0.63	0.479	0.487	0.488	0.485
1.25	0.432	0.433	0.432	0.432
2.5	0.412	0.415	0.421	0.416
5	0.327	0.331	0.333	0.330
10	0.229	0.232	0.239	0.233
20	0.179	0.179	0.188	0.182

ตารางภาคผนวก ง.2 ค่าดูดกลืนแสงการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบใบแก้ว

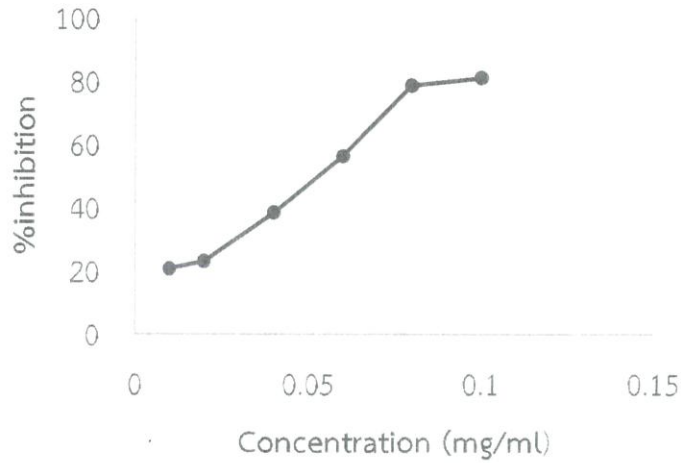
ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0.31	0.409	0.412	0.405	0.409
0.63	0.367	0.366	0.363	0.365
1.25	0.296	0.297	0.296	0.296
2.5	0.261	0.275	0.278	0.271
5	0.198	0.203	0.195	0.199
10	0.188	0.183	0.195	0.189
20	0.137	0.139	0.136	0.137

ตารางภาคผนวก ง.3 ค่าดูดกลืนแสงการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว

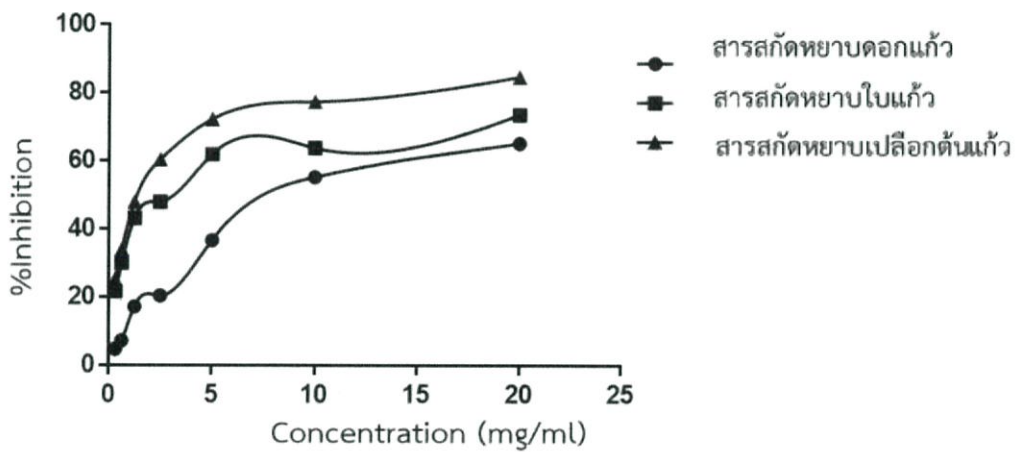
ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0.31	0.389	0.390	0.392	0.390
0.63	0.344	0.348	0.342	0.345
1.25	0.269	0.272	0.273	0.271
2.5	0.204	0.205	0.212	0.207
5	0.141	0.146	0.147	0.145
10	0.113	0.118	0.122	0.118
20	0.081	0.079	0.080	0.080

ตารางภาคผนวก ง.4 ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นต่างๆของกรดแอสคอร์บิก

ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ
0.01	20.65
0.02	22.94
0.04	38.43
0.06	56.21
0.08	78.58
0.10	81.07



รูปภาคผนวก ง.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งอนุมูลิสรระกับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปภาคผนวก ง.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งอนุมูลิสรระกับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากดอก ใบ และเปลือกของต้นแก้ว

ตารางภาคผนวก ง.5 ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาดดอกแก้ว

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0.31	5.35	4.78	4.59	4.91
0.63	8.41	6.88	6.69	7.33
1.25	17.40	17.21	17.40	17.34
2.5	21.22	20.65	19.50	20.46
5	37.48	36.71	36.33	36.84
10	56.21	55.64	54.30	55.39
20	65.77	65.77	64.05	65.20

ตารางภาคผนวก ง.6 ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาดใบแก้ว

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0.31	21.80	21.22	22.56	21.86
0.63	29.83	30.02	30.59	30.15
1.25	43.40	43.21	43.40	43.34
2.5	50.10	47.42	46.85	48.12
5	62.14	61.19	62.72	62.01
10	64.05	65.01	62.72	63.93
20	73.80	73.42	73.99	73.74

ตารางภาคผนวก ง.7 ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0.31	25.62	25.43	25.05	25.37
0.63	34.23	33.33	34.61	34.06
1.25	48.57	47.99	47.80	48.12
2.5	60.99	60.80	59.46	60.42
5	73.04	72.08	71.89	72.34
10	78.39	77.44	76.67	77.50
20	84.51	84.89	84.70	84.70

## 2. ข้อมูลผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

ตารางภาคผนวก ง.8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัดดอกแก้ว ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใบ และเปลือกต้นแก้ว ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

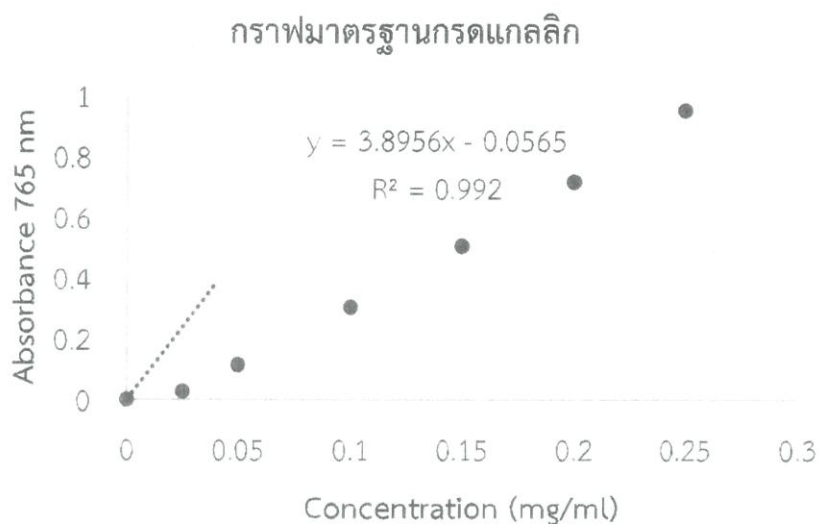
ชนิดสารสกัด	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความคลื่น 765 นาโนเมตร			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	0.436	0.441	0.437	0.438
สารสกัดหยาบใบแก้ว	0.242	0.238	0.242	0.241
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	0.288	0.287	0.290	0.288

ตารางภาคผนวก ง.9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบ ดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

ชนิดสารสกัด	ปริมาณฟีนอลิก (มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	50.57	51.08	50.67	50.78
สารสกัดหยาบใบแก้ว	61.30	60.48	61.30	61.03
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	70.75	70.54	71.16	70.81

ตารางภาคผนวก ง.10 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของกรดแกลลิก (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร
0.025	0.028
0.050	0.115
0.100	0.306
0.150	0.506
0.200	0.717
0.250	0.952



รูปภาพผนวก ง.3 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

### 3. ข้อมูลผลการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

ตารางภาคผนวก ง.11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

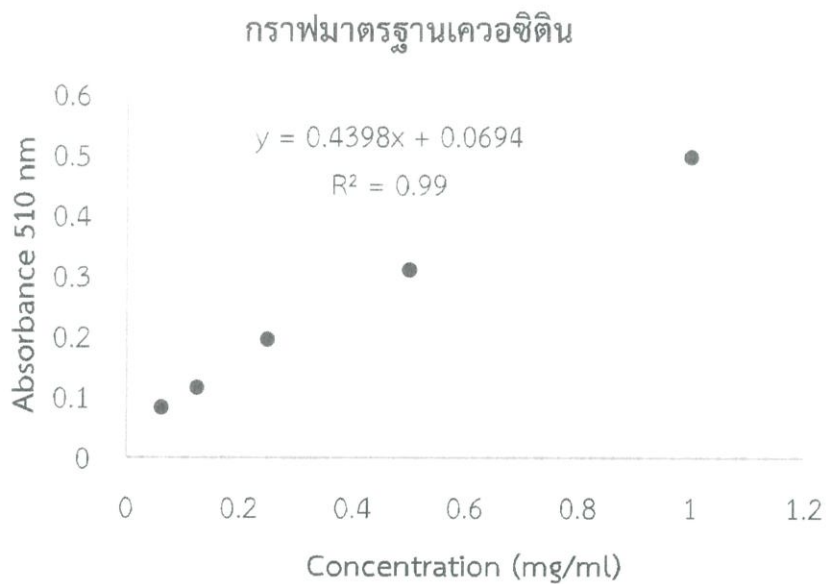
ชนิดสารสกัด	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความคลื่น 765 นาโนเมตร			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	0.237	0.237	0.238	0.237
สารสกัดหยาดใบแก้ว	0.581	0.572	0.581	0.578
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	0.516	0.515	0.521	0.517

ตารางภาคผนวก ง.12 ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว

ชนิดสารสกัด	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัมแควอซิตินต่อกรัมสารสกัด)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	38.20	38.20	38.43	38.28
สารสกัดหยาดใบแก้ว	116.42	116.42	114.37	115.73
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	101.64	101.41	102.77	101.94

ตารางภาคผนวก ง.13 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเควอซีตินที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของเควอซีติน (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร
0.0625	0.082
0.1250	0.115
0.2500	0.195
0.5000	0.310
1.0000	0.497



รูปภาคผนวก ง.4 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเควอซีตินและค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

**ภาคผนวก จ**  
**การคำนวณและตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ**

**ตารางภาคผนวก จ.1** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ของความเข้มข้นที่ต่างกัน

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	0.31 mg/ml	718.274 <sup>a</sup>	2	359.137	1551.070	.000
	0.63 mg/ml	1250.174 <sup>b</sup>	2	625.087	1270.185	.000
	1.25 mg/ml	1646.699 <sup>c</sup>	2	823.350	13512.600	.000
	2.5 mg/ml	2513.380 <sup>d</sup>	2	1256.690	842.962	.000
	5 mg/ml	2000.674 <sup>e</sup>	2	1000.337	2280.176	.000
	10 mg/ml	746.352 <sup>f</sup>	2	373.176	368.944	.000
	20 mg/ml	573.476 <sup>g</sup>	2	286.738	775.692	.000
Intercept	0.31 mg/ml	2718.071	1	2718.071	11739.018	.000
	0.63 mg/ml	5116.762	1	5116.762	10397.326	.000
	1.25 mg/ml	11836.441	1	11836.441	194256.603	.000
	2.5 mg/ml	16640.836	1	16640.836	11162.332	.000
	5 mg/ml	29306.647	1	29306.647	66801.815	.000
	10 mg/ml	38735.458	1	38735.458	38296.161	.000
	20 mg/ml	50017.370	1	50017.370	135308.581	.000
Extract	0.31 mg/ml	718.274	2	359.137	1551.070	.000
	0.63 mg/ml	1250.174	2	625.087	1270.185	.000
	1.25 mg/ml	1646.699	2	823.350	13512.600	.000
	2.5 mg/ml	2513.380	2	1256.690	842.962	.000
	5 mg/ml	2000.674	2	1000.337	2280.176	.000
	10 mg/ml	746.352	2	373.176	368.944	.000
	20 mg/ml	573.476	2	286.738	775.692	.000

ตารางภาคผนวก จ.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ของความเข้มข้นที่ต่างกัน (ต่อ)

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Error	0.31 mg/ml	1.389	6	.232		
	0.63 mg/ml	2.953	6	.492		
	1.25 mg/ml	.366	6	.061		
	2.5 mg/ml	8.945	6	1.491		
	5 mg/ml	2.632	6	.439		
	10 mg/ml	6.069	6	1.011		
	20 mg/ml	2.218	6	.370		
Total	0.31 mg/ml	3437.734	9			
	0.63 mg/ml	6369.889	9			
	1.25 mg/ml	13483.506	9			
	2.5 mg/ml	19163.160	9			
	5 mg/ml	31309.953	9			
	10 mg/ml	39487.879	9			
	20 mg/ml	50593.063	9			
Corrected Total	0.31 mg/ml	719.664	8			
	0.63 mg/ml	1253.127	8			
	1.25 mg/ml	1647.065	8			
	2.5 mg/ml	2522.324	8			
	5 mg/ml	2003.306	8			
	10 mg/ml	752.421	8			
	20 mg/ml	575.694	8			

ตารางภาคผนวก จ.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ของชนิดสารสกัดที่ต่างกัน

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	ดอก	9973.080 <sup>a</sup>	6	1662.180	2824.776	.000
	ใบ	6387.194 <sup>b</sup>	6	1064.532	1320.689	.000
	เปลือก	9117.083 <sup>c</sup>	6	1519.514	4213.517	.000
Intercept	ดอก	18445.028	1	18445.028	31346.228	.000
	ใบ	50464.669	1	50464.669	62607.896	.000
	เปลือก	69433.559	1	69433.559	192534.902	.000
Conc.	ดอก	9973.080	6	1662.180	2824.776	.000
	ใบ	6387.194	6	1064.532	1320.689	.000
	เปลือก	9117.083	6	1519.514	4213.517	.000
Error	ดอก	8.238	14	.588		
	ใบ	11.285	14	.806		
	เปลือก	5.049	14	.361		
Total	ดอก	28426.346	21			
	ใบ	56863.148	21			
	เปลือก	78555.691	21			
Corrected Total	ดอก	9981.318	20			
	ใบ	6398.479	20			
	เปลือก	9122.132	20			

ตารางภาคผนวก จ.3 การจัดกลุ่มของข้อมูลร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบ  
ในแต่ละความเข้มข้น

ความเข้มข้น 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	3	4.91		
สารสกัดหยาบใบแก้ว	3		21.86	
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	3			25.37
Sig.		1.00	1.00	1.00

ความเข้มข้น 0.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	3	7.33		
สารสกัดหยาบใบแก้ว	3		30.15	
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	3			34.06
Sig.		1.00	1.00	1.00

ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	3	17.34		
สารสกัดหยาบใบแก้ว	3		43.34	
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	3			48.12
Sig.		1.00	1.00	1.00

ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	3	20.46		
สารสกัดหยาบใบแก้ว	3		48.12	
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	3			60.42
Sig.		1.000	1.000	1.000

## ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	3	36.84		
สารสกัดหยาบใบแก้ว	3		62.01	
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	3			72.34
Sig.		1.00	1.00	1.00

## ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	3	55.39		
สารสกัดหยาบใบแก้ว	3		63.93	
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	3			77.50
Sig.		1.00	1.00	1.00

## ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	3	65.20		
สารสกัดหยาบใบแก้ว	3		73.74	
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	3			84.70
Sig.		1.00	1.00	1.00



## สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว

ความเข้มข้น mg/ml	N	Subset						
		1	2	3	4	5	6	7
0.31	3	25.37						
0.63	3		34.06					
1.25	3			48.12				
2.50	3				60.42			
5.00	3					72.34		
10.00	3						77.50	
20.00	3							84.70
Sig.		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

ตารางภาคผนวก จ.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดย  
ออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

ANOVA					
สารสกัด	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	602.491	2	301.246	2275.692	.000
Within Groups	.794	6	.132		
Total	603.286	8			

ตารางภาคผนวก จ.6 การจัดกลุ่มของข้อมูลปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Duncan ที่  
ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	3	50.78		
สารสกัดหยาบใบแก้ว	3		61.03	
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	3			70.81
Sig.		1.00	1.00	1.00

ตารางภาคผนวก จ.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

ANOVA					
สารสกัด	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10243.516	2	5121.758	7890.301	.000
Within Groups	3.895	6	.649		
Total	10247.411	8			

ตารางภาคผนวก จ.8 การจัดกลุ่มของข้อมูลปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	3	38.28		
สารสกัดหยาดใบแก้ว	3		101.94	
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	3			115.73
Sig.		1.00	1.00	1.00

ตารางภาคผนวก จ.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1446 โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	100	180.345 <sup>a</sup>	2	90.173	81155.410	.000
	200	17.055 <sup>b</sup>	2	8.527	5256.637	.000
	300	56.854 <sup>c</sup>	2	28.427	17644.497	.000
Intercept	100	358.850	1	358.850	322964.890	.000
	200	1276.633	1	1276.633	786965.486	.000
	300	1846.134	1	1846.134	1145876.552	.000

ตารางภาคผนวก จ.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1446 โดยออกแบบการทดลองแบบกลุ่มสมบูรณ์ (ต่อ)

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Extract	100	180.345	2	90.173	81155.410	.000
	200	17.055	2	8.527	5256.637	.000
	300	56.854	2	28.427	17644.497	.000
Error	100	.007	6	.001		
	200	.010	6	.002		
	300	.010	6	.002		
Total	100	539.202	9			
	200	1293.698	9			
	300	1902.999	9			
Corrected Total	100	180.352	8			
	200	17.065	8			
	300	56.864	8			

ตารางภาคผนวก จ.10 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 1446 ของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	3	0.00		
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	3		9.08	
สารสกัดหยาดใบแก้ว	3			9.86
Sig.		1.00	1.00	1.00

ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	3	10.77		
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	3		11.11	
สารสกัดหยาดใบแก้ว	3			13.85
Sig.		1.00	1.00	1.00

ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	3	10.94		
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	3		15.07	
สารสกัดหยาดใบแก้ว	3			16.96
Sig.		1.00	1.00	1.00

ตารางภาคผนวก จ.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 9341 โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	100	180.884 <sup>a</sup>	2	90.442	39706.161	.000
	200	6.857 <sup>b</sup>	2	3.428	44.078	.000
	300	17.907 <sup>c</sup>	2	8.954	558.046	.000
Intercept	100	359.355	1	359.355	157765.702	.000
	200	960.174	1	960.174	12345.088	.000
	300	1207.331	1	1207.331	75249.152	.000

ตารางภาคผนวก จ.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 9341 โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (ต่อ)

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Extract	100	180.884	2	90.442	39706.161	.000
	200	6.857	2	3.428	44.078	.000
	300	17.907	2	8.954	558.046	.000
Error	100	.014	6	.002		
	200	.467	6	.078		
	300	.096	6	.016		
Total	100	540.252	9			
	200	967.497	9			
	300	1225.334	9			
Corrected Total	100	180.897	8			
	200	7.323	8			
	300	18.003	8			

ตารางภาคผนวก จ.12 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 9341 ของสารสกัด หน่อดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหน่อดอกแก้ว	3	0.00		
สารสกัดหน่อดอกใบแก้ว	3		9.03	
สารสกัดหน่อดอกเปลือกต้นแก้ว	3			9.93
Sig.		1.00	1.00	1.00

ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	3	9.42		
สารสกัดหยาดใบแก้ว	3		10.06	
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	3			11.51
Sig.		1.00	1.00	1.00

ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	3	10.08		
สารสกัดหยาดใบแก้ว	3		11.20	
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	3			13.47
Sig.		1.00	1.00	1.00

ตารางภาคผนวก จ.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	100	307.716 <sup>a</sup>	2	153.858	4986.396	.000
	200	14.355 <sup>b</sup>	2	7.178	52.760	.000
	300	11.394 <sup>c</sup>	2	5.697	18.326	.003
Intercept	100	576.480	1	576.480	18683.187	.000
	200	1354.485	1	1354.485	9956.197	.000
	300	1545.276	1	1545.276	4970.509	.000
Extract	100	307.716	2	153.858	4986.396	.000
	200	14.355	2	7.178	52.760	.000
	300	11.394	2	5.697	18.326	.003

ตารางภาคผนวก จ.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (ต่อ)

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Error	100	.185	6	.031		
	200	.816	6	.136		
	300	1.865	6	.311		
Total	100	884.381	9			
	200	1369.657	9			
	300	1558.536	9			
Corrected Total	100	307.901	8			
	200	15.172	8			
	300	13.260	8			

ตารางภาคผนวก จ.14 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ของ สารสกัดหยาบ ดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	3	0.00		
สารสกัดหยาบใบแก้ว	3		10.20	
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	3			13.81
Sig.		1.00	1.00	1.00

ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	3	10.71		
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	3		12.29	
สารสกัดหยาดใบแก้ว	3			13.80
Sig.		1.00	1.00	1.00

ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset	
		1	2
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	3	11.9067	
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	3	12.7933	
สารสกัดหยาดใบแก้ว	3		14.6100
Sig.		1.00	1.00

ตารางภาคผนวก จ.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 1261 โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	100	.000 <sup>a</sup>	2	.000	.	.
	200	.000 <sup>a</sup>	2	.000	.	.
	300	179.654 <sup>b</sup>	2	89.827	59444.434	.000
Intercept	100	.000	1	.000	.	.
	200	.000	1	.000	.	.
	300	356.329	1	356.329	235805.654	.000
Extract	100	.000	2	.000	.	.
	200	.000	2	.000	.	.
	300	179.654	2	89.827	59444.434	.000

ตารางภาคผนวก จ.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATTC 1261 โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (ต่อ)

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Error	100	.000	6	.000	.000	6
	200	.000	6	.000	.000	6
	300	.009	6	.002	.009	6
Total	100	.000	9		.000	9
	200	.000	9		.000	9
	300	535.992	9		535.992	9
Corrected Total	100	.000	8		.000	8
	200	.000	8		.000	8
	300	179.663	8		179.663	8

ตารางภาคผนวก จ.16 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATTC 1261 ของ สารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	3	0.00		
สารสกัดหยาดใบแก้ว	3		8.94	
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	3			9.94
Sig.		1.00	1.00	1.00

ตารางภาคผนวก จ.17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	100	.000 <sup>a</sup>	2	.000	.	.
	200	.000 <sup>a</sup>	2	.000	.	.
	300	360.014 <sup>b</sup>	2	180.007	130650.202	.000
Intercept	100	.000	1	.000	.	.
	200	.000	1	.000	.	.
	300	180.007	1	180.007	130650.202	.000
Extract	100	.000	2	.000	.	.
	200	.000	2	.000	.	.
	300	360.014	2	180.007	130650.202	.000
Error	100	.000	6	.000		
	200	.000	6	.000		
	300	.008	6	.001		
Total	100	.000	9			
	200	.000	9			
	300	540.029	9			
Corrected Total	100	.000	8			
	200	.000	8			
	300	360.022	8			

ตารางภาคผนวก จ.18 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Ducan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset	
		1	2
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	3	0.00	
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	3	0.00	
สารสกัดหยาดใบแก้ว	3		13.42
Sig.		1.00	1.00

ตารางภาคผนวก จ.19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* sp. โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	100	.000 <sup>a</sup>	2	.000	.	.
	200	183.681 <sup>b</sup>	2	91.840	5833.186	.000
	300	238.638 <sup>c</sup>	2	119.319	6661.743	.000
Intercept	100	.000	1	.000	.	.
	200	91.840	1	91.840	5833.186	.000
	300	119.319	1	119.319	6661.743	.000
Extract	100	.000	2	.000	.	.
	200	183.681	2	91.840	5833.186	.000
	300	238.638	2	119.319	6661.743	.000
Error	100	.000	6	.000		
	200	.094	6	.016		
	300	.107	6	.018		

ตารางภาคผนวก จ.19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* sp. โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (ต่อ)

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Total	100	.000	9			
	200	275.615	9			
	300	358.065	9			
Corrected Total	100	.000	8			
	200	183.775	8			
	300	238.746	8			

ตารางภาคผนวก จ.20 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* sp. ของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	3	0.00	
สารสกัดหยาบใบแก้ว	3	0.00	
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	3		9.58
Sig.		1.00	1.00

ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	3	0.00	
สารสกัดหยาบใบแก้ว	3	0.00	
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	3		10.92
Sig.		1.00	1.00

ตารางภาคผนวก จ.21 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ของสารสกัด  
 หยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่  
 ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	100	.000 <sup>a</sup>	2	.000	.	.
	200	233.481 <sup>b</sup>	2	116.741	69122.711	.000
	300	322.062 <sup>c</sup>	2	161.031	72463.920	.000
Intercept	100	.000	1	.000	.	.
	200	439.601	1	439.601	260290.132	.000
	300	599.270	1	599.270	269671.680	.000
Extract	100	.000	2	.000	.	.
	200	233.481	2	116.741	69122.711	.000
	300	322.062	2	161.031	72463.920	.000
Error	100	.000	6	.000		
	200	.010	6	.002		
	300	.013	6	.002		
Total	100	.000	9			
	200	673.092	9			
	300	921.346	9			
Corrected Total	100	.000	8			
	200	233.491	8			
	300	322.075	8			

ตารางภาคผนวก จ.22 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Streptococcus* sp. ของสารสกัดหยาบดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	3	0.00		
สารสกัดหยาบใบแก้ว	3		8.97	
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	3			11.99
Sig.		1.00	1.00	1.00

ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	3	0.00		
สารสกัดหยาบใบแก้ว	3		10.31	
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	3			14.17
Sig.		1.00	1.00	1.00

ตารางภาคผนวก จ.23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ MRSA โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	100	348.304 <sup>a</sup>	2	174.152	775.004	.000
	200	693.905 <sup>b</sup>	2	346.953	9416.690	.000
	300	583.709 <sup>c</sup>	2	291.855	4520.985	.000
Intercept	100	174.152	1	174.152	775.004	.000
	200	346.953	1	346.953	9416.690	.000
	300	1129.184	1	1129.184	17491.663	.000

ตารางภาคผนวก จ.23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ MRSA โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (ต่อ)

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Extract	100	348.304	2	174.152	775.004	.000
	200	693.905	2	346.953	9416.690	.000
	300	583.709	2	291.855	4520.985	.000
Error	100	1.348	6	.225		
	200	.221	6	.037		
	300	.387	6	.065		
Total	100	523.804	9			
	200	1041.079	9			
	300	1713.281	9			
Corrected Total	100	349.652	8			
	200	694.126	8			
	300	584.097	8			

ตารางภาคผนวก จ.24 การจัดกลุ่มของข้อมูลฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA ของสารสกัดหยาดดอก ใบ และเปลือกต้นแก้ว ในแต่ละความเข้มข้น โดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
สารสกัดหยาดดอกแก้ว	3	0.00	
สารสกัดหยาดใบแก้ว	3	0.00	
สารสกัดหยาดเปลือกต้นแก้ว	3		13.20
Sig.		1.00	1.00

ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	3	0.00	
สารสกัดหยาบใบแก้ว	3	0.00	
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	3		18.63
Sig.		1.00	1.00

ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	N	Subset		
		1	2	3
สารสกัดหยาบดอกแก้ว	3	0.00		
สารสกัดหยาบใบแก้ว	3		15.02	
สารสกัดหยาบเปลือกต้นแก้ว	3			18.59
Sig.		1.00	1.00	1.00



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ

วันที่ 23 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2561

ข้าพเจ้า นายรัชชา บุญโยประการ รหัสประจำตัว 57050839  
นางสาวศิริลักษณ์ อังศุสิงห์ รหัสประจำตัว 57050900

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา  
ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย ฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบต้นแก้ว (*Murraya paniculata* L.)

ชื่อภาษาอังกฤษ Biological Activities From Orange jasmine (*Murraya paniculata* L.)  
Crude Extract

ปีการศึกษา 2560 เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่น และได้ผ่านการตรวจสอบ  
ความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่  
ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้วโปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.15 %

ลงชื่อ.....*รัชชา บุญโยประการ*.....

( รัชชา บุญโยประการ )

นักศึกษา

ลงชื่อ.....*ศิริลักษณ์ อังศุสิงห์*.....

( ศิริลักษณ์ อังศุสิงห์ )

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.วรกฤต วรรณนทกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษได้ตรวจสอบโครงการพิเศษ  
ของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์จึงลงชื่อ  
ไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....*[Signature]*.....

อาจารย์ที่ปรึกษา