

ปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบสัก

FACTORS AFFECTING THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF
Tectona grandis LEAF EXTRACTS

จุฑาภรณ์ ผลมะขาม

JUTHAPORN PHONMAKHAM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2563

KMITL-2020-SC-M-020-042

ปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบสัก

FACTORS AFFECTING THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF
Tectona grandis LEAF EXTRACTS

จุฑาภรณ์ ผลมะขาม

JUTHAPORN PHONMAKHAM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2563

KMITL-2020-SC-M-020-042

FACTORS AFFECTING THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF
Tectona grandis LEAF EXTRACTS

JUTHAPORN PHONMAKHAM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2020

KMITL-2020-SC-M-020-042

COPYRIGHT 2020

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

| | |
|-----------------------------|--|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | ปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบสัก |
| ชื่อนักศึกษา | จุฑาภรณ์ ผลมะขาม |
| รหัสประจำตัว | 60605041 |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ) |
| ภาควิชา | ชีววิทยา |
| พ.ศ. | 2563 |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ | รองศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม |

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบสัก (*Tectona grandis*) ระหว่างใบสดและใบร่วง ชนิดของแม่ไม้จำนวน 5 แม่ไม้ ได้แก่ เชียงใหม่ แพร่ ลำปาง สุโขทัย และขอนแก่น และสถานที่เพาะปลูกที่แตกต่างกันจำนวน 2 แห่ง คือ สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ และสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก รวมทั้งการนำเทคนิค sequence related amplified polymorphism (SRAP) มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสักจำนวน 28 ตัวอย่าง พบว่า ชนิดแม่ไม้และสถานที่เพาะปลูกเป็นปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย โดยแม่ไม้แพร่จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบดีที่สุด สำหรับฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่า ชนิดของแม่ไม้เท่านั้นที่มีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยสารสกัดจากใบสดและใบร่วงของแม่ไม้ เชียงใหม่ จากทั้ง 2 สถานที่เพาะปลูกมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด มีค่าการยับยั้งอยู่ระหว่างร้อยละ 68.97-73.65 สำหรับฤทธิ์ต้านการอักเสบพบว่า ทั้งแม่ไม้และสถานที่ที่ไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านการอักเสบ อย่างไรก็ตามใบร่วงสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าใบสด ได้นำสารสกัดจากแม่ไม้แพร่ใบสดและใบร่วงจากทั้งสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิและสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก (PTF, PTD, PPF และ PPD) มาสกัดสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction ด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ พบว่า สารสกัดแม่ไม้แพร่ใบสดและใบร่วงจากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ดีที่สุด เมื่อนำมาแยกสารด้วยเทคนิค column chromatography พบว่า สารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดี ซึ่งสารสกัดส่วนย่อยนี้มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นสารที่ใช้ในการยับยั้งแบคทีเรีย สำหรับการศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมนำเทคนิค SRAP มาใช้ในการประเมินความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสักจำนวน 28 ตัวอย่าง โดยพบค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.59-0.96 แสดงให้เห็นว่าสักมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ

คำสำคัญ : สารสกัดใบสัก เอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ความหลากหลายทางพันธุกรรม

| | |
|---------------------|--|
| Thesis Title | Factors affecting the biological activities of <i>Tectona grandis</i> leaf extracts |
| Student Name | Juthaporn Phonmakham |
| Student ID | 60605041 |
| Degree | Master of Science (Biotechnology) |
| Department | Biology |
| Year | 2020 |
| This Advisor | Assoc. Prof. Dr. Supattra Poeaim |

Abstract

The purpose of the study was to evaluate factors that influence to biological activity in the crude extract of the teak (*Tectona grandis*) leaves. The present study was examined the effect of fresh and fallen leaves, five plus trees: Chiang Mai (C), Phrae (P), Sukhothai (S), Lampang (L) and KhonKaen (K) as well as the different location that planted at two locations in Thongphaphum and Phitsanulok silviculture research station. Including, sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers were used to evaluate genetic diversity among 28 samples of teak. The resulted of this study plus trees and the different location of teak are the major factors influencing antibacterial activity. The methanol extract of the Phrae plus tree leaves were collected from Thongphaphum silviculture research station exhibited a potential antibacterial activity against the tested microorganisms. For anti-tyrosinase activity, plus tree was only affected on anti-tyrosinase activity. The Chiang Mai plus tree extract that collected from Thongphaphum and Phitsanulok silviculture research station were exhibited the highest anti-tyrosinase activity with percentage inhibition values 68.97-73.65 %. For anti-inflammatory, both of the plus trees and the planted location of teak were not correlated with the anti-inflammatory activity. However, the fallen leaf extracts had a potential to nitric oxide inhibition than fresh leaf. The extracts of fresh and fallen leaf of Phrae plus tree from both from Thongphaphum and Phitsanulok silviculture research station (PTF, PTD, PPF and PPD) were taken and extracted with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and aqueous by liquid-liquid extraction. The extractability of hexane and dichloromethane obtained from the fresh and fallen leaf of Thongphaphum silviculture research station were exhibited the best inhibition against all tested. Fractions obtained from those extracts by column chromatography, the third and fourth fractions

had strong antibacterial activity. So, these fractions have the potential to be developed as new antibacterial agents. For genetic diversity, the SRAP technique was used to evaluate the genetic diversity and relationship among the 28 samples of teak. The ranges of the genetic similarity coefficient were 0.59-0.96 which the results of this study showed low genetic variation.

Keywords : Teak leaf extract, anti-tyrosinase, anti-inflammatory, Genetic diversity

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ในหัวข้อเรื่องปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบสัก โดยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ต้องขอขอบพระคุณบุคคลดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และคอยช่วยเหลือให้คำปรึกษา แก้ไขปัญหาในการทำวิทยานิพนธ์นี้ รวมถึงการตรวจสอบเนื้อหาของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์และถูกต้องมากขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.ปิยรัชฎ์ ปริญาพงษ์ เจริญทรัพย์ ประธานกรรมการและผู้ทรงคุณวุฒิ จากภายนอกสถาบัน รองศาสตราจารย์ ดร.สร้อยญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์บัณฑิตประจำสาขา ที่ร่วมพิจารณาในการแก้ไข ตรวจสอบวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์ และถูกต้องมากขึ้น

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยประเภทเงินอุดหนุนทั่วไป (เงินรายได้) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 ขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ดร.สาโรจน์ วัฒนสุขสกุล ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ไม้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิและพิษณุโลก ที่อำนวยความสะดวกในการเข้าเก็บตัวอย่างใบสักจากแปลงปลูกในพื้นที่

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ภาควิชาชีววิทยา ที่ได้เอื้ออำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี สำหรับการทดลองในวิทยานิพนธ์นี้ และขอบคุณมิตรภาพจากพี่ ๆ น้อง ๆ และเพื่อน ๆ ในระดับปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวที่คอยสนับสนุน ซึ่งเป็นทั้งกำลังใจ และคอยให้กำลังใจอย่างมากในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี หากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ผิดพลาดประการใดขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

นางสาวจุฑาภรณ์ ผลมะขาม

สารบัญ

| | หน้า |
|---|-----------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | ข |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ง |
| สารบัญ..... | จ |
| สารบัญตาราง..... | ช |
| สารบัญรูป..... | ญ |
| คำย่อ/สัญลักษณ์..... | ฐ |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย..... | 3 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 4 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 5 |
| 2.1 สัก (<i>Tectona grandis</i>)..... | 5 |
| 2.1.1 ถิ่นกำเนิดและการกระจายพันธุ์..... | 5 |
| 2.1.2 ลักษณะทั่วไปของสัก..... | 5 |
| 2.1.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพและสารออกฤทธิ์จากส่วนต่าง ๆ ของสัก..... | 6 |
| 2.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบสัก..... | 8 |
| 2.2.1 ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์..... | 8 |
| 2.2.2 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส..... | 10 |
| 2.2.3 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ..... | 12 |
| 2.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรม..... | 16 |
| บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... | 21 |
| 3.1 ตัวอย่างพืช..... | 21 |
| 3.2 แบบคทีเรีย..... | 23 |
| 3.3 เซลล์ไลน์..... | 23 |
| 3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ..... | 23 |
| 3.5 สารเคมี..... | 24 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|-----------|
| 3.5.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารและแยกสาร..... | 24 |
| 3.5.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย | 25 |
| 3.5.3 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส..... | 25 |
| 3.5.4 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์..... | 25 |
| 3.5.5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7..... | 25 |
| 3.5.6 สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC..... | 26 |
| 3.5.7 สารเคมีที่ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เซรั่มแต้มนิวจากสารสกัดใบสั๊ก..... | 26 |
| 3.5.8 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ..... | 26 |
| 3.5.9 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP..... | 27 |
| 3.5.10 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส..... | 27 |
| 3.6 โปรแกรม..... | 28 |
| 3.7 วิธีการทดลอง..... | 28 |
| 3.7.1 การสกัดสารและการแยกสาร..... | 28 |
| 3.7.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบสั๊ก..... | 30 |
| 3.7.3 การหาปริมาณสารสำคัญเทคนิค HPLC..... | 33 |
| 3.7.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS..... | 33 |
| 3.7.5 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เซรั่มแต้มนิวจากสารสกัดใบสั๊ก..... | 33 |
| 3.7.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ..... | 33 |
| 3.7.7 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสั๊กด้วยเทคนิค SRAP..... | 33 |
| บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล..... | 37 |
| 4.1 ผลการสกัดสารด้วยเมทานอลจากใบสั๊ก..... | 37 |
| 4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสั๊ก..... | 37 |
| 4.2.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย..... | 37 |
| 4.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส..... | 39 |
| 4.2.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ..... | 44 |
| 4.2.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC..... | 47 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|--|-----------|
| 4.3 ผลการสกัดสารจากใบสักด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction..... | 49 |
| 4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดใบสักด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction..... | 50 |
| 4.5 ผลการแยกสารจากใบสักด้วยเทคนิค column chromatography..... | 54 |
| 4.6 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดใบสักจากการแยกสารด้วยเทคนิค column chromatography..... | 57 |
| 4.7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS..... | 63 |
| 4.8 ผลการพัฒนาผลิตภัณฑ์เซรัมแต้มสิวจากสารสกัดใบสัก..... | 67 |
| 4.9 ผลการศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP..... | 67 |
| 4.9.1 การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม..... | 67 |
| 4.9.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม..... | 70 |
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... | 78 |
| 5.1 สรุปผลการวิจัย..... | 78 |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ..... | 79 |
| เอกสารอ้างอิง..... | 81 |
| ภาคผนวก ก..... | 91 |
| ภาคผนวก ข..... | 96 |
| ภาคผนวก ค..... | 101 |
| ประวัติผู้เขียน..... | 106 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|---|------|
| 2.1 สารสำคัญและองค์ประกอบของสารเมแทบอลิต์จากส่วนต่าง ๆ ของสั๊ก | 7 |
| 3.1 รหัส แม่ไม้ ระยะเวลา และสถานที่ของตัวอย่างใบสั๊ก ที่ใช้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ..... | 21 |
| 3.2 รหัสตัวอย่าง แม่ไม้/สายต้น และแหล่งที่มาของตัวอย่างใบสั๊ก ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม..... | 22 |
| 3.3 ชื่อสาร และปริมาณของเบสเสริมที่ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมแต้มนิวจากสารสกัดใบสั๊ก..... | 26 |
| 3.4 ชนิด ชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในเทคนิค SRAP | 27 |
| 3.5 แสดงปริมาตรของสารผสมสำหรับทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส..... | 31 |
| 3.6 แสดงปริมาตรของสารผสมสำหรับทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์..... | 32 |
| 3.7 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP สำหรับ 1 ตัวอย่าง..... | 35 |
| 3.8 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP..... | 36 |
| 4.1 น้ำหนัก ร้อยละผลได้ สี และรหัสสีของการสกัดสารด้วยเมทานอลจากใบสั๊ก..... | 41 |
| 4.2 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ <i>P. acnes</i> , <i>S. aureus</i> และ <i>S. epidermidis</i> ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสั๊กความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิस्क และยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิस्क..... | 42 |
| 4.3 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสั๊ก ความเข้มข้น 1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร..... | 43 |
| 4.4 ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 (IC ₅₀) ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสั๊ก..... | 45 |
| 4.5 ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 (IC ₅₀) ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากแม่ไม้แพร์ และลำปาง..... | 47 |
| 4.6 ปริมาณสารสำคัญของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสั๊กโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC..... | 51 |
| 4.7 น้ำหนัก ร้อยละผลได้ สี และรหัสสีของสารสกัดในตัวทำละลายต่าง ๆ ของสารสกัดแม่ไม้แพร์จากสารสกัดใบสั๊กที่สกัดด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction..... | 52 |
| 4.8 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ <i>P. acnes</i> , <i>S. aureus</i> และ <i>S. epidermidis</i> ของสารสกัดจากใบสั๊กด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิस्क และยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิस्क..... | 55 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | หน้า |
|---|------|
| 4.9 น้ำหนักและร้อยละผลได้ของสารสกัดส่วนย่อยที่ทำการแยกด้วยเทคนิค column chromatography ของสารสกัดแม่ไม้แพร์ชั้นตัวทำละลายเฮกเซน (H) และ ไดคลอโรมีเทน (D) จากใบสัก PTF และ PTD จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ..... | 58 |
| 4.10 ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของเชื้อ <i>P. acnes</i> , <i>S. aureus</i> และ <i>S. epidermidis</i> ของแม่ไม้แพร์จากสารสกัดใบสัก ที่เก็บจากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน แยกสารด้วยเทคนิค column chromatography ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์..... | 59 |
| 4.11 ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของเชื้อ <i>P. acnes</i> , <i>S. aureus</i> และ <i>S. epidermidis</i> ของแม่ไม้แพร์จากสารสกัดใบสัก ที่เก็บจากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ที่แยกสารด้วยเทคนิค column chromatography ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์..... | 60 |
| 4.12 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากใบสักแม่ไม้แพร์ สารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายเฮกเซนใบสด HPTF3-4 และใบร่วง HPTD3-4 และสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนใบสด DPTF3-4 และใบร่วง DPTD3-4 จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ ด้วยเทคนิค GC-MS..... | 65 |
| 4.13 ชนิดของไพโรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างและร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของสีกจำนวน 28 ตัวอย่างจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP..... | 71 |
| 4.14 ข้อมูลสภาพภูมิอากาศของสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ และพิษณุโลก ปี 2561..... | 77 |
| 4.15 ผลการวิเคราะห์แร่ธาตุในดินสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ และพิษณุโลก..... | 77 |

สารบัญรูป

| รูปที่ | หน้า |
|--|------|
| 2.1 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของต้นสีก (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ดอก (ง) ผล (จ) เมล็ด..... | 6 |
| 2.2 กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน..... | 11 |
| 2.3 กระบวนการอักเสบ..... | 13 |
| 2.4 แสดงลักษณะของไพรเมอร์ (ก) องค์ประกอบ forward และ reverse primer ของเทคนิค SRAP (ข) และการเข้าจับดีเอ็นเอเป้าหมายของคู่ไพรเมอร์แบบไม่จำเพาะ (early cycles) และแบบจำเพาะ (late cycles) ของเทคนิค SRAP..... | 19 |
| 3.1 ขนาดของแผ่น normal phase TLC ที่มีเส้น base line และ front line ในการตรวจสอบสารด้วยเทคนิค TLC..... | 29 |
| 4.1 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (ก) <i>P. acnes</i> (ข) <i>S. aureus</i> (ค) <i>S. epidermidis</i> ของสารสกัดใบสีกจากแม่ไม้แพร์ โดย P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และ N คือ ตัวควบคุมเชิงลบหรือเมทานอล..... | 39 |
| 4.2 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสีก ที่ความเข้มข้น 1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร..... | 43 |
| 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นที่ร้อยละ 50 (IC ₅₀) ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสีกกับฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ของทั้ง 5 แม่ไม้..... | 45 |
| 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดจากแม่ไม้แพร์ และลำปาง..... | 47 |
| 4.5 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (ก) <i>P. acnes</i> (ข) <i>S. aureus</i> (ค) <i>S. epidermidis</i> ของสารสกัดจากใบสีกด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนของแม่ไม้แพร์ โดยตัวอักษร P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และ N คือ ตัวควบคุมเชิงลบหรือเมทานอล..... | 53 |
| 4.6 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (ก) <i>P. acnes</i> (ข) <i>S. aureus</i> (ค) <i>S. epidermidis</i> ของสารสกัดจากใบสีกด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction ด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนของแม่ไม้แพร์ โดยตัวอักษร P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และ N คือ ตัวควบคุมเชิงลบหรือเมทานอล..... | 54 |

สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ | หน้า |
|--|------|
| 4.7 องค์ประกอบและการเคลื่อนที่ของสารที่แยกบนแผ่นซิลิกาเจล normal phase TLC ในระบบตัวทำละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 9 : 1 เมื่อส่องภายใต้ยูวีความยาวคลื่น (ก) 254 และ(ข) 366 นาโนเมตร โดย A, B คือสารสกัดชั้นเฮกเซนของแม่ไม้แพร์ไบสด (PTF) และใบร่วง (PTD) C และ D คือสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนของแม่ไม้แพร์ไบสด (PTF) และใบร่วง (PTD) ตามลำดับ..... | 56 |
| 4.8 องค์ประกอบและการเคลื่อนที่ของสารที่แยกบนแผ่นซิลิกาเจล normal phase TLC ในระบบตัวทำละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน (ก) 8 : 2 (ข) 7 : 3 และ (ค) 6 : 4 เมื่อส่องภายใต้ยูวีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดย A, B คือสารสกัดชั้นเฮกเซนของแม่ไม้แพร์ไบสด (PTF) และใบร่วง (PTD) C และ D คือสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนของแม่ไม้แพร์ไบสด (PTF) และใบร่วง (PTD) ตามลำดับ..... | 56 |
| 4.9 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>P. acnes</i> (ก-ข) สารสกัด HPTF1-6 และ (ค-ง) DPTF1-6 ด้วยเทคนิค column chromatography โดยตัวอักษร P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และ N คือ ตัวควบคุมเชิงลบหรือเมทานอล..... | 61 |
| 4.10 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> (ก-ข) สารสกัด HPTF1-6 (ค) HPTD1-4 (ง-จ) DPTF1-6 และ (ฉ) DPTD1-4 ด้วยเทคนิค Column chromatography โดยตัวอักษร P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และ N คือ ตัวควบคุมเชิงลบหรือเมทานอล..... | 62 |
| 4.11 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>S. epidermidis</i> (ก-ข) สารสกัด HPTF1-6 (ค) HPTD1-4 (ง-จ) DPTF1-6 และ (ฉ) DPTD1-4 ด้วยเทคนิค column chromatography โดยตัวอักษร P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และ N คือ ตัวควบคุมเชิงลบหรือเมทานอล..... | 63 |
| 4.12 แถบตีเอ็นเอของสั๊กจากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP จำนวน 6 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับตีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส โดยลูกศรสีขาวแสดงแถบตีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) และลูกศรสีแดงแสดงแถบตีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic bands) | 68 |
| 4.13 แถบตีเอ็นเอของสั๊กที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP จำนวน 6 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับตีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส โดย (ก) คู่ไพรเมอร์ ME1/EM3 และ (ข) คู่ไพรเมอร์ ME2/EM4..... | 69 |

สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ | หน้า |
|---|------|
| 4.14 แถบตีเอ็นเอของสีกที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP จำนวน 6 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับตีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส โดย (ก) คู่ไพรเมอร์ ME2/EM5 และ (ข) คู่ไพรเมอร์ ME3/EM2..... | 69 |
| 4.15 แถบตีเอ็นเอของสีกที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP จำนวน 6 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับตีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส โดย (ก) คู่ไพรเมอร์ ME5/EM1 และ (ข) คู่ไพรเมอร์ ME5/EM5..... | 70 |
| 4.16 ลักษณะแถบตีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP ของคู่ไพรเมอร์ ME5/EM1 เปรียบเทียบกับตีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส จากตัวอย่างสีกจำนวน 28 ตัวอย่าง..... | 73 |
| 4.17 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสีกจำนวน 28 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SRAP โดยการจัดกลุ่มแบบ UPGMA..... | 74 |

คำย่อ/สัญลักษณ์

| | |
|------------------|---|
| 1D-NMR | One-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy |
| 2D-NMR | Two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy |
| ABTS | 2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) |
| AFLP | Amplified Fragment Length Polymorphism |
| BHI agar | Brain heart infusion agar |
| BHI Broth | Brain heart infusion broth |
| BHT | Butylated hydroxytoluene |
| CTAB | Cetyltrimethylammonium bromide |
| dATP | Deoxyadenosine triphosphate |
| dCTP | Deoxycytidine triphosphate |
| dGTP | Deoxy guanosine triphosphate |
| dNTP | Deoxynucleotide triphosphate |
| dTTP | Deoxythymidine triphosphate |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| DPPH | 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate |
| eNOS | endothelial NOS |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| FBS | Fetal bovine serum |
| FRAP | Ferric reducing antioxidant power |
| GC-MS | Gas chromatograph-mass spectrometer |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| IC ₅₀ | 50% inhibitory concentration |
| iNOS | Inducible NOS |
| ISSR | Inter Simple Sequence Repeat |
| L-DOPA | L-3,4-dihydroxyphenylalanine |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MAE | Microwave Assisted Extraction |
| MHA | Mueller hinton agar |
| MHB | Mueller hinton broth |

คำย่อ/สัญลักษณ์ (ต่อ)

| | |
|------------------|--|
| NaCl 0.85% | Sodium chloride solution 0.85% |
| nNOS | neuronal NOS |
| NO | Nitric oxide |
| NA | Nutrient agar |
| NB | Nutrient broth |
| ORFs | Open reading frames |
| PAL | Phenylalanine ammonia lyase |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PBS | Phosphate buffer saline |
| RAPD | Random amplified polymorphic DNA |
| RPMI 1640 | Roswell park memorial institute 1640 medium |
| RP-HPLC | Reverse phase high performance liquid chromatography |
| SNP | Sodium nitroprusside |
| SRAP | Sequence-related amplified polymorphism |
| SSR | Simple sequence repeat |
| TBE buffer | Tris-borate-EDTA |
| TFPGA | Tools for population genetic analyses |
| TLC | Thin layer chromatography |
| UPGMA | Unweighted pair-group method with arithmetic mean |
| $\mu\text{S/cm}$ | Micro siemens per centimeter |
| mg CE | milligrams of catechin equivalents |
| mg GAE | milligrams of gallic acid equivalents |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

พืชและสมุนไพรถูกนำมาใช้ประโยชน์ตั้งแต่สมัยโบราณจนถึงปัจจุบัน เป็นการนำองค์ความรู้จากภูมิปัญญาชาวบ้านที่มีการสืบทอดกันมา เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคและส่งเสริมสุขภาพ และในปัจจุบันยังมีบทบาทสำคัญที่นำมาใช้ประโยชน์ด้านความงาม ผิวพรรณ และเส้นผม แม้ว่าจะมีการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ แต่ปัจจุบันมีการนิยมใช้ผลิตภัณฑ์จากพืชและสมุนไพรเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีความปลอดภัยสูงกว่าการใช้สารเคมี โดยนำสารที่สกัดได้จากพืชและสมุนไพรมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายรูปแบบ เช่น ยารักษาโรค ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง เป็นต้น มีรายงานการศึกษาวิจัยเพื่อนำพืชและสมุนไพรมาใช้อย่างกว้างขวาง ทั้งการสกัดสารสำคัญเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ การศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมีและฟิสิกส์ของสารสำคัญเพื่อให้ทราบว่าเป็นสารชนิดใด นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบฤทธิ์ด้านเภสัชวิทยาเพื่อให้ได้ผลดีในการรักษา ศึกษาความเป็นพิษและผลข้างเคียง เมื่อพบว่าสารชนิดใดให้ผลในการรักษาที่ดี ไม่มีพิษหรือมีพิษข้างเคียงที่น้อย จึงนำมาเป็นข้อมูลเบื้องต้น และเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไปในอนาคต (อัมพร, 2541)

สัก (*Tectona grandis*) เป็นไม้ที่ขึ้นในป่าผลัดใบเขตร้อน อยู่ในวงศ์ Verbenaceae มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย พม่า ลาว ไทย และทางตอนใต้ของประเทศอินเดีย (กรมป่าไม้, 2556) นอกจากส่วนของเนื้อไม้ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ ทุกส่วนของสักยังมีสรรพคุณทางยา ไม่ว่าจะเป็นเปลือกไม้ เนื้อไม้ ดอก ผล และใบ มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสักในการยับยั้งแบคทีเรีย (*Purushotham และ Sankar, 2013; Lanka และ Parimala, 2017*) ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (*Mosad และคณะ, 2014*) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ แก้ปวด และลดการบวม (*Nayeem และ Karvekar, 2009*) และลดระดับน้ำตาลในเลือด (*Varma และ Jaybhaye, 2010*) นอกจากนี้ยังมีการรายงานสารสำคัญของสารสกัดจากใบสักที่สกัดด้วยเมทานอล พบสารกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ gallic acid และ ellagic acid และสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ rutin และ quercetin ซึ่งสารทั้ง 2 กลุ่มนี้พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด และมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียและอนุมูลอิสระ (*Nayeem และ Karvekar, 2010; 2011*) ทั้งนี้สารสกัดจากพืชมีปัจจัยหลายด้านที่ส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพไม่ว่าจะเป็นสถานที่เพาะปลูก สายพันธุ์ หรือฤดูกาล ตามที่มีรายงานพบว่า สารสกัดจากใบมะกอก (*Olea europaea*) ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทและเมทานอลที่เก็บในเดือนกุมภาพันธ์มีปริมาณสารฟีนอลิก และฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงกว่าในเดือนตุลาคม (*Brahmi และคณะ, 2015*) นอกจากนี้สถานที่เพาะปลูกของพืชมีผลทำให้เกิดความต่างกันของฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยมีรายงานเกี่ยวกับสารสกัดใบมะรุม (*Moringa oleifera*) จากเมือง Mardaan, Balakot, Chakwal, Jamshoro และ

Nawabshah ในประเทศปากีสถานพบว่า สารสกัดของใบมะรุมาจากเมือง Mardaan ที่เก็บในช่วงเดือนมีนาคม มีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระและมีปริมาณสารฟีนอลิกสูงที่สุด (Iqbal และ Bhenger, 2006) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพระหว่างใบอ่อนของต้น Aronia ที่มีปริมาณสารโพลีฟีนอล สารฟลาโวนอยด์ และมีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระมากกว่าใบแก่ (Nhuan และ Hwang, 2014)

ส่วนใหญ่สักจะถูกนำเนื้อไม้มาใช้ประโยชน์ ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงพันธุ์สัก เพื่อพัฒนาคุณลักษณะต่าง ๆ ให้เหมาะแก่การนำมาใช้ประโยชน์ (กรมป่าไม้, 2556) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัก โดยที่ผ่านมามีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสักในประเทศไทยและในต่างประเทศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลหลายชนิด ได้แก่ RAPD (random amplified polymorphic DNA), ISSR (inter simple sequence repeat) และ SRAP (sequence-related amplified polymorphism) (สุจิตรา และ Alfred, 2544; กานตรัตน์, 2554; อังสุมา, 2555; Narayanan และคณะ, 2007; Murukan และ Murukan, 2015; Thakor และคณะ, 2019) สำหรับในการวิจัยนี้จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP (sequence-related amplified polymorphism) ที่ถูกคิดค้นและพัฒนาโดย Li และ Quiros (2001) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว ไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา และยังสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกันสามารถทำซ้ำได้ (สุรินทร์ 2545) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่าปริมาณ และคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดที่ได้จะขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของพืชและสมุนไพร ฤดูกาล และสายพันธุ์

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และปริมาณสารสำคัญของสารสกัดของใบสักจากใบสดและใบร่วง ชนิดของแม่ไม้ และสถานที่ในการเพาะปลูกของต้นสัก ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบสักของใบสดและใบร่วง ชนิดของแม่ไม้สัก สถานที่ในการเพาะปลูกต้นสัก และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัก ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยเพื่อใช้ในการพิจารณาหรือใช้ในการเลือกพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบสักต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

1.2.2 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดใบสักในด้านฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และปริมาณสารสำคัญ

1.2.3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบสักของใบสดและใบร่วง ชนิดของแม่ไม้สัก และสถานที่ในการเพาะปลูกต้นสัก

1.2.4 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสักด้วยเทคนิค SRAP

1.2.5 พัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบสัก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 การเก็บตัวอย่างใบสัก

เก็บตัวอย่างใบสดโดยการตัดกิ่ง และเก็บใบที่มีสีเขียว สำหรับใบร่วงจะเก็บใบที่มีสีน้ำตาล และร่วงตามธรรมชาติ จำนวน 5 แม่ไม้ ได้แก่ เชียงใหม่ แพร่ ลำปาง สุโขทัย และขอนแก่น ที่รวบรวมปลูกไว้ที่สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ และสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก โดยต้นสักมีอายุ 10 ปี

1.3.2 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบสัก

สกัดสารจากใบสดและใบร่วงของใบสัก จำนวน 5 แม่ไม้ ได้แก่ เชียงใหม่ แพร่ ลำปาง สุโขทัย และขอนแก่น ที่รวบรวมปลูกไว้ที่สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ และสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก ด้วยวิธีการหมัก (maceration) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย นำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนี้ ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี dopa-chrome ฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ คัดเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดมาสกัดสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction และนำมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography นำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดอีกครั้ง จากนั้นเลือกตัวอย่างสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุดมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์

1.3.3 ศึกษาปริมาณสารสำคัญ

ศึกษาปริมาณสารสำคัญของสารสกัดใบสักจากตัวทำละลายเมทานอลด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ gallic acid, quercetin และ salicylic acid

1.3.4 ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี

นำสารสกัดที่ได้จากการแยกสารด้วยวิธี column chromatography ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

1.3.5 ศึกษาปริมาณแร่ธาตุในดิน

วิเคราะห์แร่ธาตุในดินจากแปลงปลูกสักของแหล่งปลูกจากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ และสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก

1.3.6 พัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบสัก

พัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบสัก จากตัวอย่างของสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุดมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เซรัมแต้มสิ่ว

1.3.7 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

เก็บตัวอย่างใบสัก จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิและสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก เปรียบเทียบกับตัวอย่างใบสักที่ทราบสายต้น คือ สยามินทร์และมเหล็กซ์ และตัวอย่างใบสักที่ไม่ทราบสายต้นจากสถานที่ต่าง ๆ นำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค sequence related amplified polymorphism (SRAP)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดใบสักของใบสดและใบร่วงที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และปริมาณสารสำคัญ

1.4.2 ได้ข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการพิจารณาและสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบสัก

1.4.3 สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบสัก

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

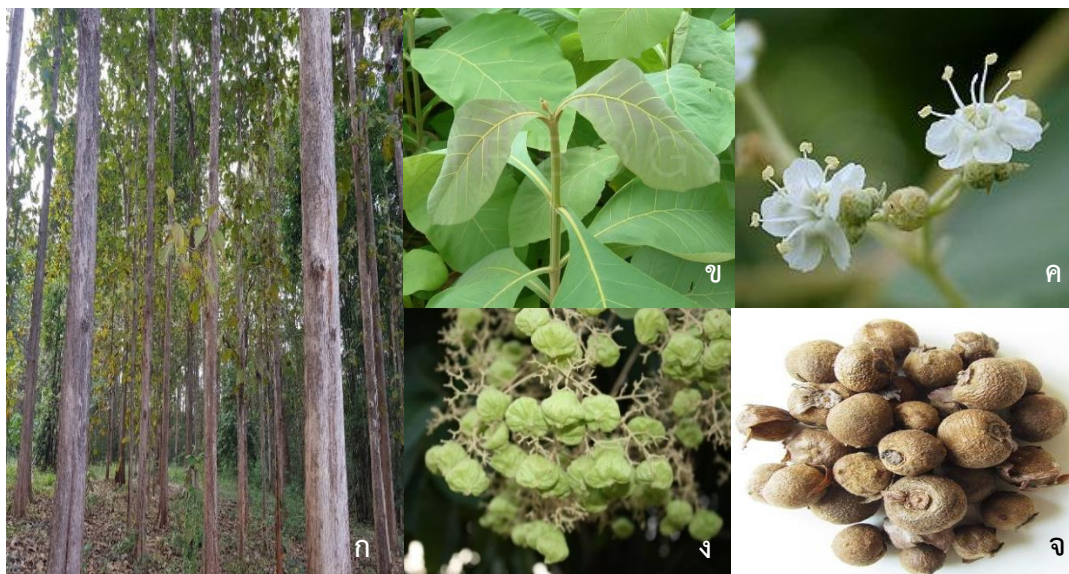
2.1 สัก (*Tectona grandis*)

2.1.1 ถิ่นกำเนิดและการกระจายพันธุ์

สักมีชื่อภาษาอังกฤษว่า Teak และมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Tectona grandis* อยู่ในวงศ์ Verbenaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางตอนใต้ของประเทศอินเดีย พม่า ไทย และบางส่วนของอินโดนีเซีย สำหรับในประเทศไทยต้นสักจะขึ้นอยู่ตามธรรมชาติ โดยเฉพาะทางตอนเหนือของประเทศ ซึ่งจะเรียกต้นพันธุ์ที่นำมาจากแหล่งธรรมชาติว่า “แม่ไม้” โดยมีทั้งในจังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำพูน เชียงราย ลำปาง แพร่ น่าน ตาก กำแพงเพชร อุตรดิตถ์ พิษณุโลก สุโขทัย เพชรบูรณ์ พิจิตร นครสวรรค์ อุทัยธานี และบางส่วนในแถบตะวันตกของจังหวัดกาญจนบุรี นอกจากนี้ยังพบในทางตอนใต้ เช่น จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี และปัตตานี

2.1.2 ลักษณะทั่วไปของสัก

ลักษณะลำต้นของต้นสักเป็นไม้ผลัดใบขนาดใหญ่ เมื่อโตเต็มที่จะมีความสูง 20 เมตร ขึ้นไป เปลือกมีลักษณะหนา 0.30-1.70 เซนติเมตร มีสีน้ำตาลปนเทา มีลักษณะเรียบ หรืออาจแตกเป็นร่องตื้นไปตามทางยาวของลำต้น (รูปที่ 2.1ก) เปลือกนอกหนาประมาณ 1-2 เซนติเมตร เปลือกในมีสีน้ำตาลและเขียวอ่อน เนื้อไม้มีสีน้ำตาลทองเห็นเส้นวงปี ซึ่งลายของวงปีจะบอกอายุของต้นสัก โดยความโต 1 วง จะใช้ระยะเวลา 1 ปี ลักษณะของใบเป็นใบแบบเดี่ยวแตกออกตามกิ่งก้านเป็นคู่ ยาวประมาณ 25-30 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 30-40 เซนติเมตร (รูปที่ 2.1ข) เมื่อต้นสักมีอายุมากขึ้นขนาดของใบจะลดลง รูปใบรีมนหรือเป็นรูปไข่ ผิวใบสากเนื่องจากมีขนแข็งเล็กและละเอียดตลอดทั้งใบ หลังใบมีสีเขียวเข้ม ท้องใบจะมีสีเขียวอ่อน ใบอ่อนที่เพิ่งแตกจะมีสีน้ำตาลแดง มีขนอ่อนนุ่ม ใบจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองน้ำตาลและแดง ในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม และในช่วงเดือนมกราคมถึงมีนาคม ใบสักจะร่วงหมดทั้งต้นคล้ายต้นสักตายแห้ง เมื่อเริ่มมีฝนในเดือนเมษายนถึงพฤษภาคมก็จะแตกใบอ่อนใหม่ ใบอ่อนที่แตกจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและโตเต็มที่ในเดือนกรกฎาคม ลักษณะของดอก หลังจากที่ใบเจริญเติบโตเต็มที่ ช่อดอกจะเริ่มแทงออกและดอกจะทยอยบานในช่วงเดือนกันยายน ดอกมีสีขาวนวลแต้มม่วง ออกเป็นช่อใหญ่ ใช้เวลาประมาณ 3-4 สัปดาห์ จึงจะบานหมดช่อ แต่ละดอกจะมีขนาดประมาณ 6-8 มิลลิเมตร (รูปที่ 2.1ค) เมล็ดมีลักษณะเป็นรูปไข่ ขนาดยาวประมาณ 0.6 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 0.4 เซนติเมตร แต่ละเมล็ดจะห่อหุ้มด้วยเปลือกหุ้มเมล็ด (รูปที่ 2.1ง) และลักษณะของผลจะเจริญเต็มที่ในเดือนมกราคม ผลแก่จัดจะมีสีน้ำตาลและร่วงหล่นตามธรรมชาติ ผลค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 เซนติเมตร มีเมล็ดภายใน 1-4 เมล็ด เปลือกแข็งมีขนสั้น (รูปที่ 2.1จ) (สุทัศน์, 2536)



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของต้นสัก (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ดอก (ง) ผล (จ) เมล็ด
ที่มา กรมป่าไม้ (2556)

2.1.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพและสารออกฤทธิ์จากส่วนต่าง ๆ ของสัก

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของสักไว้หลายด้าน ได้แก่ ฤทธิ์การสมานแผล (Varma และ Giri, 2013) ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย (Didry และคณะ, 1994; Neamatallah และคณะ, 2005; Krishna และ Nair, 2011; Purushotham และคณะ, 2010) ฤทธิ์การยับยั้งไวรัส (Sangeetha และคณะ, 2017) ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Khan และ Mlungwana, 1999; Krishna และ Nair, 2010) ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (Jagetia และ Baliga, 1984; Krishna และ Nair, 2011; Rao และคณะ, 2011) ฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือด (Ghaisas และคณะ, 2009; Pooja และคณะ, 2010) ฤทธิ์ต้านการอักเสบและระงับอาการปวด (Ramachandran และคณะ, 2011; Giri และ Varma, 2015) ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา (Sumthong และคณะ, 2006; Shalini และ Srivastava, 2009; Niamke และคณะ, 2012) ฤทธิ์การต้านมาลาเรีย (Kopa และคณะ, 2014)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสารสำคัญจากส่วนต่าง ๆ ของสัก โดยมีการแยกสารสำคัญจากสารสกัดใบสักที่สกัดด้วยเมทานอลด้วยเทคนิค NMR (nuclear magnetic resonance) พบสารในกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ gallic acid และ ellagic acid และสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ rutin และ quercetin ซึ่งสารทั้งสองกลุ่มนี้มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย และฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (Nayeem และ Karvekar, 2010; 2011) นอกจากนี้ยังมีการรายงานสารสำคัญชนิดใหม่ 2 ชนิด ที่แยกได้จากสารสกัดใบสักคือ Tectonoelin A และ Tectonoelin B (Rodney และคณะ, 2012) โดยมีรายงานเกี่ยวกับสารสำคัญจากส่วนต่าง ๆ ของต้นสัก ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สารสำคัญและองค์ประกอบของสารเมแทบอลิต์จากส่วนต่าง ๆ ของสัก (Remesh และ Mahalakshim, 2014)

| ส่วนของพืช | สารสำคัญ | องค์ประกอบของสารเมแทบอลิต์ |
|---------------------|--------------------|--|
| ใบ | ฟีนอลและกรดฟีนอลิก | TG1, 2, 3 and 4, gallic acid, ellagic acid, acetovanillone, E-isofuraldehyde, 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl) propan-1- one, evofolin A, และ syringaresinol |
| ใบ | ฟลาโวนอยด์ | rutin และ quercetin |
| ใบ | แอนทราควิโนน | anthraquinone |
| ใบและเมล็ดเปลือกไม้ | ไกลโคไซด์ | apocarotenoids: Tectonoelin A และ B steroidal glycoside: beta-sitosterol-beta-D-[4'-linolenyl-6'-(tridecan-4'''-one-1'''-oxy)] glucuranopyranoside |
| เนื้อไม้และใบ | อัลคาลอยด์ | quinones: 9,10-dimethoxy-2-methyl anthra-1,4- quinone. 1,4-anthraquinone, tectoquinone, lapachol, dehydro-a-lapachone, tecomaquinone I, naphthoquinone, anthraquinone, naphthotectone และ anthratrectone |
| เนื้อไม้ | สเตอรอยด์ | steroidal, squalene, polyisoprene, cr-tolylmethyl ether และ betulinic acid |
| เปลือกไม้ | กรดไขมัน | 7'-hydroxy-n-octacosanoyl n-decanoate, 20'-hydroxy eicosanyl linolenate และ 18'-hydroxy n-hexacosanyl n-decanoate |

เนื่องจากสักเป็นไม้ที่ใช้ประโยชน์ด้านเนื้อไม้เป็นหลัก และใบเป็นส่วนที่ไม่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนใบ ซึ่งมีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบสักดังหัวข้อที่ 2.2

2.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบสัก

2.2.1 ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์

ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ คือ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญและความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของพืชและสมุนไพร ปัจจุบันมีวิธีการศึกษาหลายวิธี เช่น disc diffusion, broth dilution และ agar dilution โดยวิธีดังกล่าวเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เป็นการประเมินผลจากบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น ซึ่งในแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน (ประสาทร และคณะ, 2551; Mounyr และคณะ, 2016)

2.2.1.1 วิธี Dilution susceptibility test

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี dilution susceptibility test เป็นการทดสอบในเชิงปริมาณ เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ โดยจะมีวิธีการทดสอบ broth และ agar dilution susceptibility test ซึ่งจะต้องเจือจางสารสกัดใน medium ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นจึงใส่เชื้อจุลินทรีย์ลงใน medium ที่มีสารสกัด หลังจากการบ่มจะดูค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ทั้งนี้จะสังเกตความขุ่นหรือใสของ broth และมีหรือไม่มี การเจริญของจุลินทรีย์บน agar (ประสาทร และคณะ, 2551)

2.2.1.2 วิธี Agar diffusion test

การทดสอบวิธี agar diffusion test เป็นวิธีที่นิยมใช้แพร่หลายมากที่สุด เนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ หลักการของวิธีนี้ คือ การใช้สารสกัดในแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ที่เตรียมไว้ เมื่อสารสกัดซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการกระจายเชื้อไว้ในปริมาณที่เหมาะสม และนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลโดยการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง (inhibition zone) ที่เป็นวงใสไม่มีเชื้อรอบ ๆ แผ่น disc วิธีนี้นิยมใช้ทดสอบกับสารสกัดเพียงความเข้มข้นเดียว หรืออาจใช้วิธีการเจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ หยดสารสกัดไปประมาณ 40 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้ววัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง (inhibition zone) และเทียบกับยาปฏิชีวนะที่ทราบปริมาณและความเข้มข้นที่แน่นอน (ประสาทร และคณะ, 2551) โดยการศึกษาจะใช้วิธี paper disc diffusion ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบสัก

มีการรายงานฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบสักพบว่า สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ โดยการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบสักความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับยาปฏิชีวนะ tetracyclines ที่ความเข้มข้น 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี antibiotics-cup plate method ทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pichia pastoris* และ *Streptococcus* sp. และแบคทีเรียแกรมลบ 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia*

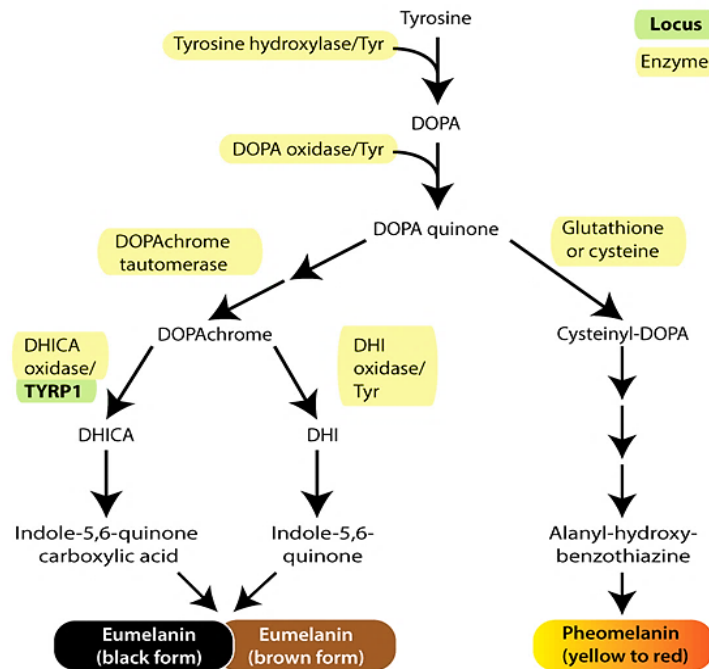
coli, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* และ *Citrobacter freundii* โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* และ *S. typhimurium* ได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้งเท่ากัน คือ 36.00 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ tetracyclines เพียงอย่างเดียวมีบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 21.00-29.00 มิลลิเมตร และสารสกัดจากใบสักเพียงอย่างเดียวมีบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 15.00-26.00 มิลลิเมตร (Purushotham และคณะ, 2010) และยังมีผลการรายงานฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียจากน้ำมันที่สกัดจากใบสักด้วยวิธี agar well diffusion ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *Proteus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 29.00, 25.50, 22.50, 21.00 และ 20.00 มิลลิเมตรตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ (Aboaba และคณะ, 2013) และมีการรายงานฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบสักที่เก็บในช่วงเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม ปี 2007 และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี disc diffusion โดยสารสกัดของใบสักที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ ทดสอบกับเชื้อ *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Salmonella paratyphi* และ *P. mirabilis* พบว่า ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียขึ้นอยู่กับตัวทำละลาย โดยสารสกัดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *K. pneumoniae* ได้ดีที่สุด โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 14.00 และ 8.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Krishna และ Nair, 2011) นอกจากนี้ยังมีการรายงานฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดจากใบสักที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ ได้แก่ เอทานอล เมทานอล เอทิลอะซิเตท และน้ำ ด้วยวิธี disc diffusion นำมาทดสอบกับแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. aeruginosa*, *S. aureus* และ *Bacillus subtilis* พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 18.00, 16.00 และ 21.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสามารถยับยั้งเชื้อราที่นำมาทดสอบทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* และ *Trichoderma viride* โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 15.00, 17.00 และ 19.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Lanka และ Parimala, 2017) และยังมีผลการรายงานฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบสักจากสายต้น และสถานที่ที่แตกต่างกัน โดยฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบสักสายต้นสยามินทร์ (SM) และมเหสักข์ (MS) ที่เก็บตัวอย่างมาจากเขื่อนสิริกิติ์ (D) อำเภอกำแพงแสน และค่ายพระศรีพนมมาศ (C) อำเภอลำปาง จังหวัดอุตรดิตถ์ จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ SM-D, SM-C, MS-D และ MS-C ด้วยวิธี disc diffusion ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ นำมาทดสอบกับแบคทีเรียทั้งหมด 8 สายพันธุ์ คือ *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. typhimurium* พบว่า

สารสกัดของใบสัก SM-C สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีที่สุด และสามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีที่สุดในลำดับที่ 22.46 มิลลิเมตร โดยมียาปฏิชีวนะ gentamicin เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (สุพัตรา และคณะ, 2560)

2.2.2 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์เมลานโนไซต์ (melanocyte) ที่อยู่บริเวณชั้นล่างสุดของหนังกำพร้า เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างเม็ดสีเมลานิน ทำหน้าที่เร่งการเปลี่ยนกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) เป็นสารโดปา (dopa) ด้วยปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) และเปลี่ยนโดปาเป็นโดปากิวโนน (dopaquinone) ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน จนเกิดเป็นเม็ดสีเมลานิน 2 ชนิด โดยชนิดสีดำ หรือ สีน้ำตาล เรียกว่า ยูเมลานิน (eumelanin) และชนิดสีเหลือง หรือ สีแดง เรียกว่า ฟีโอเมลานิน (phaeomelanin) (รูปที่ 2.2) การทำงานของเม็ดสีที่มากกว่าปกตินั้นเป็นผลมาจากปัจจัยจากการกระตุ้นในด้านต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการเพิ่มของเม็ดสี จนปรากฏบนผิวในรูปของจุดสีน้ำตาล เช่น กรรมพันธุ์ เชื้อชาติ ระดับฮอร์โมนในร่างกาย กระบวนการเผาผลาญ กระบวนการออกซิเดชัน และการอักเสบภายในเซลล์ผิว นอกจากนี้ยังมีสาเหตุภายนอก เช่น แสงแดด รังสียูวี มลพิษ และความเครียด ซึ่งในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ทำให้ผิวขาวที่มักใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเมลานิน เช่น สารประกอบของปรอท สารประกอบเมอคิวริกคลอไรด์ สารเคมีเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส แต่ทำให้เกิดการอาการแพ้และการระคายเคือง นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการกลายพันธุ์ และเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงมีการนำสารจากธรรมชาติมาใช้ ได้แก่ อาบูติน กลูต้าไทโอน ซึ่งพบมากในพืชและสมุนไพร โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสเกิดจากการที่เอนไซม์จับกับสารที่เป็น active site คือส่วนที่เป็น Cu^{2+} ซึ่งจะขัดขวางการเข้าจับกันระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ สารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้จะเป็นสารประกอบประเภท aromatic acid, aromatic aldehyde, tropolone, kojic acid และ salicylic acid โดยโครงสร้างที่มีความเป็น hydrophobic จะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี (นริศา, 2551; พลอยขวัญ, 2557)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส แบ่งเป็น 2 วิธี ได้แก่ การทดสอบในหลอดทดลอง (*In vitro*) และการทดสอบในสัตว์ทดลอง (*In vivo*) สำหรับวิธีทดสอบ *In vitro* เช่น วิธี mushroom tyrosinase inhibitory assay และ cellular tyrosinase inhibitory assay สำหรับการทดสอบ *In vivo* เป็นการทดสอบด้วยวิธี depigmenting activity ในสิ่งมีชีวิต เช่น ในหนูทดลอง ปลาม้าลายและในผิวหนังคน เป็นต้น (ทักษอร, 2557)



รูปที่ 2.2 กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน

ที่มา <http://dogsandcountry.it/2017/05/04/own-a-dark-dog-read-this/>

สำหรับในการศึกษานี้จะใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี dopa-chrome เป็นการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยการเปลี่ยนโดปาไปเป็นโดปาคิวโนน เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และสามารถทดสอบได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน ซึ่งที่ผ่านมายังไม่มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากใบสักและพืชใกล้เคียงที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน แต่สำหรับในพืชอื่นมีการรายงานฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เช่น สารสกัดส่วนย่อยจากใบกระดังงาจีน (*Artabotrys hexapetalus*) โดยนำสารสกัดส่วนย่อย A1, A2, A3, A4, A5, A6 และ A7 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบด้วยวิธี dopa-chrome พบว่าสารสกัดส่วนย่อย A5 และ A6 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุด มีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 40.51 ± 4.81 และ 43.61 ± 7.49 ตามลำดับ โดยเทียบกับกรดโคจิก (kojic acid) ซึ่งมีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับร้อยละ 76.14 ± 1.30 และเมื่อนำสารสกัดส่วนย่อย A5 และ A6 มาแยกเพื่อหาสารประกอบและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่แยกได้ด้วยเทคนิค mass spectrometry, 1D และ 2D NMR ได้สารประกอบทั้งหมด 3 ชนิด เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่า สารประกอบชนิดที่ 2 สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 23.15 ไมโครโมลาร์ รองลงมาคือสารประกอบชนิดที่ 1 และ 3 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 38.52 และ 42.91 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (นุตติยา และ รวีวรรณ, 2555) นอกจากนี้ยังมีการรายงานฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากใบลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.) ด้วยวิธี dopa-chrome พบว่า สารสกัดใบลองกองแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ

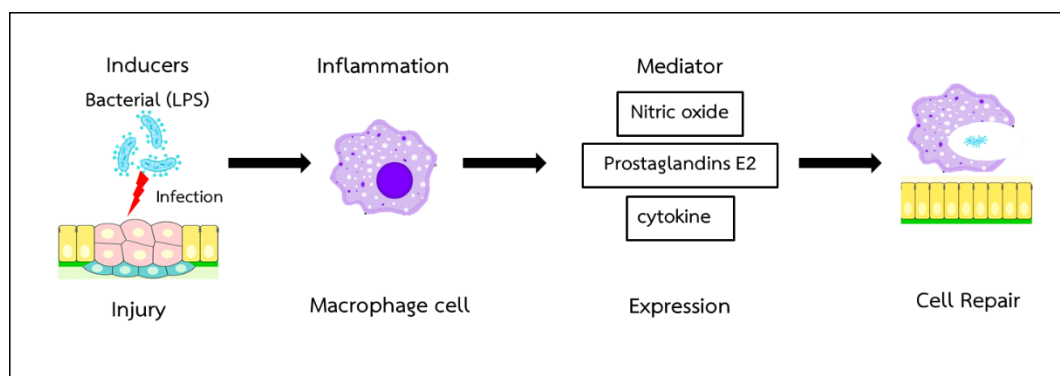
0.034 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับกรดโคจิก ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.020 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Itsarasook, 2015) รวมทั้งการรายงานฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากใบราชพฤกษ์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ดังนี้ เมทานอล เฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ โดยทำการทดสอบด้วยวิธี dopa-chrome พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำแสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 153.031 ± 0.027 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดที่สกัดด้วยเฮกเซน บิวทานอล เมทานอล และเอทิลอะซิเตท ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 190.375 ± 0.026 , 347.281 ± 0.008 , 392.764 ± 0.008 และ 535.973 ± 0.010 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีกรดแอสคอร์บิกและกรดโคจิก เป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.879 ± 0.010 และ 2.094 ± 0.010 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Wijaya และคณะ, 2018) และยังมีการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากดอกโสนสดและดอกโสนแห้ง (*Sesbania javiaca* Mig.) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทานอลและปิโตเลียมอีเทอร์ ทดสอบด้วยวิธี dopa-chrome พบว่า สารสกัดจากดอกโสนสดและแห้งที่สกัดด้วยเอทานอลแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสร้อยละ 43.13 และ 28.54 ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยปิโตเลียมอีเทอร์ โดยมีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับร้อยละ 19.68 และ 12.35 ตามลำดับ และดอกโสนสดที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าสารสกัดจากดอกโสนแห้ง (ประนอม, 2557)

จากการรายงานฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ที่ทำให้เกิดจุดต่างดำขึ้นบนผิวหนัง จึงมีการศึกษาเพื่อนำพืชนั้น ๆ มาเป็นวัตถุดิบหลักในการพัฒนาเครื่องสำอาง เช่น ผลิตภัณฑ์ทำให้ผิวขาว ลดฝ้า และจุดต่างดำ ในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ที่นำออกวางจำหน่ายโดยใช้ชื่อผลิตภัณฑ์ว่า “จุฬาเอิร์บ เซรั่มทาฝ้าอำไย” เช่นเดียวกับสารสกัดจากว่านตาลเดี่ยว โดยพัฒนาเป็นครีมบำรุงผิวสูตรกลางวัน กลางคืน และการพัฒนาเป็นเซรั่มบำรุงผิว ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการยับยั้งอนุมูลอิสระ ซึ่งใช้ชื่อผลิตภัณฑ์ว่า “ลิโอบราส”

2.2.3 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

การอักเสบ (inflammation) เป็นกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่เกิดขึ้นกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดอาการบาดเจ็บ ส่งผลให้เกิดอาการปวด บวม แดง และร้อน (พิริยอุท, 2554; Libby, 2007) ในขณะที่เกิดการอักเสบเซลล์แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งจะหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบชนิดต่าง ๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) พรอสตาแกลนดิน E2 (prostaglandins E2) และไซโตไคน์ (cytokine) เป็นต้น ดังรูปที่ 2.3 เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นออกจากร่างกาย และส่งเสริมให้เกิดการซ่อมแซม หากมีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบในปริมาณมากเกินไปจะทำให้มีการทำลาย

เนื้อเยื่อ และอาจเกิดการทำงานของเนื้อเยื่อผิดปกติได้ (Vliet และคณะ, 2000; Jung และคณะ, 2009)



รูปที่ 2.3 กระบวนการอักเสบ
(ที่มา ดัดแปลงจาก Ruslan, 2010)

ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) เป็นอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตจากกระบวนการเปลี่ยน L-arginine เป็น L-citrulline ซึ่งไนตริกออกไซด์ (nitric oxide synthase : NOS) มีทั้งหมด 3 แบบ ได้แก่ neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) และ inducible NOS (iNOS) ในสภาวะปกติไนตริกออกไซด์ถูกผลิตจากการทำงานของเอนไซม์ nNOS และ eNOS ซึ่งจะมีปริมาณไม่มาก แต่ระหว่างเกิดการอักเสบจากการกระตุ้นของสิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัส ไนตริกออกไซด์จะถูกผลิตออกมาในปริมาณมาก โดยการทำงานของเอนไซม์ iNOS ซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น สภาวะการอักเสบเรื้อรัง อัลไซเมอร์ พาร์กินสัน ภาวะหลอดเลือดแข็ง และโรคมะเร็ง นอกจากนี้ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่มากขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ superoxide anion เกิดเป็น peroxynitrite (ONOO-) ที่สามารถทำลายเซลล์เนื้อเยื่อบริเวณที่บาดเจ็บ เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้นอย่างรุนแรงอาจทำลายสารพันธุกรรม (DNA) และโปรตีน (Sautebin, 2000; เพ็ญพรรณ, 2555)

สำหรับฤทธิ์ด้านการอักเสบมีวิธีการทดสอบ 2 วิธี ได้แก่ การทดสอบในหลอดทดลอง (*In vitro*) และการทดสอบในสัตว์ทดลอง (*In vivo*) โดยการทดสอบแบบ *In vitro* เป็นการทดสอบปริมาณของสารสื่อกลางในการอักเสบชนิดต่าง ๆ เช่น การประเมินฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดด้วยวิธี nitric oxide scavenging assay (NOA) และการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกชักนำด้วย lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้มีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่าง ๆ ดังนั้นการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และพรอสตาแกลนดิน E2 จึงใช้เป็นตัวชี้ที่แสดงถึงความสามารถในการลดการอักเสบของสารทดสอบ ยังไม่พบรายงานฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดจากใบสัก แต่มีรายงานจากสารสกัดส่วนอื่น และในพืชบางชนิด เช่น พืชและสมุนไพรต่าง ๆ โดยมีรายงาน

ฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี nitric oxide scavenging assay (NOA) ของสารสกัดจากรากต้นสักที่สกัดด้วยเมทานอลพบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 507.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีสารมาตรฐาน rutin เป็นตัวเปรียบเทียบมีค่า IC_{50} เท่ากับ 62.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Pooja และคณะ, 2010) สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี 15 ชนิด ที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำ ทดสอบกับเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยสาร lipopolysaccharides (LPS) พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์เกินร้อยละ 50 คือ รากตุงต้น มีค่าการยับยั้งไนตริกออกไซด์ร้อยละ 99.9 ± 2.4 รองลงมา คือ ใบราชดัดและใบสาบแร้งสาบกา มีค่าการยับยั้งไนตริกออกไซด์ร้อยละ 97.6 ± 5.5 และ 85.3 ± 2.4 ตามลำดับ ในขณะที่ aminoguanidine เป็นสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของไนตริกออกไซด์ ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 64.7 ± 9.3 (กล่าวขวัญ และคณะ, 2557) รวมทั้งมีการรายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถาที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำ ทดสอบกับเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยสาร lipopolysaccharides (LPS) พบว่า สารสกัดเมล็ดลำไยเถาที่สกัดด้วยน้ำสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 465.94 ± 15.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดเมล็ดลำไยเถาจากตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 638.20 ± 15.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเมล็ดลำไยเถาจากเอทิลอะซิเตทมีค่า IC_{50} เท่ากับ 957.84 ± 49.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (วิริยา, 2560) สำหรับการศึกษาครั้งนี้จะเลือกวิธีทดสอบแบบ *In vitro* เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกกว่าการทดสอบด้วยวิธีการทดสอบในสัตว์ทดลอง (*In vivo*) นอกจากนี้ยังมีการรายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี carrageenan induced paw edema โดยดูความสามารถในการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูแรทหลังจากฉีดสารที่ทำให้เกิดการระคายเคือง เช่น ยีสต์ คาราจีแนน เข้าไปบริเวณใต้ฝ่าเท้า (ปฐวีฉัตร, 2554) อย่างไรก็ตามมีการรายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากเนื้อไม้สักที่สกัดด้วยน้ำความเข้มข้น 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบที่อุ้งเท้าหนูด้วยคาราจีแนน เมื่อผ่านไป 6 ชั่วโมงหลังจากการฉีดคาราจีแนนพบว่า ที่ความเข้มข้น 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดการบวมได้ร้อยละ 48.57 และ 68.83 ตามลำดับ โดยใช้ไดโคลฟีแนค โซเดียม (diclofenac sodium) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นตัวควบคุมเชิงบวก สามารถลดการบวมได้ร้อยละ 76.36 (Bhangale และคณะ, 2010) เช่นเดียวกับการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากรากต้นสักที่สกัดด้วยเมทานอลความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง วัดค่าการบวมโดยใช้เครื่อง plethysmograph วัดปริมาตรของเท้าหนูที่ทดสอบ พบว่าเท้าหนูมีการบวมลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Nayeem และ Karvekar, 2012)

จากฤทธิ์ทางชีวภาพและสารออกฤทธิ์ของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของสักพบว่า มีคุณสมบัติหลายด้านที่สามารถนำมาพัฒนา และใช้ประโยชน์อย่างมาก แต่การนำมาใช้ประโยชน์อาจต้องใช้ในปริมาณมาก ซึ่งพืชอาจสังเคราะห์ได้ปริมาณน้อยและไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ อีกทั้งยังมีข้อจำกัดอีกหลายปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ปัจจัยด้านฤดูกาล อายุของพืช หรือสิ่งแวดล้อมของพื้นที่ในการเพาะปลูก เป็นต้น โดยมีการรายงานผลที่มีต่อปัจจัยดังกล่าวของสารสกัดจากใบสักและในพืชอื่น ดังนี้ มีการรายงานปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบสักจากสถานที่ที่แตกต่าง คือ เมือง Madiun, Blitar และ Cepu ในประเทศอินโดนีเซีย โดยสกัดสารด้วยวิธี microwave assisted extraction (MAE) พบว่า สารสกัดจากใบสักจากเมือง Blitar และ Cepu มีปริมาณสารฟีนอลิกที่เท่ากัน คือ 60.09 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g GAE/ml}$) มากกว่าเมือง Madiun มีค่าเท่ากับ 59.75 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g GAE/ml}$) ซึ่งไม่แตกต่างกันในทางสถิติ และเมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดใบสักจากเมือง Madiun สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูงสุด รองลงมาคือ Cepu และ Blitar โดยมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 58.61, 57.49 และ 57.35 ไมโครกรัมโทรลล็อกซ์ต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g TE/ml}$) ตามลำดับ ซึ่งผู้วิจัยได้อธิบายเกี่ยวกับปัจจัยที่อาจส่งผลต่อปริมาณสารฟีนอลิก และฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระว่าสารสำคัญ เช่น สารฟีนอลิก และสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่สำคัญในใบสักจะถูกผลิตเพิ่มมากขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด ซึ่งเมือง Cepu เป็นเมืองที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำ มีฤดูแล้งที่ยาวนาน และมีปริมาณน้ำฝนต่อปีสูงกว่าเล็กน้อย เมื่อเทียบกับเมือง Madiun และ Blitar ซึ่งปัจจัยด้านสภาพแวดล้อมเหล่านี้อาจมีผลต่อปริมาณสารฟีนอลิก และฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสัก (Joni และคณะ, 2016) เช่นเดียวกับปัจจัยของฤดูกาล และสถานที่การเจริญเติบโตที่มีผลต่อปริมาณสารฟีนอลิกฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบมะรุม (*Moringa oleifera*) โดยเก็บตัวอย่างที่เจริญเติบโตจากเมือง Mardaan, Balakot, Chakwal, Jamshoro และ Nawabshah ในประเทศปากีสถาน ในช่วงเดือนมีนาคม มิถุนายน กันยายน และธันวาคม พบว่า สารสกัดจากใบของต้นมะรุมที่เก็บในช่วงเดือนมีนาคมมีปริมาณสารฟีนอลิกสูงสุด รองลงมาคือเดือนธันวาคม กันยายน และมิถุนายน โดยมีค่าเท่ากับ 13.56 ± 0.11 , 13.09 ± 0.38 , 12.68 ± 0.36 และ 11.82 ± 0.31 กรัมต่อหนึ่งร้อยกรัมของสารสกัด ($\text{g}/100\text{g}$) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดจากใบของต้นมะรุมที่สกัดด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระชนิดซูเปอร์ออกไซด์ได้ โดยสารสกัดใบของต้นมะรุมจากเมือง Mardann มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระมากกว่าร้อยละ 95 แต่สารสกัดใบมะรุมที่เก็บในช่วงเดือนมิถุนายนและธันวาคม มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระมากกว่าร้อยละ 96 ซึ่งสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดใบมะรุมที่เก็บในช่วงเดือนมีนาคมและกันยายน โดยมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระประมาณร้อยละ 94-95 ซึ่งทั้งนี้ผู้วิจัยได้อธิบายถึงสภาพแวดล้อม เช่น ลักษณะดินของสถานที่การเจริญเติบโต สภาพอากาศ และอุณหภูมิของช่วงเดือนที่เก็บตัวอย่างของใบมะรุมที่อาจส่งผลต่อฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ และปริมาณของสารฟีนอลิก (Iqbal และ Bhenger, 2006)

อายุของใบของพืชนั้นมีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพและปริมาณสารสำคัญ โดยมีการรายงานไว้ ดังนี้ มีการศึกษาสารสกัดของใบ *Aronia melanocarpa* ระหว่างใบอ่อนที่มีอายุใบ 2 เดือน และใบแก่ที่มีอายุใบ 4 เดือน มาสกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 พบว่า สารสกัดจากใบอ่อนที่สกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอลร้อยละ 80 มีปริมาณของสารโพลีฟีนอลเท่ากับ 141.6 ± 0.9 และ 250.8 ± 2.4 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg GAE/g dry weight) ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าใบแก่ที่มีค่าเท่ากับ 69.6 ± 2.7 และ 139.3 ± 2.1 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg GAE/g dry weight) ตามลำดับ เช่นเดียวกับปริมาณของฟลาโวนอยด์ของใบอ่อนมีค่าเท่ากับ 110.7 ± 1.5 และ 163.7 ± 1.0 มิลลิกรัมคาเทชินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg CE/g dry weight) ตามลำดับ ส่วนใบแก่มีค่าเท่ากับ 56.4 ± 0.9 และ 103.6 ± 1.8 มิลลิกรัมคาเทชินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg CE/g dry weight) ตามลำดับ (Nhuan และ Hwang, 2014) และมีการรายงานเกี่ยวกับปริมาณสารสำคัญของสารกลุ่มฟีนอลิกระหว่างใบอ่อนและใบแก่ของสารสกัดเมทานอลจากใบสกัดด้วยเทคนิค reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ sinapic acid, phloroglucinol, chlorogenic acid, catechol, ferulic acid, vanillic acid, cinnamic acid, gallic acid, coumaric acid และ p-hydroxybenzoic acid พบว่า สารสกัดใบอ่อนและใบแก่มีปริมาณสาร sinapic acid, phloroglucinol cinnamic acid และ gallic acid สูงที่สุด และสารสกัดใบอ่อนมีปริมาณสาร เท่ากับ 62.70, 64.78, 64.55 และ 60.68 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าสารสกัดใบแก่ที่มีค่าเท่ากับ 38.60, 44.97, 42.19 และ 36.08 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ (Murukan และ Murukan, 2018)

2.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถทำได้หลายวิธี ตามที่สุรินทร์ (2545) แบ่งออกได้ 3 วิธี คือระดับสัณฐานวิทยา (morphological marker) ระดับชีวเคมี (biochemical marker) และระดับโมเลกุล (molecular marker) โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อหาความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตเป็นการศึกษาในระดับโมเลกุล (molecular marker) เป็นเครื่องหมายที่สร้างมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ซึ่งเครื่องหมายชนิดนี้มีข้อได้เปรียบ คือสภาพแวดล้อม และระยะการเจริญเติบโตของพืชจะไม่มีผลต่อการแสดงออกของเครื่องหมายชนิดนี้ สำหรับการใช้เครื่องหมายในการตรวจสอบระดับยีนหรือดีเอ็นเอนั้นมีประโยชน์ สามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก การจำแนกสายพันธุ์พืชเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ และยังสามารถศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์เพื่อทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) การหาตำแหน่งยีน (gene tagging) โดยเครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมใช้ศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมีหลายเทคนิคตามที่ สุรินทร์ (2545) ได้กล่าว ดังนี้

2.3.1 RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

RFLP เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อจำแนกความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ข้อดี คือ เป็นเทคนิคที่มีการข่มร่วมกัน (codominant marker) แต่มีข้อด้อย คือ ต้องใช้ดีเอ็นเอปริมาณมากและมีคุณภาพดี มีวิธีการที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน และต้องเตรียมโพรบ (probe) ก่อน

2.3.2 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD เป็นเทคนิคเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยใช้ไพรเมอร์สายสั้น ๆ ความยาวประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ ข้อดี คือ สะดวก รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลจากลำดับเบส และใช้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อย แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอจากเทคนิคนี้จะเป็นแบบสุ่มจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายเมื่อทำซ้ำแล้วได้ผลไม่เหมือนเดิม

2.3.3 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP เป็นเทคนิคที่รวบรวมหลักการของ RFLP และ RAPD เข้าด้วยกัน โดยจะมีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ต่อเข้ากับ adapter ของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด และเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ adapter นั้น ๆ ข้อดี คือ สามารถตรวจสอบความแตกต่างได้สูง และเป็นได้ทั้ง codominant และ Dominant marker แต่มีข้อด้อย คือ ยุ่งยาก และซับซ้อน

2.3.4 SSR (Simple Sequence Repeat)

SSR คือ ลำดับเบสที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำกันสั้น ๆ ประมาณ 1-6 คู่เบส มีการกระจายตัวของเบสซ้ำอยู่ทั่วจีโนม โดยลำดับเบสนี้มักเป็นลำดับเบสเฉพาะ ดังนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว ซึ่งจะพบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเนื่องจากการมีจุดซ้ำไม่เท่ากัน ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ จะได้ codominant marker และมีความจำเพาะเจาะจงบนจีโนม จำนวนเบสซ้ำของ SSR มีความแตกต่างกันในพืชหรือสัตว์ต่างสายพันธุ์หรือในชนิดเดียวกัน

2.3.5 ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

ISSR ใช้หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง SSR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นคู่สมกับกับลำดับเบสของ SSR เนื่องจาก SSR มีลำดับเบสที่เหมือนกันอยู่หลายแห่ง จึงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพร้อมกันได้หลายตำแหน่งในจีโนม เมื่อนำมาแยกขนาดจะพบจำนวนและขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน สามารถใช้จำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี เนื่องจากมีความแปรปรวนของจำนวนซ้ำสูง มีความจำเพาะสูง และสามารถทำซ้ำได้

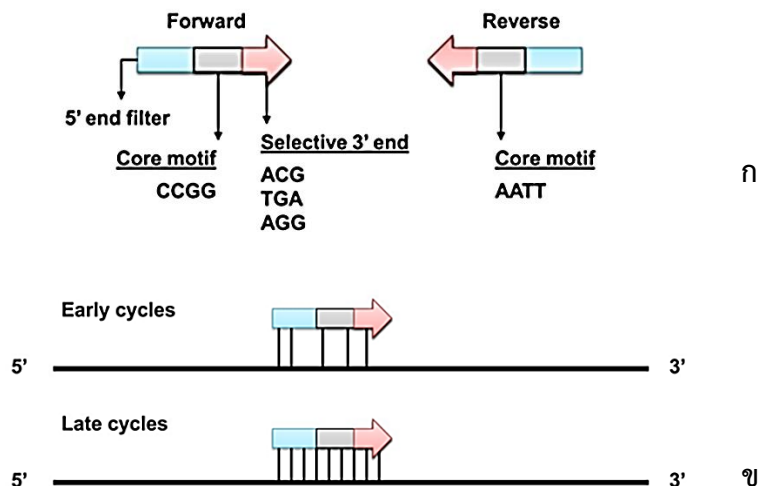
2.3.6 SRAP (Sequence-related amplified polymorphism)

SRAP คือ เทคนิคที่ออกแบบไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ forward primer มีขนาด 17 เบส และ reverse primer มีขนาด 18 เบส จากไพรเมอร์ที่ออกแบบทำให้ตำแหน่งที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในจีโนมเป็นส่วนที่ยีนมากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบสุ่มชนิดอื่น ข้อดีของเทคนิค SRAP คือทำ

ได้ง่ายและรวดเร็ว ไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา และยังสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกันสามารถทำซ้ำได้

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสั๊กสามารถใช้เทคนิคทางโมเลกุลได้หลายชนิด ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกเทคนิค SRAP โดย Li และ Quiros (2001) ได้คิดค้นและพัฒนาเทคนิค sequence related amplified polymorphism (SRAP) โดยอาศัยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อจับกับลำดับเบสในบริเวณ open reading frames (ORFs) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดได้แก่ forward primer ที่มีขนาด 17 เบส ประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า core sequence 14 เบส โดยช่วงแรกเป็นลำดับเบสที่ไม่มีอะไรเป็นพิเศษ จำนวน 10 เบส เรียกว่า filler sequence ตามด้วยเบส CCGG และเบสที่เปลี่ยนแปลงได้ อีก 3 เบส ต่อมาทางปลาย 3' และ reverse primer มีขนาด 18 เบส ประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า core sequence มี 15 เบส โดย 11 เบสแรก เริ่มต้นจากปลาย 5' เรียกว่า filler sequence ตามด้วยเบส AATT และเบสที่เลือกได้อีก 3 เบสด้านปลาย 3' เมื่อไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้จับกับลำดับเบสในบริเวณที่เป็น ORFs จะถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จากไพรเมอร์ที่ออกแบบทำให้ตำแหน่งที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในจีโนมเป็นส่วนที่ยีนมากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบสุ่มชนิดอื่น (รูปที่ 2.4ก) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้วิธี step up PCR คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส 5 รอบ เรียกว่า early cycles เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ดี แล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นตามปกติอีก 30-35 รอบ เรียกว่า late cycles เพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่มาจาก 5 รอบแรกเท่านั้นทำให้ผลที่ได้มีความคงที่ (รูปที่ 2.4ข) (สุรินทร์, 2552)

เทคนิคนี้ถูกพัฒนาจากการหาลำดับเบสในลูกผสมของ *Brassica oleracea* L. ระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่เป็น double haploid หลังจากการศึกษาลำดับเบส ประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ของลำดับเบสที่หาได้จะมีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของยีนใน GenBank และ 20 เปอร์เซ็นต์ ของเทคนิค SRAP จึงตรวจสอบในรูปของการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งตรงกัน นอกจากนี้ยังนำเทคนิค Sequence related amplified polymorphism (SRAP) ไปใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืชอื่น ๆ อีก เช่น มันฝรั่ง ข้าว กระเทียม แอปเปิ้ล กะหล่ำปลีจีน (*Brassica rapa* L.) ผักกาดก้านขาว (*Brassica napus* L.) (Li และ Quiros, 2001)



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะของไพรเมอร์ (ก) องค์ประกอบ forward และ reverse primer ของเทคนิค SRAP (ข) และการเข้าจับดีเอ็นเอเป้าหมายของคู่ไพรเมอร์แบบไม่จำเพาะ (early cycles) และแบบจำเพาะ (late cycles) ของเทคนิค SRAP
ที่มา Li และคณะ (2013)

ปัจจุบันมีการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสั๊กด้วยเทคนิคต่าง ๆ โดยในประเทศไทยมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสั๊กด้วยเทคนิค RAPD ในตัวอย่างสั๊กจากป่าธรรมชาติในประเทศไทย 15 แหล่ง พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของไม้สั๊กแต่ละแหล่งเท่ากับร้อยละ 23 โดยมีค่า polymorphic loci ตั้งแต่ร้อยละ 27.4-92.2 (สุจิตรา และ Alfred, 2544) และยังมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค ISSR โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ลุ่มน้ำ 5 แห่ง ได้แก่ ลุ่มน้ำสาละวิน ลุ่มน้ำปิง ลุ่มน้ำวัง ลุ่มน้ำยม และลุ่มน้ำน่าน และเมื่อนำมาหาค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแต่ละพื้นที่ ด้วยโปรแกรม TFPGA (Tools For Population Genetic Analyses) พบว่า ตัวอย่างจากลุ่มน้ำยมและลุ่มน้ำวังมีพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากที่สุดโดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.9797 และตัวอย่างจากลุ่มน้ำสาละวินกับลุ่มน้ำปิงมีความคล้ายคลึงกันน้อยที่สุด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.9585 (กานตรัตน์, 2554) เช่นเดียวกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสั๊กในพื้นที่ลุ่มน้ำปาย ที่ระดับความสูงต่าง ๆ ด้วยเทคนิค ISSR นำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม หาค่าความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม POPGENE และโปรแกรม TFPGA พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของตัวอย่างสั๊กได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ที่ระดับความสูง 300-900 เมตร ที่ระดับความสูงของพื้นที่ตั้งแต่ 900 เมตร ขึ้นไป และที่ระดับความสูงมากกว่า 1100 เมตร มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด โดยมีค่า polymorphic band เท่ากับร้อยละ 78.46 (อังสุมา, 2555)

นอกจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสั๊กในประเทศไทยแล้ว ยังมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสั๊กในประเทศอินเดียด้วยเทคนิค RAPD และ ISSR จากตัวอย่างของแม่ไม้สั๊กจำนวน 48 ตัวอย่าง จาก 11 แหล่งของการเจริญเติบโตพบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Jaccard มีค่าตั้งแต่ 0.31-0.85 ในการทดสอบด้วยเทคนิค RAPD และ 0.27-0.88 ในการทดสอบเทคนิค ISSR มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างเทคนิค RAPD และ ISSR เท่ากับ 0.36 ซึ่งไม่สามารถแบ่งกลุ่มตามการกระจายของพื้นที่ได้ (Narayanan และคณะ, 2007) และยังมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสั๊กด้วยเทคนิค RAPD โดยเก็บตัวอย่างใบสั๊กจากทั้งหมด 6 สถานที่ในประเทศอินเดียพบว่า สามารถแยกความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ 2 กลุ่ม ตามระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลในการเจริญเติบโตของสั๊ก ได้แก่เมือง Munnar, Palakkad และ Idukki จัดอยู่ในกลุ่มแรก และในกลุ่มที่ 2 ได้แก่เมือง Kochi, Kollam และ Trivandrum โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมมีค่า Polymorphic band เท่ากับ 56% และ 52.5% ตามลำดับ (Murukan และ Murukan, 2015) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสั๊กด้วยเทคนิค SRAP จากตัวอย่างของสั๊กจำนวน 32 ตัวอย่าง จาก 6 เมือง ในรัฐ Gujarat ของประเทศอินเดีย โดยใช้คูไพรเมอร์ในการศึกษาทั้งหมด 11 คูไพรเมอร์ ได้แก่ ME3/EM2, ME3/EM3, ME2/EM4, ME3/EM6, ME5/EM2, ME5/EM3, ME2/EM3, ME2/EM5, ME2/EM6, ME3/EM5 และ ME5/EM1 โดยทุกคูไพรเมอร์มีค่า polymorphism เท่ากับร้อยละ 100 ยกเว้นคูไพรเมอร์ ME2/EM3 มีค่า polymorphism เท่ากับร้อยละ 80 ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่พบอยู่ระหว่าง 98-1005 คู่เบส มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 40 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic bands) จำนวน 39 แถบ และมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่าง 0.11-0.92 โดยที่ค่า 0.47 สามารถจัดกลุ่มของตัวอย่างได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม ซึ่งเทคนิค SRAP สามารถหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสั๊กในรัฐ Gujarat ของประเทศอินเดียได้ (Thakor และคณะ, 2019)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืช

ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ ชนิดของแม่ไม้ ระยะของใบ และสถานที่ปลูก โดยประกอบด้วย 5 แม่ไม้ คือ แม่ไม้เชียงใหม่ (C) แพร่ (P) ลำปาง (L) สุโขทัย (S) และขอนแก่น (K) จากแหล่งปลูก 2 สถานที่ คือ สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ (T) และสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก (P) และระยะใบ 2 ลักษณะ คือ ใบสด (F) และใบร่วง (D) โดยใบสดจะเก็บจากส่วนยอดลักษณะใบมีสีเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2560 และใบร่วงจะเก็บใบที่ร่วงตามธรรมชาติลักษณะใบมีสีน้ำตาล โดยวางสแลนใต้ต้นสักป้องกันการตกจากพื้นเพื่อไม่ให้ปนกับใบร่วงของแม่ไม้อื่น เก็บใบร่วงในช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2561 จาก ที่รวบรวมปลูกไว้ที่ โดยมีรหัสตัวอย่างดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 รหัส แม่ไม้ ระยะใบ และสถานที่ของตัวอย่างใบสัก ที่ใช้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

| สถานที่ | แม่ไม้ | ระยะใบ | |
|--------------------------------------|---------------|----------|------------|
| | | ใบสด (F) | ใบร่วง (D) |
| สถานีวนวัฒน วิจัยทองผาภูมิ (T) | เชียงใหม่ (C) | CTF | CTD |
| | แพร่ (P) | PTF | PTD |
| | ลำปาง (L) | LTF | LTD |
| | สุโขทัย (S) | STF | STD |
| | ขอนแก่น (K) | KTF | KTD |
| สถานีวนวัฒน วิจัยพิษณุโลก (P) | เชียงใหม่ (C) | CPF | CPD |
| | แพร่ (P) | PPF | PPD |
| | ลำปาง (L) | LPF | LPD |
| | สุโขทัย (S) | SPF | SPD |
| | ขอนแก่น (K) | KPF | KPD |

หมายเหตุ D: ใบร่วง, F: ใบสด, P: สถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก, T: สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ,
C: เชียงใหม่, K: ขอนแก่น, L: ลำปาง, P: แพร่ และ S: สุโขทัย

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสักด้วยเครื่องหมายโมเลกุล sequence related amplified polymorphism (SRAP) มีตัวอย่างทั้งหมด 28 ตัวอย่าง โดยมีรหัส แม่ไม้/สายต้น และแหล่งที่มาดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 รหัสตัวอย่าง แม่ไม้/สายต้น และแหล่งที่มาของตัวอย่างใบสัก ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

| รหัสตัวอย่าง | แม่ไม้/สายต้น | แหล่งที่มาของตัวอย่าง |
|--------------|---------------|------------------------------|
| TGJP01 | สยามินทร์ | สวนจิตรลดา (อพ.สธ.) |
| TGJP02 | มเหสักข์ | สวนจิตรลดา (อพ.สธ.) |
| TGJP03 | สุโขทัย | สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ |
| TGJP04 | สุโขทัย | สถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก |
| TGJP05 | ลำปาง | สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ |
| TGJP06 | ลำปาง | สถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก |
| TGJP07 | เชียงใหม่ | สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ |
| TGJP08 | เชียงใหม่ | สถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก |
| TGJP09 | แพร่ | สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ |
| TGJP10 | แพร่ | สถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก |
| TGJP11 | ขอนแก่น | สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ |
| TGJP12 | ขอนแก่น | สถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก |
| TGJP13 | เชียงราย | สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ |
| TGJP14 | เชียงราย | สถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก |
| TGJP15 | เชียงใหม่ | สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ |
| TGJP16 | เชียงใหม่ | สถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก |
| TGJP17 | แม่ฮ่องสอน | สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ |
| TGJP18 | แม่ฮ่องสอน | สถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก |
| TGJP19 | ตาก | สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ |
| TGJP20 | ตาก | สถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก |
| TGJP21 | สยามินทร์ | อ. ด่านช้าง จ. สุพรรณบุรี |
| TGJP22 | มเหสักข์ | อ. ด่านช้าง จ. สุพรรณบุรี |
| TGJP23 | สยามินทร์ | สวนจิตรลดา (อพ.สธ.) |
| TGJP24 | ไม่ทราบสายต้น | ลาดกระบัง กรุงเทพฯ |
| TGJP25 | ไม่ทราบสายต้น | ลาดกระบัง กรุงเทพฯ |
| TGJP26 | ไม่ทราบสายต้น | โรงเรียนพรตพิทยพยัต กรุงเทพฯ |
| TGJP27 | ไม่ทราบสายต้น | อ. เมือง จ. กำแพงเพชร |
| TGJP28 | ไม่ทราบสายต้น | อ. เมือง จ. สุโขทัย |

3.2 แบคทีเรีย

3.2.1 *Propionibacterium acnes* DMST14916

3.2.2 *Staphylococcus aureus* TISTR 1466

3.2.3 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

3.3 เซลล์ไลน์

3.3.1 RAW 264.7

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.4.1 กรวยแยกสาร (Separatory funnel)

3.4.2 กรวยกรองแบบบุชเนอร์ (Buchner funnel)

3.4.3 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Whatman filter papers No.1)

3.4.4 กระบอกตวง (Cylinder)

3.4.5 กล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน (Compound light microscope)

3.4.6 กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted microscope)

3.4.7 โกร่งบด (Mortar)

3.4.8 ขวดแก้วดูแรน (Duran bottle)

3.4.9 ขวดปริมาตร (Volumetric flask)

3.4.10 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

3.4.11 คิวเวตต์ควอตซ์ (cuvette quartz)

3.4.12 เครื่องกวนสาร (Hotplate stirrer)

3.4.13 เครื่องนับจำนวน (Counter)

3.4.14 เครื่องปั่น (Blender)

3.4.15 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.4.16 เครื่องปั่นเหวี่ยงสารขนาดเล็ก (Spin down)

3.4.17 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)

3.4.18 เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (Microplate reader)

3.4.19 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal cycler)

3.4.20 เครื่องให้ความร้อนหลอดทดลอง (Heat box)

3.4.21 เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel document system)

3.4.22 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)

3.4.23 เครื่องรันเจล (Gel electrophoresis)

3.4.24 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

- 3.4.25 เครื่องทำแห้งแบบสุญญากาศ (Vacuum drier)
- 3.4.26 จานเพาะเชื้อ (Petri dishes)
- 3.4.27 ตู้บ่ม (Incubator)
- 3.4.28 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
- 3.4.29 ตู้อบความร้อน (Hot air oven)
- 3.4.30 โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 3.4.31 โถเพาะเชื้อแบคทีเรียแบบไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar)
- 3.4.32 ปีกเกอร์ (Beaker)
- 3.4.33 ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)
- 3.4.34 แผ่นดิสก์ (Paper disc)
- 3.4.35 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 3.4.36 ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette tip)
- 3.4.37 ไมโครเพลท 96 หลุม (96-well plates)
- 3.4.38 ไมโครเวฟ (Microwave oven)
- 3.4.39 ไม้พันสำลี (Cotton swab)
- 3.4.40 หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Micro Centrifuge Tube)
- 3.4.41 ห่วงเชี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.4.42 สไลด์นับจำนวนเซลล์ (Hemocytometer)
- 3.4.43 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- 3.4.44 Aluminum sheets 20 x 20 cm TLC Silica gel
- 3.4.45 TLC tank
- 3.4.46 UV box

3.5 สารเคมี

3.5.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารและแยกสาร

- 3.5.1.1 *p*-Anisaldehyde
- 3.5.1.2 *n*-Butanol
- 3.5.1.3 Chloroform
- 3.5.1.4 Dichloromethane
- 3.5.1.5 Ethyl acetate
- 3.5.1.6 Hexane
- 3.5.1.7 Methanol
- 3.5.1.8 Silica gel 60A, 40-63 μm

3.5.1.9 Sodium sulphate anhydrous

3.5.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย

3.5.2.1 Brain heart infusion agar (BHI agar)

3.5.2.2 Brain heart infusion broth (BHI broth)

3.5.2.3 Gentamicin

3.5.2.4 Methanol

3.5.2.5 Mueller hinton agar (MHA)

3.5.2.6 Normal saline solution 0.85% (NSS)

3.5.3.7 Nutrient agar (NA)

3.5.3 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.5.3.1 Ascorbic acid

3.5.3.2 Deionized water (DI)

3.5.3.3 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa)

3.5.3.4 Methanol

3.5.3.5 Phosphate buffer pH 6.8

3.5.3.6 Tyrosinase enzyme

3.5.4 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์

3.5.4.1 Ascorbic acid

3.5.4.2 Deionized water (DI)

3.5.4.3 Griess reagent

3.5.4.4 Phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS)

3.5.4.5 Sodium nitroprusside (SNP)

3.5.5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7

3.5.5.1 10% fetal bovine serum (FBS)

3.5.5.2 Griess reagent

3.5.5.3 Lipopolysaccharide (LPS)

3.5.5.4 Phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS)

3.5.5.5 Roswell park memorial institute (RPMI) 1640 medium

3.5.5.6 Sodium bicarbonate

3.5.5.7 Trypan blue

3.5.6 สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC

- 3.5.6.1 Gallic acid
- 3.5.6.2 Quercetin
- 3.5.6.3 Salicylic acid

3.5.7 สารเคมีที่ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เซรัมแต้มสิวจากสารสกัดใบสัก

- 3.5.7.1 เบสเซรัม (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 ชื่อสาร และปริมาณของเบสเซรัมที่ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เซรัมแต้มสิวจากสารสกัดใบสัก

| ชื่อสาร | ปริมาณ (%) |
|------------------------------------|------------|
| Aqua | 67.70 |
| Sodium acrylate | 7 |
| <i>Chamomilla recutita</i> extract | 5 |
| <i>Centella asiatica</i> extract | 5 |
| Aloe barbadensis leaf extract | 5 |
| DMDM hydantoin | 0.3 |
| Alcohol | 5 |

3.5.8 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- 3.5.8.1 3X CTAB
- 3.5.8.2 10% CTAB
- 3.5.8.3 Chloroform
- 3.5.8.4 Ethanol
- 3.5.8.5 70% Ethanol
- 3.5.8.6 Liquid nitrogen
- 3.5.8.7 β -mercaptonethanol
- 3.5.8.8 Isoamyl alcohol
- 3.5.8.9 Isopropanol
- 3.5.8.10 RNase A

3.5.9 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

- 3.5.9.1 10X Standard *Taq* reaction buffer
- 3.5.9.2 Deoxyadenosine triphosphate (dATP)
- 3.5.9.3 Deoxycytidine triphosphate (dCTP)
- 3.5.9.4 Deoxy guanosine triphosphate (dGTP)
- 3.5.9.5 Deoxythymidine triphosphate (dTTP)
- 3.5.9.6 Magnesium chloride
- 3.5.9.7 *Taq* DNA polymerase
- 3.5.9.8 SRAP primers (ดังตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 ชนิด ชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในเทคนิค SRAP (Li และ Quiros 2001)

| ชนิดไพรเมอร์ | ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ |
|----------------|--------------|-------------------------------|
| Forward primer | ME1 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA TA-3' |
| | ME2 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA GC-3' |
| | ME3 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA AT-3' |
| | ME4 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA CC-3' |
| | ME5 | 5'-TGA GTC CAA ACC GGA AG-3' |
| Reverse primer | EM1 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT AAT-3' |
| | EM2 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT TGC-3' |
| | EM3 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GAC-3' |
| | EM4 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT TGA-3' |
| | EM5 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT AAC-3' |
| | EM6 | 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GCA-3' |

3.5.10 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

- 3.5.10.1 1kb DNA ladder
- 3.5.10.2 100bp DNA ladder
- 3.5.10.3 6x Loading dye
- 3.5.10.4 1X TBE buffer
- 3.5.10.5 Agarose
- 3.5.10.6 Ethidium bromide

3.6 โปรแกรม

3.6.1 GraphPad Prism 8

3.6.2 IBM SPSS Statistics 23

3.6.3 NTSYSpc Version 2.1

3.7 วิธีการทดลอง

3.7.1 การสกัดสารและการแยกสาร

3.7.1.1 การสกัดสารด้วยเมทานอล

การสกัดสารด้วยเมทานอลดัดแปลงจาก Mosad และคณะ (2014) นำตัวอย่างใบสดมาทำความสะอาด ล้างด้วยน้ำประปา ตากให้แห้ง ส่วนใบร่วงจะใช้ผ้าสะอาดชุบน้ำพอหมาดแล้วเช็ดทำความสะอาด และตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างใบที่อบแล้วไปปั่นพอยาบ โดยใช้ใบสีก 50 กรัม ห่อด้วยผ้าขาวบาง และหมักด้วยเมทานอล 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน กรองสารด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ได้เป็นสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสีก นำมาหาน้ำหนัก ร้อยละผลได้ และบันทึกสีของสารสกัดที่ได้

3.7.1.2 การสกัดสารด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction

นำสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสีกมาละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จนกว่าสารจะละลายหมด โดยกวนด้วยเครื่องกวนสาร (stirrer) จนสารสกัดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมตัวทำละลายผสมกับสารสกัดที่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร โดยสารละลายที่เติมลงไปจะเติมตามลำดับความมีขั้ว จากขั้วต่ำไปยังตัวทำละลายที่มีขั้วสูง ดังนี้ เฮกเซน (H) ไคคลอโรฟอร์ม (D) เอทิลอะซิเตท (E) และบิวทานอล (B) จากนั้นนำสารละลายลงในกรวยแยก เขย่าให้เข้ากัน และทิ้งไว้จนสารละลายแยกเป็น 2 ชั้น และไขสารละลายแต่ละชั้น ซึ่งสารละลายจะอยู่ด้านล่าง ยกเว้นชั้นไคคลอโรฟอร์มที่สารละลายจะอยู่ด้านบน จากนั้นนำมาตั้งน้ำออกด้วยสารละลายน้ำเกลืออิ่มตัว ด้วยอัตราส่วน 1 : 1 ยกเว้นสารสกัดชั้นน้ำ (W) และนำไปใส่กรวยแยก เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น และไขเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายของแต่ละขั้วตัวทำละลายมาเติม โซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรส์ (Na_2SO_4) และนำมากรอง จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ จะได้สารสกัดในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ บันทึกน้ำหนัก ร้อยละผลได้ และสีของสารสกัดที่ได้ และนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

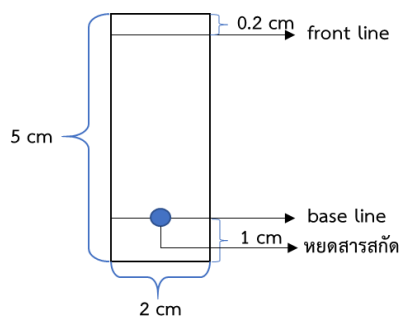
3.7.1.3 การแยกสารด้วยเทคนิค column chromatography

การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยมีขั้นตอนดังนี้ ทหาระบบตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ที่เหมาะสำหรับการแยกสารด้วยเทคนิค

column chromatography โดยตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ดังวิธีการในหัวข้อที่ 3.7.1.4 ถ้าระบบตัวทำละลายสามารถพาสารขึ้นไปยังเส้น front line ได้หมดจึงเลือกระบบตัวทำละลายนั้นมาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยการศึกษาครั้งนี้พบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารคือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล ในอัตราส่วน 9 : 1 จากนั้นจึงนำซิลิกามาละลายด้วยคลอโรฟอร์ม : เมทานอล ในอัตราส่วน 9 : 1 ให้มีลักษณะเหลวข้น แล้วเทลงคอลัมน์ และไขตัวทำละลายออกมาเป็นระยะ ใช้ลูกยางเคาะรอบคอลัมน์เพื่อให้ซิลิกาที่เป็นเฟสคงที่บรรจุตัวกันแน่น และคอยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ และนำตัวอย่างของสารสกัดปริมาณ 1 กรัม มาละลายด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล ในอัตราส่วน 9 : 1 ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน และนำสารสกัดดังกล่าวใส่ลงในคอลัมน์ พร้อมทั้งไขให้สารละลายลงมายังเฟสคงที่ จากนั้นเติมตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่เพื่อชะให้สารสกัดลงมายังด้านล่างคอลัมน์โดยการเพิ่มความเข้มข้นให้กับเฟสเคลื่อนที่ โดยลดอัตราส่วนของคลอโรฟอร์ม และเพิ่มอัตราส่วนของเมทานอลลงทีละ 1 ส่วน เช่น 8 : 2 และ 7 : 3 เป็นต้น จนอัตราส่วนของคลอโรฟอร์ม : เมทานอล เท่ากับ 1 : 9 และเก็บตัวอย่างที่ไหลออกจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลอง หลอดละประมาณ 15 มิลลิลิตร เพื่อนำไปตรวจสอบสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography : TLC) ต่อไป

3.7.1.4 การตรวจสอบสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography : TLC)

นำตัวอย่างแต่ละหลอดมาหยดลงบนแผ่น normal phase TLC ขนาด 5x2 เซนติเมตร บริเวณเส้น base line รอยจารึก และใส่ลงใน chamber ที่มีตัวทำละลายของคลอโรฟอร์ม : เมทานอล ในอัตราส่วน 9 : 1 ที่อิ่มตัวเพื่อให้ตัวทำละลายพาตัวอย่างขึ้นไปจนถึง front line (รูปที่ 3.1) จากนั้นนำมาตรวจผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร จากนั้นสเปรย์ด้วย *p*-Anisaldehyde reagent และให้ความร้อนบน hot plate จะเห็นจุดบนแผ่น TLC ทำการรวมตัวอย่างแต่ละหลอดที่เหมือนเข้าด้วยกันจะได้เป็นสารสกัดส่วนย่อย (fraction) จากนั้นนำสารสกัดส่วนย่อยไประเหยตัวทำละลายออก และนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป



รูปที่ 3.1 ขนาดของแผ่น normal phase TLC ที่มีเส้น base line และ front line ในการตรวจสอบสารด้วยเทคนิค TLC

3.7.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบสัก

3.7.2.1 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย

ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากใบสักด้วยวิธี paper disc diffusion (CLSI, 2018) ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ดังนี้ *Propionibacterium acnes* DMST14916, *Staphylococcus aureus* TISTR1466 และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 โดยเลี้ยงเชื้อที่จะนำมาทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *P. acnes* จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน anaerobic jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และปรับความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่จะใช้ทดสอบด้วยน้ำเกลือ 0.85% (Normal saline solution) และวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.13 สำหรับเชื้อ *P. acnes* ปรับให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.50-0.60 จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ (sterile cotton swab) จุ่มในสารละลายเชื้อแบคทีเรียมา swab ลงบนอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) สำหรับเชื้อ *P. acnes* ใช้อาหาร Brain Heart Infusion (BHI) ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ใช้คีมคีบปลอดเชื้อ (sterile forceps) คีบ paper disc ที่หยดสารสกัดความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ โดยใช้ตัวควบคุมเชิงบวกเป็นยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และเมทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงลบ วางให้แนบกับผิวหน้า นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้นเชื้อ *P. acnes* ทำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน anaerobic jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกข้อมูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นหน่วยเป็นมิลลิเมตร

3.7.2.2 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี dopa-chrome เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Chang และ Tseng (2006) โดยผสมสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (C) ที่ความเข้มข้น 1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 60 ไมโครลิตร กับสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สำหรับชุดควบคุม (A) ผสมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8) ปริมาตร 140 ไมโครลิตร กับสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ชุดควบคุม (B) ใส่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8) ปริมาตร 140 ไมโครลิตร และชุดควบคุม (D) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาตร 60 ไมโครลิตร (ตารางที่ 3.5) ลงใน 96-well plate บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-dopa ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้ววัดค่า

การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader จากนั้นคำนวณหา ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A-B)-(C-D)}{(A-B)} \times 100$$

เมื่อ A คือ control ค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

B คือ blank control ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

C คือ sample ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ทำการทดสอบ

D คือ blank sample ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ทดสอบกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ตารางที่ 3.5 แสดงปริมาตรของสารผสมสำหรับทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

| ชุดควบคุม/สารสกัด | ฟอสเฟต | Tyrosinase | สารสกัด | L-dopa 2.5 mM (μ l) |
|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------|--------------------------------|
| | บัฟเฟอร์ (pH 6.8) (μ l) | enzyme 25 U/ml (μ l) | | |
| A (control) | 140 | 20 | - | 40 |
| B (blank control) | 160 | - | - | 40 |
| C (sample) | 80 | 20 | 60 | 40 |
| D (blank sample) | 100 | - | 60 | 40 |

3.7.2.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการประเมินฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ (nitric oxide scavenging assay) : NOA คือการตรวจวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและไม่ซับซ้อน เป็นการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ทางอ้อม ดัดแปลงจากวิธีของ Aktas และคณะ (2013) โดยใช้สารละลาย sodium nitroprusside (SNP) จนสลายตัวให้ไนตริกออกไซด์ และทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นไนไตรท์ ซึ่งสามารถตรวจวัดในสารละลาย Griess reagent สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบจะแข่งขันกับออกซิเจนทำให้ปริมาณไนไตรท์ลดลง มีวิธีการทดสอบโดยนำสารสกัด (B) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 50 ไมโครลิตร ชุดควบคุม A ใส่ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และชุดควบคุม C ใส่สารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เติมสารละลาย sodium nitroprusside 10 มิลลิโมลาร์ (ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และเติมสารละลาย Griess reagent (sulphanilamide 1%+N-1-naphthlenediamine hydrochloride 0.1%+ phosphoric acid 2.5% ในอัตราส่วน 1:1:1) ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร (ตารางที่ 3.6)

ผสมสารให้เข้ากัน บ่ม 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร โดยมีกรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ แล้วนำไปคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ (% nitric oxide inhibition)

$$\% \text{ nitric oxide inhibition} = \frac{A-(B-C)}{A} \times 100$$

เมื่อ A คือ control ค่าการดูดกลืนแสงของ sodium nitroprusside (SNP) ที่ไม่เติมสารสกัด

B คือ sample ค่าการดูดกลืนแสงของ sodium nitroprusside (SNP) ที่เติมสารสกัด

C คือ blank sample ค่าการดูดกลืนแสงสารสกัดที่ไม่เติม sodium nitroprusside (SNP)

ตารางที่ 3.6 แสดงปริมาณของสารผสมสำหรับทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์

| ชุดควบคุม/ สารสกัด | SNP 10 mM (μL) | สารสกัด (μL) | DI/PBS (pH 7.4) (μL) | Griess Reagent (μL) |
|-----------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| A (control) | 50 | - | 50 | 100 |
| B (sample) | 50 | 50 | - | 100 |
| C (blank sample) | - | 50 | 50 | 100 |

3.7.2.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7

ความเข้มข้นของไนโตรที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สามารถบอกถึงปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ เนื่องจากไนโตรที่เป็นผลิตภัณฑ์ของการออกซิเดชันของไนตริกออกไซด์ ทำได้โดยการวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรที่โดยปฏิกิริยา Griess reagent ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นเซลล์ 1.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม ใน 96-well plate ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 5% FBS-RPMI 1640 และบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดความเข้มข้น 6.25, 12.50, 50, 25, และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (วิธีการเตรียม ภาคผนวก ก) และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (วิธีการเตรียม ภาคผนวก ก) สำหรับชุดควบคุมเติม LPS เพียงอย่างเดียว และ blank sample จะไม่เติม LPS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 48 ชั่วโมง โดยมีสารมาตรฐานที่ใช้ต้านการอักเสบคือ indomethacin สามารถตรวจหาปริมาณไนตริกออกไซด์โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Griess reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-well plate ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร (กล่าวขวัญ และคณะ, 2011) คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (% nitric oxide inhibition)

$$\% \text{ nitric oxide inhibition} = \frac{A-(B-C)}{A} \times 100$$

โดยที่ A คือค่าการดูดกลืนแสงชุดควบคุมที่ใส่ LPS เพียงอย่างเดียว

B คือค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ใส่ LPS

C คือการดูดกลืนแสงของ blank สารสกัด

3.7.3 การหาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC

หาปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้สารมาตรฐาน gallic acid, quercetin และ salicylic acid เนื่องจากมีรายงานว่าพบสารสำคัญดังกล่าวของสารสกัดจากใบสัก สารดังกล่าวเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Nayeem และ Karvekar, 2010; 2011) โดยส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับพื้นที่ใต้กราฟ เพื่อคำนวณหาปริมาณสารในสารสกัดใบสัก

3.7.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS โดยส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.7.5 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เซรัมแต้มสิวจากสารสกัดใบสัก

ผสมเบสเซรัม (ตารางที่ 3.3) และสารสกัดจากใบสักที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 และ 5 จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย

3.7.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of variance : ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test at $P < 0.05$ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic 23

3.7.7 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสีกด้วยเทคนิค SRAP

3.7.7.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1987) โดยตัดใบสักให้มีขนาดเล็ก และนำไปบดกับไนโตรเจนเหลวจนละเอียด จากนั้นเติม 3X CTAB (วิธีการเตรียม 3X CTAB แสดงในภาคผนวก ก) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บดจนเป็นเนื้อเดียวกัน และใส่ในหลอดทดลอง 2 มิลลิลิตร และเติม β -mercaptonethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลับหลอดเบาๆทุก 15 นาที เมื่อครบเวลาเติม

chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสด้านบนปริมาตร 400-500 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเติม 10% CTAB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสด้านบนปริมาตร 400-500 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม isopropanol ที่เย็น อัตราส่วน 1:1 กับส่วนใส กลับหลอดไปมา และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เมื่อครบเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้งและคว่ำหลอดทดลองบนกระดาษทิชชู ประมาณ 1-2 นาที ให้แห้ง และเติม 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้งและคว่ำหลอดทดลองบนกระดาษทิชชู ประมาณ 1-2 นาที และเติม absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (วิธีเตรียม TE buffer แสดงในภาคผนวก ก) ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ นำไปบ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส จนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลาย จึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสต่อไป

3.7.7.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1% ในสารละลาย 1X TBE buffer (วิธีเตรียม 1X TBE buffer แสดงในภาคผนวก ก) เตรียมถาดสำหรับใสเจลโดยทำการเช็ดทำความสะอาด นำถาดเจลมาวางแล้วเสียบหัวลงบนด้านปลายของแผ่นเจล เทสารละลายอะกาโรสลงในถาด ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ เมื่อสารละลายอะกาโรสแข็งดีจึงหิวออกอย่างระมัดระวัง นำเจลมาวางในเครื่องรันเจล เท 1X TBE buffer ให้ท่วมผิวหน้าเจล ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ loading dye หยอดตัวอย่างที่ผสมแล้วลงใน well โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และใช้ Marker ขนาด 1 Kb เป็นขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ประมาณ 10 นาที แล้วนำไปล้างในน้ำกลั่น ประมาณ 5 นาที จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel document แล้วบันทึกภาพ สำหรับการวัดปริมาณของดีเอ็นเอใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยดูสารละลายดีเอ็นเอที่ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 495 ไมโครลิตร (dilution factor เท่ากับ 100) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วัดค่าการดูดกลืนแสงหรือค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 และ

280 นาโนเมตร แล้ นำมาคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และปริมาณดีเอ็นเอในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/ μ l)

3.7.7.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

การศึกษาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสั๊กด้วยเทคนิค SRAP ดัดแปลงจากวิธีของ Li และ Quiros (2001) โดยใช้ไพรเมอร์ ตามตารางที่ 3.4 นำมาศึกษากับ ตัวอย่างสั๊ก และนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ส่วนประกอบของสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP แสดงตารางที่ 3.7 และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ขั้นตอน เวลา อุณหภูมิ และจำนวนรอบ ดังตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.7 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP สำหรับ 1 ตัวอย่าง (ดัดแปลง จาก Zhang และคณะ, 2013)

| สารเคมี | ความเข้มข้น เริ่มต้น | ปริมาตร (ไมโครลิตร) | ความเข้มข้น สุดท้าย |
|-------------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| Standard <i>Taq</i> reaction buffer | 10X | 2 | 1X |
| dNTP _s | 1.25 mM | 4 | 250 μ M |
| MgCl ₂ | 50 mM | 1 | 2.5 mM |
| Forward primer | 20 pmol | 1 | 1 pmol |
| Reverse primer | 20 pmol | 1 | 1 pmol |
| <i>Taq</i> DNA Polymerase | 5000 unit/ml | 0.2 | 1 unit |
| DNA template | 100 ng/ μ l | 2 | 200 ng/ μ l |
| DI water | - | 8.8 | - |
| ปริมาตรรวม | - | 20 | - |

ตารางที่ 3.8 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP (ดัดแปลงจาก Li และ Quiros, 2001)

| ขั้นตอน | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) | จำนวนรอบ |
|-------------------------|----------------------------|-------------|----------|
| Initiation denaturation | 94 | 5 | 1 |
| Denaturation | 94 | 1 | |
| Annealing | 35 | 1 | 5 |
| Extension | 72 | 1 | |
| Denaturation | 94 | 1 | |
| Annealing | 50 | 1 | 35 |
| Extension | 72 | 1 | |
| Final extension | 72 | 10 | 1 |
| Cool down | 4 | | |

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 2 ละลายด้วยสารละลาย 1X TBE buffer เป็นเวลาประมาณ 35 นาที โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp DNA ladder และนำไปแปลแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SRAP เมื่อเกิดแถบดีเอ็นเอจะให้คะแนนเป็น 1 และเมื่อไม่เกิดแถบดีเอ็นเอจะให้คะแนนเป็น 0 จากนั้นนำคะแนนมาคิดค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) และวิเคราะห์ความหลายหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ในรูปแบบเดนโดรแกรม (dendrogram) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc Version 2.1

บทที่ 4

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

4.1 ผลการสกัดสารด้วยเมทานอลจากใบสัก

จากการสกัดสารด้วยเมทานอลจากใบสัก โดยนำใบสด (F) และใบร่วง (D) จำนวน 5 แม่ไม้ ได้แก่ เชียงใหม่ (C) แพร่ (P) ลำปาง (L) สุโขทัย (S) และขอนแก่น (K) จากแหล่งเพาะปลูก 2 แหล่ง ได้แก่ สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ (T) และสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก (P) จำนวนรวม 20 สารสกัด หยาบ โดยน้ำหนัก ร้อยละผลได้ของสารสกัด และสีของสารสกัดโดยเทียบรหัสสีจาก RHS mini color chart แสดงดังตารางที่ 4.1 ซึ่งจะเห็นว่าโดยรวมแล้วน้ำหนักของสารสกัดจากใบสดจะมีปริมาณมากกว่าสารสกัดจากใบร่วง และสีของสารสกัดจากใบสดจะมีตั้งแต่สีเขียว สีนํ้าตาล จนถึงสีแดงเข้ม แต่สีของสารสกัดจากใบร่วงจะมีสีส้ม

4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสัก

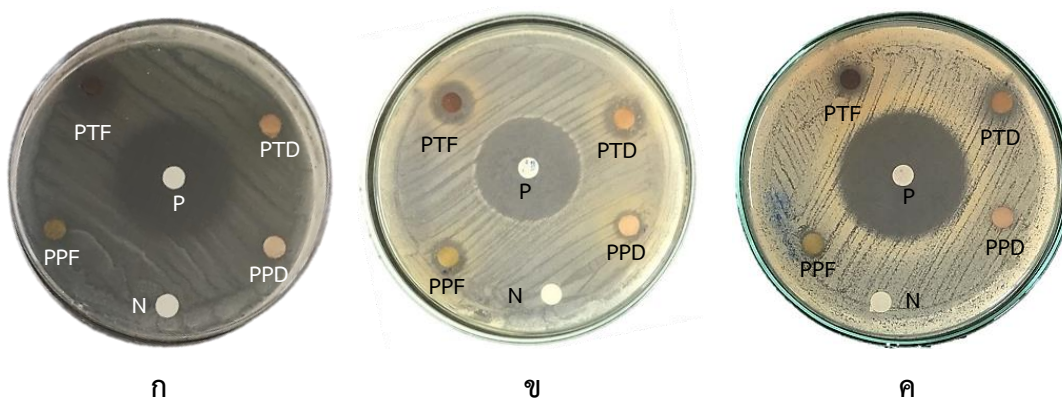
จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ ชนิดของแม่ไม้ ระยะเวลาของใบ และสถานที่ปลูก โดยประกอบด้วย 5 แม่ไม้ คือ แม่ไม้เชียงใหม่ (C) แพร่ (P) ลำปาง (L) สุโขทัย (S) และขอนแก่น (K) จากแหล่งปลูก 2 สถานที่ คือ สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ (T) และสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก (P) และระยะใบ 2 ลักษณะ คือ สด (F) และใบร่วง (D) มีผลการศึกษาดังนี้

4.2.1 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย

จากการสกัดสารด้วยเมทานอลจากใบสักได้สารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสัก จำนวน 20 สารสกัดหยาบ นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *P. acnes* DMST14916, *S. aureus* TISTR 1466 และ *S. epidermidis* ATCC 12228 ด้วยวิธี paper disc diffusion ที่ความเข้มข้นสารสกัด 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ โดยใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวกพบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ โดยฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของ 5 แม่ไม้ของทั้ง 2 สถานที่ พบว่า มีทั้งสารสกัดที่ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง และเกิดบริเวณยับยั้งสูงที่สุดเท่ากับ 14.31 มิลลิเมตร และสารสกัดที่มีบริเวณยับยั้งต่ำที่สุดมีค่าเท่ากับ 8.45 มิลลิเมตร โดยแม่ไม้แพร่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด (รูปที่ 4.1) มีบริเวณยับยั้งสูงที่สุดเท่ากับ 14.31 มิลลิเมตร รองลงมาคือแม่ไม้ลำปาง และแม่ไม้สุโขทัย มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13.78 และ 12.45 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *P. acnes* มีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 8.76-14.01

มิลลิเมตร โดยมีสารสกัดจากใบสดของแม่ไม้แพร์ PTF จากสถานีวิจัยของผาภูมิ มีบริเวณยับยั้งเชื้อมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 14.01 มิลลิเมตร รองลงมาคือ สารสกัดใบร่วงของแม่ไม้ลำปาง LPD จากสถานีวิจัยพิษณุโลก และสารสกัดใบสดของแม่ไม้สุโขทัย STF จากสถานีวิจัยของผาภูมิ มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13.32 และ 12.11 มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 มีบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 8.45-13.90 มิลลิเมตร โดยมีสารสกัดใบสดของแม่ไม้แพร์ PTF จากสถานีวิจัยของผาภูมิ มีบริเวณยับยั้งสูงสุด คือ 13.90 มิลลิเมตร รองลงมาคือสารสกัดใบร่วงจากแม่ไม้แพร์ PTD จากสถานีวิจัยของผาภูมิ และสารสกัดใบสดของแม่ไม้สุโขทัย STF จากสถานีวิจัยของผาภูมิ มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13.45 และ 12.45 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 มีบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 9.94-14.31 มิลลิเมตร โดยสารสกัดใบร่วงของแม่ไม้แพร์ PTD จากสถานีวิจัยของผาภูมิ มีบริเวณยับยั้งสูงสุด คือ 14.31 มิลลิเมตร รองลงมาคือสารสกัดใบร่วงของแม่ไม้ลำปาง LTD จากสถานีวิจัยของผาภูมิ และสารสกัดใบสดของแม่ไม้แพร์ PTF จากสถานีวิจัยของผาภูมิ โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13.78 และ 13.11 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียระหว่างใบสดและใบร่วงพบว่า ใบสดมีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 8.76-14.01 มิลลิเมตร และใบร่วงมีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 8.45-14.31 มิลลิเมตร จะเห็นว่าใบสดและใบร่วงมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ใกล้เคียงกัน และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียจากแหล่งเพาะปลูก 2 สถานที่ พบว่า สถานีวิจัยของผาภูมิ มีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 9.09-14.31 มิลลิเมตร และสถานีวิจัยพิษณุโลกมีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 8.45-13.32 มิลลิเมตร แต่สารสกัดทั้ง 5 แม่ไม้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 12228 ได้ (ตารางที่ 4.2) อาจสรุปได้ว่าสารสกัดจากสถานีวิจัยของผาภูมิมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียดีกว่าสถานีวิจัยพิษณุโลก เมื่อพิจารณารายงานฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบสักสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ ดังรายงานของ สุพัตรา และคณะ (2560) พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสัก ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ คือ *B. cereus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* และสามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีที่สุด โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 22.46 มิลลิเมตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่สามารถยับยั้งเชื้อแกรมบวกได้ แต่มีบริเวณการยับยั้งกว้างกว่าการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานการยับยั้งแบคทีเรียในสายพันธุ์ อื่น ๆ โดย Purushotham และคณะ (2010) พบว่า สารสกัดจากใบสัก ร่วมกับยาปฏิชีวนะ tetracycline สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ คือ *Pichia pastoris* และ *Streptococcus* sp. จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าชนิดของแม่ไม้ และสถานที่ มีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย โดยแม่ไม้แพร์จากสถานีวิจัยของผาภูมิ สามารถยับยั้ง

แบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ดีที่สุด ซึ่งไบสดและไบร่วงมีฤทธิ์ใกล้เคียงกันในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ยกเว้นไบร่วงที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ได้



รูปที่ 4.1 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (ก) *P. acnes* (ข) *S. aureus* (ค) *S. epidermidis* ของสารสกัดไบสั๊กจากแม่ไม้แพร์ โดย P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และ N คือ ตัวควบคุมเชิงลบหรือเมทานอล













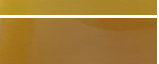







4.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เมื่อนำสารสกัดหยาบเมทานอลทั้ง 20 สารสกัด มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี dopa-chrome โดยทดสอบกับเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้น 25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ที่แสดงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังกราฟมาตรฐาน คือ $y = 0.19117x$ (รูปภาคผนวกที่ ข-1) พบว่า สารสกัดจากไบสั๊กมีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ระหว่างร้อยละ 35.45-73.65 โดยสารสกัดไบร่วงของแม่ไม้เชียงใหม่ CPD จากสถานีวิจัยพิษณุโลก สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุด โดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 73.65 รองลงมาคือสารสกัดไบร่วงของแม่ไม้เชียงใหม่ CPF จากสถานีวิจัยพิษณุโลก และสารสกัดไบร่วงของแม่ไม้เชียงใหม่ CTD จากสถานีวิจัยทองผาภูมิ มีค่าการยับยั้งร้อยละ 71.73 และ 71.66 ตามลำดับและสารสกัดไบสดของแม่ไม้ขอนแก่นแสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำสุด มีค่าการยับยั้งร้อยละ 35.45 (ตารางที่ 4.3) แสดงให้เห็นว่าแม่ไม้ไม่มีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดของไบ คือ ไบสดและไบร่วง พบว่า มีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับสถานที่เพาะปลูกทั้ง 2 สถานที่ ที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสใกล้เคียงกัน ดังรูปที่ 4.2 เมื่อพิจารณาจากรายงานฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดไบกระดังงาจีน (*Artabotrys hexapetalus*) ด้วยวิธี dopa-chrome ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถ

ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงสุดร้อยละ 43.61 (นุตติยา และ รวีวรรณ, 2555) และในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของใบลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.) ด้วยวิธี dopa-chrome พบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.034 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Itsarasook, 2015) จะเห็นว่าฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจะมีค่าแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด เช่นเดียวกับตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารตามที่ Wijaya และคณะ (2018) ได้ทำการรายงานฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากใบราชพฤกษ์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ดังนี้ เมทานอล เฮกเซน เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และน้ำ ด้วยวิธี dopa-chrome พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำแสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 153.031 ± 0.027 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักอาจจะมาจากสารกลุ่มไฮดรอกซิล (-OH group) ของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดเกิดพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) กับบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง (ขวัญจิตร, 2558) ซึ่งสารประกอบฟีนอลที่พบจากพืช เช่น kojic acid, kaempferol และ quercetin จัดเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สำคัญ (Kim และ Uyama, 2005; Solano และคณะ, 2006)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบหนาดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และสามารถแยกสารประเภทฟลาโวนอยด์ได้ 9 ชนิด คือ quercetin, rhamnetin, tamarixetin, luteolin, luteolin-7-methyl ether, dihydroquercetin-4'-methyl ether, dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether, 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone และ blumeatin เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี dopa-chrome พบว่า สาร quercetin สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด รองลงมาคือ rhamnetin และ tamarixetin ตามลำดับ (นิศากร, 2554) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่ศึกษาปริมาณสารสำคัญของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักด้วยเทคนิค HPLC และพบสาร salicylic acid, quercetin และ gallic acid ดังตารางที่ 4.6 ดังนั้นฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในการศึกษานี้ อาจมาจากสารดังกล่าว

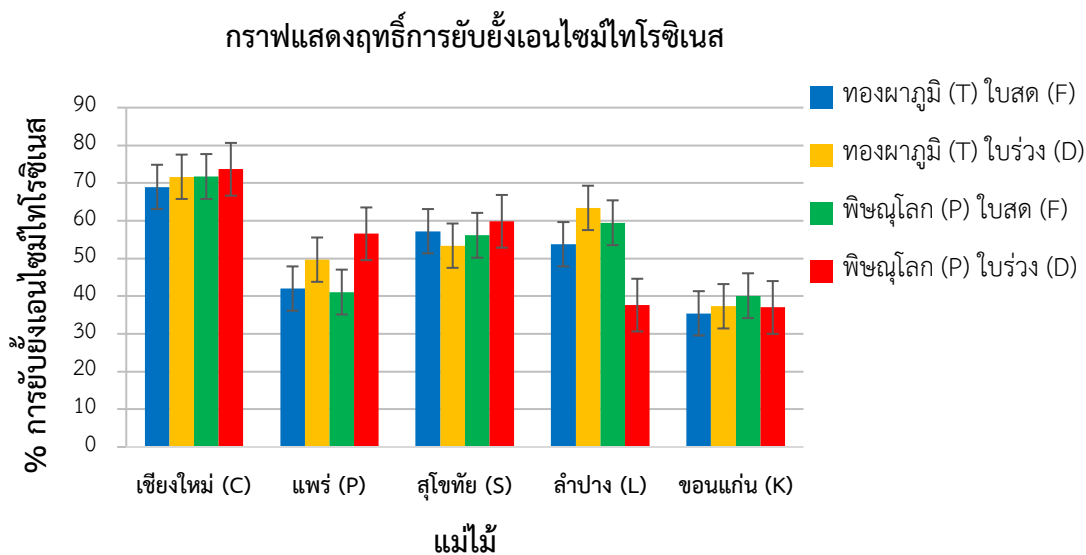
ตารางที่ 4.1 น้ำหนัก ร้อยละผลได้ สี และรหัสสีของการสกัดสารด้วยเมทานอลจากใบสัก

| สถานที่ | แม่ไม้ | รหัส | ใบสด | | | | | ใบร่วง | | | | |
|-------------------------|-----------|------|-----------------------|----------------|--|---------------|------|-----------------------|----------------|---|---------------|--|
| | | | น้ำหนักสารสกัด (กรัม) | ผลได้ (ร้อยละ) | สีสารสกัด | รหัสสีสารสกัด | รหัส | น้ำหนักสารสกัด (กรัม) | ผลได้ (ร้อยละ) | สีสารสกัด | รหัสสีสารสกัด | |
| สถานีวิจัย ทองผาภูมิ | เชียงใหม่ | CTF | 4.60 | 9.20 |  | RHS165A | CTD | 2.89 | 5.78 |  | RHS163A | |
| | แพร่ | PTF | 3.71 | 7.42 |  | RHS183A | PTD | 4.18 | 8.36 |  | RHS19B | |
| | ลำปาง | LTF | 2.82 | 5.64 |  | RHS166A | LTD | 3.10 | 6.20 |  | RHS172A | |
| | สุโขทัย | STF | 3.18 | 6.36 |  | RHSN77A | STD | 2.51 | 5.02 |  | RHS172A | |
| | ขอนแก่น | KTF | 5.96 | 11.92 |  | RHS183A | KTD | 2.53 | 5.06 |  | RHS172A | |
| สถานีวิจัย พิษณุโลก | เชียงใหม่ | CPF | 6.80 | 13.60 |  | RHS200C | CPD | 1.73 | 3.46 |  | RHS172A | |
| | แพร่ | PPF | 6.55 | 13.10 |  | RHS199A | PPD | 4.36 | 8.72 |  | RHS173C | |
| | ลำปาง | LPF | 8.23 | 16.46 |  | RHS199C | LPD | 2.62 | 5.24 |  | RHS171A | |
| | สุโขทัย | SPF | 2.89 | 5.78 |  | RHS183A | SPD | 3.08 | 6.16 |  | RHS173D | |
| | ขอนแก่น | KPF | 8.46 | 16.92 |  | RHS152D | KPD | 2.83 | 5.66 |  | RHS34C | |

ตารางที่ 4.2 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *P. acnes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์

| สถานที่ | แม่ไม้ | บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | |
|-------------------------------|------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | <i>P. acnes</i> | | <i>S. aureus</i> | | <i>S. epidermidis</i> | |
| | | ใบสด | ใบร่วง | ใบสด | ใบร่วง | ใบสด | ใบร่วง |
| สถานีวนวัฒนวิจัย ทองผาภูมิ | เชียงใหม่ | 9.82 ^c ±0.15 | 0.00 | 11.23 ^b ±0.97 | 9.09 ^d ±1.38 | 0.00 | 0.00 |
| | แพร่ | 14.01 ^a ±0.22 | 0.00 | 13.90 ^a ±0.91 | 13.45 ^a ±0.70 | 13.11 ^a ±0.50 | 14.31 ^a ±0.61 |
| | ลำปาง | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 11.68 ^b ±0.73 | 0.00 | 13.78 ^b ±0.51 |
| | สุโขทัย | 12.11 ^b ±0.05 | 10.51 ^b ±0.91 | 12.45 ^b ±0.30 | 11.26 ^b ±0.25 | 9.94 ^b ±0.54 | 9.79 ^d ±0.01 |
| | ขอนแก่น | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 12.11 ^c ±0.05 |
| สถานีวนวัฒนวิจัย พิษณุโลก | เชียงใหม่ | 0.00 | 0.00 | 10.26 ^c ±0.90 | 8.99 ^d ±0.12 | 0.00 | 0.00 |
| | แพร่ | 0.00 | 0.00 | 9.80 ^d ±0.67 | 9.87 ^c ±0.59 | 0.00 | 0.00 |
| | ลำปาง | 0.00 | 13.32 ^a ±0.82 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | สุโขทัย | 8.76 ^d ±1.83 | 0.00 | 0.00 | 8.45 ^d ±0.22 | 0.00 | 0.00 |
| | ขอนแก่น | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| ตัวควบคุมเชิงบวก | gentamicin | 28.82±1.37 | | 27.75±0.73 | | 31.99±0.71 | |

หมายเหตุ ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยตัวอักษร a-d ในตารางแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) $p < 0.05$ และ NC = ไม่เกิดบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสัก ที่ความเข้มข้น 1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.3 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสัก ความเข้มข้น 1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

| สถานที่ | แม่ไม้ | ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส | |
|-------------------------------|-----------|----------------------------------|---------------------------|
| | | ใบสด | ใบร่วน |
| สถานีวนวัฒน วิจัยทองผาภูมิ | เชียงใหม่ | 68.97 ^{ab} ±2.83 | 71.66 ^{ab} ±3.25 |
| | แพร่ | 42.02 ^{fg} ±3.41 | 49.68 ^{ef} ±1.52 |
| | สุโขทัย | 57.22 ^{cde} ±3.98 | 53.39 ^{de} ±5.45 |
| | ลำปาง | 53.77 ^{de} ±1.34 | 63.41 ^{bc} ±1.06 |
| | ขอนแก่น | 35.45 ^s ± 1.86 | 37.32 ^s ±4.32 |
| สถานีวนวัฒน วิจัยพิชณูโลก | เชียงใหม่ | 71.73 ^{ab} ±3.53 | 73.65 ^a ±0.81 |
| | แพร่ | 41.09 ^s ±1.13 | 56.54 ^c ±3.43 |
| | สุโขทัย | 56.14 ^{cde} ±0.95 | 59.85 ^{cd} ±0.72 |
| | ลำปาง | 59.47 ^{cd} ±2.98 | 37.63 ^s ±3.46 |
| | ขอนแก่น | 40.12 ^s ±0.93 | 37.01 ^s ±1.87 |

หมายเหตุ ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยตัวอักษร a-g ในตารางแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) $p < 0.05$

4.2.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ

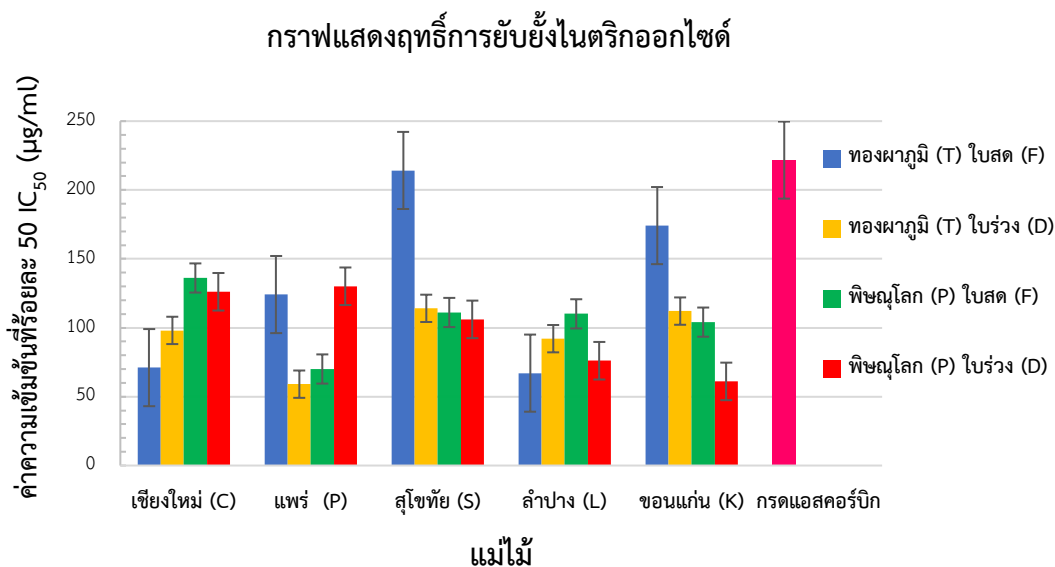
เมื่อนำสารสกัดหยาบเมทานอลทั้ง 20 สารสกัด มาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์ (nitric oxide scavenging assay : NOA) เพื่อประเมินความสามารถในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดจากใบสัก จากนั้นนำสารสกัดที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่ดีที่สุด มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์กับเซลล์ไลน์แมคโครฟาจชนิด 264.7 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยสาร lipopolysaccharides (LPS)

4.2.3.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide scavenging assay)

การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์ (nitric oxide scavenging assay) โดยทดสอบกับ Sodium nitroprusside (SNP) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ กับสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักความเข้มข้น 100, 125, 250, และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก แสดงค่ามาตรฐานร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ ดังกราฟ $y = 0.191x$ (รูปภาคผนวกที่ ข-2) พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ และความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ร้อยละ 50 (IC_{50}) มีค่าอยู่ระหว่าง 59.06-214.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.3) โดยแม่ไม้ลำปางจากทั้ง 2 สถานที่มีค่าการยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ระหว่าง 67.07-110.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือแม่ไม้แพร์และเชียงใหม่ มีค่าการยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ระหว่าง 59.06-130.31 และ 71.07-136.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นว่าแม่ไม้ของสารสกัดจากใบสักไม่มีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างใบสดและใบร่วง จากแหล่งปลูกสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ พบว่า ใบร่วงของแม่ไม้แพร์ (PTD) สุโขทัย (STD) และขอนแก่น (KTD) สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าใบสด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 59.06, 114.11 และ 112.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ยกเว้นใบร่วงของแม่ไม้เชียงใหม่ (CTD) และลำปาง (LTD) สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้น้อยกว่าใบสด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 98.09 และ 92.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 221.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดจากสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลกพบว่า ใบร่วงของแม่ไม้เชียงใหม่ (CPD) ลำปาง (LPD) สุโขทัย (SPD) และขอนแก่น (KPD) สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าใบสด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 126.30, 76.08, 106.10 และ 61.06 ยกเว้นใบร่วงของแม่ไม้แพร์ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 130.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสถานที่จะเห็นได้ว่าสถานที่ไม่มีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ และเมื่อพิจารณาจากค่า IC_{50} จะเห็นว่าทุกสารสกัดสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสัก

| สถานที่ | แม่ไม้ | IC ₅₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร) | |
|--------------------------------------|---------------|--|------------|
| | | ใบสด (F) | ใบร่วง (D) |
| สถานีวนวัฒน วิจัยทองผาภูมิ (T) | เชียงใหม่ (C) | 71.07 | 98.09 |
| | แพร์ (P) | 124.12 | 59.06 |
| | สุโขทัย (S) | 214.21 | 114.11 |
| | ลำปาง (L) | 67.07 | 92.09 |
| สถานีวนวัฒน วิจัยพิษณุโลก (P) | ขอนแก่น (K) | 174.17 | 112.11 |
| | เชียงใหม่ (C) | 136.14 | 126.13 |
| | แพร์ (P) | 70.07 | 130.13 |
| | สุโขทัย (S) | 111.11 | 106.10 |
| | ลำปาง (L) | 110.11 | 76.08 |
| | ขอนแก่น (K) | 104.10 | 61.06 |
| สารมาตรฐาน | กรดแอสคอร์บิก | 221.72 | |



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นที่ร้อยละ 50 (IC₅₀) ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักกับฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ของทั้ง 5 แม่ไม้

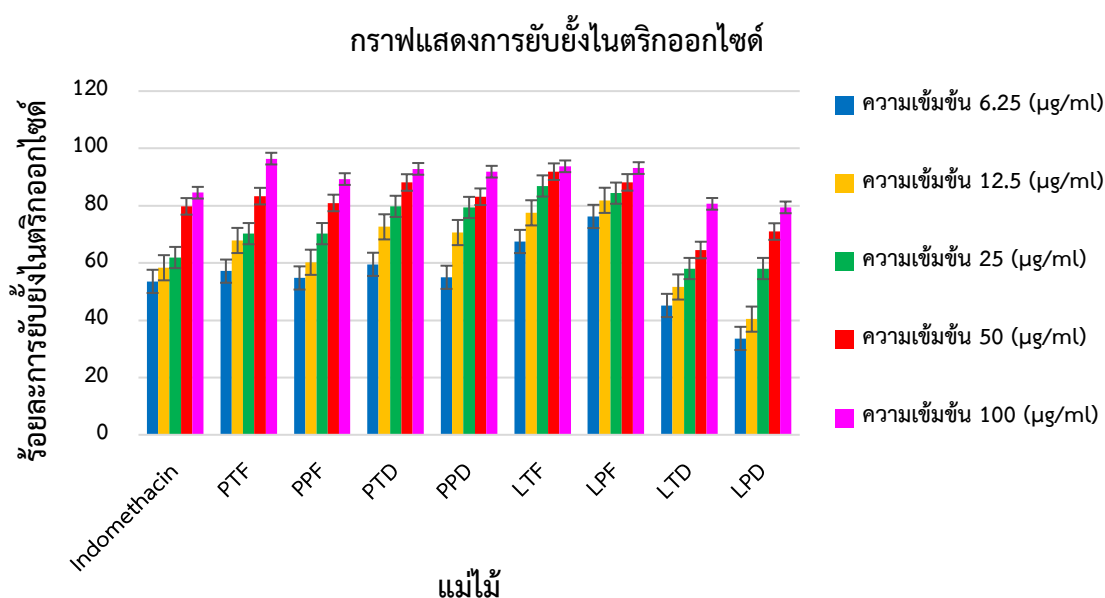
จากผลการทดลองดังกล่าวอาจสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักมีฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ ซึ่งเป็นสารสื่อกลางในการอักเสบเมื่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้รับบาดเจ็บทำให้เซลล์แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้จะหลั่งไนตริกออกไซด์ออกมา ดังนั้นจึงเลือกตัวอย่างใบสดและใบร่วงของแม่ไม้แพร์ และลำปาง จากแหล่งปลูกทั้ง 2 แหล่ง รวมเป็นจำนวน 8 สารสกัด ที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบกับเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยสาร lipopolysaccharides (LPS) ต่อไป

4.2.3.2 ฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักพบว่า แม่ไม้แพร์และลำปาง จากทั้ง 2 สถานที่ คือ สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิและพิษณุโลก แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี nitric oxide scavenging assay (NOA) ดีที่สุด จึงนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ไลน์ชนิดแมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยสาร lipopolysaccharides (LPS) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับสารสกัดที่ความเข้มข้น 6.25, 12.50 50, 25, และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ทั้ง 2 แม่ไม้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ในเซลล์ไลน์ชนิดแมคโครฟาจ RAW 264.7 ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) อยู่ระหว่าง <6.25-24.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแม่ไม้แพร์ใบสด PTF ใบร่วง PTD และแม่ไม้ลำปางใบสด LTF จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ และแม่ไม้แพร์ใบสด PPF ใบร่วง PPD และแม่ไม้ลำปางใบสด LPF จากสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุดเท่ากับ <6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือแม่ไม้ลำปางใบร่วง LTD จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ และแม่ไม้ลำปางใบร่วง LPD จากสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก มีค่าเท่ากับ 10.32 และ 24.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตารางที่ 4.5 จากค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดจากใบสัก มีฤทธิ์การยับยั้งดีกว่าสารสกัดจากเมล็ดลำไยเถาด้วยตัวทำละลายเอทานอล เอทิลอะซิเตท และน้ำ ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 456.94-957.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (วิริยา, 2560) แต่เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากใบสักมีค่าการยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ระหว่างร้อยละ 64.52-91.87 (รูปที่ 4.4) (ร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงในตารางภาคผนวก ข-5) ซึ่งน้อยกว่าสารสกัดจากรากตุงต้น ใบราชดัด และใบสบประพวศ มีค่าการยับยั้งไนตริกออกไซด์อยู่ระหว่างร้อยละ 85.30-99.90 (กล่าวขวัญและคณะ, 2557) ดังนั้นพืชแต่ละชนิดมีฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.5 ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากแม่ไม้แพร์ และลำปาง

| สถานที่ | แม่ไม้ | ค่า IC ₅₀ การยับยั้งไนตริกออกไซด์ (µg/ml) | |
|------------------|--------------|--|------------|
| | | ใบสด (F) | ใบร่วง (D) |
| สถานีวนวัฒนวิจัย | แพร์ (P) | <6.25 | <6.25 |
| ทองผาภูมิ (T) | ลำปาง (L) | <6.25 | 10.32 |
| สถานีวนวัฒนวิจัย | แพร์ (P) | <6.25 | <6.25 |
| พิษณุโลก (P) | ลำปาง (L) | <6.25 | 24.82 |
| สารมาตรฐาน | Indomethacin | <6.25 | |



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดจากแม่ไม้แพร์ และลำปาง

4.2.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยเทคนิค HPLC

การศึกษาปริมาณสารสำคัญของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ gallic acid, quercetin และ salicylic acid ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าปริมาณสารสำคัญของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักทั้ง 20 สารสกัดหยาบพบสาร salicylic acid มากที่สุด อยู่ระหว่าง 6.08-75.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ quercetin มีปริมาณสารอยู่ระหว่าง 0.11-14.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ gallic acid ที่พบเพียงบางสารสกัดเท่านั้น โดยมีปริมาณสารอยู่ระหว่าง 0-4.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากปริมาณสาร salicylic acid

ที่พบในสารสกัดใบสดของแม่ไม้ลำปางจากสถานีวิจัยพิษณุโลก LPF มีปริมาณสูงที่สุด โดยมีปริมาณสารเท่ากับ 75.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ สารสกัดใบสดแม่ไม้ขอนแก่นจากสถานีวิจัยทองผาภูมิ KTF และสารสกัดใบสดของแม่ไม้เชียงใหม่จากสถานีวิจัยพิษณุโลก CPF มีปริมาณสารเท่ากับ 61.88 และ 53.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) สำหรับปริมาณสาร quercetin พบว่า สารสกัดใบสดของแม่ไม้แพร่จากสถานีวิจัยพิษณุโลก PPF มีปริมาณสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 14.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดใบสดของแม่ไม้เชียงใหม่จากสถานีวิจัยทองผาภูมิ CTF และสารสกัดใบร่วงของแม่ไม้แพร่จากสถานีวิจัยทองผาภูมิ โดยมีปริมาณเท่ากับ 11.06 และ 9.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และปริมาณของสาร gallic acid พบว่า ใบสดของแม่ไม้แพร่จากสถานีวิจัยพิษณุโลก PPF มีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดใบสดของแม่ไม้เชียงใหม่จากสถานีวิจัยพิษณุโลก CPF และสารสกัดใบสดของแม่ไม้สุโขทัยจากสถานีวิจัยพิษณุโลก SPF โดยมีปริมาณสารเท่ากับ 4.88, 4.65 และ 0.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้พบปริมาณสาร salicylic acid ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับ Kole และคณะ (2016) ได้รายงานปริมาณสารสำคัญของสารสกัดจากใบสักพบปริมาณของสาร salicylic acid สูงที่สุด คือ 12.99 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้มีปริมาณสารมากกว่าถึง 6 เท่า นอกจากนี้ยังพบปริมาณของสาร gallic acid มีค่าอยู่ระหว่าง 0.20-10.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ในการศึกษาในครั้งนี้มีค่าน้อยกว่าโดยมีค่าอยู่ในช่วง 0-4.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญระหว่างแม่ไม้พบว่า แม่ไม้สุโขทัย มีปริมาณสาร salicylic acid สูงที่สุด รองลงมา คือ แม่ไม้ขอนแก่นและแม่ไม้ลำปาง โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 9.19-75.96, 9.37-61.88 และ 9.81-53.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับแม่ไม้แพร่มีปริมาณสาร quercetin สูงที่สุด รองลงมา คือ แม่ไม้เชียงใหม่และแม่ไม้สุโขทัย มีค่าอยู่ระหว่าง 7.55-14.56, 7.55-11.06 และ 0.30-2.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับสาร gallic acid พบว่า แม่ไม้แพร่มีปริมาณสูงที่สุด รองลงมา คือ แม่ไม้เชียงใหม่และแม่ไม้สุโขทัย โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 0-4.88, 0-4.65 และ 0-0.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญระหว่างสถานที่พบว่า สารสกัดจากสถานีวิจัยทองผาภูมิมีปริมาณสาร salicylic acid อยู่ระหว่าง 6.08-61.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าสารสกัดจากสถานีวิจัยพิษณุโลกที่มีค่าอยู่ระหว่าง 9.37-75.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสาร quercetin พบว่า สารสกัดจากสถานีวิจัยทองผาภูมิมีค่าอยู่ระหว่าง 0.11-11.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าสารสกัดจากสถานีวิจัยพิษณุโลกที่มีค่าอยู่ระหว่าง 0.20-14.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณสาร gallic acid พบว่าสารสกัดจากสถานี

นวนวัฒนวิชัยทองผาภูมิมีค่าอยู่ระหว่าง 0-0.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าสารสกัดจากสถานีนวนวัฒนวิชัยพิษณุโลกที่มีค่าอยู่ระหว่าง 0-4.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าปริมาณของสารสำคัญ ได้แก่ gallic acid, quercetin และ salicylic acid ของสารสกัดจากสถานีนวนวัฒนวิชัยพิษณุโลกมีปริมาณสูงกว่าสารสกัดจากสถานีนวนวัฒนวิชัยทองผาภูมิ

หากเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญของสารสกัดใบสักระหว่างใบสดและใบร่วง พบว่าสารสกัดจากใบสดมีปริมาณสาร salicylic acid อยู่ระหว่าง 6.08-75.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าสารสกัดของใบร่วงมีปริมาณสารอยู่ระหว่าง 9.81-16.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับสารสกัดใบสดที่มีปริมาณของสาร quercetin และ gallic acid อยู่ระหว่าง 0.37-15.56 และ 0-4.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยใบร่วงมีปริมาณสารอยู่ระหว่าง 0.11-9.69 และ 0-0.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดใบสดมีปริมาณสารมากกว่าสารสกัดจากใบร่วง สอดคล้องกับการรายงานปริมาณสารสำคัญในกลุ่มของสารฟีนอลิกระหว่างใบสดและใบแก่จากสารสกัดใบสักด้วยเทคนิค reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) พบว่า สารสกัดใบอ่อนมีปริมาณสูงกว่าสารสกัดจากใบแก่ (Murukan และ Murukan, 2018)

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักพบว่า สารสกัดจากสถานีนวนวัฒนวิชัยทองผาภูมิและพิษณุโลกมีผลไม่แตกต่างกัน ยกเว้นฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย ที่ผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างของสารสกัดจากสถานีนวนวัฒนวิชัยทองผาภูมิแสดงฤทธิ์ดีกว่าสถานีนวนวัฒนวิชัยพิษณุโลก นอกจากนี้ยังพบว่า ตัวอย่างใบสดและใบร่วง แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน โดยตัวอย่างของใบร่วงแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดีกว่าใบสด ยกเว้นฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียที่ตัวอย่างใบสดแสดงฤทธิ์ดีกว่าใบร่วง และสำหรับตัวอย่างสารสกัดทั้ง 5 แม้มัน แสดงฤทธิ์ที่แตกต่างกัน ทั้งฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ดังนั้นจะนำสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักของแม้มันแพร์ ที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียดีที่สุด มาแยกให้มีความบริสุทธิ์โดยการนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction

4.3 ผลการสกัดสารจากใบสักด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักพบว่า แม้มันแพร์สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงนำตัวอย่างแม้มันแพร์ใบสด (PTF) ใบร่วง (PTD) จากแหล่งปลูกสถานีนวนวัฒนวิชัยทองผาภูมิ และแม้มันแพร์ใบสด (PPF) ใบร่วง (PPD) จากแหล่งปลูกสถานีนวนวัฒนวิชัยพิษณุโลก จำนวน 4 สารสกัด มาสกัดสารด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction โดยใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน (H) ไดคลอโรมีเทน (D) เอทิลอะซิเตท (E)

บิวทานอล (B) และน้ำ (W) ได้สารสกัดจากตัวทำละลายต่าง ๆ ทั้งหมดจำนวน 20 สารสกัดย่อย จากการสกัดสารพบว่า สารสกัดส่วนใหญ่เป็นสารขี้ผึ้ง เนื่องจากมีน้ำหนัก และร้อยละผลได้ของ ตัวทำละลายในชั้นบิวทานอล (B) สูงที่สุด โดยมีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 2.59-5.61 กรัม รองลงมาคือสารสกัดในชั้นตัวทำละลาย เฮกเซน (H) และไดคลอโรมีเทน (D) ซึ่งเป็นสารขี้ผึ้ง มีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 0.99-2.19 และ 0.57-1.66 กรัม เมื่อพิจารณาสีของสารสกัดพบว่า มีตั้งแต่สีน้ำตาล แดงเข้ม เขียว และเหลือง โดยแต่ตัวทำละลายมีสีที่แตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 4.7 และสารสกัดทั้ง 20 สารสกัดย่อยจะนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียต่อไป

4.4 การศึกษาการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดใบสักด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction












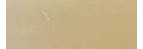








เมื่อนำสารสกัดทั้ง 20 สารสกัดย่อยที่สกัดด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction มาทดสอบ ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *P. acnes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ด้วยวิธี paper disc diffusion ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ โดยใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก พบว่า ตัวทำละลายเฮกเซน (H) และไดคลอโรมีเทน (D) สามารถยับยั้งเชื้อ *P. acnes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้ โดยมีบริเวณยับยั้งอยู่ในระหว่าง 0.00-14.72 มิลลิเมตร ยกเว้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (E) สามารถยับยั้งได้เพียงเชื้อ *P. acnes* และ *S. aureus* เท่านั้น โดยมีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 0.00-9.50 มิลลิเมตร แต่ตัวทำละลายบิวทานอล (B) และน้ำ (W) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้ (ตารางที่ 4.8) แสดงว่าสารขี้ผึ้งไม่มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย โดยสารสกัดไดคลอโรมีเทนแม่ไม้ แพร่ใบสดจากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ DPTF สามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* และ *S. aureus* ได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 14.72 และ 12.52 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัด เฮกเซนแม่ไม้แพร่ใบสดจากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ HPTF สามารถยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13.95 มิลลิเมตร

เมื่อพิจารณาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียในแต่ละตัวทำละลาย พบว่าไดคลอโรมีเทน (D) สามารถยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 0.00-14.72 มิลลิเมตร รองลงมาคือตัวทำละลาย เฮกเซน (H) และเอทิลอะซิเตท (E) มีบริเวณยับยั้งระหว่าง 0.00-13.95 และ 0.00-9.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ การศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Krishna และ Nair (2011) ที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และเมทานอลพบว่า คลอโรฟอร์ม แสดงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ *K. pneumoniae* ได้

ตารางที่ 4.6 ปริมาณสารสำคัญของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

| สถานที่ | แม่ไม้ | ใบสด | | | | ใบร่วง | | | |
|---------------------------------------|-----------|------|-------------------------------------|-----------------------------------|--|--------|-------------------------------------|-----------------------------------|--|
| | | รหัส | Gallic acid ($\mu\text{g/ml}$) | Quercetin ($\mu\text{g/ml}$) | Salicylic acid ($\mu\text{g/ml}$) | รหัส | Gallic acid ($\mu\text{g/ml}$) | Quercetin ($\mu\text{g/ml}$) | Salicylic acid ($\mu\text{g/ml}$) |
| สถานีวนวัฒนวิจัย ทองพูนภูมิ (T) | เชียงใหม่ | CTF | 0 | 11.06 | 31.95 | CTD | 0 | 7.64 | 9.81 |
| | แพร่ | PTF | 0 | 7.55 | 6.08 | PTD | 0 | 9.69 | 15.71 |
| | ลำปาง | LTF | 0.33 | 0.78 | 9.19 | LTD | 0 | 0.11 | 11.74 |
| | สุโขทัย | STF | 0.21 | 2.38 | 20.30 | STD | 0 | 0.16 | 14.10 |
| | ขอนแก่น | KTF | 0.46 | 1.36 | 61.88 | KTD | 0.57 | 0.28 | 10.62 |
| สถานีวนวัฒนวิจัย พิษณุโลก (P) | เชียงใหม่ | CPF | 4.65 | 7.55 | 53.51 | CPD | 0 | 8.66 | 13.18 |
| | แพร่ | PPF | 4.88 | 14.56 | 48.89 | PPD | 0 | 7.94 | 10.56 |
| | ลำปาง | LPF | 0.23 | 1.24 | 75.96 | LPD | 0.58 | 0.32 | 15.68 |
| | สุโขทัย | SPF | 0.75 | 0.37 | 16.96 | SPD | 0 | 0.30 | 16.89 |
| | ขอนแก่น | KPF | 0.31 | 1.74 | 9.37 | KPD | 0 | 0.20 | 10.38 |

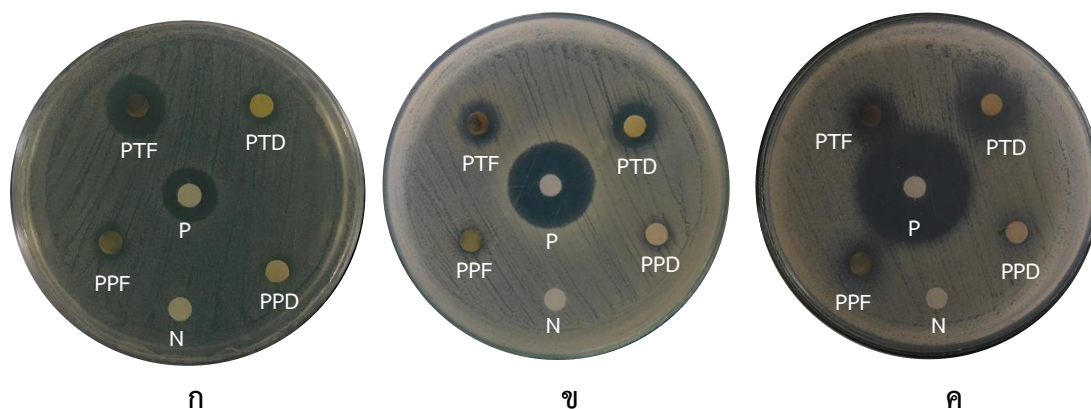
ตารางที่ 4.7 น้ำหนัก ร้อยละผลได้ สี และรหัสสีของสารสกัดในตัวทำละลายต่าง ๆ ของสารสกัดแม่ไม้แพรงจากสารสกัดใบสักที่สกัดด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction

| สถานที่ | ตัวทำละลาย | รหัส | ใบสด | | | | ใบร่วง | | | | |
|-----------------------------------|--------------|------|-----------------------|----------------|--|---------------|--------|-----------------------|----------------|---|---------------|
| | | | น้ำหนักสารสกัด (กรัม) | ผลได้ (ร้อยละ) | สีสารสกัด | รหัสสีสารสกัด | รหัส | น้ำหนักสารสกัด (กรัม) | ผลได้ (ร้อยละ) | สีสารสกัด | รหัสสีสารสกัด |
| สถานี วนวัฒนวิจัย ทองผาภูมิ | เฮกเซน | HPTF | 1.56 | 15.55 |  | RHSN200C | HPTD | 1.31 | 16.34 |  | RHS160B |
| | ไดคลอโรมีเทน | DPTF | 0.59 | 5.87 |  | RHS166A | DPTD | 1.66 | 20.76 |  | RHS199C |
| | เอทิลอะซิเตท | EPTF | 0.41 | 4.05 |  | RHS187A | EPTD | 0.13 | 1.64 |  | RHSN187D |
| | บิวทานอล | BPTF | 5.61 | 56.87 |  | RHS85B | BPTD | 2.59 | 32.38 |  | RHSN155A |
| | น้ำ | WPTF | 0.39 | 10.16 |  | RHS202C | WPTD | 0.71 | 8.89 |  | RHS165A |
| สถานี วนวัฒนวิจัย พิษณุโลก | เฮกเซน | HPPF | 2.19 | 21.90 |  | RHS146C | HPPD | 0.99 | 12.38 |  | RHSN187D |
| | ไดคลอโรมีเทน | DPPF | 0.57 | 5.70 |  | RHS199A | DPPD | 1.03 | 12.88 |  | RHS92C |
| | เอทิลอะซิเตท | EPPF | 1.05 | 10.50 |  | RHS202C | EPPD | 0.46 | 5.75 |  | RHSN187D |
| | บิวทานอล | BPPF | 4.35 | 43.50 |  | RHS155A | BPPD | 2.98 | 37.25 |  | RHS100D |
| | น้ำ | WPPF | 1.19 | 11.90 |  | RHS199C | WPPD | 0.45 | 5.63 |  | RHS202C |

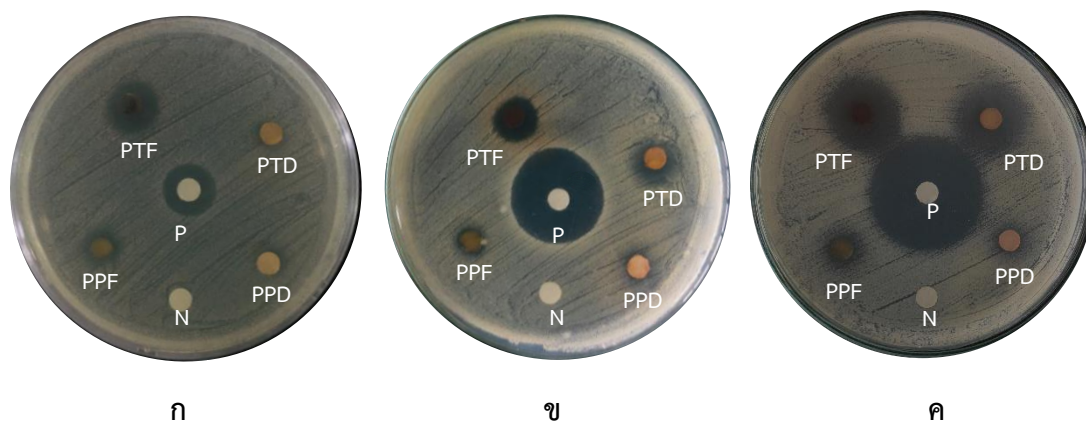
หมายเหตุ รหัสของสารสกัดจะใช้ชื่อย่อแทนสารสกัด เป็น 4 ตัวอักษร โดยตัวอักษรแรกแทนตัวทำละลายเฮกเซน (H) ไดคลอโรมีเทน (D) เอทิลอะซิเตท (E) บิวทานอล (B) และน้ำ (W) ตัวอักษรที่ 2 แทนแม่ไม้แพรง (P) ตัวอักษรที่ 3 แทนสถานที่เพาะปลูกสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ (T) และสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก (P) และตัวอักษรที่ 4 แทนชนิดของของใบ ใบสด (F) และใบร่วง (D)

เฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำเหมือนกัน ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Lanka และ Parimala (2017) ที่ศึกษาสารสกัดจากใบสักด้วยตัวทำละลาย เอทานอล เมทานอล เอทิลอะซิเตท และน้ำ พบว่า สารสกัดจากใบสักที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ 3 สายพันธุ์ คือ *P. aeruginosa*, *S. aureus* และ *Bacillus subtilis* ได้ดีที่สุด เมื่อพิจารณาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียระหว่างใบสดและใบร่วง พบว่า ใบสดของตัวทำละลายเฮกเซน (H) และไคคลอโรมีเทน (D) สามารถยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าใบร่วง มีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 7.39-13.95 และ 0.00-13.26 มิลลิเมตร ตามลำดับ ยกเว้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (E) พบว่า ใบร่วงสามารถยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าใบสด โดยมีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 0.00-9.50 และ 0.00-7.21 มิลลิเมตร ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียระหว่างสถานที่พบว่า สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่า สถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก มีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 0.00-14.72 และ 0.00-10.04 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.5 ก-ค และ 4.6 ก-ค)



รูปที่ 4.5 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (ก) *P. acnes* (ข) *S. aureus* (ค) *S. epidermidis* ของสารสกัดจากใบสักด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนของแม่ไม้แพร์ โดยตัวอักษร P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และ N คือ ตัวควบคุมเชิงลบหรือเมทานอล



รูปที่ 4.6 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (ก) *P. acnes* (ข) *S. aureus* (ค) *S. epidermidis* ของสารสกัดจากใบสักด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction ด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนของแม่ไม้แพร์ โดยตัวอักษร P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และ N คือ ตัวควบคุมเชิงลบหรือเมทานอล

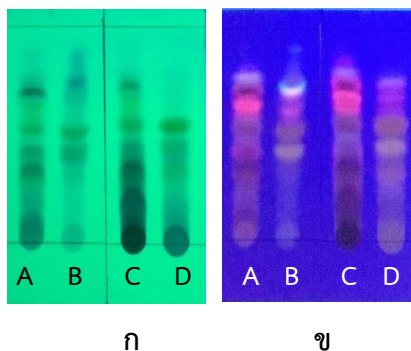
4.5 ผลการแยกสารจากใบสักด้วยเทคนิค column chromatography

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดใบสักที่สกัดด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction พบว่า ตัวอย่างใบสด (PTF) และใบร่วง (PTD) ของแม่ไม้แพร์จากสถานีวิจัยทองผาภูมิ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (H) และไดคลอโรมีเทน (D) สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ดีที่สุด จึงนำมาการแยกสารด้วยเทคนิค column chromatography และจากการหา ระบบตัวทำละลายเป็นเฟสเคลื่อนที่ ที่สามารถแยกองค์ประกอบของสารได้ดี พบว่า ระบบตัวทำละลายที่สามารถแยกองค์ประกอบของสารสกัดจากใบสักได้ คือ คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 9 : 1 สามารถแยกสารได้ดีที่สุด เมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent ส่องภายใต้ยูวีที่ความยาวคลื่น 254 เพื่อสังเกตการเคลื่อนที่ของสาร (รูป 4.7ก) และเมื่อส่องด้วยยูวีที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร จะปรากฏแถบของสารเรืองแสง แสดงว่ามีสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (รูปที่ 4.7ข) จากรูป 4.7ก จะเห็นว่ายังมีสารติดอยู่ด้านล่าง base line ของแผ่น TLC ที่ไม่เกิดการแยกไปด้านบน สารดังกล่าวอาจเป็นสารขี้ผึ้งทำให้จับกับซิลิกาเจลของแผ่น TLC และเมื่อลองเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายเมทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขี้ผึ้ง จากอัตราส่วนของคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 9 : 1 เป็น 8 : 2, 7 : 3 และ 6 : 4 พบว่า สารที่เคยติดอยู่ด้านล่าง base line ของแผ่น TLC เกิดการแยกเพิ่มขึ้นไปยังด้านบนของแผ่น TLC ได้ดี (รูปที่ 4.8 ก-ค)

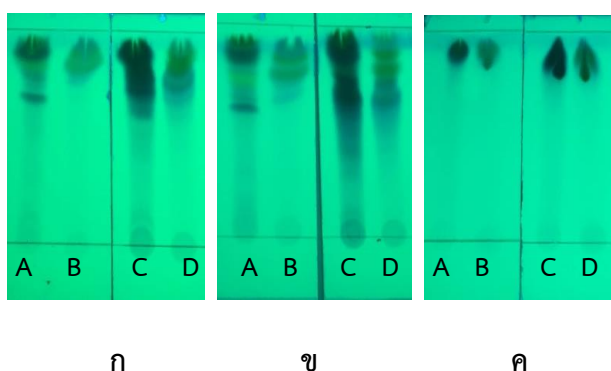
ตารางที่ 4.8 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *P. acnes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ของสารสกัดจากใบสัก ด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และ ยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์

| แบคทีเรีย | สารสกัด | บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | gentamicin |
|-----------------------|---------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------|---------|------------|
| | | เฮกเซน (H) | ไดคลอโรมีเทน (D) | เอทิลอะซิเตท (E) | บิวทานอล (B) | น้ำ (W) | |
| <i>P. acnes</i> | PTF | 13.95 ^a ±0.40 | 13.86 ^{ab} ±0.50 | 7.21 ^{bc} ±0.44 | 0.00 | 0.00 | |
| | PTD | 8.46 ^d ±0.11 | 7.90 ^f ±0.44 | 8.68 ^a ±0.92 | 0.00 | 0.00 | 14.50±0.46 |
| | PPF | 7.66 ^e ±0.35 | 8.19 ^f ±0.77 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | |
| | PPD | 0.00 | 7.55 ^f ±0.57 | 9.50 ^a ±0.91 | 0.00 | 0.00 | |
| <i>S. aureus</i> | PTF | 11.86 ^b ±0.09 | 12.52 ^{cd} ±0.93 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | |
| | PTD | 10.13 ^c ±1.46 | 11.36 ^d ±0.37 | 7.64 ^b ±0.23 | 0.00 | 0.00 | 22.78±0.60 |
| | PPF | 7.66 ^e ±0.35 | 7.39 ^f ±0.89 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | |
| | PPD | 7.34 ^e ±0.28 | 0.00 | 6.79 ^c ±0.08 | 0.00 | 0.00 | |
| <i>S. epidermidis</i> | PTF | 12.14 ^b ±0.78 | 14.72 ^a ±1.61 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | |
| | PTD | 11.19 ^b ±0.52 | 13.26 ^{bc} ±0.95 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 33.04±0.10 |
| | PPF | 7.97 ^{de} ±0.23 | 10.04 ^e ±0.49 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | |
| | PPD | 0.00 | 7.59 ^f ±0.53 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | |

หมายเหตุ ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยตัวอักษร a-f ในตารางแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) $p<0.05$



รูปที่ 4.7 องค์ประกอบและการเคลื่อนที่ของสารที่แยกบนแผ่นซิลิกาเจล normal phase TLC ในระบบตัวทำละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 9 : 1 เมื่อส่องภายใต้ยูวีความยาวคลื่น (ก) 254 และ (ข) 366 นาโนเมตร โดย A, B คือสารสกัดชั้นเอกเซนของแม่ไม้แพร์ไบสด (PTF) และใบร่วง (PTD) C และ D คือสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนของแม่ไม้แพร์ไบสด (PTF) และใบร่วง (PTD) ตามลำดับ



รูปที่ 4.8 องค์ประกอบและการเคลื่อนที่ของสารที่แยกบนแผ่นซิลิกาเจล normal phase TLC ในระบบตัวทำละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน (ก) 8 : 2 (ข) 7 : 3 และ (ค) 6 : 4 เมื่อส่องภายใต้ยูวีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดย A, B คือสารสกัดชั้นเอกเซนของแม่ไม้แพร์ไบสด (PTF) และใบร่วง (PTD) C และ D คือสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนของแม่ไม้แพร์ไบสด (PTF) และใบร่วง (PTD) ตามลำดับ

จากผลการทดลองเมื่อนำสารสกัดแม่ไม้แพร์ไบสด (PTF) และใบร่วง (PTD) ของตัวทำละลายเอกเซน (H) และไดคลอโรมีเทน (D) มาละลายด้วยคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 9 : 1 และแยกด้วย column chromatography เมื่อเก็บสารที่ชะลงมาจากคอลัมน์ และนำสารดังกล่าวไปตรวจสอบองค์ประกอบของสารด้วยแผ่นซิลิกาเจล normal phase TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 9 : 1 นำมาสเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent และนำมาส่องภายใต้ยูวีความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร เพื่อรวมสารที่เหมือนกันเป็นสารสกัดส่วนย่อยเดียวกัน พบว่า สามารถแยกสารสกัดส่วนย่อยของสารสกัด HPTF, HPTD,

DPTF และ DPTD คือ 12, 6, 7, และ 8 สารสกัดส่วนย่อย ตามลำดับ โดยน้ำหนัก และร้อยละผลได้ของสารสกัดส่วนย่อยดังกล่าวแสดงดังตารางที่ 4.9 โดยน้ำหนักรวมของสารสกัดส่วนย่อย HPTF1-12 HPTD1-6, DPTF1-7 และ DPTD1-8 เท่ากับ 0.627, 0.726, 0.55 และ 1.225 กรัม คิดเป็นผลได้ร้อยละ 62.70, 72.60, 55.00 และ 92.00 ตามลำดับ และนำสารสกัดส่วนย่อยดังกล่าวไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียต่อไป

4.6 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบสักโดยการแยกสารด้วยเทคนิค column chromatography

จากการแยกสารด้วยเทคนิค column chromatography จากสารสกัดใบสดของแม่ไม้แพรวด้วยตัวทำละลายเฮกเซน HPTF ใบร่วงของแม่ไม้แพรวด้วยตัวทำละลายเฮกเซน HPTD และจากสารสกัดใบสดของแม่ไม้แพรวด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน DPTF และใบร่วงด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน DPTD จากสถานีวิจัยของภาควิชา นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *P. acnes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ด้วยวิธี paper disc diffusion ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ โดยใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ โดยมีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 6.45-16.63 มิลลิเมตร โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือเชื้อ *S. aureus* และ *P. acnes* มีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 7.22-14.97 และ 8.55-12.78 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดโดยมีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 8.55-16.02 และ 8.14-16.63 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยสารสกัดส่วนย่อยที่ 4 ของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนจากสารสกัดใบสด DPTF4 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 16.63 มิลลิเมตร รองลงมาคือสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 ของตัวทำละลายเฮกเซนจากสารสกัดใบร่วง HPTD3 และสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 ของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนจากสารสกัดใบร่วง DPTD3 มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 16.02 และ 15.69 มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 ของตัวทำละลายเฮกเซนจากสารสกัดใบร่วง HPTD3 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 14.97 มิลลิเมตร รองลงมาคือสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนจากสารสกัดใบร่วง DPTD3 และ DPTD4 มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13.27 และ 13.03 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 ของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนจากสารสกัดใบสด DPTF3 สามารถยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดส่วนย่อยที่ 4 ของตัวทำละลายเฮกเซนจากสารสกัดใบสด HPTF4 และ สารสกัดส่วนย่อยที่ 5 ของตัวทำละลายเฮกเซนจากสารสกัดใบสด HPTF5 มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 12.78, 10.60 และ 9.98 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากผลการศึกษาจะเห็นว่าสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายทั้ง 2

ชนิดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ดีที่สุด เมื่อพิจารณาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียระหว่างไบสดและไบร่ว่ง พบว่า ไบร่ว่งสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้ดีกว่าไบสด แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ได้ (ตารางที่ 4.10-11)

ตารางที่ 4.9 น้ำหนัก และร้อยละผลได้ของสารสกัดส่วนย่อยที่ทำการแยกด้วยเทคนิค column chromatography ของสารสกัดแม่ไม้แพร์ชั้นตัวทำละลายเฮกเซน (H) และไดคลอโรมีเทน (D) จากใบสัก PTF และ PTD จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ

| ตัวทำละลาย | ไบสด | | | ไบร่ว่ง | | |
|---------------------|--------|-----------------------|----------------|---------|-----------------------|----------------|
| | รหัส | น้ำหนักสารสกัด (กรัม) | ผลได้ (ร้อยละ) | รหัส | น้ำหนักสารสกัด (กรัม) | ผลได้ (ร้อยละ) |
| เฮกเซน (H) | HPTF1 | 0.154 | 15.40 | HPTD1 | 0.171 | 17.10 |
| | HPTF2 | 0.169 | 16.90 | HPTD2 | 0.146 | 14.60 |
| | HPTF3 | 0.020 | 2.00 | HPTD3 | 0.271 | 27.10 |
| | HPTF4 | 0.025 | 2.50 | HPTD4 | 0.007 | 0.70 |
| | HPTF5 | 0.027 | 2.70 | HPTD5 | 0.002 | 0.20 |
| | HPTF6 | 0.014 | 1.40 | HPTD6 | 0.129 | 12.90 |
| | HPTF7 | 0.063 | 6.30 | | | |
| | HPTF8 | 0.006 | 0.60 | | | |
| | HPTF9 | 0.016 | 1.60 | | | |
| | HPTF10 | 0.013 | 1.30 | | | |
| | HPTF11 | 0.007 | 0.70 | | | |
| | HPTF12 | 0.113 | 11.30 | | | |
| ไดคลอโรมีเทน (D) | DPTF1 | 0.033 | 6.60 | DPTD1 | 0.040 | 4.00 |
| | DPTF2 | 0.074 | 14.80 | DPTD2 | 0.099 | 9.90 |
| | DPTF3 | 0.100 | 20.00 | DPTD3 | 0.291 | 29.10 |
| | DPTF4 | 0.097 | 19.40 | DPTD4 | 0.256 | 25.60 |
| | DPTF5 | 0.070 | 14.00 | DPTD5 | 0.001 | 0.10 |
| | DPTF6 | 0.029 | 5.80 | DPTD6 | 0.128 | 12.80 |
| | DPTF7 | 0.047 | 9.40 | DPTD7 | 0.104 | 10.40 |
| | | | | DPTD8 | 0.106 | 10.60 |

ตารางที่ 4.10 ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของเชื้อ *P. acnes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ของแม่ไม้แพร์จากสารสกัดใบสั๊ก ที่เก็บจากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน แยกสารด้วยเทคนิค column chromatography ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์

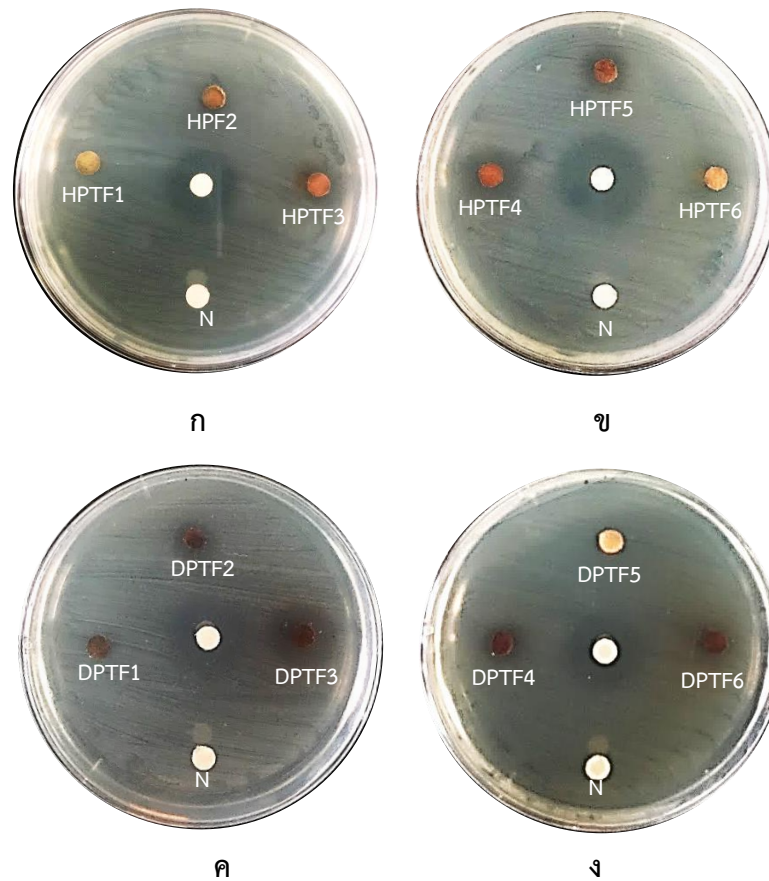
| สารสกัด | บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) | | | | | | |
|------------|---------------------------|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----|
| | <i>P. acnes</i> | | <i>S. aureus</i> | | <i>S. epidermidis</i> | | |
| | ส่วนย่อย | PTF | PTD | PTF | PTD | PTF | PTD |
| เฮกเซน (H) | | | | | | | |
| F1 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 6.45 ^d ±0.65 | 0.00 | |
| F2 | 0.00 | 0.00 | 11.20 ^b ±0.31 | 0.00 | 11.46 ^b ±1.81 | 0.00 | |
| F3 | 8.55 ^b ±0.61 | 0.00 | 12.47 ^a ±0.86 | 14.97 ^a ±1.46 | 15.14 ^a ±2.01 | 16.02 ^a ±2.25 | |
| F4 | 10.60 ^a ±0.65 | 0.00 | 12.23 ^a ±0.30 | 9.29 ^b ±1.35 | 15.32 ^a ±0.24 | 11.52 ^b ±1.05 | |
| F5 | 9.98 ^a ±0.25 | ND | 11.14 ^b ±0.17 | ND | 11.03 ^b ±0.71 | ND | |
| F6 | 0.00 | ND | 0.00 | ND | 0.00 | ND | |
| F7 | 9.95 ^a ±0.63 | | 0.00 | | 0.00 | | |
| F8 | 0.00 | | 0.00 | | 0.00 | | |
| F9 | ND | | ND | | ND | | |
| F10 | 0.00 | | 0.00 | | 0.00 | | |
| F11 | 0.00 | | 7.47 ^c ±0.00 | | 8.48 ^c ±0.00 | | |
| F12 | ND | | ND | | ND | | |
| gentamicin | 15.70±0.01 | | 24.14±0.06 | | 30.42±0.41 | | |

หมายเหตุ ND = Not detected และ ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของบริเวณ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยตัวอักษร a-d ในตารางแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติ ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) $p < 0.05$

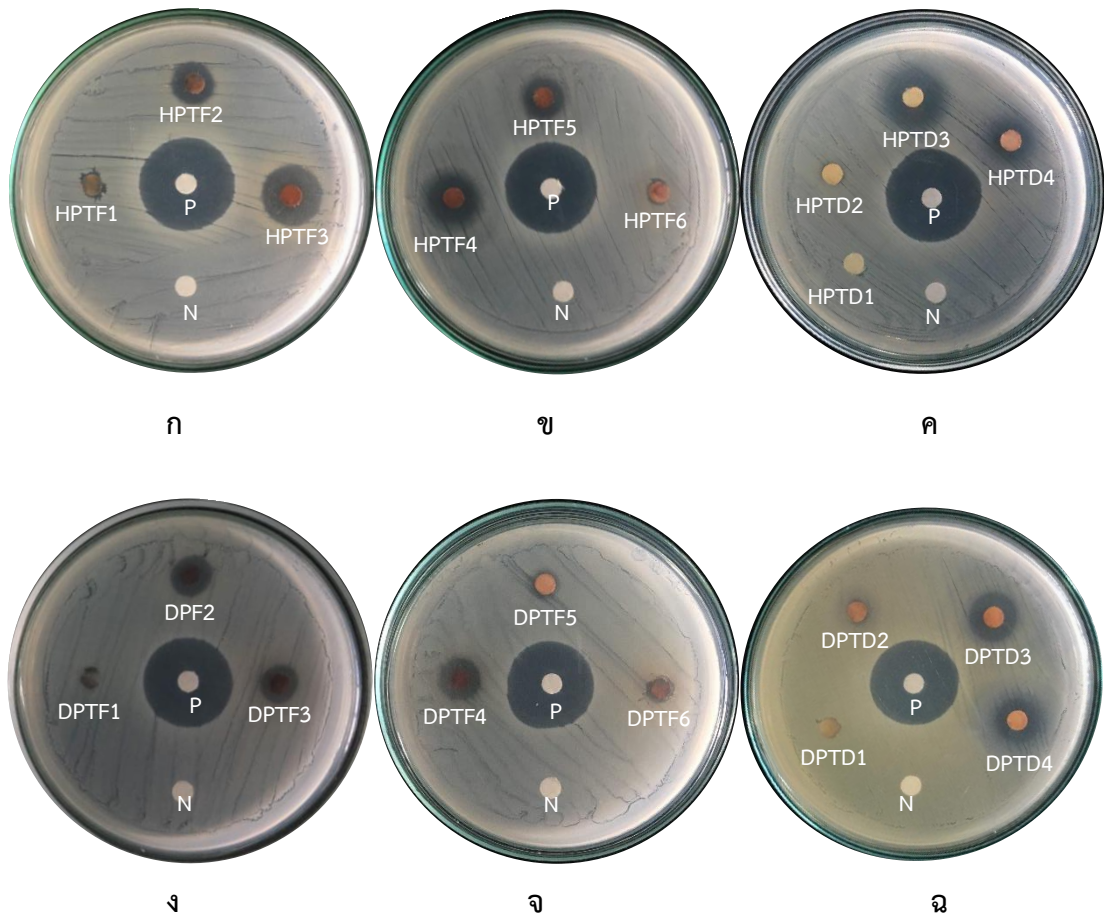
ตารางที่ 4.11 ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของเชื้อ *P. acnes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ของแม่ไม้แพร์จากสารสกัดใบสัก ที่เก็บจากสถานีวนวัฒนวิจัยทองพูนภูมิ สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ที่แยกสารด้วยเทคนิค column chromatography ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และยาปฏิชีวนะ gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์

| สารสกัด ส่วนย่อย ไดคลอโร- มีเทน (D) | บริเวณยับยั้ง | | | | | |
|--|--------------------------|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | <i>P. acnes</i> | | <i>S. aureus</i> | | <i>S. epidermidis</i> | |
| | PTF | PTD | PTF | PTD | PTF | PTD |
| F1 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| F2 | 8.99 ^b ±0.15 | 0.00 | 10.39 ^b ±0.81 | 10.41 ^c ±0.04 | 11.65 ^b ±0.71 | 8.66 ^c ±0.70 |
| F3 | 12.78 ^a ±0.40 | 0.00 | 10.04 ^b ±0.34 | 13.27 ^a ±0.27 | 12.72 ^b ±1.18 | 15.69 ^a ±1.56 |
| F4 | 8.14 ^c ±0.38 | 0.00 | 11.69 ^a ±0.68 | 13.03 ^b ±0.13 | 16.63 ^a ±0.80 | 13.97 ^b ±1.82 |
| F5 | 0.00 | 0.00 | 7.90 ^c ±0.17 | 7.73 ^d ±0.24 | 0.00 | 0.00 |
| F6 | 0.00 | 0.00 | 7.22 ^c ±0.70 | 0.00 | 7.71 ^c ±0.70 | 0.00 |
| F7 | ND | 0.00 | ND | 0.00 | ND | 0.00 |
| F8 | | 0.00 | | 0.00 | | 0.00 |
| Gentamicin | 15.18±0.11 | | 23.64±0.34 | | 30.76±0.1 | |

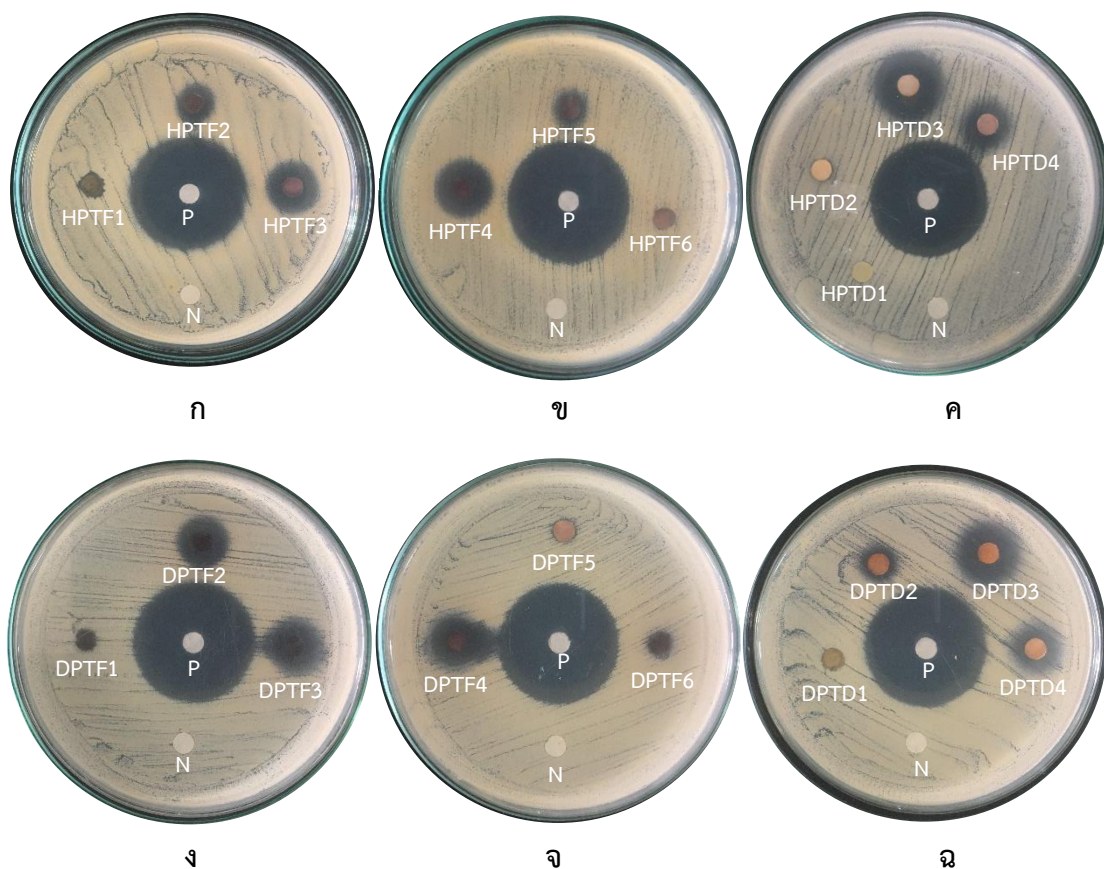
หมายเหตุ ND = Not detected และ ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยตัวอักษร a-d ในตารางแสดงค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) $p < 0.05$



รูปที่ 4.9 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* (ก-ข) สารสกัด HPTF1-6 และ (ค-ง) DPTF1-6 ด้วยเทคนิค column chromatography โดยตัวอักษร P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และ N คือ ตัวควบคุมเชิงลบ หรือเมทานอล



รูปที่ 4.10 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* (ก-ข) สารสกัด HPTF1-6 (ค) HPTD1-4 (ง-จ) DPTF1-6 และ (ฉ) DPTD1-4 ด้วยเทคนิค column chromatography โดยตัวอักษร P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และ N คือ ตัวควบคุมเชิงลบ หรือเมทานอล



รูปที่ 4.11 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* (ก-ข) สารสกัด HPTF1-6 (ค) HPTD1-4 (ง-จ) DPTF1-6 และ (ฉ) DPTD1-4 ด้วยเทคนิค column chromatography โดยตัวอักษร P คือ ตัวควบคุมเชิงบวก gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และ N คือ ตัวควบคุมเชิงลบ หรือเมทานอล

4.7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS จะเลือกสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายเฮกเซนของแม่ไม้แพรวไบสด HPTF3-4 และใบร่วง HPTD3-4 และสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนของแม่ไม้แพรวไบสด DPTF3-4 และใบร่วง DPTD3-4 จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS ผลการวิเคราะห์ พบว่า สารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายเฮกเซนของแม่ไม้แพรวไบสด HPTF3 และ HPTF4 พบองค์ประกอบทางเคมีที่ทราบโครงสร้างทางเคมีจำนวน 8 และ 6 ชนิด ตามลำดับ และสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายเฮกเซนของแม่ไม้แพรวใบร่วง HPTD3 และ HPTD 4 พบองค์ประกอบทางเคมีที่ทราบโครงสร้างทางเคมีจำนวน 21 และ 7 ชนิด ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)

สำหรับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนของแม่ไม้แพรวใบสด DPTF3 และ DPTF4 พบองค์ประกอบทางเคมีที่ทราบโครงสร้างทางเคมีจำนวน 3 และ 13 ชนิด ตามลำดับ และสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนของแม่ไม้แพรวใบร่วง DPTD3 และ DPTD4 พบองค์ประกอบทางเคมีที่ทราบโครงสร้างทางเคมีจำนวน 5 และ 8 ชนิด ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)

เมื่อพิจารณาฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายเฮกเซนของแม่ไม้แพรวใบสด HPTF3-4 และใบร่วง HPTD3-4 และสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนของแม่ไม้แพรวใบสด DPTF3-4 และใบร่วง DPTD3-4 จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ พบสารที่น่าสนใจ และอาจมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Hexadecanoic acid methyl ester, Phenol, 2,4-bis-(1,-dimethylethyl), Stigmasterol, Spathulenol และ Loliolide (ตารางที่ 4.12) โดยปริมาณของสาร Hexadecanoic acid methyl ester มีค่าอยู่ระหว่าง 3.037-14.171 โดยสารสกัดส่วนย่อยที่ 4 ของตัวทำละลายเฮกเซนของแม่ไม้แพรวใบสด HPTF4 จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ มีปริมาณเท่ากับร้อยละ 14.171 ซึ่งสอดคล้องกับผลการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ พบว่า สารสกัดส่วนย่อยดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดส่วนย่อยที่ 4 ของตัวทำละลายเฮกเซนของแม่ไม้แพรวใบร่วง HPTD จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ ที่ไม่พบสาร Hexadecanoic acid methyl ester และยังสอดคล้องกับสาร Phenol, 2,4-bis- (1,1-dimethylethyl) ที่มีปริมาณสารร้อยละ 14.799 พบในสารสกัดส่วนย่อยที่ 4 ของตัวทำละลายเฮกเซนของแม่ไม้แพรวใบสด HPTF4 และพบในสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 ของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนของแม่ไม้แพรวใบร่วง DPTD4 จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ ที่มีปริมาณเท่ากับ 15.388 ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียจากสารสกัดส่วนย่อยดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้ดีกว่าสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 ของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนของแม่ไม้แพรวใบสด DPTF3 ที่มีปริมาณน้อยกว่า โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 4.877 เช่นเดียวกับสารสกัดส่วนย่อยที่ 4 ของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนของแม่ไม้แพรวใบสด DPTF4 ที่มีปริมาณเท่ากับร้อยละ 0.469 ซึ่งน้อยกว่าสารสกัดส่วนย่อยที่ 4 ของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนของแม่ไม้แพรวใบร่วง DPTD4 ที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 9.166 ดังนั้นฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียอาจจะมาจากสารดังกล่าว ซึ่งที่ผ่านมามีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสารไว้ดังนี้

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากใบสักแม่ไม้แพร์ สารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายเฮกเซนโบสดี HPTF3-4 และใบร่วง HPTD3-4 และสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนโบสดี DPTF3-4 และใบร่วง DPTD3-4 จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ ด้วยเทคนิค GC-MS

| สารสกัด ส่วนย่อย | HPTF | % of total | HPTD | % of total | DPTF | % of total | DPTD | % of total |
|---------------------|-------------------------------------|---------------|-------------------------------------|---------------|-------------------------------------|---------------|-------------------------------------|---------------|
| F3 | Phenol, 2,4-bis-(1,1-dimethylethyl) | 1.755 | Phenol, 2,4-bis-(1,1-dimethylethyl) | 0.818 | Phenol, 2,4-bis-(1,1-dimethylethyl) | 4.877 | Phenol, 2,4-bis-(1,1-dimethylethyl) | 15.388 |
| | Hexadecanoic acid methyl ester | 3.037 | Hexadecanoic acid methyl ester | 4.048 | Hexadecanoic acid methyl ester | 12.879 | | |
| | | | Hexadecanoic acid | 3.848 | | | | |
| | | | Stigmasterol | 1.491 | | | | |
| F4 | Phenol, 2,4-bis-(1,1-dimethylethyl) | 14.799 | Spathulenol | 10.160 | Phenol, 2,4-bis-(1,1-dimethylethyl) | 0.469 | Phenol, 2,4-bis-(1,1-dimethylethyl) | 9.166 |
| | Hexadecanoic acid methyl ester | 14.171 | | | | | Loliolide | 12.872 |

Hexadecanoic acid methyl ester

Hexadecanoic acid methyl ester หรือ Palmitic acid methyl ester เป็นกรดไขมันที่พบได้ทั้งในพืช และสัตว์ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสบู่และเครื่องสำอาง และมีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (Farina และคณะ, 2014) และยังมีรายงานฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียและการยับยั้งเชื้อรา โดย Manivachagam และคณะ (2007) ได้แยกสาร Hexadecanoic acid methyl ester จากพืชทนเค็ม 4 ชนิด คือ *Arthrocnemum indicum*, *Salicornia brachiata* Roxb, *Suaeda maritima* (L.) Dumort และ *Suaeda monoica* ที่อยู่ในวงศ์ Chenopodiaceae และนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราด้วยวิธี agar diffusion พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 17.5 ± 1.3 , 20.3 ± 1.5 , 18.5 ± 1.3 และ 18.5 ± 1.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ Krishnan และคณะ (2016) แยกสาร Hexadecanoic acid จากสารสกัดของใบ *Canthium parviflorum* และนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli* และเชื้อรา *Candida albicans*

Phenol, 2,4-bis-(1,1-dimethylethyl)

Phenol, 2,4-bis-(1,1-dimethylethyl) เป็นสารกลุ่ม Phenolic ซึ่งสารกลุ่มนี้เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด สามารถยับยั้งแบคทีเรีย ยับยั้งอนุมูลอิสระ และสามารถต้านการอักเสบได้ (Salem และคณะ, 2018)

Stigmasterol

Stigmasterol เป็นอนุพันธ์ของสาร Phytosterols ซึ่งเป็นสารธรรมชาติในกลุ่มไตรเทอร์พีนที่มีโครงสร้างคล้ายกับคอเลสเตอรอล มีรายงานฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (MRSA) (Mesfin และคณะ, 2016; Adnan และคณะ, 2016)

Spathulenol

Spathulenol เป็นส่วนประกอบ sesquiterpene ของน้ำมันหอมระเหยในพืชที่มีกลิ่นหอม (Flora F และคณะ, 2017) และมีรายงานฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย (Tan และคณะ, 2016) และฤทธิ์ต้านการอักเสบและภูมิคุ้มกัน (Martins และคณะ, 2010) โดยมีรายงานการแยกสาร Spathulenol จากดอกของ *Baccharis dracunculifolia* สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *B. cereus* และ *P. aeruginosa* (Luciane และคณะ, 2019)

Loliolide

Loliolide พบได้ทั้งพืช และสัตว์ มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ เช่น ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Grabarczyk

และคณะ, 2015) โดยมีการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียจากสาร Loliolide ที่แยกจากใบของ *Sonchus oleraceus* L. และนำมาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* และ *Neisseria gonorrhoeae*

4.8 ผลการพัฒนาผลิตภัณฑ์เซรัมแต้มนิวจากสารสกัดใบสัก

จากการนำสารสกัดของแม่ไม้แพร์ของตัวทำละลายเฮกเซน (H) และไดคลอโรมีเทน (D) จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ นำมาแยกสารด้วยเทคนิค Column chromatography และนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย พบว่า สารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 คือ HPTF3, HPTF4, HPTD3, HPTD4, DPTF3, DPTF4, DPTD3 และ DPTD4 สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด จึงนำมาพัฒนาเป็นเซรัมแต้มนิว จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่า เซรัมแต้มนิวจากสารสกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 และ 5 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ได้

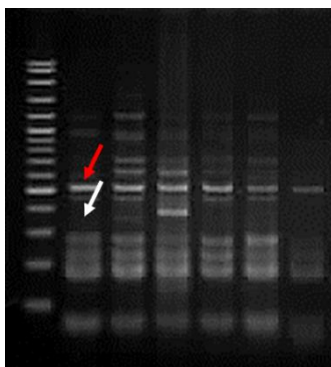
จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบสักระหว่างใบสดและใบร่วง ของแม่ไม้จำนวน 5 ชนิด คือ เชียงใหม่ แพร์ ลำปาง สุโขทัย และขอนแก่น จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ และพิษณุโลก พบว่า ปัจจัยระหว่างใบสดและใบร่วงมีผลต่อฤทธิ์ด้านการอักเสบ และปริมาณสารสำคัญ สำหรับปัจจัยด้านชนิดของแม่ไม้มีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนส และปริมาณสารสำคัญ นอกจากนี้ปัจจัยของสถานที่เพาะปลูก พบว่ามีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย และปริมาณสารสำคัญ จะเห็นได้ว่าระยะของใบ ชนิดของแม่ไม้ และสถานที่นั้นอาจส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ และปริมาณของสารสำคัญนั้นแตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการยืนยันความหลากหลายทางพันธุกรรมของสักด้วยเทคนิคทางโมเลกุล หากมีความแตกต่างกัน ก็จะสามารถนำแม่ไม้สักดังกล่าวนี้มาพัฒนา เพื่อเป็นทางเลือกในการนำไปใช้ประโยชน์ เช่นการขยายพันธุ์ของแม่ไม้สักชนิดนั้น ๆ หรือการนำมาสกัดสารเพื่อให้ได้สารในปริมาณที่มาก

4.9 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP

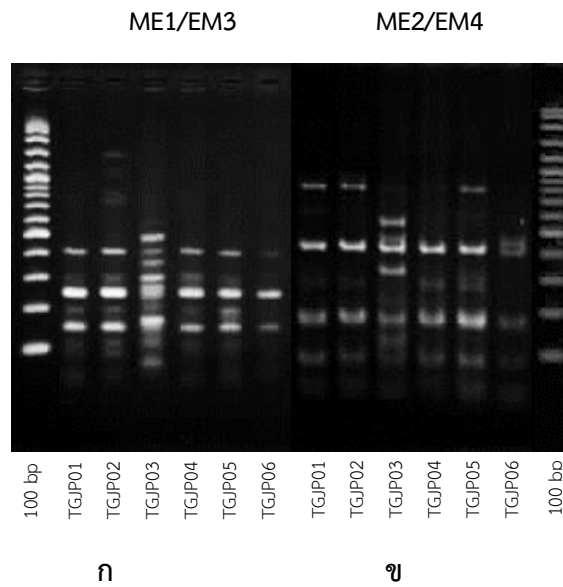
4.9.1 การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

การศึกษานี้นำตัวอย่างสักจำนวน 6 ตัวอย่าง โดยมีตัวแทนของตัวอย่างที่ทราบสายต้น คือ สยามินทร์ และมเหสักข์ จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ TGJP01 และ TGJP02 ตัวอย่างของแม่ไม้สุโขทัย จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ และสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลกจำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ TGJP03 และ TGJP04 และตัวอย่างของแม่ไม้ลำปาง จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ และสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลกจำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ TGJP05 และ TGJP06 มาคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากทั้งหมดจำนวน 30 คู่ไพรเมอร์ (Li และ Quiros 2001) พบว่า แต่ละคู่ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และปรากฏแถบดีเอ็นเอหลายลักษณะ แถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกันในทุก

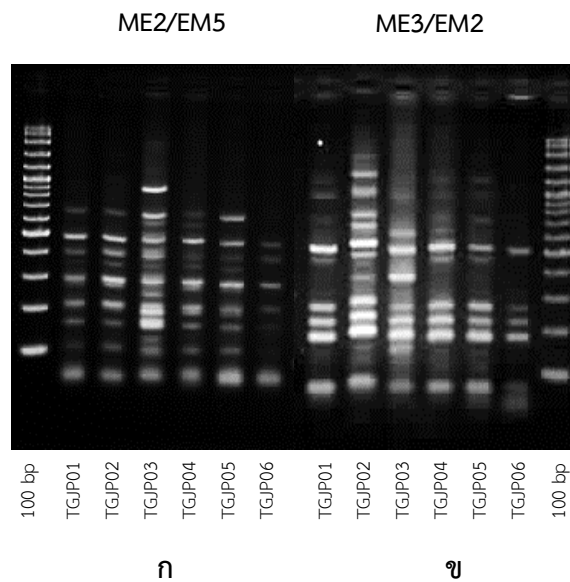
ตัวอย่าง (monomorphic band) (ลูกศรสีแดงที่แสดงในรูปที่ 4.12) จะไม่นำมาศึกษา แต่จะเลือกคู่ไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกัน (polymorphic band) (ลูกศรสีขาวที่แสดงในรูปที่ 4.12) โดยมีคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ ME1/EM3, ME2/EM4, ME2/EM5, ME3/EM2, ME5/EM1 และ ME5/EM5 (รูปที่ 4.13-4.15) ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน มีแถบดีเอ็นเอเข้ม สามารถนับจำนวนได้ มาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสักจำนวน 28 ตัวอย่าง



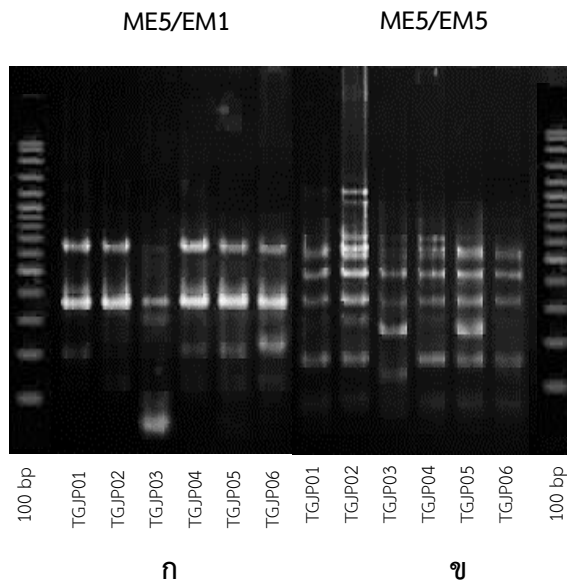
รูปที่ 4.12 แถบดีเอ็นเอของสักจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP จำนวน 6 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส โดย ลูกศรสีขาวแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) และลูกศรสีแดงแสดงแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic band)



รูปที่ 4.13 แถบดีเอ็นเอของสั๊กที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP จำนวน 6 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส โดย (ก) คู่ไพรเมอร์ ME1/EM3 (ข) คู่ไพรเมอร์ ME2/EM4



รูปที่ 4.14 แถบดีเอ็นเอของสั๊กที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP จำนวน 6 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส โดย (ก) คู่ไพรเมอร์ ME2/EM5 (ข) คู่ไพรเมอร์ ME3/EM2



รูปที่ 4.15 แถบดีเอ็นเอของสั๊กที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP จำนวน 6 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส โดย (ก) คู่ไพรเมอร์ ME5/EM1 (ข) คู่ไพรเมอร์ ME5/EM5

4.9.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

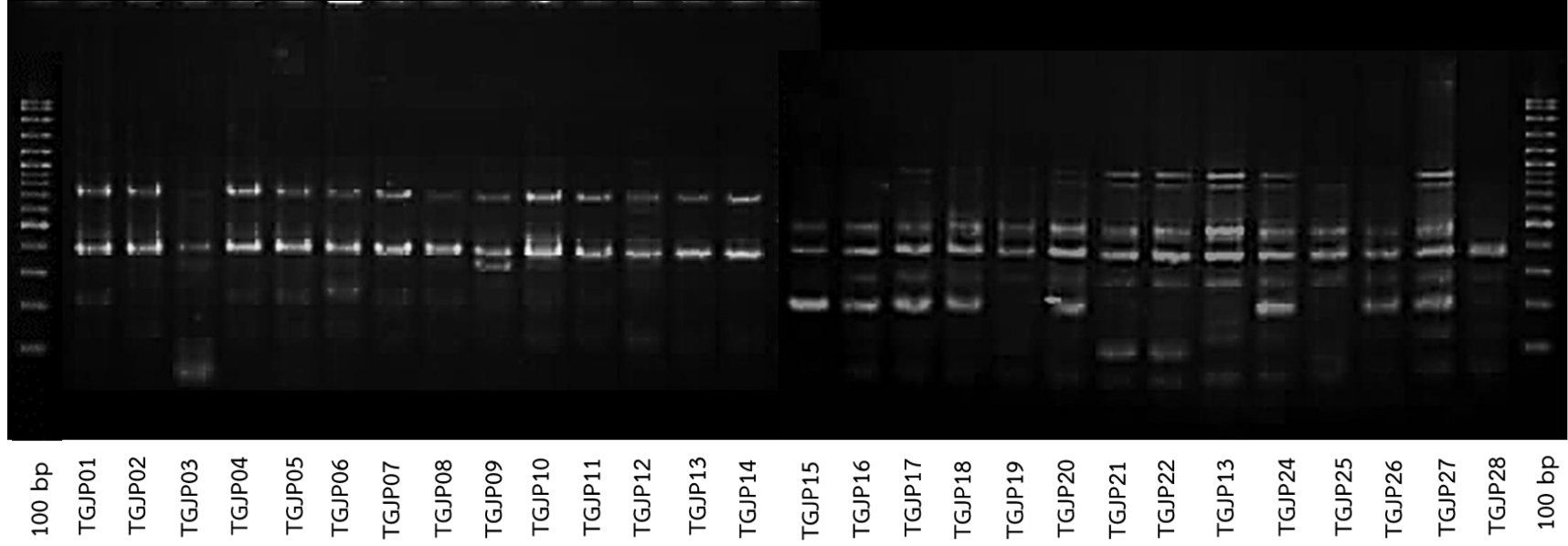
จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP ของสั๊ก จำนวน 28 ตัวอย่าง จาก 6 คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม หลังการตรวจสอบลักษณะแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ปรากฏแถบดีเอ็นเอได้อยู่ในระหว่าง 100-1500 คู่เบส ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 67 แถบ ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) จำนวน 55 แถบ คิดเป็นร้อยละ 82.39 โดยคู่ไพรเมอร์ ME2/EM5 ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 14 แถบ และคู่ไพรเมอร์ ME5/EM5 ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 9 แถบ ซึ่งเป็นคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันมากที่สุด มีจำนวน 9 แถบ คิดเป็นร้อยละ 100 (รูปที่ 4.16) ส่วนคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ต่างก็น้อยที่สุด คือ ME2/EM5 มีจำนวน 7 แถบ คิดเป็นร้อยละ 70 (ตารางที่ 4.13) เมื่อพิจารณาค่าแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic band) เฉลี่ยในการศึกษานี้มีค่าน้อยกว่า Thakor และคณะ (2019) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสั๊กจากสถานที่ต่าง ๆ ในประเทศไทยด้วยเทคนิคเดียวกัน ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (Polymorphic band) คิดเป็นร้อยละ 98.18 และมีขนาดแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 98-1005 คู่เบส

ตารางที่ 4.13 ชนิดของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง และร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของสั๊กจำนวน 28 ตัวอย่างจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

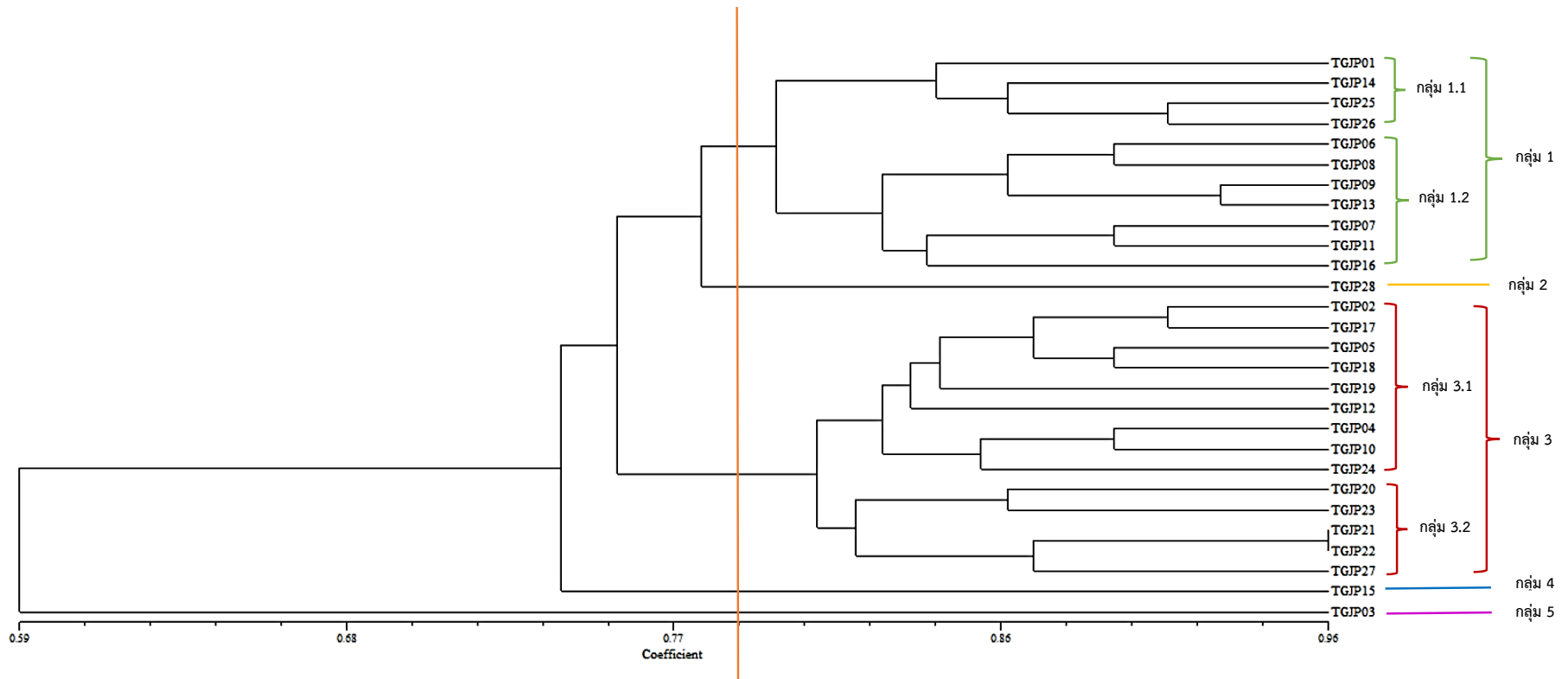
| คู่ไพรเมอร์ | ขนาดแถบดีเอ็นเอ(bp) | จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด | จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง | ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง |
|--------------------|---------------------|-------------------------|------------------------------------|--|
| ME1/EM3 | 100-1500 | 11 | 9 | 81.82 |
| ME2/EM4 | 100-1000 | 10 | 7 | 70.00 |
| ME2/EM5 | 100-900 | 14 | 12 | 85.71 |
| ME3/EM2 | 180-1200 | 11 | 9 | 81.82 |
| ME5/EM1 | 100-1200 | 9 | 9 | 100 |
| ME5/EM5 | 100-1000 | 12 | 9 | 75 |
| รวม | - | 67 | 55 | 494.35 |
| จำนวนเฉลี่ย | | 11.17 | 9.17 | 82.39 |

จากการแปลผลของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค SRAP ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.11 โดยใช้วิธี unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) แสดงผลดังรูปที่ 4.17 เมื่อนำมาหาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.59-0.96 โดยที่ค่า 0.79 สามารถแบ่งกลุ่มสั๊กเป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่ม 1 สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มย่อยที่ 1.1 ประกอบด้วยตัวอย่าง TGJP01 (สยามินทร์ สวนจิตรลดา อพ.สธ.) TGJP14 (แม่ไม้เชียงราย พิษณุโลก) TGJP25 (ไม่ทราบสายต้น ลาดกระบัง กรุงเทพฯ) และ TGJP26 (ไม่ทราบสายต้น โรงเรียนพรตพิทยพยัต กรุงเทพฯ) กลุ่มย่อยที่ 1.2 ได้แก่ TGJP06 (แม่ไม้ลำปาง พิษณุโลก) TGJP08 (แม่ไม้เชียงใหม่ พิษณุโลก) TGJP09 (แม่ไม้แพร่ ทองผาภูมิ) TGJP13 (แม่ไม้เชียงราย ทองผาภูมิ) TGJP07 (แม่ไม้เชียงใหม่ ทองผาภูมิ) TGJP11 (แม่ไม้ขอนแก่น ทองผาภูมิ) TGJP16 (แม่ไม้เชียงแสน พิษณุโลก) กลุ่มที่ 2 ได้แก่ TGJP28 (ไม่ทราบสายต้น อ. เมือง จ. สุโขทัย) กลุ่มที่ 3 แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยที่ 3.1 ได้แก่ TGJP02 (มเหสักข์ สวนจิตรลดา อพ.สธ.) TGJP17 (แม่ไม้แม่ฮ่องสอน ทองผาภูมิ) TGJP05 (แม่ไม้ลำปาง ทองผาภูมิ) TGJP18 (แม่ไม้แม่ฮ่องสอน พิษณุโลก) TGJP19 (แม่ไม้ตาก ทองผาภูมิ) TGJP12 (แม่ไม้ขอนแก่น พิษณุโลก) TGJP04 (แม่ไม้สุโขทัย พิษณุโลก) TGJP10 (แม่ไม้แพร่ พิษณุโลก) TGJP24 (ไม่ทราบสายต้น ลาดกระบัง กรุงเทพฯ) กลุ่มย่อยที่ 3.2 ได้แก่

TGJP20 (แม่ไม้ตาก พิษณุโลก) TGJP23 (สยามินทร์ สวนจิตรลดา อพ.สธ) TGJP21 (สยามินทร์ อ.ด่านช้าง จ. สุพรรณบุรี) TGJP22 (มเหล็กข์ อ.ด่านช้าง จ. สุพรรณบุรี) TGJP27 (ไม่ทราบสายต้น อ.เมือง จ. กำแพงเพชร) กลุ่มที่ 4 ได้แก่ TGJP15 (แม่ไม้เชียงใหม่ ทองผาภูมิ) และกลุ่มที่ 5 ได้แก่ TGJP03 (แม่ไม้สุโขทัย ทองผาภูมิ) แสดงผลในรูปแบบภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ดังรูปที่ 4.17 จะเห็นว่าในแต่ละกลุ่มไม่สามารถแยกความสัมพันธ์ระหว่างแม่ไม้และสถานที่ออกจากกันได้อย่างชัดเจน แสดงว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของสักไม้สัมพันธ์กับแม่ไม้ และสถานที่ และเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างของแม่ไม้สัก และสักที่ทราบสายต้น คือ สยามินทร์ และมเหล็กข์ พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ซึ่งต่างจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสักด้วยเทคนิค SRAP จากตัวอย่างของสักจำนวน 32 ตัวอย่าง จาก 6 เมือง ในรัฐ Gujarat ของประเทศอินเดีย มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.11-0.92 โดยที่ค่า 0.47 สามารถจัดกลุ่มของตัวอย่างได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม ซึ่งสามารถหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสักในรัฐ Gujarat ของประเทศอินเดียจากสถานที่ในแต่ละเมืองได้ (Thakor และคณะ, 2019) เช่นเดียวกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค ISSR โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ลุ่มน้ำ 5 แหล่ง ได้แก่ ลุ่มน้ำสาละวิน ลุ่มน้ำปิง ลุ่มน้ำวัง ลุ่มน้ำยม และลุ่มน้ำน่าน พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ของสักตามลุ่มน้ำได้อย่างชัดเจน (กานตรัตน์, 2554) เช่นเดียวกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสักในพื้นที่ลุ่มน้ำปาย ที่ระดับความสูงต่าง ๆ ด้วยเทคนิค ISSR พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มของตัวอย่างสักได้ตามระดับความสูง (อังสุมา, 2555) และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสักด้วยเทคนิค RAPD โดยเก็บตัวอย่างใบสักจากทั้งหมด 6 สถานที่ในประเทศอินเดียพบว่าสามารถแยกความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ 2 กลุ่ม ตามระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลในการเจริญเติบโตของสักได้ (Murukan และ Murukan, 2015) การศึกษานี้ไม่สามารถแยกความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ จากข้อมูลของกรมป่าไม้ได้มีการพัฒนาคุณลักษณะต่าง ๆ ของสักที่ใช้ในเชิงพาณิชย์ จึงมีการคัดเลือกแม่ไม้สักมาขยายพันธุ์เพื่อการปลูกสร้างสวนป่า เมื่อได้พันธุ์ที่ดีจึงนำไปขยายพันธุ์ และนำไปปลูกตามสถานที่ต่าง ๆ เพื่อสร้างสวนป่าไม้สัก โดยในปี 2551 มีการปลูกทดสอบสายพันธุ์ของแม่ไม้สัก ที่สถานีวนวัฒนวิจัยดงลาน จังหวัดขอนแก่น สถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก และสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี โดยใช้คู่ผสมระหว่างแม่ไม้เชียงใหม่เป็นแม่พันธุ์ ส่วนพ่อพันธุ์เป็นแม่ไม้ลำปาง จึงเป็นไปได้ว่าแม่ไม้สักจึงมีความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ได้เก็บตัวอย่างจากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ และสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลกที่ทำการปลูกในปี 2551 (กรมป่าไม้, 2556)



รูปที่ 4.16 ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP ของคูไพร์เมอร์ ME5/EM1 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส จากตัวอย่างสักจำนวน 28 ตัวอย่าง



รูปที่ 4.17 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสีกจำนวน 28 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SRAP โดยการจัดกลุ่มแบบ UPGMA

ดังนั้นความหลากหลายทางพันธุกรรมของแม่ไม้สักในประเทศไทย เมื่อศึกษาด้วยเทคนิค SRAP พบว่า มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ รวมกลุ่มกันโดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.59 จึงมีความเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารสำคัญที่พบจากสารสกัดใบสักในแต่ละแม่ไม้นั้นเหมือนกัน แต่อาจอาจมีปริมาณสารที่แตกต่างกัน อาจขึ้นกับแหล่งเพาะปลูก เนื่องจากแหล่งเพาะปลูกแต่ละสถานที่อยู่ต่างภูมิภาค ทำให้มีสภาพแวดล้อม สภาพภูมิอากาศ อุณหภูมิ ปริมาณแสง ปริมาณน้ำฝน และแร่ธาตุในดินที่ต่างกัน ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้มีผลทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพของในแต่ละแม่ไม้ ของทั้ง 2 สถานที่ที่มีความแตกต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้รวบรวมข้อมูลสภาพภูมิอากาศ อุณหภูมิ ปริมาณแสง ปริมาณน้ำฝน และแร่ธาตุในดินของแหล่งเพาะปลูกจากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ และพิษณุโลก ที่อาจส่งผลต่อการเจริญเติบโต ทำให้ปริมาณสารสำคัญ และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบสักในแต่ละสถานที่ และแต่ละแม่ไม้แตกต่างกัน โดยที่ผ่านมามีการรายงานข้อมูลของสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นสัก โดยต้นสักสามารถเจริญได้ดีในที่มีแสงมาก ความเข้มของแสงที่เหมาะสม คือ 75-95 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 1,000-2,000 มิลลิเมตรต่อปี ดินร่วนปนทราย หรือดินที่เกิดจากการผุสลายของหินปูน มีปริมาณแคลเซียมสูง และมีค่า pH ประมาณ 6.5-7.5 (กรมป่าไม้, 2553) และจากการเก็บข้อมูลของเจ้าหน้าที่จากสถานีวนวัฒนวิจัยที่ได้ทำการบันทึก โดยอ้างอิงจากปี 2561 พบว่า อุณหภูมิเฉลี่ยในปี 2561 ของสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ มีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 26.5 องศาเซลเซียส และพิษณุโลกประมาณ 24 องศาเซลเซียส ส่วนปริมาณน้ำฝนต่อปี พบว่า สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ มีปริมาณเฉลี่ย 2126 มิลลิเมตรต่อปี มากกว่าสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลกมีปริมาณเฉลี่ย 1436.5 มิลลิเมตรต่อปี ค่าแสดงดังตารางที่ 4.14 จากข้อมูลดังกล่าวสภาพภูมิอากาศ อุณหภูมิ รวมถึงปริมาณน้ำฝนต่อปีของสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นสักมากกว่าสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก นอกจากนี้ได้เก็บตัวอย่างดินจากแปลงเพาะปลูกสักของทั้ง 2 แหล่ง มาวิเคราะห์แร่ธาตุในดิน ได้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 4.21 โดยแปลงเพาะปลูกของสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ แปลง 1 เป็นแปลงเพาะปลูกแม่ไม้แพร์ และสุโขทัย แปลง 2 เป็นแปลงเพาะปลูกแม่ไม้ลำปาง แปลง 3 เป็นแปลงเพาะปลูกแม่ไม้เชียงใหม่ และขอนแก่น ส่วนแปลงเพาะปลูกของสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก แปลง 1 เป็นแปลงเพาะปลูกแม่ไม้แพร์ สุโขทัย และลำปาง แปลง 2 เป็นแปลงเพาะปลูกแม่ไม้เชียงใหม่ และขอนแก่น จากข้อมูลพบว่า แปลงเพาะปลูกของสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ แปลง 1 เป็นแปลงเพาะปลูกแม่ไม้แพร์ และสุโขทัย มีปริมาณแร่ธาตุในดินสูงกว่าแปลงอื่น ๆ ปัจจัยดังกล่าวนี้ อาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสัก ทำให้แต่ละแม่ไม้ จากทั้ง 2 สถานที่ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ และปริมาณสารที่ต่างกันออกไป โดยสอดคล้องกับการรายงานปริมาณสารฟีนอลิก และฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระจาก

สารสกัดใบสักจากสถานที่การเจริญเติบโตที่แตกต่างในประเทศอินโดนีเซียพบว่า ปริมาณสารฟีนอลิก และฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแต่ละสถานที่นั้นแตกต่างกัน ความอุดมสมบูรณ์ของดิน ลักษณะของดินของสถานที่การเจริญเติบโต สภาพอากาศ และอุณหภูมิและปริมาณน้ำฝนต่อปี มีผลต่อปริมาณสารฟีนอลิก และฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสัก (Joni และคณะ, 2016 ; Iqbal และ Bhenger, 2006) จากผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียพบว่า สารสกัดจากแหล่งปลูกสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิแสดงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียดีกว่าสารสกัดจากแหล่งปลูกสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก โดยแม่ไม้แพร์สามารถแสดงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด รองลงมาคือแม่ไม้สุโขทัย ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์แร่ธาตุในดินที่พบว่าแปลงปลูก 1 ที่เป็นแปลงปลูกของแม่ไม้แพร์ และสุโขทัย มีปริมาณของแร่ธาตุในดินมากกว่าแปลงอื่น ๆ ที่อาจส่งผลต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย จากตารางที่ 4.15 พบว่า แปลงที่ 1 ของสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ มีค่า pH เท่ากับ 7.17 ซึ่งมีสภาพเป็นกลาง เหมาะกับการเจริญของต้นสัก ต่างจากแปลง 2 และ 3 ของสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ ส่วนแปลง 1 และ 2 ของสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก มีค่า pH อยู่ระหว่าง 4.34-4.84 ซึ่งมีสภาพค่อนข้างเป็นกรด เช่นเดียวกับปริมาณแคลเซียมที่พบในแปลง 1 ของสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิมากที่สุด และปริมาณแคลเซียมน้อยที่สุดในแปลง 2 ของสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณสาร salicylic acid ที่พบในปริมาณมาก เนื่องจากกระบวนการสร้างสาร salicylic acid โดยการทำงานของ salicylic acid เกิดจาก methyl salicylic จะเปลี่ยนเป็น salicylic acid เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดจากสิ่งมีชีวิต เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส และผลกระทบจากสภาพเครียดที่ถูกกระตุ้นจากสิ่งไม่มีชีวิต ได้แก่ น้ำ แสงอัลตราไวโอเลต อุณหภูมิสูง และต่ำ สารกำจัดวัชพืชและแมลง โลหะหนัก และความเค็ม เพื่อเป็นการกระตุ้นระบบป้องกันตนเองของพืช (สุรัสวดี, 2555) ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณสารสำคัญกับการศึกษาในครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญระหว่างสถานที่พบว่า สารสกัดจากสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลกที่มีค่าอยู่ระหว่าง 9.37-75.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งมากกว่าสารสกัดจากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิที่มีปริมาณสาร salicylic acid อยู่ระหว่าง 6.08-61.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ดังนั้น salicylic acid อาจไม่ใช่สารสำคัญที่มีผลทำให้แม่ไม้แพร์จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด ซึ่งอาจมีสารชนิดอื่นนอกจากสาร 3 ชนิด ที่ได้ทดสอบในการศึกษารั้งนี้

นอกจากนี้ปัจจัยในด้านระยะใบพบว่า ฤทธิ์ทางชีวภาพและชนิดของสารที่พบระหว่างใบสดและใบร่วงแสดงฤทธิ์ที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นปริมาณของสารสำคัญที่พบ โดยรวมแล้วใบสดพบปริมาณสารที่มากกว่าในใบร่วง เนื่องจากสากเป็นไม้ผลัดใบ ในการเกิดใบร่วงเป็นการลดการสูญเสียจากการคายน้ำที่ปากใบ พืชจะหยุดการเจริญเติบโตชั่วคราว ทำให้ไม่มีการสร้างสารหรือผลิตสารออกมาจึงทำให้ปริมาณสารที่พบในใบร่วงมีปริมาณน้อยกว่าในใบสด (Sawangpro, 2018) ดังนั้นใบร่วงของสาก

อาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ และพัฒนาเพื่อผลิตสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพแทนใบสดได้

ตารางที่ 4.14 ข้อมูลสภาพภูมิอากาศของสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ และสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก ปี 2561

| รายการวิเคราะห์ | ผลการวิเคราะห์ | | | | | หน่วย |
|-----------------|---------------------------|-------|-------|--------------------------|-------|-------|
| | สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ | | | สถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก | | |
| | แปลง1 | แปลง2 | แปลง3 | แปลง1 | แปลง2 | |
| ค่า pH | 7.17 | 4.78 | 4.84 | 4.34 | 4.59 | - |
| ค่าการนำไฟฟ้า | 127 | 35.3 | 26.3 | 15.1 | 21.2 | μS/cm |
| อินทรีย์วัตถุ | 7.43 | 5.72 | 5.20 | 1.53 | 1.65 | % |
| ฟอสฟอรัส | 6.27 | 2.41 | 2.69 | 1.23 | 4.10 | ppm |
| โพแทสเซียม | 34.0 | 21.7 | 26.1 | 50.1 | 50.0 | ppm |
| แคลเซียม | 5336 | 748 | 805 | 374 | 310 | ppm |
| แมกนีเซียม | 244 | 165 | 226 | 106 | 155 | ppm |
| เหล็ก | 14.0 | 26.3 | 26.5 | 64.6 | 73.6 | ppm |
| แมงกานีส | 66.0 | 54.8 | 89.6 | 58.0 | 34.3 | ppm |
| ทองแดง | 1.31 | 0.74 | 0.94 | 0.49 | 0.48 | ppm |
| สังกะสี | 0.93 | 0.81 | 0.75 | 0.29 | 0.40 | ppm |

ตารางที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์แร่ธาตุในดินสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ และสถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก

| ข้อมูลสภาพภูมิอากาศ ปี 2561 | สถานที่ | |
|--------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | สถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ | สถานีวนวัฒนวิจัยพิษณุโลก |
| ปริมาณน้ำฝน (มม.) | 2126 | 1436.5 |
| อุณหภูมิ °C (เฉลี่ย) | 26.5 | 24.0 |

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสัก ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่า แม่ไม้แพร์สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ดีที่สุดมีบริเวณยับยั้งสูงที่สุดเท่ากับ 14.31 มิลลิเมตร โดยสารสกัดจากใบสดของแม่ไม้แพร์ จากสถานีวิจัยของภาควิชา PTF มีบริเวณยับยั้งเชื้อ *P. acnes*, และ *S. aureus* มีค่าเท่ากับ 14.01 และ 13.90 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดใบร่วงของแม่ไม้แพร์ จากสถานีวิจัยของภาควิชา PTD สามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ได้สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 14.31 มิลลิเมตร จากนั้นทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopa-chrome พบว่า สารสกัดจากใบสักมีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ระหว่างร้อยละ 35.45-73.65 โดยสารสกัดใบร่วงของแม่ไม้เชียงใหม่ จากสถานีวิจัยพิษณุโลก CPD สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุด โดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 73.65 และเมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี nitric oxide scavenging assay (NOA) พบว่า แม่ไม้ลำปางจากทั้ง 2 สถานที่ มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 67.07-110.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือแม่ไม้แพร์ มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 59.06-130.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบกับเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยสาร lipopolysaccharides (LPS) พบว่า มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง <6.25-24.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญพบสาร salicylic acid มากที่สุด อยู่ระหว่าง 6.08-75.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ quercetin มีปริมาณสารอยู่ระหว่าง 0.11-14.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ gallic acid มีปริมาณสารอยู่ระหว่าง 0-4.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสัก พบว่าแม่ไม้แพร์สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงนำตัวอย่างแม่ไม้แพร์ใบสด (PTF) ใบร่วง (PTD) จากแหล่งปลูกสถานีวิจัยของภาควิชา และแม่ไม้แพร์ใบสด (PPF) ใบร่วง (PPD) จากแหล่งปลูกสถานีวิจัยพิษณุโลก จำนวน 4 สารสกัด มาสกัดสารด้วยเทคนิค liquid-liquid extraction โดยใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน (H) ไดคลอโรมีเทน (D) เอทิลอะซิเตท (E) บิวทานอล (B) และน้ำ (W) นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่า ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (D) สามารถยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 0.00-14.72 มิลลิเมตร รองลงมาคือตัวทำละลายเฮกเซน (H) และเอทิลอะซิเตท (E) มีบริเวณยับยั้ง 0.00-13.95 และ 0.00-9.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ จึงเลือกสารสกัด

ของตัวทำละลายเฮกเซน (H) และไดคลอโรมีเทน (D) นำมาแยกสารด้วยด้วยเทคนิค column chromatography สามารถแยกสารสกัดส่วนย่อยของตัวทำละลายเฮกเซน (H) จากสารสกัดแม่ไม้แปรรูปสด HPTF และแม่ไม้แปรรูปร่วน HPTD จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิ ได้ 12 และ 6 สารสกัดส่วนย่อย ตามลำดับ และสามารถแยกสารสกัดส่วนย่อยของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (D) จากสารสกัดแม่ไม้แปรรูปสด DPTF และแม่ไม้แปรรูปร่วน DPTD ได้ 7 และ 8 สารสกัดส่วนย่อยตามลำดับ นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่า สารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดโดยมีบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 8.55-16.02 และ 8.14-16.63 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายเฮกเซนจากแม่ไม้แปรรูปสด HPTF3-4 และใบร่วน HPTD3-4 และสารสกัดส่วนย่อยที่ 3 และ 4 ของตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนของแม่ไม้แปรรูปสด DPTF3-4 และใบร่วน DPTD3-4 จากสถานีวนวัฒนวิจัยทองผาภูมิไปหาสารสำคัญด้วยเทคนิค GC-MS พบสารที่น่าสนใจ และอาจมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Hexadecanoic acid methyl ester, Phenol, 2,4-bis-(1,-dimethylethyl), Stigmasterol, Spathulenol และ Loliolide

จากการศึกษาพบว่าชนิดของแม่ไม้มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ และปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกัน จึงนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสักด้วยเทคนิค SRAP แสดงให้เห็นว่าสักมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.59-0.96 ไม่สามารถแยกความสัมพันธ์ระหว่างแม่ไม้และสถานที่ออกจากกันได้อย่างชัดเจน จึงมีความเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารสำคัญที่พบจากสารสกัดใบสักในแม่ไม้แต่ละชนิดนั้นเหมือนกัน แต่อาจอาจมีปริมาณที่แตกต่างกัน อาจขึ้นกับสถานที่ของแหล่งเพาะปลูก เนื่องจากแหล่งเพาะปลูกของแต่ละสถานที่อยู่ต่างภูมิภาคกัน ทำให้สภาพแวดล้อม สภาพภูมิอากาศ อุณหภูมิ ปริมาณแสง ปริมาณน้ำฝน และแร่ธาตุในดินต่างกัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

นอกจากฤทธิ์ทางชีวภาพที่ศึกษาในครั้งนี้นี้ ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่น ที่น่าสนใจนำมาศึกษาเพิ่มเติม เช่น ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ ระหว่างใบสดและใบร่วน เป็นต้น เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในระดับ *In vitro* ควรมีการศึกษาในระดับ *In vivo* เพิ่มเติม และควรทำการแยกสาร และวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดด้วยวิธี GC-MS ของสารสกัดที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดี เนื่องจากอาจพบสารที่น่าสนใจมากกว่าที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อให้มีศักยภาพสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม อาจมีการศึกษาด้วยเทคนิคอื่น ๆ เพิ่มเติม หรืออาจเพิ่มจำนวนตัวอย่างพืชให้มากขึ้น และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณตำแหน่งยีนต่าง ๆ เพื่อเพิ่มความถูกต้องและแม่นยำของข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

- กานตรัตน์ สุขปาน. 2554. การพัฒนาเครื่องหมาย ISSR เพื่อใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้สักในพื้นที่ 5 ลุ่มน้ำ ทางภาคเหนือ. [Online]. Available: http://bioff.forest.ku.ac.th/PDF_FILE/FEB_2013/43.pdf.
- กรมป่าไม้. 2553. การปลูกและจัดการสักเชิงเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ : กรมป่าไม้ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- กรมป่าไม้. 2556. องค์ความรู้ไม้สักไทย. กรุงเทพฯ : กรมป่าไม้ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- กล่าวขวัญ ศรีสุข., สาวินีย์ สีมานันท์., ปริญญา เกตุกุล., เอกรัฐ ศรีสุข., กาญจนา หริ่มเพ็ง., เบญจวรรณ ชิวปรีชา. และ คำรณ เลียดประถม. 2560. “ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี.” *วิทยาศาสตร์บูรพา*. 6 : 304-311.
- ทักษอร รัตนยูวัน. 2557. “การพัฒนาตัวพออนุภาคนาโนไขมันที่บรรจุสารสกัดดอกดาวเรืองเพื่อยับยั้งฤทธิ์เอนไซม์ไทโรซิเนส.” *วิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรมบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*.
- นริศา คำแก่น. 2548. การทดสอบสารจากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- นิตากร แซ่วัน. 2554. *การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสขององค์ประกอบทางเคมีจากใบหนาด*. [Online]. Available: <http://www.med.nu.ac.th/pathology/405313/book54/Inflammation.pdf>.
- นุตติยา วีระวณิชชัย และ ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ 2555. “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งไทโรซิเนสของฟลาโวนอยด์จากกระดังงาจีน”.14(1): 23-29.
- ปฐวีณกร เกษโกมล. 2554. “ฤทธิ์ระงับปวดและฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ในสัตว์ทดลอง.” *วิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*.
- ประนอม สุขเกื้อ. 2557. “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากพืชท้องถิ่น (โสน, *Sesbania javiaca* Mig.)” *วิทยาสตรบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ*.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร., พิทัย กาญจนบุตร. และ สาธรร พงศ์ตระกูลพิพัฒน์. 2551. “การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ.” หน้า 91-101. ใน **การประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ มข ครั้งที่ 9 สัตวแพทย์ทางเลือกวันนี้**. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- เพ็ญพรรณ เวชวิทยาคลัง. 2555. “ฤทธิ์ต้านการอักเสบของโสม.” *ไทยเภสัชวิทยานิตยสาร*. 7 : 1-12.
- พิริยอุท สิริไชยากุล. 2554. *Acute and Chronic Inflammation*. [Online]. Available : <http://www.med.nu.ac.th/pathology/405313/book54/Inflammation.pdf>.
- พลอยขวัญ กาญจนสุรัตน์. 2557. “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส-2 และ -9 และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส.” *วิทยานิตยสารวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยขอนแก่น*.
- เรณู คำหอม 2559. “การทดสอบสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของปืบ” *วิทยานิตยสารวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเคมีศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยบูรพา*.
- รัตนา อินทรานุกกรณ์. 2547. *การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร*. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิริยา นิตยธีรานนท์. 2560. *การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบจากสารสกัดเมล็ดลำไยเถา*. [Online]. Available : <http://research.rmutto.ac.th/file/146fulltext.pdf>.
- สุจิตรา จางตระกูล และ Alfred, S. 2544. “การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้สักในประเทศไทยโดยใช้ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)” หน้า 90-95. ใน **สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12 พันธุศาสตร์ยุคปฏิวัติยีน**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุทัศน์ เดชวิสิทธิ์. 2536. **ไม้สักทอง**. นนทบุรี : เท็คโทนา แกรนด์สิกรูฟ.
- สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม., ปิยรัชฎ์ ปริญาพงษ์ เจริญทรัพย์., พฤษวรัช หลอดเข็ม และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2560. “ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบสัก.” หน้า 156-163. ใน **การประชุมวิชาการชมรมคณะปฏิบัติการ อพ.สธ. ครั้งที่ 8 “ทรัพยากรไทย : ศักยภาพมากล้นมีให้เห็น”**. สระบุรี. : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- อัมพร คุณเอนก. 2541. “สารเคมีที่พบในพืชสมุนไพรและการทดสอบเบื้องต้น.” ว. กรมวิทย์. พ. 40 (1) : 67-84.
- อังสุมา พิณทอง. 2555. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้สักในพื้นที่ลุ่มน้ำปายที่ระดับความสูงต่าง ๆ โดยใช้เครื่องหมาย ISSR. [Online]. Available : <http://research.rmutto.ac.th/file/146fulltext.pdf>.
- Aboaba, S., Akande, A. and Flamini, G. 2013. “Chemical Constituents, Toxicity and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from the Leaves of *Tectona grandis*.” *Elixir Bio Technology*. 61 : 16795-16798.
- Adnan, S.N.A. Ibrahim, N. and Yaacob, W.A. 2016. “Transcriptome Analysis of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Response to Stigmasterol and Lupeol.” *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 8 : 48-54.
- Aktas, N., Genc, Y., Gozcelioglu, B., Konuklugil, B. and Harput, U.S. 2013. “Radical Scavenging Effect of Different Marine Sponges from Mediterranean Coasts.” *Records of Natural Products*. 7(2) : 96-104.
- Aradhana, R.Rao, K.N.V. Banji, D. and Chaithanya, R.K. 2010. “A Review on *Tectona grandis*. Linn. : Chemistry and Medicinal Uses (FAMILY : VERBENACEAE).” *Journal of Herbal Science and Technology* (1) : 6-9.
- Bhangale, J. Chaudhari, S.R. Shete, R.V. and Kale, B.N. 2010. “Antinociceptive and Anti Inflammatory Effects of *Tectona grandis* (L.) Bark”. *Pharmacologyonline* 2 : 856-864.
- Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M. and Hammami, M. 2015. “Effect of Growth Stage and Solven Extract on the Antioxidant Potential of Oliv Leaves.” *Journal of Plant Sciences*. 3(3) : 1-7.
- Chang, T. and Tseng, M. 2006. “Preliminary Screening of Soil Actinomycetes for Anti-Tyrosinase Activity.” *Journal of Marine Science and Technology*. 14(3) : 190-193.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Wayne.
- Didry, N. Dubreuil, L. and Pinkas, M. 1994. “Activity of Anthraquinonic and Naphthoquinonic Compounds on Oral Bacteria.” *Pharmazie*. 49 : 681–683.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Doyle, J. and Doyle, J.L. 1987. "A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue." *Phytochemical Bulletin*. 19(1) : 11-15.
- Farina, M. Preeti, B. and Neelam, P. 2014. "Phytochemical Evaluation, Antimicrobial Activity, and Determination of Bioactive Components from Leaves of *Aegle Marmelos*." *BioMed Research International*. 10 : 1-11.
- Flora, M.F.M. Joyce, A.S. Candida, A.L.K. and Julio, H.R.C. 2017. "Antioxidant, Anti-inflammatory, Antiproliferative and Antimycobacterial Activities of the Essential Oil of *Psidium guineense* Sw. and Spathulenol." *Journal of Ethnopharmacology*. 1-29.
- Ghaisas, M.M. Navghare, A.R. Takawale, A.R. Zope, A.D. and Deshpande, A.D. 2009. "In-vitro Antioxidant Activity of *Tectona grandis* linn." *Pharmacologyonline*. 3 : 296-305.
- Giri, S.P. and Varma, S.B. 2015. "Analgesic and Anti-inflammatory Activity of *Tectona grandis* Linn. Stem Extract." *The Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 26(5) : 479-484.
- Grabarczyk, M. Winska, K. Maczka, W. and Potaniec, B. 2015. "Loliolide - the Most Ubiquitous Lactone." *Folia Biologica et Oecologica*. 11
- Joni, K. Arumingtyas, E. L. Ningtyas, D.W. and Setiawan, E.C. 2016. Antioxidant Activity of MAE Extracted Teak (*Tectona grandis* L.F.) Leaves Collected from Different Plantation Site at Java Island, Indonesia." *International Journal of ChemTech Research*. 9(7) : 154-160.
- Jung, H.W. Seo, U.K. Kim, J.H. Leem, K.H. and Park, Y.K. 2009. "Flower extract of *Panax notoginseng* Attenuates Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Response via Blocking of NF- κ B Signaling Pathway in Murine Macrophages." *Journal of Ethnopharmacology*. 122 : 313-319.
- Lanka, S. and Parimala. 2017. "Antimicrobial Activities of *Tectona grandis* Leaf and Bark Extracts." *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 4(12) : 245-248.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Li, G. and Quiros, F.C. 2001. "Sequence-related Amplified Polymorphism (SRAP), a New Marker System Based on a Simple PCR Reaction: Its Application to Mapping and Gene Tagging in Brassica." *Theoretical and applied Genetics*. 103 : 455-461.
- Li, G. Peter, B.E.M. and Quiros, C.F. 2013. "SRAP Molecular Marker Technology in Plant Science." *Plant Breeding from Laboratories to Fields* 23-44.
- Libby, P.MD. 2007. "Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease." *Nutrition Review*. 65(12) : 140-146.
- Iqbal, S. and Bhangar, M.I. 2006. "Effect of Season and Production Location on Antioxidant Activity of *Moringa oleifera* Leaves Grown in Pakistan." *Journal of Food Composition and Analysis*. 19 : 522-551.
- Itsarasook, K. 2015. "Free Radical Scavenging and Tyrosinase Inhibitory Activity of Longkong Leaves Extract." *SDU Research Journal*. 8(3) : 82-96.
- Jagetia, G.C. Baliga, M.S. 1984. "The Evaluation of Nitric Oxide Scavenging Activity of Certain Indian Medicinal Plants *In vitro*: a Preliminary Study." *Naturwissenschaften*. 71(11) : 581-582.
- Khan, R.M. and Mlungwana, S.M. 1999. "5-Hydroxylapachol: a Cytotoxic Agent from *Tectona grandis*." *Phytochemistry*. 50 : 439-442.
- Kim, Y.J. and Uyama, H. 2005. "Tyrosinase Inhibitors from Natural and Synthetic Sources: Structure, Inhibition Mechanism and Perspective for the Future." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 62 : 1707-1723.
- Kopa, T.K. Tchinda, A.T. Tala, M.F. Zofou, D. Jumbam, R. Wabo, H.K. Titanji, V.P.K. Frederich, M. Hua, T.N. and Pierre, T. 2014. "Antiplasmodial Anthraquinones and Hemisynthetic Derivatives from the Leaves of *Tectona grandis* (Verbenaceae)." *Phytochemistry Letters*. 8 : 41-45.
- Kushwah, A.S. Kaur, P. and Singh, R. 2013. "*In-vitro* Antioxidant Potential and Phytochemical Screening of *Tectona grandis* Linn. Leaves." *International Journal of Pharmaceutical and Medicinal Research*. 1 : 33-38.
- Krishna, M.S. and Nair, A.J. 2011. "Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant Potential of Different Extracts from Leaf, Bark and Wood of *Tectona grandis*." *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 2(2) : 155-158.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Krishnan, K.R. Jame, F. and Mohan, A. 2016. "Isolation and Characterization of n-Hexadecanoic Acid from *Canthium parviflorum* Leaves." *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 8(8) : 614-617.
- Luciane, N. C. Jasmina, G. Marina, S. José, E. G. Giani, A. L. Nelson, B. C. and Zild, C.G. 2019. "Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) Aerial Parts at Flowering Period." *Frontiers in Plant Science*. 10(27) : 1-9.
- Manivachagam, C. Senthilkumar, A. and Venkatesalu, V. 2011. "Antibacterial and antifungal efficacy of fatty acid methyl esters from the leaves of *Sesuvium portulacastrum* L." *European review for medical and pharmacological sciences* 15(7) : 775-780.
- Martins, Z. Andrea, V. Csupor, B. Joseph, M. and Hohmann, J. 2010. "Spathulenol Inhibit the Human ABCB1 Efflux Pump." *Planta Medica*. 76(12)
- Medzhitov, R. 2010. "Inflammation 2010 : New Adventures of an Old Flame." *Cell*. 140 : 771-776.
- Mesfin, M.O. Manash, K.C. and Ahmed, H.D. 2016. "Structure Elucidation of β -sitosterol with Antibacterial Activity from the Root Bark of *Malva parviflora*." *Springer Plus*. 5 : 1-11.
- Mosad, A.G. Hussein, A.S. Hassan, M.F.M. Laila, A.G.R. Mona, A.M.M. and Amal Mohamed, S. 2014. "Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Tectona grandis* Linn. Leaves." *International Journal of Phytopharmacology*. 5(2) : 143-157.
- Mounyr, B. Moulay, S. and Saad, K.I. 2016. "Methods Forin Vitroevaluating Antimicrobial Activity: A Review." *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6 : 71-79.
- Murukan, G. and Murukan, K. 2015. "Comparison of Morphological Traits and Genetic Polymorphism of *Tectona grandis* L.f. from Selected Localities of Kerala, India." *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*. 4(2) : 144-148.
- Murukan, G. and Murukan, K. 2018. "Comparison of Phenolic Acids and Antioxidant Activities of Young and Mature Leaves of *Tectona grandis* L f." *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 11(1) : 60-66.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Narayanan, C. Wali, S.A. Shukla, R. Kumar, A.K. Mandal, K. and Ansari, A. 2007. "RAPD and ISSR Marker for Molecular Characterization of Teak (*Tectona grandis*) Plus Trees." *Journal of Tropical Forest Science*. 19(4) : 218-225.
- Nayeem, N. and Karvekar, M.D. 2009. "Preliminary Phytochemical Analysis and Wound Healing Activity of Various Extracts of the Frontal Leaves of *Tectona grandis*." *Pharmacologyonline*. 2 : 402-412.
- Nayeem, N. and Karvekar, M.D. 2010. "Isolation of Phenolic Compounds From the Methanolic Extract of *Tectona grandis*." *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 1(2) : 221-225.
- Nayeem, N. and Karvekar, M. D. 2011. "Anti Microbial and Anti-oxidant Properties of the Isolated Compounds From the Methanolic Extract from the Leaves of *Tectona grandis*." *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*. 2(4) :163-165.
- Nayeem, N. and Karvekar, M.D. 2012. "Effect of Plant Stages on Analgesic and Anti-inflammatory Activity of the Leaves of *Tectona grandis*." *European Journal of Experimental Biology*. 2(2) : 396-399.
- Neamatallah, A. Yan, L. Dewar, S.J. Austin, B. 2005. "An Extract from teak (*Tectona grandis*) Bark Inhibited *Listeria Monocytogenes* and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*." *Letters in Applied Microbiology*. 41 : 94-96.
- Niamke, F.B. Amusant, N. Stien, D. Chaix, G. Lozano, Y. Kadio, A.A. Lemenage, N. Goh, D. Adima, A.A. and Coulibaly, S.K. 2012. "4',5'-Dihydroxy-epiisocatalponol, a New Naphthoquinone from *Tectona grandis* L. f. Heartwood and Fungicidal Activity." *International Biodeterioration & Biodegradation*. 74 : 93-98.
- Nhuan, T.D. and Hwang, E.S. 2014. "Bioactive Compound Contents and Antioxidant Activity in Aronia (*Aronia melanocarpa*) Leaves Collected at Different Growth Stages." *Preventive Nutrition and Food Science*. 19(3) : 204-212.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Pooja, K. Chandra, S. Sukhbir L. Khokra, Priyanka S. Vipin S. and Vikas G. 2010 “Free Radical Scavenging Activity of *Tectona grandis* Roots.” *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 12(1) : 159-163.
- Purushotham, K.G. Arun, P. Johnsy Jayarani, J. Vasnthakumari, R. Sankar, L. and Raviprakash Reddy, B. 2010. “Synergistic In Vitro Antibacterial Activity of *Tectona grandis* Leaves with Tetracycline.” *International Journal of Pharmtech Research*. 2(1) : 519-523.
- Purushotham, K.G. and SanKar, L. 2013. “Screening of *in Vitro* Antibacterial Activity of *Tectona grandis* on Burn Pathogens.” *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 3(3) : 488-492.
- Ramachandran, S. Rajasekaran, A. and Kumar, M.K.T. 2011. “Antidiabetic, Hyperlipidemic and Antioxidant Potentials of methanol Extract of *Tectona grandis* Flowers in Streptozotocin Induced Diabetic Rats.” *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 4(8) : 624–631.
- Ramesh, B.N. and Mahalakshmi, A.M. 2014. “Teak (*Tectona grandis*):A Renowned Timber Plant with Potential Medicinal Values. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 6(1) : 48-54.
- Rao, K.N.V. Aradhana, R. David, B. Chaitanya, R.S. and Kumar, A. 2011. “*In-vitro* Anti-Oxidant and Free Radical Scavenging Activity of Various Extracts of *Tectona grandis* Linn Leaves.” *Journal of Pharmacy Research*. 4(2) : 440–442.
- Rodney, L. Rosa, M.V. Jose, M.G.M. Clara, N. and Francisco, A.M. 2012. “Tectonoelins, New Norlignans from a Bioactive Extract of *Tectona grandis*.” *Phytochemistry Letters*. 5 : 382-386.
- Ruslan, M. 2010. “Inflammation 2010 : New Adventures of an Old Flame.” *Cell*. 140 : 771-776.
- Salem, N. Jazia, S. Olfa, B. Kamel, M. Saber, K. M. H. Majdi Saoussen, S. Emna, B. Marwa, O. Nesrine, H. Manef, A. Brahim, M. Ferid, L. Jouda, M. and Ben, J. 2018.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- “Phenological Stage Effect on Phenolic Composition and Repellent Potential of *Mentha pulegium* Against *Tribolium castaneum* and *Lasioderma serricorne*.” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 8(4) : 207-216.
- Sangeetha, K. Purushothaman, I. and Rajarajan, S. 2017. “Spectral Characterization, Antiviral Activities, in Silico ADMET and Molecular Docking of the Compounds Isolated from *Tectona grandis* to Chikungunya Virus.” *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 87 : 302–310.
- Sautebin, L. 2000. “Prostaglandins and Nitric Oxide as Molecular Targets for Anti-inflammatory Therapy.” *Fitoterapia*. 71 : 48-57.
- Sawangproh, Weerachon. 2018. **Snow and Plants**. [Online]. Available : <http://ostervangsvagen.blogspot.com/2018/01/snow-and-plants.html>.
- Setiawan, C. Purnomo, H. and Kusmadi, J. 2013. “Application of Microwave-Assisted Extraction on Teak (*Tectona grandis*) Leaves Antioxidant Extraction.” *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 4(3) : 1012-1018.
- Shalini and Srivastava, R. 2009. “Antifungal Activity Screening and HPLC Analysis of Crude Extract from *Tectona grandis*, *Shilajit*, *Valeriana Wallachi*.” *Electronic journal of environmental, agricultural and food chemistry*. 8(4) : 218–229.
- Shruthi, D.P. Sunith, K.E. Haritha, E. Govindappa, M. and dalingseshwara, K.G. 2012. “Phytochemical Screening, Anti-inflammatory Activity of Different Extracts from Leaf, Stem and Bark of *Tectona grandis*.” *International Journal of Research in Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 1(2) : 140-146.
- Solano, F. Briganti, S. Picardo, M. and Ghanem, G. 2006. “Hypopigmenting Agents: An Updated Review on Biological, Chemical and Clinical Aspects.” *Pigment Cell Research*. 19(6) : 550-571
- Sudsai, T. Wattanapiromsakul, C. Nakpheng, T. and Tewtrakul, S. 2013. “Evaluation of the Wound Healing Property of *Bosesenbergia longgiflora* Rhizome.” *Journal of Ethnopharmacology*. 150(1) : 223-231.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Sumthong, P. Damveld, R.A. Choi, Y.H. Arentshorst, M. Ram, A.F. and Hondel, V.C.A. 2006. "Activity of Quinones from Teak (*Tectona grandis*) on Fungal Cell Wall Stress." *Planta Medica*. 72 : 943-944.
- Suseela, L. and Parimala. 2017. "Antimicrobial Activities of *Tectona grandis* Leaf and Bark Extracts." *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 4(12) : 245-248.
- Tan, N. Satana, D. Sen, B. Tan, E. Altan, H.B. Demirci, B, and Uzun, M. 2016. "Antimycobacterial and Antifungal Activities of Selected Four *Salvia* Species." *Records of Natural Products*. 10 : 593-603.
- Thakor, M.C. Fougat, R.S. Kumar. and Sakure, A.A. 2019. "Sequence-related Amplified Polymorphism (SRAP) Analysis of Teak (*Tectona grandis* L.) Germplasm." *Ecological Genetics and Genomics*. 12 : 1-6.
- Varma, S.B. and Jaybhaye, D.L. 2010. "Antihyperglycemic Activity of *Tectona grandis* Linn. Bark Extract on Alloxan Induced Diabetes in Rats." *Natural Product Research*. 24(11) : 1059-1068.
- Varma, S.B. and Giri SP. 2013. "Study of wound healing activity of *Tectona grandis* Linn. Leaf Extract on Rats." *Ancient Sci Life*. 32(4) : 241-244.
- Vliet, A.V.D. Eiserich, J. and Cross, C.E. 2000. "Nitric Oxide: a Pro-inflammatory Mediator in Lung Disease." *Respiratory Research*. 1(2) : 67-72.
- Wijaya, C. Elya, B. and Yanuar, A. 2018. "Study of Tyrosinase Inhibitory Activity and Phytochemical Screening of *Cassia Fistula* L. Leaves." *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 10(1) : 384-387.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. การเตรียมอาหาร Brain heart infusion agar (BHI agar)

ชั่งอาหารสำเร็จ Brain heart infusion 37 กรัม และผงวุ้น 15 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. การเตรียมอาหาร Brain heart infusion Broth (BHI Broth)

ชั่งอาหารสำเร็จ Brain heart infusion 1.85 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำไปละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยไมโครเวฟ แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. การเตรียมอาหาร Mueller hinton agar (MHA)

ชั่งอาหารสำเร็จ Mueller hinton 38 กรัม และผงวุ้น 15 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. การเตรียมอาหาร Mueller hinton broth (MHB)

ชั่งอาหารสำเร็จ Mueller hinton 1.90 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำไปละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยไมโครเวฟ แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. การเตรียมอาหาร Nutrient agar (NA)

ชั่งอาหารสำเร็จ Nutrient broth 13 กรัม และผงวุ้น 15 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6. การเตรียมอาหาร Nutrient broth (NB)

ชั่งอาหารสำเร็จ Nutrient broth 0.65 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำไปละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยไมโครเวฟ แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7. การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85%

ชั่ง NaCl 0.85 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

8. การเตรียมสารในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การเตรียมสารละลาย Phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย Phosphate buffer pH 6.8 อ้างอิงตามวิธีของ Gomori (1995) เตรียมสารละลาย A ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยชั่งสาร $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 7.80 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย B ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยชั่งสาร $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 8.90 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลาย A ปริมาตร 24.50 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 25.50 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 6.8 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การเตรียมสารละลาย L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)

การเตรียมสารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร L-DOPA 4.93 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลาย Phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมเอนไซม์ไทโรซิเนส

การเตรียมเอนไซม์ไทโรซิเนส ความเข้มข้น 25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยทำการเจือจางสารละลายจาก Stock ของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากความเข้มข้น 1000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยดูดสารละลายจาก Stock มาปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 900 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

9. การเตรียมสารในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไนตริกออกไซด์

การเตรียม Phosphate buffer saline (PBS)

การเตรียม Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำ PBS สำเร็จรูป 1 เม็ด ใส่ลงในปีกเกอร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย Magnetic stirrer และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การเตรียม Sodium nitroprusside (SNP)

การเตรียม Sodium nitroprusside (SNP) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยชั่ง SNP 2.9795 มิลลิกรัม ละลายด้วย Phosphate buffer saline (PBS)

การเตรียม lipopolysaccharide (LPS)

การเตรียม Stock ของ lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง LPS 1 มิลลิกรัม ละลายด้วย Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร และเจือจางจาก Stock ของ LPS ให้ได้ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

การเตรียม Indomethacin

การเตรียม stock ของ Indomethacin ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร และเจือจางจาก Stock ของ Indomethacin ให้ได้ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

การเตรียม Stock สารสกัดจากใบสัก

การเตรียม Stock สารสกัดจากใบสัก ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้นไม่เกินร้อยละ 2 และ Phosphate buffer saline (PBS) จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.22 ไมโครเมตร และเจือจางจาก stock ของสารสกัดใบสัก ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

10. การเตรียมสารละลาย Anisaldehyde reagent

การเตรียมสารละลาย Anisaldehyde reagent ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยผสม Absolute ethanol ปริมาตร 90 มิลลิลิตร p-Anisaldehyde ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน และเก็บในขวดสีชา เพื่อป้องกันแสง

11. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยละลายอาหาร RPMI 1640 ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Magnetic stirrer จากนั้นเติม NaHCO_3 ปริมาณ 2 กรัม และผสมให้เข้ากันจนกว่า NaHCO_3 จะละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ในขวดแก้ว ปราศจากเชื้อ ภายในตู้ Laminar air flow และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

12. การเตรียม Fetal bovine serum (FBS)

การเตรียม Fetal bovine serum (FBS) โดย Inactivate ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ และเมื่ออุณหภูมิถึง 56 องศาเซลเซียส ให้บ่มต่ออีกเป็นเวลา 30 นาที และเขย่าทุก ๆ 10 นาที จากนั้นแบ่งใส่ขวดที่ปราศจากเชื้อขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

13. การเตรียมอาหาร Complete media

การเตรียม Complete media ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยผสม RPMI 1640 กับ ร้อยละ 8 ของ FBS แล้วเติมยาปฏิชีวนะ Gentamicin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ในขวดแก้วที่ปราศเชื้อ ภายในตู้ Laminar air flow และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

14. การเตรียมสารละลาย 3X CTAB buffer

การเตรียมสารละลาย 3X CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่ง CTAB ปริมาณ 3 กรัม Polyvinylpyrrolidone (PVP) ปริมาณ 1 กรัม ลงในบีกเกอร์ ละลายด้วยสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลาย NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 28 มิลลิลิตร และสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Magnetic stirrer จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

15. การเตรียมสารละลาย 10% CTAB buffer

การเตรียมสารละลาย 10% CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร CTAB ปริมาณ 10 กรัม ละลายด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Magnetic stirrer และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

16. การเตรียมสารละลาย Tris-EDTA (TE) buffer

การเตรียมสารละลาย TE buffer ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำโดยการผสมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (pH 8.0) ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร กับสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

17. การเตรียมสารละลาย 10X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer

การเตรียมสารละลาย 10X TBE buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยทำการชั่งสาร Tris-base ปริมาณ 108 กรัม Boric acid ปริมาณ 61.83 กรัม และ EDTA ปริมาณ 9.305 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 900 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 8.0 ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

18. การเตรียมสารละลาย dNTPs

การเตรียมสารละลาย dNTPs ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สำหรับใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดยผสมสารละลาย dATP, dTTP, dGTP และ dCTP ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร ผสมกับ Nuclease free water ปริมาตร 95 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองปราศจากเชื้อขนาด 1.5 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

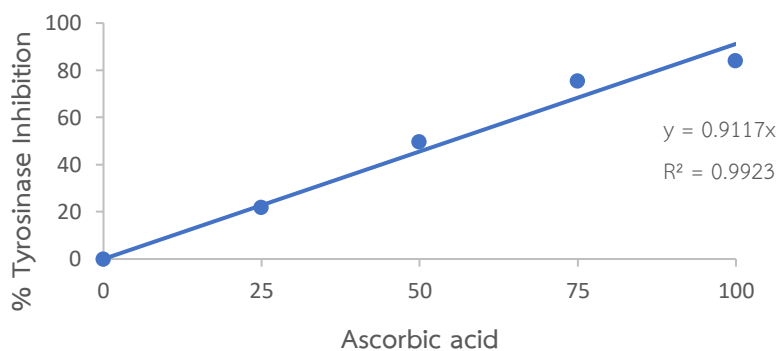
ภาคผนวก ข

1. การคำนวณค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

นำค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 25-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตารางภาคผนวกที่ ข-1 มาสร้างกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกกับค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดังรูปภาคผนวกที่ ข-1

ตารางภาคผนวกที่ ข-1 สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

| ความเข้มข้นของสาร มาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (µg/ml) | ค่าร้อยละการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส | | | ค่าเฉลี่ย |
|--|---|-------|-------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 25 | 20.12 | 23.26 | 22.08 | 21.82 |
| 50 | 48.68 | 45.54 | 54.91 | 49.71 |
| 75 | 74.23 | 78.64 | 73.69 | 75.52 |
| 100 | 81.73 | 84.58 | 85.69 | 84.00 |



รูปภาคผนวกที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้นต่าง ๆ และค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากกราฟมาตรฐานดังรูปภาคผนวกที่ ข-1 ได้สมการดังนี้

$$Y = 0.9117x \quad (\text{ข-1})$$

โดย Y คือ ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

และจากสมการ (ข-1) เมื่อหาค่า X จะได้ $X = y/0.9117$ (ข-2)

ถ้าหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานจากสมการโดยแทนค่า y เท่ากับ ร้อยละ 50 ในสมการที่ (ข-2) ได้ดังนี้

$$X = 50/0.9117$$

$$X = 54.84$$

ค่า IC₅₀ ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ได้จากการคำนวณ เท่ากับ 54.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC₅₀ ของสารมาตรฐานแอสคอร์บิกที่ได้จากโปรแกรม GraphPad 8.4.2 เท่ากับ 50.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยในบทที่ 4 ได้รายงานค่าของ IC₅₀ ของสารมาตรฐานแอสคอร์บิกที่ได้จากโปรแกรม GraphPad 8.4.2 คือ 50.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

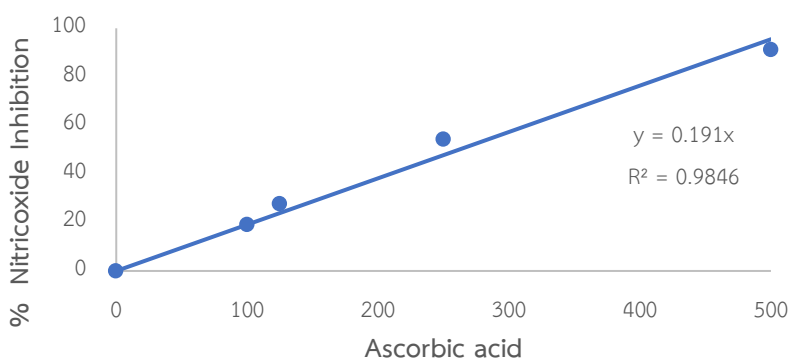
ตารางภาคผนวกที่ ข-2 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาดเมทานอลจากใบสักที่ความเข้มข้น 1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

| สารสกัด | ค่าร้อยละการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส | | | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน |
|---------|---|-------|-------|-----------|--------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| CTF | 67.42 | 65.03 | 74.47 | 68.97 | 2.83 |
| CTD | 69.89 | 77.97 | 67.13 | 71.66 | 3.25 |
| CPF | 75.67 | 74.83 | 64.96 | 71.73 | 3.53 |
| CPD | 74.43 | 72.03 | 74.48 | 73.65 | 0.81 |
| PTF | 38.37 | 41.56 | 40.42 | 40.12 | 3.41 |
| PTD | 37.99 | 33.40 | 39.65 | 37.01 | 1.52 |
| PPF | 38.83 | 42.13 | 42.32 | 41.09 | 1.13 |
| PPD | 61.59 | 50.00 | 58.03 | 56.54 | 3.43 |
| STF | 63.26 | 58.69 | 49.71 | 57.22 | 3.98 |
| STD | 45.52 | 50.8 | 63.86 | 53.39 | 5.45 |
| SPF | 55.12 | 55.26 | 58.03 | 56.14 | 0.95 |
| SPD | 60.80 | 60.31 | 58.45 | 59.85 | 0.72 |
| LTF | 55.53 | 54.63 | 51.15 | 53.77 | 1.34 |
| LTD | 63.04 | 65.41 | 61.79 | 63.41 | 1.06 |
| LPF | 54.69 | 58.79 | 64.93 | 59.47 | 2.98 |
| LPD | 41.34 | 40.92 | 30.79 | 37.68 | 3.46 |
| KTF | 33.19 | 39.13 | 34.03 | 35.45 | 1.86 |
| KTD | 45.56 | 30.90 | 35.48 | 37.32 | 4.32 |
| KPF | 38.37 | 41.56 | 40.42 | 40.12 | 0.93 |
| KPD | 37.99 | 33.40 | 39.65 | 37.01 | 1.87 |

ภาคผนวกที่ ข-3 สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์

| ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ($\mu\text{g/ml}$) | ค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ | | | ค่าเฉลี่ย |
|---|----------------------------------|-------|-------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 100 | 19.08 | 18.78 | 19.67 | 19.16 |
| 125 | 28.26 | 26.09 | 29.12 | 27.82 |
| 250 | 53.98 | 55.03 | 53.90 | 54.30 |
| 500 | 93.87 | 90.11 | 89.76 | 91.21 |

นำค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 100-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตารางภาคผนวกที่ ข-3 มาสร้างกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกกับค่าร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ดังรูปภาคผนวกที่ ข-2



รูปภาคผนวกที่ ข-2 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้นต่าง ๆ และค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์

จากกราฟมาตรฐานดังรูปภาคผนวกที่ ข-2 ได้สมการดังนี้

$$Y = 0.191x \quad (\text{ข-3})$$

โดย Y คือ ร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์

X คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

และจากสมการ (ข-3) เมื่อหาค่า X จะได้ $X = y/0.191$ (ข-4)

ถ้าหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานจากสมการโดยแทนค่า y เท่ากับ ร้อยละ 50 ในสมการที่ (ข-4) ได้ดังนี้

$$X = 50/0.191$$

$$X = 261.78$$

ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ได้จากการคำนวณ เท่ากับ 261.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานแอสคอร์บิกที่ได้จากโปรแกรม GraphPad 8.4.2 เท่ากับ 221.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยในบทที่ 4 ได้รายงานค่าของ IC_{50} ของสารมาตรฐานแอสคอร์บิกที่ได้จากโปรแกรม GraphPad 8.4.2 คือ 221.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางภาคผนวก ข-4 ค่าเฉลี่ยของร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ด้วยวิธี NOA ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักที่ ความเข้มข้น 100, 125, 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

| สถานที่ | แม่ไม้ | ค่าเฉลี่ยของร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ | | | | | | | | | |
|-----------|-----------|---|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| | | ใบสด | | | | | ใบร่วง | | | | |
| | | 100 | 125 | 250 | 500 | 1000 | 100 | 125 | 250 | 500 | 1000 |
| ทองผาภูมิ | เชียงใหม่ | 60.94 | 64.07 | 67.97 | 80.47 | 82.03 | 50.33 | 51.31 | 53.35 | 64.76 | 65.00 |
| | แพร่ | 32.20 | 50.86 | 64.87 | 74.15 | 86.03 | 69.53 | 71.87 | 77.34 | 89.06 | 92.96 |
| | สุโขทัย | 35.02 | 40.55 | 51.21 | 53.33 | 77.18 | 44.73 | 53.94 | 56.57 | 57.89 | 63.83 |
| | ลำปาง | 65.06 | 69.17 | 84.93 | 84.24 | 89.97 | 54.10 | 65.75 | 74.42 | 77.17 | 80.13 |
| | ขอนแก่น | 44.59 | 47.30 | 52.70 | 62.16 | 67.57 | 42.79 | 57.43 | 59.45 | 64.18 | 71.62 |
| พิษณุโลก | เชียงใหม่ | 36.24 | 46.64 | 53.35 | 54.36 | 56.37 | 40.00 | 50.00 | 50.00 | 55.00 | 58.00 |
| | แพร่ | 62.29 | 65.74 | 67.59 | 87.96 | 90.74 | 42.59 | 49.07 | 64.81 | 76.85 | 86.38 |
| | สุโขทัย | 40.78 | 61.18 | 69.07 | 77.63 | 92.10 | 48.06 | 55.91 | 67.75 | 70.39 | 73.68 |
| | ลำปาง | 42.46 | 61.64 | 70.23 | 71.91 | 74.65 | 59.18 | 63.01 | 72.79 | 76.02 | 83.56 |
| | ขอนแก่น | 47.29 | 68.24 | 74.99 | 80.40 | 92.56 | 68.92 | 73.17 | 86.48 | 91.44 | 97.97 |

ตารางภาคผนวก ข-5 ค่าเฉลี่ยของการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบสักของแม่ไม้แพร์ และลำปาง ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.50, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับยาปฏิชีวนะ อินโดเมทาซิน

| สถานที่ | แม่ไม้ | ค่าเฉลี่ยของร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ | | | | | | | | | |
|--------------|--------|---|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| | | ใบสด | | | | | ใบร่วง | | | | |
| | | 6.25 | 12.50 | 25 | 50 | 100 | 6.25 | 12.50 | 25 | 50 | 100 |
| ทองผาภูมิ | แพร์ | 57.14 | 67.85 | 70.23 | 83.33 | 96.43 | 59.52 | 72.61 | 79.76 | 88.09 | 92.85 |
| | ลำปาง | 76.25 | 77.5 | 86.88 | 91.87 | 93.75 | 45.16 | 51.51 | 58.06 | 64.52 | 80.64 |
| พิษณุโลก | แพร์ | 54.76 | 60.24 | 70.24 | 80.95 | 89.29 | 55.00 | 70.62 | 79.37 | 83.13 | 91.87 |
| | ลำปาง | 76.25 | 81.87 | 84.37 | 88.13 | 93.13 | 33.65 | 40.38 | 58.06 | 70.97 | 79.41 |
| อินโดเมทาซิน | | 53.57 | 58.33 | 61.9 | 79.76 | 84.52 | | | | | |

ภาคผนวก ค

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากใบสักด้วยเทคนิค GC-MS

ตารางภาคผนวก ค-1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากใบสักของ HPTF จากสารสกัด
ส่วนย่อยที่ 3 ด้วยเทคนิค GC-MS

| ลำดับ | RT (min) | องค์ประกอบของสาร | สูตร โมเลกุล | มวล โมเลกุล | % of total |
|-------|-------------|--|--|----------------|---------------|
| 1 | 12.975 | Undecane | C ₁₁ H ₂₄ | 156.31 | 0.521 |
| 2 | 21.375 | Phenol, 2,4-bis-(1,1-dimethylethyl) | C ₁₇ H ₃₀ OSi | 278.50 | 1.755 |
| 3 | 23.745 | 6,8-Nonadien-2-one, 6-methyl-5-(1-methylethylidene)- | C ₁₃ H ₂₀ O | 192.30 | 1.701 |
| 4 | 27.030 | 3-Homoadamantanecarboxylic acid | C ₁₂ H ₁₈ O ₂ | 194.27 | 0.710 |
| 5 | 27.802 | Hexadecanoic acid methyl ester | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 270.40 | 3.037 |
| 6 | 28.374 | Dibutyl phthalate | C ₁₆ H ₂₂ O ₄ | 278.34 | 0.937 |
| 7 | 35.874 | Gamma-Sitosterol | C ₂₉ H ₅₀ O | 414.70 | 76.925 |
| 8 | 38.318 | 1,3-Bis (trimethylsilyl) benzene | C ₆ H ₄ [Si (CH ₃) ₃] | 222.47 | 14.414 |

RT = Retention time

ตารางภาคผนวก ค-2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากใบสักของ HPTF จากสารสกัด
ส่วนย่อยที่ 4 ด้วยเทคนิค GC-MS

| ลำดับ | RT (min) | องค์ประกอบของสาร | สูตรโมเลกุล | มวล โมเลกุล | % of total |
|-------|-------------|-------------------------------------|--|----------------|---------------|
| 1 | 12.964 | Undecane | C ₁₁ H ₂₄ | 156.31 | 8.252 |
| 2 | 21.365 | Phenol, 2,4-bis-(1,1-dimethylethyl) | C ₁₇ H ₃₀ OSi | 278.50 | 14.799 |
| 3 | 27.791 | Hexadecanoic acid methyl ester | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 270.40 | 14.171 |
| 4 | 28.363 | Dibutyl phthalate | C ₁₆ H ₂₂ O ₄ | 278.34 | 15.688 |
| 5 | 34.498 | Hexanedioic acid | C ₆ H ₁₀ O ₄ | 146.14 | 23.226 |
| 6 | 35.998 | Octasiloxane | C ₁₈ H ₅₄ O ₇ Si ₈ | 607.30 | 16.198 |

RT = Retention time

ตารางภาคผนวก ค-3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากใบสักของ HPTD จากสารสกัด
ส่วนย่อยที่ 3 ด้วยเทคนิค GC-MS

| ลำดับ | RT (min) | องค์ประกอบของสาร | สูตรโมเลกุล | มวล โมเลกุล | % of total |
|-------|-------------|--|--|----------------|---------------|
| 1 | 12.959 | Undecane | C ₁₁ H ₂₄ | 156.31 | 0.189 |
| 2 | 19.623 | Alpha-Campholenal | C ₁₀ H ₁₆ O | 152.23 | 0.611 |
| 3 | 21.360 | Phenol, 2,4-bis (1,1- dimethylethyl) | C ₁₇ H ₃₀ OSi | 21.360 | 0.818 |
| 4 | 23.518 | Carveol 1 | C ₁₀ H ₁₆ O | 152.23 | 0.970 |
| 5 | 23.907 | Ledene | C ₁₅ H ₂₄ | 204.35 | 1.389 |
| 6 | 24.592 | Spiro [4.5] decane, 6-methylene | C ₁₁ H ₁₈ | 150.26 | 1.304 |
| 7 | 24.867 | 2-Cyclohexen-1-one, 3-(3- hydroxybutyl)-2,4,4-trimethyl | C ₁₃ H ₂₂ O ₂ | 210.31 | 1.516 |
| 8 | 25.660 | Bicyclo [3.1.0] hexan-2-one,3,3,6- trimethyl- | C ₉ H ₁₄ O | 138.21 | 5.652 |
| 9 | 27.387 | 2-Heptanone, 6-methyl-6-[3- methyl-3-(1-methylethenyl)-1- cyclopropen-1-yl]- | C ₁₅ H ₂₄ O | 220.35 | 2.146 |
| 10 | 27.791 | Hexadecanoic acid, methyl ester | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 270.40 | 4.048 |
| 11 | 28.342 | Hexadecanoic acid | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 256.40 | 3.848 |
| 12 | 29.151 | Isopropyl Palmitate | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ | 298.50 | 2.306 |
| 13 | 30.176 | 9-Octadecenoic acid, methyl ester | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | 296.50 | 2.561 |
| 14 | 30.500 | Octadecanoic acid, methyl ester | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ | 298.50 | 1.052 |

RT = Retention time

ตารางภาคผนวก ค-3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากใบสักของ HPTD จากสารสกัด
ส่วนย่อยที่ 3 ด้วยเทคนิค GC-MS (ต่อ)

| ลำดับ | RT (min) | องค์ประกอบของสาร | สูตรโมเลกุล | มวล โมเลกุล | % of total |
|-------|-------------|--|---|----------------|---------------|
| 15 | 32.119 | 3',5'-Bis (trifluoromethyl) acetophenone | C ₁₀ H ₆ F ₆ O | 256.14 | 3.926 |
| 16 | 32.281 | Tetradecanoic acid, 2-hydroxy- | C ₁₄ H ₂₈ O ₃ | 244.37 | 4.344 |
| 17 | 34.498 | Hexanedioic acid, bis (2- ethylhexyl) ester | C ₂₂ H ₄₂ O ₄ | 370.60 | 3.268 |
| 18 | 36.289 | Bis (2-ethylhexyl) phthalate | C ₂₄ H ₃₈ O ₄ | 390.60 | 2.293 |
| 19 | 39.079 | 9,10-Methanthracen-11-ol, 9,10-dihydro-9,10,11-trimethyl- | C ₁₈ H ₁₈ O | 250.30 | 2.819 |
| 20 | 44.113 | Stigmasterol | C ₂₉ H ₄₈ O | 412.70 | 1.491 |
| 21 | 45.106 | <i>Gamma.</i> -Sitosterol | C ₂₉ H ₅₀ O | 414.70 | 3.510 |

RT = Retention time

ตารางภาคผนวก ค-4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากใบสักของ HPTD จากสารสกัด
ส่วนย่อยที่ 4 ด้วยเทคนิค GC-MS

| ลำดับ | RT (min) | องค์ประกอบของสาร | สูตรโมเลกุล | มวล โมเลกุล | % of total |
|-------|-------------|------------------------------|---|----------------|---------------|
| 1 | 12.959 | Undecane | C ₁₁ H ₂₄ | 156.31 | 3.847 |
| 2 | 23.863 | Alloocimene | C ₁₀ H ₁₆ | 136.23 | 4.877 |
| 3 | 25.293 | (-) -Spathulenol | C ₁₅ H ₂₄ O | 220.35 | 10.160 |
| 4 | 26.378 | 2-Dimethylguanosine | C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₅ | 311.29 | 5.769 |
| 5 | 28.363 | Butyl 2-ethylhexyl phthalate | C ₂₀ H ₃₀ O ₄ | 334.40 | 5.683 |
| 6 | 34.498 | Di (2-ethylhexyl) adipate | C ₂₂ H ₄₂ O ₄ | 370.60 | 14.284 |
| 7 | 36.289 | Bis (2-ethylhexyl) phthalate | C ₂₄ H ₃₈ O ₄ | 390.60 | 7.755 |

RT = Retention time

ตารางภาคผนวก ค-5 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากใบสักของ DPTF จากสารสกัด
ส่วนย่อยที่ 3 ด้วยเทคนิค GC-MS

| ลำดับ | RT (min) | องค์ประกอบของสาร | สูตรโมเลกุล | มวล โมเลกุล | % of total |
|-------|-------------|--|--|----------------|---------------|
| 1 | 12.964 | Undecane | C ₁₁ H ₂₄ | 156.31 | 12.155 |
| 2 | 21.360 | Phenol, 2,4-bis (1,1- dimethylethyl)- | C ₁₇ H ₃₀ OSi | 21.360 | 4.877 % |
| 3 | 27.786 | Hexadecanoic acid, methyl ester | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 270.40 | 12.879 |

RT = Retention time

ตารางภาคผนวก ค-6 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากใบสักของ DPTF จากสารสกัด
ส่วนย่อยที่ 4 ด้วยเทคนิค GC-MS

| ลำดับ | RT (min) | องค์ประกอบของสาร | สูตรโมเลกุล | มวล โมเลกุล | % of total |
|-------|-------------|--|--|----------------|---------------|
| 1 | 12.964 | Undecane | C ₁₁ H ₂₄ | 156.31 | 0.326 |
| 2 | 21.360 | Phenol, 2,4-bis (1,1- dimethylethyl)- | C ₁₇ H ₃₀ OSi | 21.360 | 0.469 |
| 3 | 28.358 | Dibutyl phthalate | C ₁₆ H ₂₂ O ₄ | 278.34 | 0.725 |
| 4 | 29.151 | Isopropyl palmitate | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ | 298.50 | 0.394 |
| 5 | 30.171 | 9-octadecenoic acid, methyl ester | C ₁₉ H ₃₄ O ₃ | 310.50 | 0.434 |
| 6 | 34.482 | Octadecane | C ₁₈ H ₃₈ | 254.50 | 4.196 |
| 7 | 35.696 | Pentacosane | C ₂₅ H ₅₂ | 352.70 | 7.148 |
| 8 | 36.284 | Bis (2-ethylhexyl) phthalate | C ₂₄ H ₃₈ O ₄ | 390.60 | 1.290 |
| 9 | 36.769 | Eicosane | C ₂₀ H ₄₂ | 282.5 | 12.181 |
| 10 | 37.730 | Docosane | C ₂₂ H ₄₆ | 310.60 | 16.251 |
| 11 | 38.599 | Tetracosane | C ₂₄ H ₅₀ | 338.70 | 18.785 |
| 12 | 39.462 | Pentacosane | C ₂₅ H ₅₂ | 352.7 | 19.733 |
| 13 | 40.438 | Triacontane | C ₃₀ H ₆₂ | 422.8 | 18.067 |

RT = Retention time

ตารางภาคผนวก ค-7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากใบสักของ DPTD จากสารสกัด
ส่วนย่อยที่ 3 ด้วยเทคนิค GC-MS

| ลำดับ | RT (min) | องค์ประกอบของสาร | สูตรโมเลกุล | มวล โมเลกุล | % of total |
|-------|-------------|--|--|----------------|---------------|
| 1 | 12.959 | Undecane | C ₁₁ H ₂₄ | 156.31 | 10.019 |
| 2 | 21.354 | Phenol, 2,4-bis (1,1- dimethylethyl)- | C ₁₀ H ₁₆ | 136.23 | 15.388 |
| 3 | 28.363 | Dibutyl phthalate | C ₁₆ H ₂₂ O ₄ | 278.34 | 7.480 |
| 4 | 32.097 | Dibenzo (B, def) carbazole | C ₁₈ H ₁₁ N | 241.30 | 17.447 |
| 5 | 34.493 | Hexanedioic acid, bis (2- ethylhexyl) ester | C ₂₂ H ₄₂ O ₄ | 370.60 | 19.971 |

RT = Retention time

ตารางภาคผนวก ค-8 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากใบสักของ DPTD จากสารสกัด
ส่วนย่อยที่ 4 ด้วยเทคนิค GC-MS

| ลำดับ | RT (min) | องค์ประกอบของสาร | สูตรโมเลกุล | มวล โมเลกุล | % of total |
|-------|-------------|---|--|----------------|---------------|
| 1 | 4.099 | Cyclopentanol, 1-methyl- | C ₆ H ₁₂ O | 100.16 | 22.505 |
| 2 | 12.959 | Undecane | C ₁₁ H ₂₄ | 156.31 | 5.620 |
| 3 | 21.360 | Phenol, 2,4-bis (1,1- dimethylethyl)- | C ₁₀ H ₁₆ | 136.23 | 9.166 |
| 4 | 25.617 | Loliolide | C ₁₁ H ₁₆ O ₃ | 196.24 | 12.872 |
| 5 | 27.786 | Glycinamide hydrochloride | C ₂ H ₇ ClN ₂ O | 110.54 | 4.737 |
| 6 | 28.358 | Phthalic acid, butyl 2- ethylhexyl ester | C ₂₀ H ₃₀ O ₄ | 334.40 | 6.421 |
| 7 | 29.146 | 1-Dodecanamine | C ₁₂ H ₂₇ N | 185.35 | 5.636 |
| 8 | 33.327 | 6H-Pyrazolo [1,2-a] [1,2,4,5] tetrazine, hexahydro-2,3- dimethyl- | C ₇ H ₁₆ N ₄ | 156.23 | 3.683 |

RT = Retention time

ผลงานทางวิชาการ

Antibacterial and anti-tyrosinase activities of the methanolic extracts from leaves of *Tectona grandis*

Phonmakham, J.¹, Wattanasuksakul, S.² and Poeaim, S.^{1*}

¹Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok, Thailand; ²Forest Research and Development Bureau Royal Forest Department Phaholyothin Road, Chatuchak, Bangkok, Thailand.

Phonmakham, J., Wattanasuksakul, S. and Poeaim, S. (2018). Antibacterial and anti-tyrosinase activities of the methanolic extracts from leaves of *Tectona grandis*. International Journal of Agricultural Technology 14(7): 1611-1618.

Abstract The antibacterial and anti-tyrosinase activities of methanolic extracts from fresh and fallen leaves of *Tectona grandis* (Teak) was studied. Fresh and fallen of teak leaves were collected from Thongphaphum and Phitsanulok silviculture research station. Antibacterial activity was determined by disc diffusion method with concentration at 500 µg/disc. Fresh and fallen of teak leaves extracts showed a good activity against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. In the other hand, fresh teak leaves inhibited growth of *Propionibacterium acnes* better than fallen teak leaves. The anti-tyrosinase activity was determined by Dopachrome method with concentration at 1500 µg/ml, inhibitory power of tyrosinase enzyme from fresh and fallen leaves extracts value were detected in the percentage between 35.45%-73.65%.

Keywords: Antibacterial, Anti-tyrosinase, *Tectona grandis*, Teak

Introduction

The plants have been used as medicine for a long time and apply effectively for to develop a natural product. *Tectona grandis* or Teak is a plant in the Verbenaceae family found most in South-East Asian countries, including Thailand, Myanmar and Indonesia. The extracts from different parts of *T. grandis* can used as the medical properties such as hair growth activity, antioxidant activity, cytotoxic, anti-inflammatory, anti-hyperglycemic and diuretic (Nidavani and Am, 2014).

In the previous reports that the methanolic extracts from leaves of *T. grandis* with tetracycline and essential oils had the antibacterial activity. (Purushotham *et al.*, 2010; Aboaba *et al.*, 2013). The antibiotic is powerful medicines that resistant bacterial infection, the development of new drugs from plants for the antibacterial activity (Cushnie and Lamb, 2005; Farjana *et al.*, 2014; Wikaningtyas and Sukandar, 2016).

* **Corresponding Author:** Poeaim, S.; **Email:** poeaim@hotmail.com

Melanin is pigment produced by melanocyte in skin, the factors that stimulate the melanin product, including ultraviolet radiation, sunlight, etc. The action of ultraviolet radiation light stimulating the tyrosinase enzyme. The tyrosinase enzyme is involved in the oxidation and reduction process in the epidermis for controlling the production of melanin, this enzyme responsible for color change to browning (Stacey *et al.*, 2016). In the previous reports the antioxidant and anti-tyrosinase activities indicate for inhibition of melanin (Sun *et al.*, 2017; Haliloglu *et al.*, 2017). Whereas, the anti-tyrosinase activity of *T. grandis* not have been reported.

In addition, have reported a comparison of biological activity age of leaves from the first stage and second stage of *Olea europaea* extracts and the ethanol extract from young and old leaves extracts of *Aronia melanocarpa* antioxidant activity (Brahmi *et al.*, 2013; Do Thi and Hwang 2014). While most of the literature in fresh leaves of *T. grandis*. The purpose of this study was compared antibacterial and anti-tyrosinase activity of methanolic extracts from fresh and fallen leaves of *Tectona grandis* (Teak).

Materials and methods

Plant material and extraction

The fresh and fallen leaves of 20 samples from 5 Plus tree are Chaingmai (CM), Phrae (PH), Sukhothai (ST), Lampang (LP) and Khonkaen (KK) of *T. grandis* were collected from Thongphaphum and Phitsanulok silviculture research station, Thailand showed in Figure 1. The sample of *T. grandis* leaves were blean to powder (50 g) after that soaked in methanol (250 ml) in dark room at room temperature for 7 days. Finally, the solvent was evaporating by rotary vacuum evaporator and the crude extracts keep to study.

Antibacterial activity

The antibacterial activity was performed by disc diffusion method were checked against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* was modified by Tendencia (2004). Bacterial were culture in Mueller-Hinton Broth, MHB (2 ml) and incubated at 37°C for 18-24 hours. Adjust turbidity by normal saline solution (0.85%) and determine by spectrophotometry the optical absorbance to 0.08-0.13 at 625 nm. Then, swab culture on Mueller-Hinton Agar (MHA) and dry the surface for 3-5 minutes. The crude extracts were dissolved in methanol and solutions were dropped on paper disc (500 µg/disc), place paper disc on MHA and incubated for 18-24

hours. After that measure the diameter of inhibition zone and gentamicin was used as a positive control and methanol was used as a negative control.

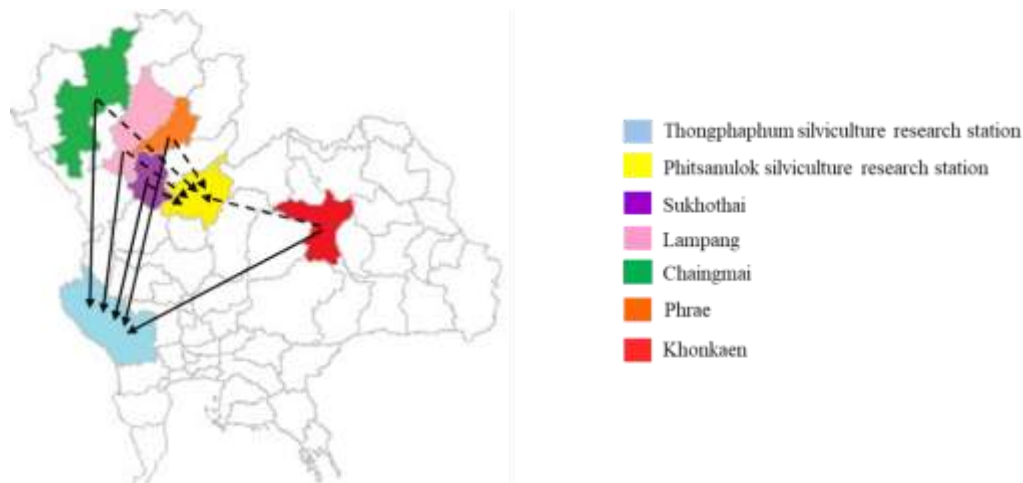


Figure 1. Different location, where the plus trees of *T. grandis* was collected from Thongphaphum and Phitsanulok silviculture research station, Thailand

Anti-tyrosinase activity

In the present study, the anti-tyrosinase activity follow the protocol to Chang and Tseng (2006) with few modifications. 20 μ l of tyrosinase enzyme (25 Unit/ml) mixed with 80 μ l of phosphate buffer (pH 6.8) and added 60 μ l of the sample (1500 μ g/ml), added into 96 well plate was incubated at 25°C in the dark room for 10 minutes. After added 40 μ l of of L-Dopachrome (2.5 mM) and incubated in the dark room for 20 minutes. The Dopachrome was checked in the absorbance at 475 nm with microplate reader. Inhibition the percentage of tyrosinase activity was calculated according to the equation.

$$\% \text{ Inhibition} = [(A - B) - (C - D) / (A - B)] \times 100$$

A is the absorbance at 475 nm with control, B is the absorbance at 475 nm with blank control, C is the the absorbance at 475 nm with sample and D is the absorbance at 475 nm with blank sample.

Statistical Analysis

For all the experiments, the results of antibacterial and anti-tyrosinase activites are presented as mean values \pm standard deviation (SD) using IBM

SPSS Statistics version 25.0. The differences between the samples were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's Multiple Range Test at $P < 0.05$ were considered significantly.

Results

Antibacterial activity

The antibacterial activity from fresh and fallen leaves extracts by disc diffusion method against *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. acnes* with concentration at 500 µg/disc. The diameter of inhibition zone showed that fresh (13.90±0.91mm) and fallen (13.45±0.70 mm) leaves extracts from Phrae, fresh leaves (12.45±0.30 mm) from Sukhothai, fresh leaves from Chaingmai (11.23±0.79 mm) and fallen (11.68±0.73 mm) leaves from Lampang at Thongphaphum silviculture research station good activity against *S. aureus*. Fresh (13.11±0.51 mm) and fallen (14.31±0.6 mm) leaves extract from Phrae, fallen (13.78±0.51 mm) leaves extract from Lampang and fallen (11.62±0.43 mm) leaves extract from Khonkaen at Thongphaphum silviculture research station inhibited growth of *S. epidermidis*. Fresh (14.01±0.22 mm) leaves extract at Thongphaphum silviculture research station, fallen (13.32±0.82 mm) leaves extract from Lampang at Pitsanulok, silviculture research station, fresh leaves extract from Sukhothai at Thongphaphum silviculture research station inhibited growth of *P. acnes* reported in Table 1 and Figure 2.



Figure 2. Inhibition zone of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. acnes* of *T. grandis* leaves extract from Phrae (1) Fresh leaves (2) fallen leaves at Thongphaphum silviculture research station, (3) Fresh leaves (4) fallen leaves at Phitsanulok silviculture research, (5) Positive control is gentamicin and (6) Negative control is methanol

Table 1. Inhibition zone of the methanolic extracts from leaves of *T. grandis*

| Bacterial strains | Location | Age of leaves | Mean diameter of inhibition zone (mm) at concentration 500 µg/disc | | | | | |
|-------------------|-----------------------|---------------|--|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|------------|
| | | | CM | PH | ST | LP | KK | |
| <i>S. aureus</i> | Thongphaphum | F | 11.23±0.79 ^b _c | 13.90±0.91 ^a | 12.45±0.30 ^a _b | - | - | |
| | | D | 9.09±1.38 ^{ef} | 13.45±0.70 ^a | 11.26±0.25 ^c _d | 11.68±0.73 ^b _c | - | |
| | Phitsanulok | F | 10.26±0.69 ^d _e | 9.80±0.67 ^{ef} | - | - | - | |
| | | D | 8.99±0.12 ^{ef} | 9.87±0.59 ^{ef} | - | 8.45±0.22 ^f | - | |
| | Gentamicin | | | 26.54±0.36 | 28.42±1.03 | 27.01±0.30 | 28.18±0.45 | 28.07±0.31 |
| | <i>S. epidermidis</i> | Thongphaphum | F | - | 13.11±0.51 ^{ab} | 9.94±0.54 ^d | - | - |
| D | | | - | 14.31±0.61 ^a | 9.79±0.01 ^d | 13.78±0.51 ^a | 11.62±0.43 ^c | |
| Phitsanulok | | F | - | - | - | - | - | |
| | | D | - | - | - | - | - | |
| Gentamicin | | | 31.40±1.64 | 32.93±0.20 | 32.62±0.18 | 31.35±0.63 | 31.41±0.96 | |
| <i>P. acnes</i> | | Thongphaphum | F | 9.82±0.15 ^d | 14.01±0.22 ^a | 12.11±0.05 ^c | - | - |
| | D | | - | - | 10.51±0.91 ^d | - | - | |
| | Phitsanulok | F | - | - | 8.76±1.83 ^c | - | - | |
| | | D | 7.88±0.27 ^c | - | - | 13.32±0.82 ^b | - | |
| | Gentamicin | | | 29.44±0.65 | 30.59±0.27 | 28.24±0.55 | 28.52±1.49 | 29.41±0.48 |

(F) fresh leaves extract, (D) fallen leaves extract, (CM) Chaingmai, (PH) Phrae, (ST) Sukhothai, (LP) Lanpang, (KK) Khonkaen and (-) not inhibition zone

^{a-f} Values followed by the same letters in the same column are not significantly different according to the Duncan's Multiple Range Test at $P < 0.05$

Anti-tyrosinase activity

The effect of *T. grandis* leaves extracts on tyrosinase activity by Dopachrome method was used ascorbic acid as standard. The results showed that percentage of inhibition of tyrosinase with concentration at 1.5 mg/ml. Fresh and fallen leaves from Chaingmai, Sukhothai of plus tree from Thonhphaphum and Pitsanulok silviculture research station inhibition tyrosinase enzyme greater than fifty percentage the values between 68.79%-73.65% and 57.22%-59.85%, respectively showed in Table 2 and Figure 3.

Table 2. The effect of *T. grandis* leaves extract on tyrosinase activity

| Location | Age of leaves | % Inhibition of tyrosinase | | | | |
|--------------|---------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | CM | PH | ST | LP | KK |
| Thongphaphum | F | 68.97±2.83 ^{ab} | 42.02±3.41 ^f | 57.22±3.98 ^{cde} | 53.77±1.34 ^{de} | 35.45±1.86 ^g |
| | D | 71.66±3.25 ^{ab} | 49.68±1.52 ^{ef} | 53.39±5.45 ^{de} | 63.41±1.06 ^{bc} | 37.32±4.32 ^g |
| Pitsanulok | F | 71.73±3.53 ^{ab} | 41.09±1.13 ^g | 56.14±0.95 ^{cde} | 59.47±2.98 ^{cd} | 40.12±0.93 ^g |
| | D | 73.65±0.81 ^a | 56.54±3.43 ^{cde} | 59.85±0.72 ^{cd} | 37.63±3.46 ^g | 37.01±1.87 ^g |

(F) fresh leaves extract, (D) fallen leaves extract, (CM) Chaingmai, (PH) Phrae, (ST) Sukhothai, (LP) Lanmpang, (KK) Khonkaen

^{a-g} Values followed by the same letters in the same column are not significantly different according to the Duncan's Multiple Range Test at $P < 0.05$

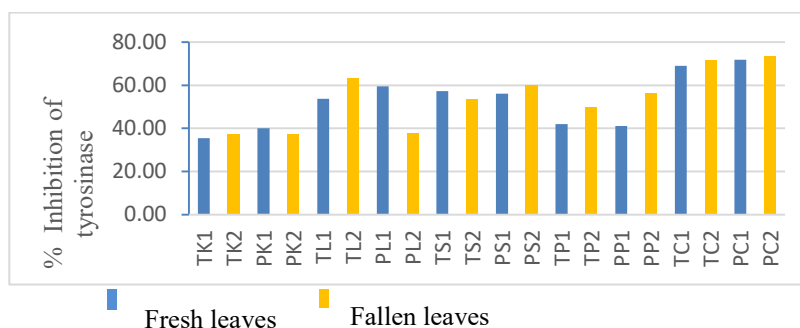


Figure 3. Percentage of Inhibition of tyrosinase activity from *T. grandis* leaves extract (T) Thongphaphum silviculture research station, (P) Pitsanulok silviculture research station, (K) Khonkaen, (L) Lampang, (S) Sukhothai, (P) Phrae, (C) Chaingmai, (1) Fresh leaves, (2) Fallen leaves

Discussion

The study focused on the comparison the methanolic extracts of fresh and fallen leaves from *T. grandis*, the results showed that against *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. acnes* similar to the report that the methanolic extracts of leaves from *T. grandis* had a good activity against *S. aureus* (14.00 mm) by disc diffusion method concentration at 500 µg/disc (Krishna and Nari, 2010). In addition, reported that essential oil extract of *T. grandis* against gram negative and gram positive as *Escherichia coli* (29.00 mm) and *S. epidermidis* (20.00 mm) (Aboaba *et al.*, 2013).

Plant and herbs that presence of bioactive compounds and extensive phytochemical can break on structures and cell membranes of bacteria are possible antibacterial activity (Ghasemzadeh *et al.*, 2016). It has been reported

that the phenolic compounds such as anthraquinones can antibacterial activity (Tamokou *et al.*, 2009). A similar study Krishna *et al.* (2011) reported the compound from *T. grandis* leaves extract as anthraquinones and activity against *S. aureus* and *K. pneumoniae*.

The anti-tyrosinase activity from leaves extract of *T. grandis* showed that the fallen leaves extract highest percentage of inhibitory tyrosinase activity. The research was found the compounds such as gallic acid, rutin, quercetin, ellagic acid and sitosterol of the methanolic leaves extract of *T. grandis* (Nayeem and MD, 2011). According, the previous study the phenolic compounds as gallic acid effect inhibition tyrosinase enzyme (Alam *et al.*, 2012). However, this compound increased amount of stress on teak and different soil-weather have effects on the total phenolic content and antioxidant activity (Kusnadi *et al.*, 2016).

T. grandis leaves extract indicated to be a valuable bioactive source, and to be applied for the health and medical purpose. These natural compounds may also prove to have free radicals, antibacterial and anti-tyrosinase.

It concluded that the methanol extract from leaves of *T. grandis* showed that the fresh and fallen leaves from Phrae of plus tree at Thongphaphum silviculture research station inhibited *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. acnes*. Fresh and fallen leaves from Chaingmai, Sukhothai of plus tree from Thonhpaphum and Pitsanulok silviculture research station inhibition tyrosinase enzyme greater than fifty percentage. Further investigations are needed to identify the bioactive compounds of fractions for developed in the future.

Acknowledgement

The study is supported from National Research council of Thailand (NRCT) (grant number วช(อ)(กบง)/124/2560) and Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL). The author is thankful Dr. Saroj Wattanasuksakul from Forest Research and Department Bureau Royal Forest Department and the staff members from Thongphaphum and Phitsanulok silviculture research station.

References

- Aboaba, S., Akande, A. and Flamini, G. (2013). Chemical constituents, toxicity and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Tectona grandis*. Elixir Bio Technology. 61:16795-16798.
- Alam, N., Yoon, K. N. Lee, J. S., Cho, H. J. and Lee, T. S. (2012). Consequence of the antioxidant activities and tyrosinase inhibitory effects of various extracts from the fruiting bodies of *Pleurotus ferulae*. Saudi Journal of Biological Sciences. 19:111-118.
- Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M. and Hammami, M. (2013). Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. Industrial Crops and Products. 49:256-264.

- Chang, T. and Tseng, M. (2006). Preliminary screening of soil actinomycetes for anti-tyrosinase activity. *Journal of Marine Science and Technology*. 14:190-193.
- Cushnie, T. and Lamb, A. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26:343-356.
- Farjana, A., Zerín, N. and Kabir, M. S. (2014). Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4:920-923.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E. and Rahmat, A. (2016). Changes in antioxidant and antibacterial activities as well as phytochemical constituents associated with ginger storage and polyphenol oxidase activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16:1-11.
- Haliloglu, Y., Ozek, T., Tekin, M., Goger, F., Baser, K. H. C. and Ozek, G. (2017). Phytochemicals, antioxidant, and antityrosinase activities of *Achillea sivasica* Çelik and Akpulat. *International Journal of Food Properties*. 20:693-706.
- Krishna, M. S. and Nair, A. J. (2010). Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant Potential of different extracts from leaf, bark and wood of *Tectona grandis*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 2:155-158.
- Krishna, M. S. and Nair, A. J. (2011). Anthraquinones from leaves of *Tectona grandis*: A detailed study on its antibacterial activity and other biological properties. *International Journal of Phytomedicine*. 3:50-58.
- Kusnadi, J., Arumingtyas, E. L., Ningtyas, D. W. and Setiawan, E. C. (2016). Antioxidant activity of MAE extracted teak (*Tectona grandis* L.F.) leaves collected from different plantation site at Java Island, Indonesia *International Journal of ChemTech Research*. 7:154-160.
- Nayeem, N. and Karvekar, M. D. (2011). Isolation of phenolic compounds from the methanolic extract of *Tectona grandis*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2:221-225.
- Nidavani, R. and Am, M. (2014). Teak (*Tectona grandis* Linn.): A renowned timber plant with potential medicinal values. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6:86-90.
- Purushotham, K. G., Arun, P., Johnsy Jayarani, J., Vasnthakumari, R., Sankar, L. and Raviprakash Reddy, B. (2010). Synergistic *in vitro* antibacterial activity of *Tectona grandis* leaves with tetracycline. *International Journal of Pharmtech Research*. 2:519-523.
- Stacey, A. N. D., Mello, Graeme, J., Finlay, Bruce, C., Baguley, Marjan, E. and Askarian-Amiri. (2016). Signaling Pathways in Melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 17:1-18.
- Sun, L., Guo, Y., Zhang, Y. and Zhuang, Y. (2017). Antioxidant and anti-tyrosinase activities of phenolic extracts from rape bee pollen and inhibitory melanogenesis by cAMP/MITF/TYR pathway in B16 mouse melanoma cells. *Frontiers in Pharmacology*. 8:1-9.
- Tamokoua, J. D. D., Michel, F. T., Hippolyte, K. W., Jules, R. K. and Pierre, T. (2009). Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. *Journal of Ethnopharmacology*. 124:571-575.
- Tendencia, E. A. (2004). Disk diffusion method. In *Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment*. Aquaculture department southeast asian fisheries development Center, Tigbauan, Iloilo, Philippine, pp. 13-29.
- Thi, N. D. and Hwang, E. S. (2014). Bioactive Compound contents and antioxidant activity in Aronia (*Aronia melanocarpa*) leaves collected at different growth stages. *Preventive Nutrition and Food Science*. 19:204-212.
- Wikaningtyas, P. and Sukandar, E. Y. (2016). The antibacterial activity of selected plants towards resistant bacteria isolated from clinical specimens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6:16-19.

(Received: 13 September 2018, accepted: 31 October 2018)

ประวัติผู้เขียน

| | |
|------------------|---|
| ชื่อ | นางสาวจุฑาภรณ์ ผลมะขาม |
| วัน เดือน ปีเกิด | 25 ธันวาคม 2533 |
| ที่อยู่ปัจจุบัน | 19 หมู่ 3 ต.คลองควาย อ.สามโคก จ.ปทุมธานี 12160 |
| ประวัติการศึกษา | (2556) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา เกรตเฉลี่ย 2.65 มหาวิทยาลัยบูรพา (2563) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง |
| ผลงานทางวิชาการ | Phonmakham, J. Wattanasuksakul, S. and Poeaim, S. 2018. “Antibacterial and anti-tyrosinase activities of the methanolic extracts from leaves of <i>Tectona grandis</i> ” <i>International Journal of Agricultural Technology</i> 14(7) : 1611-1618. |