ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากใบสัก

ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF METHANOLIC EXTRACTS FROM TEAK LEAVES

พรชนัน ภาคพานิช
พัชรพร รวมวงค์
พิชชาพร ชื่นบาน

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากใบสัก

ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF METHANOLIC EXTRACTS FROM TEAK LEAVES

พรชนัน ภาคพานิช
พัชรพร รวมวงค์
พิชชาพร ชื่นบาน

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF METHANOLIC EXTRACTS FROM TEAK LEAVES

PHONCHANAN PAKPARNICH
PATCHARAPORN RUAMWONG
PICHAPORN CHUENBAN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากใบสัก Antibacterial and Antioxidant Activities of Methanolic Extracts from Teak Leaves
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพรชนัน ภาคพานิช รหัสนักศึกษา 56050868 นางสาวพัชรพร รวมวงค์ รหัสนักศึกษา 56050874 นางสาวพิชชาพร ชื่นบาน รหัสนักศึกษา 56050877
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการ	
ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากใบสัก		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพรชนัน	ภาคพานิช	รหัสนักศึกษา 56050868
	นางสาวพัชรพร	รวมวงค์	รหัสนักศึกษา 56050874
	นางสาวพิชชาพร	ชื่นบาน	รหัสนักศึกษา 56050877
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2559		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม		

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์ โดยการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของสักสยามินทร์และมเหสักข์มีค่าเท่ากับ 178.35 ± 4.93 และ 214.36 ± 4.20 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ในด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระพบว่า สักสยามินทร์และมเหสักข์มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ จากวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) เท่ากับ 178.99 ± 3.77 และ 270.65 ± 8.52 มิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ เช่นเดียวกับวิธี 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical (ABTS) ค่าที่ได้เท่ากับ 253.05 ± 1.99 และ 347.49 ± 3.10 มิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็ก (Ferric ion reducing antioxidant power assay, FRAP) ของสักสยามินทร์และมเหสักข์เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ เท่ากับ 121.46 ± 5.62 และ 198.28 ± 1.85 มิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ทั้งนี้ยังทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ซึ่งพบว่าสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์สามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* โดยสักสยามินทร์จะให้ผลดีกว่ามเหสักข์ ยกเว้นใน *Staphylococcus epidermidis* ส่วนในการศึกษาสารประกอบฟีนอลิคและการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดเมทานอลจากมเหสักข์มีสารประกอบฟีนอลิค และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่มากกว่าสักสยามินทร์

คำสำคัญ : การต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย สารประกอบฟีนอลิค สัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Antibacterial and Antioxidant Activities of Methanolic Extracts from Teak Leaves		
Students	Phonchanan	Pakparnich	Student ID 56050868
	Patcharaporn	Ruamwong	Student ID 56050874
	Pichaporn	Chuenban	Student ID 56050877
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
Academic Year	2016		
Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim		

Abstract

The purpose of this study was to investigate the biological activities of methanolic extracts from the Siamin and Mahesak teak leaves. The total phenolic content of methanolic leaves extracts from Siamin and Mahesak teak are 178.35 ± 4.93 and 214.36 ± 4.20 mg GAE/g extract, respectively. The antioxidant activity of methanolic leaves extracts from Siamin and Mahesak teak were evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH) assay are 178.99 ± 3.77 and 270.65 ± 8.52 mg TEAC/g extract, respectively, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline -6-sulfonic acid) radical (ABTS) assay are 253.05 ± 1.99 and 347.49 ± 3.10 mg TEAC/ g extract, respectively. The Fe^{3+} - TPTZ reduction in ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) antioxidant assay are 121.46 ± 5.62 and 198.28 ± 1.85 mg TEAC/g extract. The results found that the methanolic extract from Mahesak teak leaves has more total phenolic content and antioxidant activity than Siamin teak leaves. Furthermore, methanolic extract from Siamin and Mahesak teak leaves were studied for their antibacterial activity using disc diffusion method. These extracts are able to inhibit the growth of gram positive bacteria including *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. For antibacterial activity, the results found that the methanolic extract from Siamin teak leaves has better antibacterial activity than Mahesak, except for *S. epidermidis*.

Keywords : Antibacterial, Antioxidant, Total phenolic content, Teak

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยคำแนะนำและคำปรึกษาในด้านต่างๆ จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ซึ่งคอยสนับสนุน และเสนอแนะ ทำให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ทุกประการ ขอขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ สำหรับการเป็นประธานกรรมการและกรรมการ อีกทั้งยังช่วยแนะนำสำหรับปรับปรุงและแก้ไขโครงงานพิเศษ รวมถึงรูปเล่มโครงงานพิเศษจนออกมาสำเร็จ

ขอขอบคุณโครงการรวมใจภักดิ์ ปลูกมเหสักข์ - สักสยามินทร์ จากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สำหรับการสนับสนุนตัวอย่างใบสักในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ เพื่อเป็นความรู้ในการทำงานและแก้ไขปัญหาในโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้ลุล่วงไปได้

ขอขอบคุณบิดา มารดาและครอบครัวที่คอยสนับสนุน เป็นกำลังใจ ไต่ถามถึงความเป็นไปของงานและตัวผู้จัดทำอย่างห่วงใยและเป็นแรงผลักดันให้อยู่เสมอ

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจกันและกันอยู่เสมอ จากวันแรกจนถึงวันนี้ ขอบคุณที่คอยช่วยแก้ปัญหาและให้ความร่วมมือกันเพื่อทำให้งานชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ต้องขอขอบคุณทุกคนที่ได้กล่าวถึงมาในก่อนหน้านี้อีกครั้ง ทุกคน เป็นเสมือนแรงขับเคลื่อน กำลังใจ และเรี่ยวแรงที่ทำให้โครงงานพิเศษชิ้นนี้ก้าวไปข้างหน้า จนถึงวันที่ประสบความสำเร็จ

พรชนัน ภาคพานิช
พัชรพร รวมวงค์
พิชชาพร ชื่นบาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 สัก	3
2.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิครวม	6
2.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	6
2.3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH	6
2.3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS	7
2.3.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็กของสารต้านอนุมูลอิสระ	8
2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย	8
2.4.1 Dilution method	8
2.4.2 Diffusion method	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	10
3.1 ตัวอย่างพืช	10
3.2 อุปกรณ์	10
3.3 สารเคมี	11
3.4 แบคทีเรีย	11
3.5 การดำเนินงาน	12
3.5.1 สารสกัดจากใบสัก	12
3.5.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด	12
3.5.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ	12
3.5.3.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	12
3.5.3.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS	13
3.5.3.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion 14
3.5.5 การคำนวณทางสถิติ 14
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 15
4.1 ผลการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด 15
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 16
4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH 16
4.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS 19
4.2.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP 21
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion 22
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 26
เอกสารอ้างอิง 27
ภาคผนวก 30
ภาคผนวก ก 31
ภาคผนวก ข 34
ภาคผนวก ค 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ และองค์ประกอบจากสารสกัดส่วนต่างๆ ของสัก	5
4.1	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์	16
4.2	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์	18
4.3	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์	20
4.4	ค่าความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็ก (FRAP value) ของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์	22
4.5	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกของ Gentamicin และสารสกัดเมทานอลจากสักสยามินทร์และมเหสักข์	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะต้นสัก (*Tectona grandis*)	3
4.1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรและความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก.....	15
4.2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์	17
4.3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์	18
4.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์	19
4.5	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสักสยามินทร์และมเหสักข์กับความเข้มข้นสารสกัดจากใบสัก	20
4.6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรกับความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์	21
4.7	ลักษณะวงใสของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* โดย Positive คือ Gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม Negative คือ เมทานอลร้อยละ 100 Siamin คือ สารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์ และ Mahesak คือ สารสกัดเมทานอลจากใบมเหสักข์ ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (เส้นมาตราส่วนมีขนาดเท่ากับ 1 เซนติเมตร)	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไม้สัก มีชื่อในภาษาอังกฤษว่า Teak และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tectona grandis* อยู่ในวงศ์ Verbenaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางตอนใต้ของประเทศอินเดีย พม่า ไทย อินโดนีเซีย และหมู่เกาะอินเดียตะวันออก (มณฑี, 2536) มีการนำไม้สักไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในการนำเนื้อไม้ไปก่อสร้างบ้านเรือน เรือ รถ เสา เครื่องมือกสิกรรม เครื่องเรือน ตลอดจนการแกะสลักต่างๆ (กรมป่าไม้, 2556) ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ของสักนั้นมีอยู่หลากหลายประการ เช่น เนื้อไม้และใบเป็นสมุนไพรช่วยแก้บวม ลดเบาหวาน ขับลมในลำไส้ แก้ไตพิการ ใบอ่อนให้สีแดง ส่วนใบแก่ให้สีน้ำตาลทอง ทำสีย้อมกระดาษหรือสีย้อมผ้าได้เช่นกัน (สมาคมการป่าไม้แห่งประเทศไทย, 2513)

จากการศึกษาในปัจจุบันมีการพบว่า สารสกัดเมทานอลจากเนื้อไม้ของสักมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระในหนูทดลองได้ (Subramoniam, 2015) รวมไปถึงสามารถนำมาใช้เป็นยาฆ่าเชื้อและรักษาสิวได้ (Monali and Rabindra, 2013) ในส่วนของใบสัก มีงานวิจัยที่บ่งชี้ว่า มีสารจำพวกกรดฟีนอลิค (กรดแกลลิกและแอลเลจิค) และสารฟลาวานอยด์ (รูทินและควอซิทิน) ในสารสกัดเมทานอล (Naira and Karvekar, 2010) ซึ่งสารข้างต้นมีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระได้ โดยมนุษย์นั้นสามารถได้รับอนุมูลอิสระได้จากหลายทางอนุมูลอิสระสามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อต่างๆ ภายในร่างกาย หากมีการสะสมอนุมูลอิสระในปริมาณมากจะส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ ตามมา (อนันต์ และคณะ, 2551) นอกเหนือไปจากนี้ ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพของการยับยั้งแบคทีเรียของใบสัก โดยพบว่าสารสกัดคลอโรฟอร์มมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella pneumoniae* (Mahesh and Jayakumaran, 2010) ซึ่งถือได้ว่าใบสักนั้นมีประโยชน์ใช้สอยในหลากหลายด้าน จึงนำมาสู่หัวข้อโครงงานพิเศษในครั้งนี้

โครงงานพิเศษเล่มนี้ได้ทำการศึกษาสักสยามินทร์และมเหสักข์ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการต้านแบคทีเรีย เพื่อประเมินความแตกต่างของประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารสกัดเมทานอล ซึ่งก่อนหน้านี้ ได้มีงานวิจัยที่ศึกษาคุณประโยชน์ในด้านการต้านอนุมูลอิสระและการต้านแบคทีเรีย แต่ยังไม่ได้มีการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสักต่างชนิดกัน ดังนั้น หากสามารถศึกษาได้ถึงการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน อาจนำไปสู่การส่งเสริมการเพาะปลูกสักให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์และสามารถต่อยอดเพื่อนำไปพัฒนาการรักษาโรคอันสามารถเกิดได้จากอนุมูลอิสระหรือแบคทีเรียได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคจากสารสกัดเมทานอลของใบสักสยามินทร์และมเหสักข์

2) เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเมทานอลของใบสักสยามินทร์และมเหสักข์

3) เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากสารสกัดเมทานอลของใบสักสยามินทร์และมเหสักข์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) ศึกษาตัวอย่างจากโครงการรวมใจภักดิ์ ปลูกมเหสักข์-สักสยามินทร์ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี ณ เขื่อนสิริกิติ์ อำเภอท่าปลาจังหวัดอุตรดิตถ์

2) ศึกษาเฉพาะสารสกัดที่สกัดได้จากตัวทำละลายเมทานอล

3) ศึกษาปริมาณฟีนอลิคทั้งหมดของสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับกรดแกลลิก โดยวิธี Folin-Ciocalteu

4) ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี Diphenyl-picryhydrazyl radical assay (DPPH), 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical assay (ABTS) และ Ferric ion reducing antioxidant power assay (FRAP)

5) ศึกษาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus cereus* (DMST 5040) *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) *Salmonella typhimurium* (DMST 0562) *Staphylococcus aureus* (TISTR 1466) และ *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) ด้วยวิธี Disc diffusion

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถทราบฤทธิ์ทางชีวภาพด้านสารประกอบฟีนอลิค การต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการเจริญในแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์

2) สามารถทราบประโยชน์และนำองค์ความรู้ที่ได้เป็นแนวทางในการนำใบสักไปศึกษาและพัฒนาต่อไปในด้านอื่นๆ ในอนาคต เช่น ด้านเภสัชวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สัก

สัก (Teak) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tectona grandis* Linn.f. เป็นไม้ที่มีชื่อเสียงแพร่หลาย เนื่องจากมีเนื้อไม้ที่มีคุณภาพสูง มีสีสันและลวดลายตามธรรมชาติที่งดงาม จึงนิยมนำมาใช้ในงานก่อสร้างและโครงสร้างที่อยู่อาศัย เครื่องเรือน และการแกะสลักได้อย่างดีเยี่ยม ทั้งนี้ไม้สักยังสามารถต้านทานต่อปลวก เชื้อเห็ดราต่างๆ ทนต่อกรด และสภาพอากาศได้ เนื่องจากเนื้อไม้ของสักพบว่ามีน้ำมันหรือสารบางชนิด เช่น สารเทคโตควิโนน (Tectoquinone) ที่เป็นพิษต่อปลวกและเห็ดราบางชนิด (สุทัศน์, 2536) ไม้สักเป็นต้นไม้ผลัดใบขนาดใหญ่ มีลำต้นเปล่า สูงเกินกว่า 20 เมตร ลำต้นปราศจากกิ่งก้าน มีใบขึ้นบนยอดเป็นพุ่มกว้าง ลำต้นมีสีน้ำตาลปนเทา เปลือกมีรอยแตกเป็นร่องตื้นๆ ตามความยาวของลำต้น เปลือกนอกมีความหนาตั้งแต่ 0.3-1.70 เซนติเมตร ส่วนเปลือกในจะมีสีน้ำตาลและเขียวอ่อน กระพี้ขาวและหนา เนื้อไม้มีสีน้ำตาลหรือเหลืองทองไปจนถึงสีน้ำตาลแก่มีลายเป็นเส้นสีน้ำตาลแทรก (โชคชัย, 2536) เส้นวงปีชัดเจน ซึ่งวงปีนี้จะบ่งบอกถึงอายุของสักต้นนั้นๆ โดยความโตหนึ่งวงปีจะใช้ระยะเวลาหนึ่งปี (สุทัศน์, 2536)

รูปที่ 2.1 ลักษณะต้นสัก (*Tectona grandis*)
(ที่มา : ถ่ายภาพโดย พิชชาพร ชื่นบาน, 2559)

ลักษณะใบของสักเป็นใบแบบเดี่ยว แตกออกมาตามกิ่งก้าน ขนาดของใบมีความยาวประมาณ 25-30 เซนติเมตร ความกว้างเกือบเท่าความยาว เมื่ออายุยังน้อยประมาณ 1-5 ปี ต้นอ่อนสักสามารถมีความกว้างถึง 40 เซนติเมตรและยาวถึง 80 เซนติเมตร เมื่อมีอายุมากขึ้นขนาดของใบจะลดลง รูปใบมีลักษณะโป่งตรงกลาง ปลายและโคนใบเรียวแหลม ผิวใบสากเนื่องจากมีขนแข็งเล็กละเอียดตลอดทั้งใบ หลังใบสีเขียวเข้มมองเห็นลายเส้นใบเป็นร่างแหชัดเจน ท้องใบมีสีเขียวอ่อนและมีรอยนูนตามลายเส้นใบ ใบอ่อนสักจะมีสีน้ำตาลแดงและขนอ่อนนุ่ม เมื่อนำใบมาขยี้จะให้สีแดงคล้ายเลือด เนื่องจากมีสารแทรกในใบ (สุทัศน์, 2536) โดย Ramesh and Mahalakshmi (2014) ได้รวบรวม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อสามัญของสักที่เรียกกันในแต่ละประเทศ ยกตัวอย่างเช่น ในประเทศแถบยุโรปนั้น สักมีชื่อเรียกภาษาอังกฤษว่า Indian oak หรือ Teak ในภาษาฝรั่งเศสเรียกว่า Teck และภาษาเยอรมันมีชื่อเรียกว่า Tiek ส่วนประเทศแถบเอเชียที่พบสักอย่างแพร่หลาย เช่น ในอินเดียสักมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปตามภาษา ในภาษาฮินดีเรียกว่า Sagun, Sagwan หรือ Saigun ภาษาสันสกฤตเรียกว่า Saka ส่วนในภาษาดราวิเดียนเรียกว่า Jati เช่นเดียวกันกับในประเทศมาเลเซีย ชาวพม่าเรียกว่า Kyun ส่วนในลาวจะเรียกสักว่า Sak ซึ่งคล้ายกันกับในประเทศไทย

การจัดอนุกรมวิธานของ *T. grandis* Linn. ดังนี้

Kingdom	Plantae
Super division	Angiosperms
Division	Eudicots
Class	Asterids
Order	Lamiales
Family	Verbenaceae
Genus	*Tectona*
Species	*grandis*

(ที่มา : Ramesh and Mahalakshmi, 2014)

จากรายงานของ Ramesh and Mahalakshmi (2014) สักเป็นไม้เขตร้อนที่มีชื่อเสียงโดยมีความหนาแน่นเฉลี่ย 650 กิโลกรัมต่อตารางเมตร และเพราะธรรมชาติของสักมีความทนทานและมีความเสถียร จึงนิยมในการนำไปสร้างเรือและการต่อเรือ นอกเหนือจากนี้ยังใช้ในการก่อสร้าง การตกแต่ง เครื่องเรือน ตู้ เครื่องดนตรี และงานหัตถกรรม แกะสลักไม้ นอกเหนือจากนี้สักยังได้รับการพิจารณาว่าเป็นส่วนประกอบหลักในยาแผนโบราณหลายชนิด สารสกัดที่แตกต่างกันจากส่วนต่างๆ ของสักมีคุณสมบัติในการเสมหะ ต้านการอักเสบ และขับพยาธิ โดยดั้งเดิม สักจะใช้ในการรักษาหลอดลมอักเสบ อาเจียน สภาวะกรดมาก เบาหวาน โรคเรื้อน เป็นยาห้ามเลือดและโรคนอนพยาธิ ในยาแผนโบราณจะแปะผงไม้ในการรักษาอาการปวดหัวอย่างรุนแรงและอาการบวม สักยังเป็นไม้ที่มีกลิ่นฉุน เย็น เป็นยาระบาย ยากล่อมประสาทสำหรับคนที่ตั้งครรภ์และมีประโยชน์ในการรักษาโรคริดสีดวงทวาร Leukoderma และโรคบิด โดยสารสกัดจากใบสัก ยังใช้กันอย่างกว้างขวางในความเชื่อของชาวบ้านในการรักษาบาดแผลหลายๆ ชนิด โดยเฉพาะแผลไฟลวก

จากรายงานของ Mosad *et al.* (2014) สารสกัดเมทานอล 90% ปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทิลอะซิเตท และบิวทานอลของใบสัก พบปริมาณสารทุติยภูมิ เช่น แทนนิน ฟลาวานอยด์ ซาโปนิน และคาร์โบไฮเดรต

Ramesh and Mahalakshmi (2014) ได้พบสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิและองค์ประกอบที่แยกได้จากใบ ราก เมล็ด เปลือกไม้ เนื้อไม้ และแก่นไม้ของสัก ดังแสดงในตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ และองค์ประกอบจากสารสกัดส่วนต่างๆ ของสัก

สารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ	องค์ประกอบของสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ	ส่วนของพืช
Phenols and Phenolic acid	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, and syringaresinol	ใบ
Norlignans	Tectonoelin A (or (7Z)-9'nor-3',4,4'-trihydroxy-3-methoxylign-7-ene-9,7'-lactone), medioresinol, 1-hydroxypinoresinol, lariciresinol, balaphonin and zhebeiresinol	ราก ใบ เมล็ด และเนื้อไม้
Flavonoids	Rutin and quercitin	ใบ
Anthraquinones	Possible anthraquinone moieties for dyeing property	ใบ
Glycosoides	Apocarotenoids: tectoionols A and B Steroidal glycoside: beta-sitosterol-beta-D-[4'-linolenyl-6'-(tridecan-4'"-one-1'"-oxy)] glucuranopyranoside	เมล็ดและใบ รากและเปลือกไม้
Alkaloides	Quinones: 9,10-dimethoxy-2-methyl anthra-1,4- quinone. 1,4-anthraquinone, tectoquinone, lapachol, dehydro-a-lapachone, tecomaquinone I. Naphthoquinone and anthraquinone derlvatives Naphthotectone and anthratectone	แก่นไม้ ใบ
Steroids	Steroidal compounds, squalene, polylsoprene, cr-tolylmethyl ether, betulinic acid	แก่นไม้
Fatty esters	7'-hydroxy-n-octacosanoyl n-decanoate, 20'-hydroxy eicosanyl linolenate and 18'-hydroxy n-hexacosanyl n-decanoate	รากและเปลือกไม้

(ที่มา : Ramesh and Mahalakshmi, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิครวม

จากการรายงานของ รวินิภาและคณะ (2556) กล่าวว่า การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลทั้งหมด (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent อาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของโมลิบโดทังสเตตไอออน (Molybdotungstate ion) ประกอบด้วย โซเดียมทังสเตต (Sodium tungstate) โซเดียมโมลิบเดต (Sodium bolybdate) กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) และโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) สังเกตการเปลี่ยนแปลงของไอออน Mo(VI) ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป Mo(V) ซึ่งมีสีน้ำเงิน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร รายงานค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิก (Gallic acid equivalent, mg GAE/g) โดยสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 2.1 ซึ่งอ้างอิงจาก Abdelhady *et al.* (2011)

$$T = C \times [V/M] \quad \text{.....(สมการ 2.1)}$$

โดย T คือ ปริมาณฟีนอลิคทั้งหมดของสารสกัด (mg GAE/g)
C คือ ความเข้มข้นของกรดแกลลิกที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน (mg/ml)
V คือ ปริมาตรของสารละลายสารสกัด (ml)
M คือ น้ำหนักของสารสกัด (g)

Mosad *et al.* (2014) ได้ศึกษาสารสกัดเมทานอล ปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเอทิลอะซิเตท จากใบสักพบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเท่ากับ 188.90, 30.20, 46.59 และ 295.67 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ

2.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay)

บุหรัน (2556) กล่าวไว้โดยสรุปว่า อนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดได้ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารที่ให้อิเล็กตรอน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง โดยก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา สารมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ คือ โทรลอกซ์ (Trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) แสดงค่าเป็น TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) มีข้อดี คือ สะดวกและรวดเร็ว แต่ DPPH เป็นอนุมูลที่ค่อนข้างเสถียร ต่างจากอนุมูลภายในร่างกาย ทำให้ค่าการวิเคราะห์น้อยกว่าความเป็นจริง ทั้งนี้ ไม่สามารถตรวจสอบตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ เนื่องจากแอลกฮอล์อาจทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีน การหาสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง คำนวณได้จากสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้นก่อนใส่สารตัวอย่าง ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$DPPH + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A \quad \text{.....(สมการ 2.2)}$$

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0\text{-}A_0)/A_0] \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

จากรายงานของ Mosad *et al.* (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอล ปิโตเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเอทิลอะซิเตทจากใบสัก พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบสักมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (Scavenging activity of 50%, SC_{50}) ของสารสกัดเมทานอลจากสักที่ตัวทำละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 100 มีค่าเท่ากับ 28.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ Rice-Evan *et al.* (1996) ยังพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในสารสกัดจากสักมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคที่สูงจะส่งผลให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นตาม ซึ่งสารประกอบฟีนอลิคนั้นประกอบไปด้วยไฮโดรเจนอิสระจำนวนมากที่จะมีบทบาทอย่างมากในฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

2.3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS radical cation decolorization assay)

บุหรัน (2556) ได้กล่าวโดยสรุปว่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ($ABTS^+$, 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียว สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ก่อนวัดต้องทำการเจือจาง $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยตัวทำละลาย เมื่อทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา $ABTS^{\bullet+}$ จะทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างทำให้สีจางลง และสามารถคำนวณสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงเมื่อเกิดการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เช่นเดียวกับวิธี DPPH อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ สามารถละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์จึงเกิดปฏิกิริยาได้เร็ว แต่มีข้อเสีย คือ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่ใช่สารที่พบในธรรมชาติ หรือในสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ

Mahesh and Jayakumaran (2010) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของต้นสัก ได้แก่ ใบ เปลือกไม้และเนื้อไม้ พบว่าสารสกัดจากสักมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ เนื่องจากสารสกัดสามารถฟอกสีของอนุมูลอิสระได้ โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากใบเท่ากับ 10, 100 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ เท่ากับร้อยละ 7.7, 87.9 และ 95.9 ตามลำดับ สารสกัดเมทานอลจากเปลือกไม้ของสักพบร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ ที่แต่ละความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 4, 11.1 และ 25.07 ตามลำดับ และในส่วนของสารสกัดเมทานอลของเนื้อไม้ของสักพบว่ามีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ ที่แต่ละความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 26.03, 44.9 และ 78.37 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็กของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay)

บุหรัน (2556) ได้กล่าวว่า การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็กของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นวิธีที่อาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ แล้วเกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ซึ่งขั้นตอนเริ่มจาก นำสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-striazine) ที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางมาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์และสารละลายเฟอร์ริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ซึ่งข้อเสียคือปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกาย และสารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) แต่ทั้งนี้ยังมีรายงานถึงข้อดีของวิธีนี้ คือ เป็นวิธีที่ไม่แพง สารต่างๆ ที่ใช้ง่ายต่อการเตรียม ผลที่ได้แม่นยำสามารถทำซ้ำได้ รวดเร็ว และเป็นวิธีทดสอบโดยตรง (Benzie and Strain, 1996)

Cynthia *et al.* (2013) ศึกษาสารสกัดเอทานอลจากใบสักที่สกัดด้วยวิธี Soxlet extraction และ Microwave-assisted extraction พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบสักความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็กได้เท่ากับ 41.79 และ 50.52 ไมโครกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร ซึ่งเทียบกับกรดแอสคอร์บิกที่เป็นสารมาตรฐาน นอกจากนี้งานวิจัยของ Joni *et al.* (2016) ยังพบความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็กของสารสกัดเอทานอลจากใบสัก โดยใช้วิธีการสกัดสองวิธีเช่นเดียวกับ Cynthia *et al.* (2013) ได้แก่ วิธี Soxlet มีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็กเท่ากับ 43.64 ไมโครกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร และวิธี Microwave-assisted extraction เท่ากับ 50.52 ไมโครกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ยังมีการรายงานของ Ghaisas *et al.* (2008) ถึงสารสกัดจากเปลือกไม้ในชั้นเอทานอล พบว่ามีค่า IC_{50} ของการรีดิวซ์ไอออนเหล็กเท่ากับ 190 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพร (ธีรวุฒิ และ รัชนี, 2550) ทดสอบได้ 2 วิธี คือ

2.4.1. Dilution method

เป็นการเจือจางยาให้มีความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ มาทดสอบกับเชื้อ วิธีนี้สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อได้ (Minimal inhibition concentration, MIC) สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 วิธี คือ การเจือจางยาในอาหารเหลว (Broth dilution method) และการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution method) ซึ่งจะต้องใช้เวลา เครื่องมือและแรงงานในการทำ แต่ผลการทดลองที่ได้แน่นอนกว่า

2.4.2 Diffusion method

เป็นการทดสอบโดยทำให้ตัวยาจากที่หนึ่งซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจใช้แผ่นยาเป็นกระดาษกรอง หรือเป็นเม็ดยา หรือเจาะหลุมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใส่ยาลงไป เพื่อให้ยาซึมจากบริเวณหนึ่งที่มีความเข้มข้นสูงไปสู่ที่ที่มีความเข้มข้นต่ำ อ่านผลการทดสอบโดยดูบริเวณที่มีการยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญของเชื้อ (Clear zone หรือ inhibition zone) วิธีนี้ไม่สามารถอ่านผลเป็นค่าความเข้มข้นของยาโดยตรงได้ แต่ก็เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากทำได้ง่าย ใช้เวลาน้อยและวิธีที่นิยมทดสอบมากที่สุดคือแบบที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (Disc diffusion method)

โดยจากงานวิจัยของ Mahesh and Jayakumaran (2010) พบว่าสารสกัดคลอโรฟอร์มให้ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (วงใสขนาด 14 มิลลิเมตร) และ *Klebsiella pneumoniae* (วงใสขนาด 8 มิลลิเมตร) ได้ดี โดยได้ทำการทดลองด้วยวิธี Disc diffusion ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 25, 50, 100, 250 และ 500 ไมโครกรัม ขนาดของดิสก์ที่ใช้ทดสอบมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร และใช้ Ciprofloxacin เป็นตัวเทียบมาตรฐาน ในส่วนของสารสกัดเมทานอลและเอทิลอะซิเตทให้ผลการยับยั้งที่ดีพอควรต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ทั้งนี้ Srinivasan *et al.* (2001) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากพืชสมุนไพรที่ใช้เป็นยาพื้นบ้านในอินเดีย 50 สายพันธุ์ ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงเชื้อราอีกทั้งสิ้น 14 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดชั้นน้ำจากใบสัก สามารถยับยั้งเชื้อ *Chromobacterium violaceum, Enterobacter faecalis, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella typhi* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และสามารถยับยั้ง *Candida albicans* ซึ่งเป็นเชื้อราได้

Purushotham *et al.* (2010) พบว่าเมื่อนำสารสกัดคลอโรฟอร์มจากใบสัก มาทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวะนะเตตระไซคลินเพื่อดูการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Minimum inhibitory concentration (MIC) พบว่าสารสกัดคลอโรฟอร์มจากใบสักสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Salmonella typhimurium* และ *Klebsiella pneumoniae* ได้ดี แต่ออกฤทธิ์ต่ำกับแบคทีเรีย *Escherichia coli* และเชื้อรา *Pichia pastoris* และไม่พบการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญร่วมกันกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Citrobacter freundii*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืช

ใบสัก จากต้นสักสยามินทร์และมเหสักข์ที่มีอายุ 3 ปี ภายในเขื่อนสิริกิติ์ อำเภอท่าปลา จังหวัดอุตรดิตถ์ วันที่ 29 ตุลาคม 2559

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 96-well plate
3.2.2 Aluminum foil
3.2.3 Buchner flask
3.2.4 Buchner funnel
3.2.5 Cotton swab
3.2.6 Desiccator
3.2.7 Digital balance
3.2.8 Duran ขนาด 100, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
3.2.9 Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3.2.10 Filter cloth
3.2.11 Laminar air flow cabinet
3.2.12 Micropipette
3.2.13 Microplate reader
3.2.14 Petri dish
3.2.15 Pipette tip ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
3.2.16 Rotary evaporator
3.2.17 Sonicator
3.2.18 Stirrer
3.2.19 Vernier caliper
3.2.20 Volumetric flask
3.2.21 Vortex mixer
3.2.22 Whatman filter paper No. 0.45 และ 1 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารเคมี

3.3.1 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)

3.3.2 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

3.3.3 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)

3.3.4 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethychroman-2-carboxylic acid (Trolox)

3.3.5 Acetate buffer

3.3.6 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.3.7 Folin-Ciocalteu

3.3.8 Gallic acid

3.3.9 Gentamycin

3.3.10 Iron(III) chloride

3.3.11 Iron(II) sulfate heptahydrate

3.3.12 Methanol

3.3.13 Mueller-Hinton agar (MH agar)

3.3.14 Nutrient agar (NA)

3.3.15 Potassium persulfate

3.3.16 Sodium carbonate

3.3.17 Sodium chloride

3.3.18 Sodium hydroxide

3.4 แบคทีเรีย

3.4.1 *Bacillus cereus* (DMST 5040)

3.4.2 *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

3.4.3 *Escherichia coli* (ATCC 25922)

3.4.4 *Micrococcus luteus* (ATCC 9341)

3.4.5 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

3.4.6 *Salmonella typhimurium* (DMST 0562)

3.4.7 *Staphylococcus aureus* (TISTR 1466)

3.4.8 *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การดำเนินงาน

3.5.1 สารสกัดจากใบสัก

นำตัวอย่างใบสักจากต้นสักสยามินทร์และมเหสักข์มาล้างทำความสะอาดและตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 3 x 3 นิ้ว จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ นำตัวอย่างใบที่แห้งไปปั่นหยาบ แล้วห่อด้วยผ้าขาวบาง (Filter cloth) เพื่อสกัดสารด้วยวิธี Maceration โดยแช่ในตัวทำละลายเมทานอล และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ สารละลายที่ได้จะนำไปกลั่นระเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ได้เป็นสารสกัดเมทานอลจากใบสัก เก็บไว้ในโถดูดความชื้น (Desiccator) เพื่อรอใช้ในการทดลอง

3.5.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (Total phenolic compound)

วิธีในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในตัวอย่างบน 96-well plate ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Al-Duais *et al.* (2009) โดยนำสารสกัดเมทานอลจากใบสักทั้งสองชนิดมาละลายด้วย DMSO จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการด้วยน้ำกลั่น สารสกัดที่เจือจางแล้วใส่ใน 96-well plate ปริมาตรหลุมละ 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu : น้ำ (1 : 4) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าเป็นเวลา 60 วินาที และทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร (10%) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าเป็นเวลา 60 วินาที และทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร บนเครื่อง Microplate reader โดยมี DMSO ในน้ำกลั่น เป็น Blank และกรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารละลายมาตรฐาน (40 – 200 มิลลิกรัมต่อลิตร) ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาค่า Gallic acid equivalents (GAE) ในหน่วยมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g extract)

3.5.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

3.5.3.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

วิธีในการวิเคราะห์หาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดัดแปลงจาก Prieto (2014) โดยเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลาย เตรียมสารสกัดตัวอย่างและสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นที่ต้องการใส่ลงใน 96-well plate โดยปริมาตรสารตัวอย่างต่อสารละลาย DPPH ในอัตราส่วน 1 : 2 จากนั้นบ่มในที่มืด 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยมีตัวทำละลายเมทานอลเป็น Blank และโทรลอกซ์เป็นสารละลายมาตรฐาน (10 – 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ได้มาคำนวณ DPPH scavenging activity ในหน่วยร้อยละ และนำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (Inhibitory concentration of 50%, IC_{50}) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 7 จากนั้นนำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดที่แต่ละความเข้มข้นเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโทรลอกซ์เพื่อหาค่า Trolox equivalents (TEAC) โดยค่า DPPH scavenging activity คำนวณได้จากสมการที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$[A_{control} - A_{sample}]/A_{control} \times 100$ .....(สมการ 3.1)

โดย $A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH กับตัวทำละลาย – ค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลาย

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากใบสักกับ DPPH – ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากใบสัก

3.5.3.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

วิธีในการวิเคราะห์หาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงจาก Re *et al.* (1999) โดยเตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ในน้ำกลั่น จากนั้นนำมาทำให้เป็นอนุมูลอิสระ ($ABTS^{\cdot+}$) โดยเติมโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2.45 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้องไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ $ABTS^{\cdot+}$ มาเจือจางกับตัวทำละลายให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.70 ± 0.02 จึงจะสามารถใช้ในการทดลองได้ ทำการเจือจางสารสกัดเมทานอลจากใบตามความเข้มข้นต่างๆ และเติมสารละลายตัวอย่างที่แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate จากนั้นเติม $ABTS^{\cdot+}$ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าและบ่มในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยมีตัวทำละลายเมทานอลเป็น Blank และโทรลอกซ์เป็นสารละลายมาตรฐาน (10 – 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ได้ นำมาหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 7 และ Trolox equivalents (TEAC) เช่นเดียวกับวิธี DPPH โดยคำนวณ ABTS Scavenging activity ในหน่วยร้อยละ จากสมการที่ 3.2

$[A_{control} - A_{sample}]/A_{control} \times 100$ .....(สมการ 3.2)

โดย $A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS กับตัวทำละลาย – ค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลาย

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากใบสักกับ ABTS – ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากใบสัก

3.5.3.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

วิธีในการวิเคราะห์หาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ใน 96-well plate ดัดแปลงจาก Benzie and Strain (1996) ทำการเตรียมตัวอย่างสารสกัดและสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นที่ต้องการ เตรียมสารละลาย FRAP reagent ซึ่งประกอบไปด้วย 300 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 3.6 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ TPTZ (2,4,6-tripyridyl-*s*-triazine) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร, 20 มิลลิโมลาร์ เฟอร์ริกคลอไรด์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 24 มิลลิลิตร โดยผสมใน Water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บสารละลายในขวดสีชา จากนั้นผสมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ FRAP reagent ด้วยอัตราส่วนสารสกัดหรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารมาตรฐานปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ FRAP reagent ที่เจือจางกับน้ำ (1 : 1) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่มืด 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์เพื่อคำนวณหาปริมาณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (FRAP value)

3.5.4 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion

วิธีในการวิเคราะห์หาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ดัดแปลงจาก EUCAST (2015) โดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MH agar ใน Petri dish จากนั้นนำหัวเชื้อแบคทีเรียมาทำการเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.08 - 0.13 จากนั้นทำการ Swab เชื้อที่เจือจางแล้วลงบน MH agar ที่เตรียมไว้ หยดสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นดิสก์ และรอให้แห้ง วางแผ่นดิสก์ ลงบนอาหาร MH agar ที่มีเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางจากวงใสที่เกิดขึ้น (Clear zone) โดยมี Gentamicin ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (10 ไมโครกรัมต่อดิสก์) เป็นตัวควบคุมเชิงบวกและตัวทำละลายเมทานอลเป็นตัวควบคุมเชิงลบ

3.5.5. การคำนวณทางสถิติ

ในการคำนวณค่าทางสถิติ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Statistic 23 ด้วยวิธี T-test แบบ Independence ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากการสกัดสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์ ด้วยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายเมทานอล (Maceration) ผลที่ได้เมื่อนำไปทำการกลั่นระเหยตัวทำละลายออก พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอมเขียว ในขณะที่สารสกัดจากใบมเหสักข์มีสีน้ำตาลแดงอิฐ โดยลักษณะของสารสกัดจากใบสักทั้งสองชนิดมีความข้นหนืดเหมือนกัน สารสกัดที่ได้จะนำไปทำการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียต่อไป

4.1 ผลการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (Total phenolic compound) ในสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยมีกรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 40, 80, 120, 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรและความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ได้สามารถนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงต่อความเข้มข้นของกรดแกลลิก เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9992 ดังแสดงกราฟในรูปที่ 4.1

รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรกับความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

หมายเหตุ : R^2 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination : R square)

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์ โดยนำค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด) โดยพบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบมเหสักข์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเท่ากับ 214.36 ± 4.20 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ซึ่งสูงกว่าสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์ที่มีค่าเท่ากับ 178.35 ± 4.93 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด เมื่อตรวจสอบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี T-test พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์

ตัวอย่าง	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด* ± SE (mg GAE/g extract)
สักสยามินทร์	178.35[a] ± 4.93
มเหสักข์	214.36[b] ± 4.20

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี Independent T-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

* ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด แสดงในหน่วยมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g extract)

ซึ่งปริมาณฟีนอลิคในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Mosad *et al.* (2014) ที่พบว่าสารสกัดจากใบสักที่สกัดด้วยเมทานอลร้อยละ 100 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดอยู่ที่ประมาณ 188.90 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด นอกจากนั้นยังมีการรายงานการศึกษาเปรียบเทียบสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดระหว่างใบอ่อนและใบแก่ของสักโดย Naira and Karvekar (2010) พบว่าในใบอ่อนมีปริมาณกรดฟีนอลิค 26 ไมโครกรัมต่อกรัม ซึ่งมากกว่าในใบแก่ที่มีปริมาณกรดฟีนอลิค 17 ไมโครกรัมต่อกรัม

ทั้งนี้ จากงานวิจัยของ Krishnaveni *et al.* (2013) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของสารสกัดชั้นน้ำจากใบสัก พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 1.45 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และในรายงานของนงลักษณ์ (2559) ทำการศึกษาสารสกัดเอทานอลจากใบสัก ที่เก็บจากอำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี และสกัดสารด้วยวิธีการหมัก พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเท่ากับ 67.45 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด โดยจะเห็นได้ว่าในแต่ละชั้นของสารสกัดจากใบสักจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคที่แตกต่างกัน

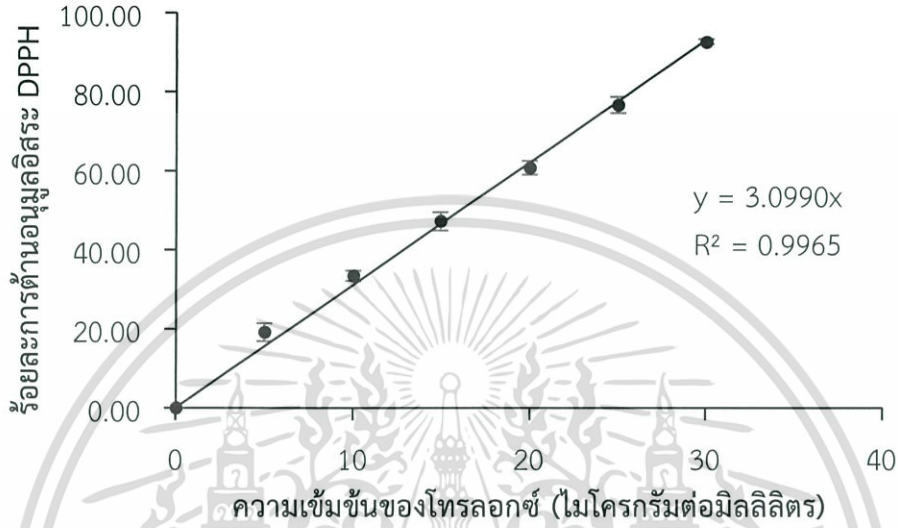
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารมาตรฐานที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้คือ โทรลอกซ์ นำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐาน มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นกราฟเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9965 ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ที่มีค่า IC_{50} พบว่าสารมาตรฐานโทรลอกซ์มีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงกราฟในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์

หมายเหตุ : R^2 คือ ค่าสัมประสิทธ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination : R square)

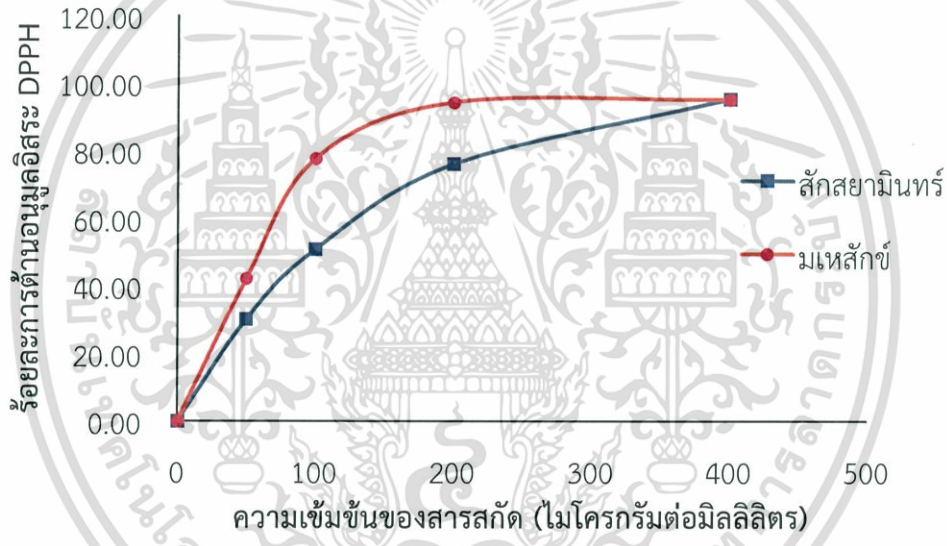
คำนวณหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์ แสดงในตารางที่ 4.2 และนำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเมทานอลจากใบสักทั้งสองสายพันธุ์มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ให้ลดลงร้อยละ 50 โดยจากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 7 พบว่าสักสยามินทร์มีค่า IC_{50} สูงกว่ามเหสักข์ซึ่งเท่ากับ 97.77 และ 59.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่าสารสกัดเมทานอลจากใบมเหสักข์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้มากกว่าสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์ หรือกล่าวได้ว่าสารสกัดเมทานอลจากใบมเหสักข์ที่ความเข้มข้น 59.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลงร้อยละ 50 ดังแสดงกราฟในรูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด ± SE	
	สักสยามินทร์	มเหสักข์
50	30.17 ± 1.24	42.03 ± 1.61
100	50.82 ± 2.67	77.63 ± 0.24
200	76.04 ± 1.95	94.19 ± 0.41
400	95.22 ± 0.63	95.09 ± 0.62

หมายเหตุ : ± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์

นำการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ร้อยละ 50 (y) ของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์ มาเทียบกับสมการของกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์ (y = 3.0990x) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของโทรลอกซ์ (x) และนำมาหารด้วยค่า IC_{50} ของแต่ละสารสกัด ได้ค่า Trolox equivalent เฉลี่ยของสักสยามินทร์และมเหสักข์เท่ากับ 178.99 ± 3.77 และ 270.65 ± 8.52 มิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ เมื่อนำมาหาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี T-test พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH เป็นการทดสอบที่ง่าย สะดวกและรวดเร็วแต่เนื่องจาก DPPH ค่อนข้างเสถียรทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง (บุหรัน, 2556) โดยในงานวิจัยของ Naira and Karvekar (2011) ทำการศึกษาสารสกัดเมทานอลจากใบสัก พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

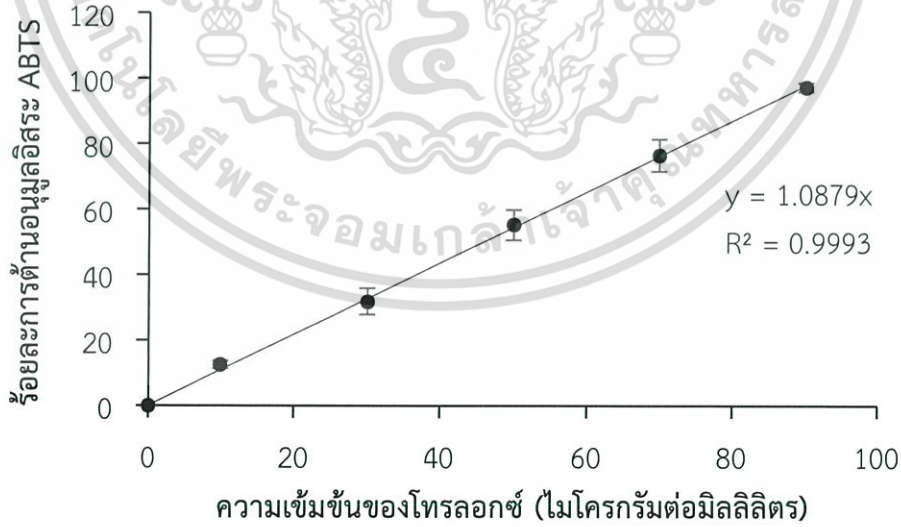
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อมา Mosad *et al*. (2014) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากใบของสัก ที่ชั้นเมทานอลแต่ละความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 50 ถึง 100 พบว่าที่ความเข้มตัวทำละลายเมทานอลร้อยละ 90 สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (Scavenging capacity of 50%, SC_{50}) เท่ากับ 15.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากที่กล่าวมาสามารถยืนยันได้ว่าสารสกัดจากสักชั้นเมทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเห็นได้จากค่า IC_{50} ของการศึกษาครั้งนี้ ที่มีความใกล้กับงานวิจัยของ Naira and Karvekar (2011)

นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาที่ชั้นตัวทำละลายอื่น ดังงานวิจัยของ Ghaisas *et al*. (2008) ที่ศึกษาสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนเปลือกไม้สักใน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 37.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และงานวิจัยของ Rajkumar and Sunil (2011) รายงานว่าที่สารสกัดเอทานอลส่วนเปลือกมีค่า IC_{50} เท่ากับ 238 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถบอกได้ว่านอกจากใบแล้ว ส่วนประกอบอื่นของต้นสัก เช่น เปลือกไม้ ยังมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เช่นเดียวกัน

4.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25, 50, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือสารละลายโทรลอกซ์ จากนั้น นำผลที่ได้มาคำนวณเพื่อหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS โดยเป็นกราฟเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9993 ทำให้ทราบถึงระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ที่ร้อยละ 50 พบว่าสารมาตรฐานโทรลอกซ์มี IC_{50} เท่ากับ 45.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์

หมายเหตุ : R^2 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination : R square)

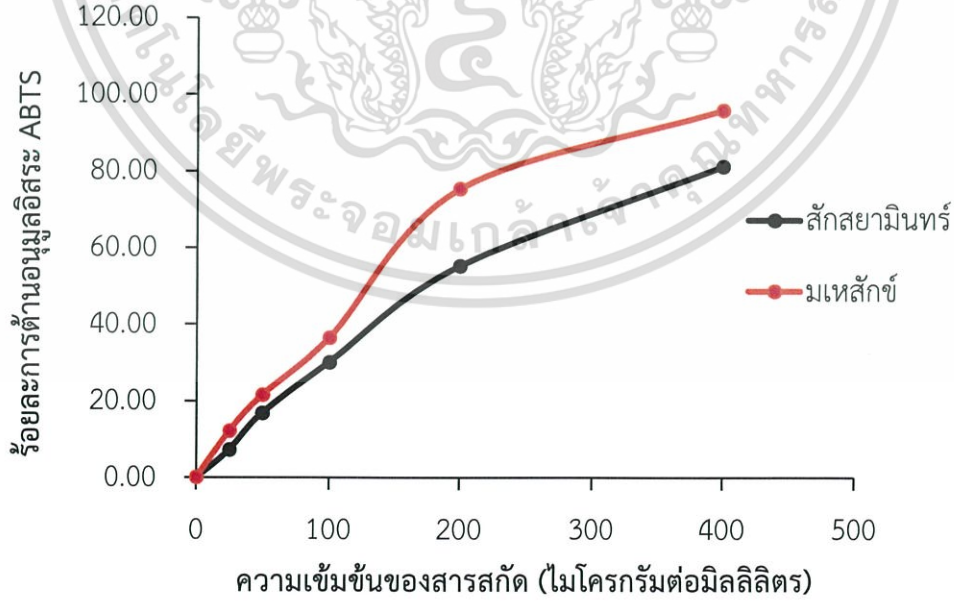
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์ แสดงดังตารางที่ 4.3 นำร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารสกัดจากใบสักและร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสักสยามินทร์และมเหสักข์ ดังรูปที่ 4.5 ทำให้ทราบถึงระดับความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดเมทานอลของตัวอย่างสักที่นำมาศึกษา โดยค่า IC_{50} ของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 7 อยู่ที่ 178.14 และ 136.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบมเหสักข์และสักสยามินทร์มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ เท่ากับ 253.05 ± 1.99 และ 347.49 ± 3.10 มิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด ที่คำนวณได้จากสมการกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์ (y = 1.0879x) เช่นเดียวกับวิธี DPPH จะเห็นว่าสารสกัดเมทานอลจากใบมเหสักข์สูงกว่าสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยวิธี T-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.3 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ± SE	
	สักสยามินทร์	มเหสักข์
25	7.24 ± 1.88	12.08 ± 1.21
50	16.87 ± 1.36	21.58 ± 1.26
100	30.08 ± 1.21	36.46 ± 0.87
200	55.14 ± 1.92	75.19 ± 1.96
400	81.03 ± 2.98	95.72 ± 2.65

หมายเหตุ : ± SE คือค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean)



รูปที่ 4.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสักสยามินทร์และมเหสักข์กับความเข้มข้นสารสกัดจากใบสัก

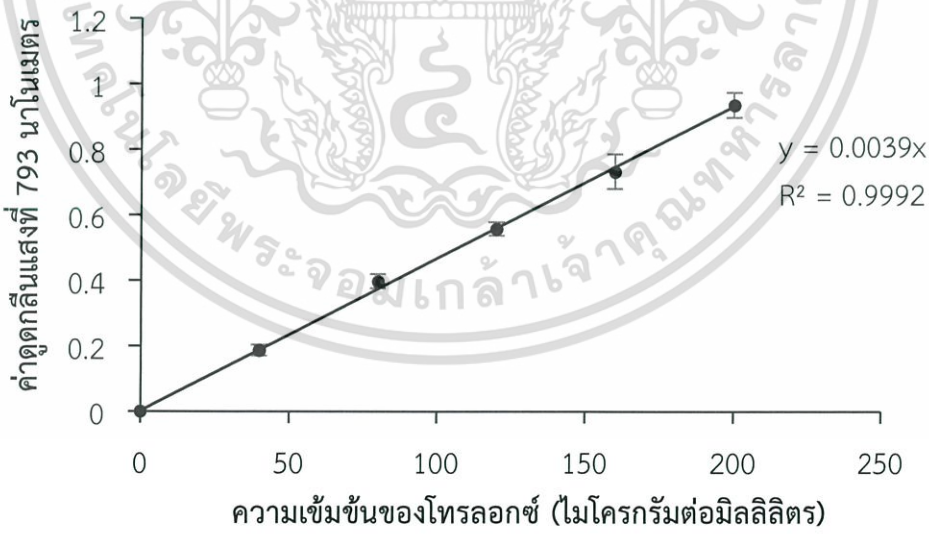
หมายเหตุ : R^2 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination : R square)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mahesh and Jayakumaran (2010) ได้ทำการศึกษาสารสกัดจากส่วนเนื้อไม้ เปลือกไม้ และใบสัก โดยผลการศึกษานั้นพบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบสัก สามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ตั้งแต่ความเข้มข้นสารสกัดเมทานอลที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะสามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 95.9 โดยที่ Ramesh and Mahalakshmi (2014) ได้ศึกษาสารสกัดจากส่วนเนื้อไม้ เปลือกไม้ และใบสักเช่นเดียวกัน พบว่าสารสกัดจากเนื้อไม้สามารถยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ถึงร้อยละ 98.6 ในชั้นเอทานอล และในการศึกษาของ Vikas *et al.* (2013) พบว่าส่วนเปลือกไม้สักมีสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ เท่ากับร้อยละ 67.62 ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงสามารถบอกได้ว่าส่วนประกอบต่างๆ ของต้นสัก เช่น ใบ เปลือกไม้ เนื้อไม้ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS แต่จะให้ผลแตกต่างกันไปในแต่ละส่วน และแต่ละความเข้มข้น

4.2.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

จากการวิเคราะห์หาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์ ด้วยวิธี FRAP โดยมีโทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 40, 80, 120, 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ความเข้มข้นต่างๆ และความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ทดสอบได้ นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงต่อความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็กของสารสกัด พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9992 กราฟที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 793 นาโนเมตรกับความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์

หมายเหตุ : R^2 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination : R square)

ผลการวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็กของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสายพันธุ์สยามินทร์และมเหสักข์ ผลการศึกษาที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่ามีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็กของสารสกัดจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox equivalent) โดยพบว่าค่าของสารสกัดเมทานอลจากใบมเหสักข์เท่ากับ 198.28 ± 1.85 มิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัดสูงกว่าสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์เท่ากับ 121.46 ± 5.62 มิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยวิธี T-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่าความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็ก (FRAP value) ของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์

ตัวอย่าง	FRAP value* ± SE (mg TEAC/g extract)
สักสยามินทร์	121.46[a] ± 0.02
มเหสักข์	198.28[b] ± 0.00

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี Independent T-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

* FRAP value คือ ค่าความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็ก แสดงในหน่วยมิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด (mg TEAC/g extract)

Cynthia *et al.* (2013) ได้ศึกษาสารสกัดเอทานอลจากใบสักที่สกัดด้วยวิธี Soxlet extraction และ Microwave-assisted extraction พบว่าความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็กได้เท่ากับ 41.79 และ 50.52 ไมโครกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร และในงานวิจัยของ Joni *et al.* (2016) ได้ทำการศึกษาสารสกัดจากใบสักด้วยวิธี Soxlet extraction และ Microwave-assisted extraction เช่นเดียวกับงานวิจัยที่กล่าวข้างต้น แต่เก็บตัวอย่างจากต่างสถานที่กัน พบว่ามีความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็กเท่ากับ 43.64 และ 50.52 ไมโครกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร และในงานของ Ghaisas *et al.* (2008) ที่ศึกษาสารสกัดจากเปลือกไม้ในชั้นเอทานอล มีค่า IC_{50} ของการรีดิวซ์ไอออนเหล็กเท่ากับ 190 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงสามารถบอกได้ว่าส่วนประกอบอื่นของสักนอกเหนือจากสารสกัดเมทานอลของใบสามารถรีดิวซ์ไอออนเหล็กได้เช่นกัน

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disc Diffusion

การตรวจฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากใบสักสายพันธุ์มเหสักข์และสักสยามินทร์ โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ดังนี้ *Bacillus cereus* (DMST 5040) *Bacillus subtilis (*ATCC 6633) *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853*) Salmonella typhimurium* (DMST 0562) *Staphylococcus aureus* (TISTR 1466) และ *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) ด้วยวิธี Disc diffusion โดยทำการทดสอบคุณภาพความไวของเชื้อมาตรฐาน *E. coli* ต่อยาปฏิชีวนะ Gentamicin 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ ควบคู่ตลอดการทดลอง ผลการทดสอบพบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความไวของเชื้อ *E. coli* ต่อยาปฏิชีวนะมีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเท่ากับ 21.88 มิลลิเมตร เปรียบเทียบจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ให้ขอบเขตการยับยั้งการเจริญของเชื้อตามเกณฑ์มาตรฐานของ The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ซึ่งอยู่ในช่วง 19-26 มิลลิเมตร

สารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ โดยมี Gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และมีเมทานอลร้อยละ 100 เป็นตัวควบคุมเชิงลบ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli, P. aeruginosa* และ *S. typhimurium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ แต่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus, B. subtilis, M. luteus, S. aureus* และ *S. epidermidis* ซึ่งพิจารณาได้จากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส โดยแสดงตัวอย่างของเชื้อ *B. subtilis* ดังรูปที่ 4.7 ทั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบสักทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis, M. luteus* และ *S. epidermidis* ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* และ *S. aureus* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยวิธี T-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *M. luteus* ได้สูงกว่าสารสกัดเมทานอลจากใบมเหสักข์ ในขณะเดียวกันสารสกัดเมทานอลจากใบมเหสักข์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีกว่าสารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์ ดังแสดงในตารางที่ 4.5

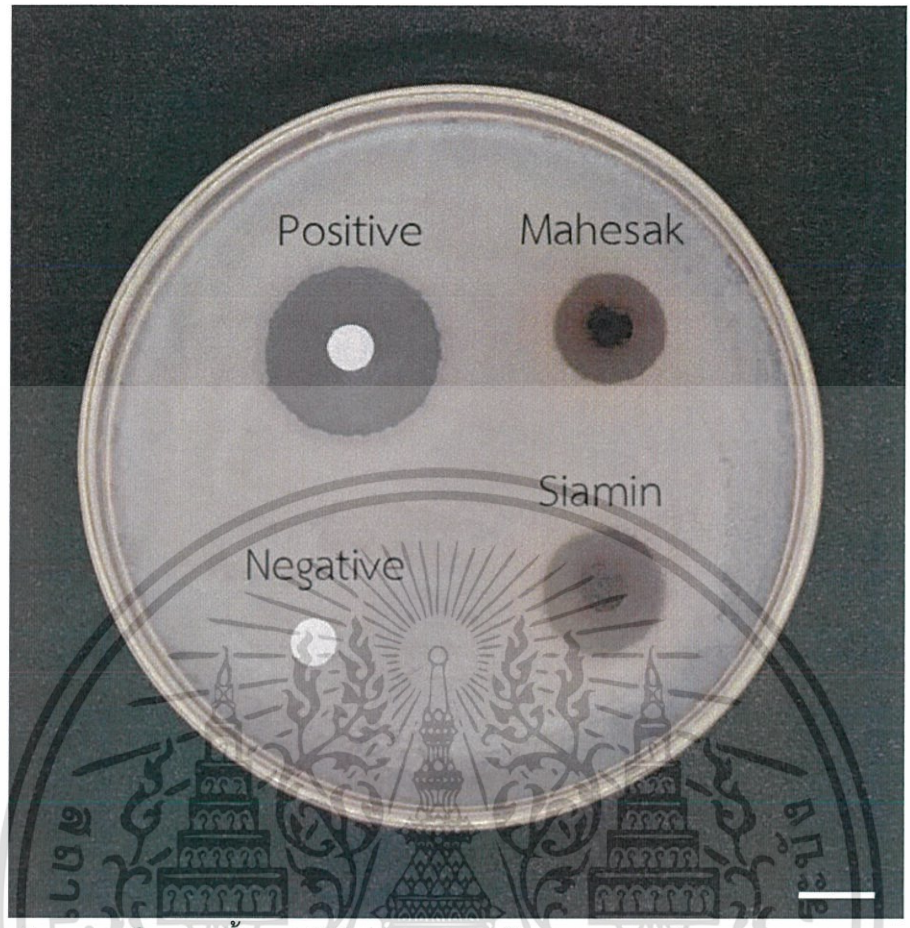
ตารางที่ 4.5 เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกของ Gentamicin และสารสกัดเมทานอลจากสักสยามินทร์และมเหสักข์

เชื้อแบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (mm ± SE)		
	Gentamicin	สารสกัดเมทานอล 1000 µg/disc	
	10 µg/disc	สักสยามินทร์	มเหสักข์
B. cereus	25.94 ± 1.01	14.10[a] ± 0.22	13.72[a] ± 0.80
B. subtilis	22.20 ± 0.70	13.84[a] ± 0.32	12.69[b] ± 0.25
M. luteus	29.90 ± 0.68	15.52[a] ± 0.32	11.74[b] ± 0.41
S. aureus	19.21 ± 0.34	10.79[a] ± 0.17	10.36[a] ± 0.24
S. epidermidis	28.68 ± 0.34	14.14[a] ± 0.25	15.64[b] ± 0.34

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติโดยเปรียบเทียบด้วยวิธี Independent T-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ลักษณะวงใสของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* โดย Positive คือ Gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม Negative คือ เมทานอลร้อยละ 100 Siamin คือ สารสกัดเมทานอลจากใบสักสยามินทร์ และ Mahesak คือ สารสกัดเมทานอลจากใบมเหสักข์ ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (เส้นมาตราส่วนมีขนาดเท่ากับ 1 เซนติเมตร)

จากงานวิจัยของ Mahesh and Jayakumaran (2010) รายงานถึงผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบสัก โดยการทำ Soxlet extraction พบว่าสารสกัดเมทานอลมีผลกับทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งยังได้รายงานอีกว่าสารสกัดคลอโรฟอร์มให้ผลการยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 14 มิลลิเมตร และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Klebsiella pneumonia* ดีที่สุด เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 8 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และต่อมาในงานวิจัยของ Mahesh and Jayakumaran (2011) ศึกษาสารสกัดจากใบในชั้นตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตทและเมทานอล ตามลำดับ โดยการทำ Soxlet extraction และการกลั่นพบว่าสารประกอบที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดย Irma (2014) ทำการศึกษาสารสกัดเอทานอลจากใบสักกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *B. cereus S. aureus* และ *S. typhii* มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 23.40, 29.20 และ 23.63 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในส่วนของแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *P. aeroginosa* เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 12.17 และ 29.02 มิลลิเมตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเห็นได้ว่าในงานวิจัยอื่น สารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้จะไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบซึ่งอาจสืบเนื่องมาจากสักที่นำมาศึกษาเป็นสักคนละสายพันธุ์ หรือเนื่องด้วยภูมิศาสตร์ สภาพอากาศรวมถึงคุณภาพดินที่ใช้เพาะปลูกต้นสักต่างกัน ส่งผลให้สารต่างๆ ที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกัน

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาสารสกัดเมทานอลด้วยวิธี Maceration จากใบสักสยามินทร์และมเหสักข์ โดยใช้สารสกัดจากใบสักทั้งสองสายพันธุ์ไปศึกษาสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่าสักสยามินทร์และมเหสักข์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเท่ากับ 178.35 ± 4.93 และ 214.36 ± 4.20 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด ตามลำดับ

เมื่อนำสารสกัดเมทานอลมาทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ IC_{50} ของสักสยามินทร์และมเหสักข์มีค่าเท่ากับ 178.99 ± 3.77 และ 270.65 ± 8.52 มิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด ต่อมาได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ IC_{50} ของสักสยามินทร์และมเหสักข์มีค่าเท่ากับ 253.05 ± 1.99 และ 347.49 ± 3.10 มิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด และเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนเหล็ก พบว่าค่าความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กไอออนเท่ากับ 121.46 ± 5.62 และ 198.28 ± 1.85 มิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด โดยจากการเปรียบเทียบผลการศึกษาวิธีการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระจากวิธี DPPH ABTS และ FRAP พบว่าสักทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดยสารสกัดเมทานอลของมเหสักข์มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสักสยามินทร์ ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ที่ศึกษาแล้วพบว่ามเหสักข์มีปริมาณมากกว่า จากความสัมพันธ์นี้สามารถบอกได้ว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคชี้วัดถึงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ จะเห็นได้ว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคสูง การต้านอนุมูลอิสระก็จะสูงตามไปด้วยเช่นกัน

เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพด้านฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย จากผลการศึกษาด้วยวิธี Disc diffusion ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ พบว่าสารสกัดเมทานอลของสักทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* โดยจะให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติกันทั้งสักสยามินทร์และมเหสักข์ กับ *B. cereus* และ *S. aureus* ส่วนใน *B. subtilis* และ *M. luteus* สักสยามินทร์จะออกฤทธิ์ยับยั้งได้แตกต่างกว่ามเหสักข์ โดยให้บริเวณวงใสที่กว้างกว่า มีเพียงใน *S. epidermidis* เท่านั้นที่มเหสักข์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่า โดยให้ผลแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการศึกษาดังกล่าว จึงสามารถสรุปได้ว่าสักสยามินทร์มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่า เพราะมีแบคทีเรียเพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้นในการศึกษาครั้งนี้ที่มเหสักข์สามารถให้พื้นที่บริเวณวงใสได้กว้างกว่า

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาสารสกัดเมทานอลจากใบสักทั้งสองสายพันธุ์เพียงเท่านั้น ดังนั้นควรมีการทดสอบในชั้นตัวทำละลายอื่น เพื่อประเมินและเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่อไป อีกทั้งควรประเมินผลกระทบต่อเซลล์ไลน์เพื่อดูความแตกต่างของการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ และควรทดสอบในส่วนอื่นของสัก เพื่อแยกสารสำคัญไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่น เภสัชวิทยา เวชสำอาง ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

โชคชัย พรหมแพทย์. 2536. สักทองเพื่อการค้า. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี : ศูนย์หนังสือเกษตร.

ธิติ วิสารัตน์. (ผู้รวบรวม). 2556. องค์ความรู้ไม้สักไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณการเกษตรแห่งประเทศไทย.

ธีรวุฒิ หวังอำนวยพร และรัชนี ไสยประจง. 2550. "ความสามารถในการต้านจุลินทรีย์และต้านสารอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรไทยบางชนิด." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัญฑิต บัญฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556. "อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ." *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 21(3) : 275-286.

เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์. 2553. "การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน." รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

นงลักษณ์ ห้วยหงส์ทอง. 2559 "การทดสอบสารพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรไทยบางชนิดที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน." รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยบูรพา.

มณฑี โพธิ์ทัย. 2536. ปลูกสักทองเชิงธุรกิจ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : หจก. เม็ดทรายพริ้นติ้ง.

รวินิภา ศรีมูล, ศิริจันทร์ ตาใจ และศิริกมล นิยมวรรณ์. 2556. "ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำผลไม้แปรรูปในจังหวัดจันทบุรี." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี.

สุทัศน์ เดชวิสิทธิ์. 2536. "ไม้สักทอง การลงทุนปลูกไม่สักเพื่อการค้า" พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี : สำนักพิมพ์ เท็คโทน่า แกรนดีสกรุ๊ฟ.

อนันต์ โพธิ์ลังกา, วรวิทย์ รัตนพิเศษ และเกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์. 2551. "การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิคกับฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากต้นเฉาก๊วยและต้นหมาน้อย." *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 33(3) : 224-232.

Abdelhady, M.I.S., Motaal, A.A. and Beerhues, L. 2011. "Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Standardized Extracts from Leaves and Cell Cultures of Three *Callistemon* Species." *American Journal of Plant Sciences.* 2 : 847-850.

Al-Duais, M., Müller, L., Böhm, V. and Jetschke, G. 2009. "Antioxidant Capacity and Total Phenolics of *Cyphostemma digitatum* Before and After Processing: Use of Different Assays." *European Food Research Technology.* 228 : 813-821.

Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. 1996. "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay." *Analytical Biochemistry.* 239 : 70-76.

Cynthia, S., Purnomo, H. and Kusnadi, J. 2013. "Antioxidant Extraction of Teak (*Tectona grandis*) Leaves Using Microwave-Assisted Extraction." *International Journal of PharmTech Research.* 5(3) : 1410-1415.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2015. "EUCAST Disc Diffusion Method." *Antimicrobial Susceptibility Testing.* 5.0 : 1-17.

Ghaisas, M.M., Navghare, V.V., Takawale, A.R., Zope, V.S. and Deshpande, A.D. 2008. "*In-vitro* Antioxidant Activity of *Tectona grandis* Linn." *Pharmacologyonline.* 3 : 296-305.

Irma, I.A., Tuti, S., Afiyah, D.N. and Wardhani, D.P. 2014. "Physicochemical and Organoleptic of Beef Sausages with Teak Leaf Extract (*Tectona grandis*) Addition as Preservative and Natural Dye." *International Food Research Journal.* 21(5) : 2033-2042.

Joni, K., Estri, L.A., Dian, W.N. and Elina, C.S. 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.

Krishnaveni, M., Amsavalli, L., Chandrasekar, R., Madhaiyan, P. and Durairaj, S. 2013. "Antioxidant Acticity of Plants at Govt. College of Engineering Campus, Salem, Tamil nadu, India." *International Journal of Pharmaceutical Science and Research.* 21(1) : 160-163.

Mahesh, S.K. and Jayakumaran, N.A. 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(2) : 155-158.

Mahesh, S.K. and Jayakumaran, N.A. 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.

Monali, P.M. and Rabindra, N.P. 2013. "In Vitro Antibacterial Efficacy of 21 Indian Timber-Yeilding Plants Against Multidrug-Resistant Bacteria Causing Urinary Tract Infection." *Osong Public Health Research Perspect.* 4(6) : 347-357.

Mosad, A.G., Hussien, A.S., Hassan, M.F.M., Laila, A.R., Mona, A.M. and Amal, M.S. 2014. "Antioxidant and Cytotoxic Activities *Tectona grandis* Linn. Leaves." *International Journal of Phytopharmacology.* 5(2) : 143-157.

Naira, N. and Karvekar, M. 2010. "Isolation of Phenolic Compounds from the Ethanolic Extract of *Tectona grandis*." *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* 1(2) : 221-225.

Naira, N. and Karvekar, M. 2011. "Anti Microbial and Antioxidant Properties of the Isolated Compounds from the Methanolic Extract from the Leaves of *Tectona grandis.*" *Journal of Basic and Clinical Pharmacy.* 4(2) : 163 – 165.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Prieto, J.M. 2012. "Procedure: Preparation of DPPH Radical, and Antioxidant Scavenging Assay." *Dr. Prieto's DPPH Microplate Protocol.* (1) : 1-3.

Purushotham, K.G., Arun, P., Jayarani, J.J., Vasnthakumaari, R., Sankar, L. and Reddy, B.R. 2010. "Synegistic *in vitro* Antibacterial Activity of *Tectona grandis* Leaves with Tetracycline." *International Journal of PharmTech Research.* 2(1) : 519-523.

Rajkumar, S.B. and Sunil, S.J. 2011. "Screening of Antidiabetic and Antioxidant Potential of *Tectona grandis* Bark Ethanol Extract." *International Journal of Pharmaceutical Research.* 4(3) : 24-30.

Ramesh, B.N. and Mahalakshmi A. 2014. "Teak (*Tectona grandis* Linn.): A Renowned Timber Plant With Potential Medicinal Values." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 6(1) : 48-54.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. "Antioxidant Activity Applying an Improves ABTS Radical Cation Decolorization Assay." *Free Radical Biology and Medicine.* 26(9-10) : 1231-1237.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. 1996 "Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids." *Free Radical Biology and Medicine.* 20(7) : 933-956.

Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T. and Perumalsamy, P.L. 2001. "Antimicrobial Activity of Certain Indian Medicanal Plants Used in Folkloric Medicine." *Journal of Ethnopharmacology.* 74 : 217-220.

Subramoniam, A. 2015. Plants with Anti-Diabetes Mellitus Properties. Flo Rida: CRC Press.

Vikas, R., Manuj, K.D., Satyabrat, G. and Vineet, K. 2014. "Multifunctional Properties of Polysaccharides from *Dalbergia sissoo*, *Tectona grandis* and *Mimosa diplotricha*." *Carbohydrate Polymers* . 102 : 341–350.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox

สารเคมีที่ใช้

1. Trolox	3	มิลลิกรัม
2. เมทานอล	1	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสาร Trolox ปริมาณ 3 มิลลิกรัม
2. เติมเมทานอล 1 มิลลิลิตรแล้วผสมให้เข้ากันภายในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

สารเคมีที่ใช้

1. กรดแกลลิก	1	มิลลิกรัม
2. น้ำกลั่น		

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งกรดแกลลิกปริมาณ 1 มิลลิกรัม
2. เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรแล้วผสมให้เข้ากันภายในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารเพื่อทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ (ABTS)

สารเคมีที่ใช้

1. ABTS (2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	192.03	มิลลิกรัม
2. Potassium Persulfate ($K_2S_2O_8$)	33.11	มิลลิกรัม
3. น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร
4. เมทานอล		

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสาร ABTS ปริมาณ 192.03 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร
2. ชั่งสาร Potassium Persulfate ปริมาณ 33.11 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
3. ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร
4. บ่มในที่มืด 12 - 16 ชั่วโมง
5. เมื่อต้องการใช้งานนำมาเจือจางกับเมทานอลแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.70 ± 0.02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

4. การเตรียมสารเพื่อทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ (DPPH)

สารเคมีที่ใช้

1. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	1.9	มิลลิกรัม
2. เมทานอล		

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสาร DPPH ปริมาณ 1.9 มิลลิกรัม
2. ละลายกับเมทานอล 50 มิลลิลิตร
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.80 – 1.00

5. การเตรียมสารละลาย FRAP

สารเคมีที่ใช้

1. Acetate buffer (300 mM, pH 3.6)	200	มิลลิลิตร
2. TPTZ (10 mM)	20	มิลลิลิตร
3. $FeCl_3$	20	มิลลิลิตร
4. น้ำกลั่น		

ขั้นตอนการเตรียม

1. เตรียม 300 mM Acetate buffer pH 3.6 ปริมาณ 200 มิลลิลิตร ผสมกับ 10 mM TPTZ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร
2. เติม $FeCl_3$ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 24 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเก็บในขวดสีชา

6. การเตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu

สารเคมีที่ใช้

1. Folin-Ciocalteu	1	มิลลิลิตร
2. น้ำกลั่น	4	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. นำ Folin-Ciocalteu (สำเร็จรูป) 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร
2. เก็บสารละลายในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร หุ้มด้วยฟอยล์ แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น เตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้งต่อการใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

7. การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

สารเคมีที่ใช้

1. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 3 กรัม
2. น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง Na_2CO_3 ปริมาณ 3 กรัม
2. ละลาย Na_2CO_3 กับน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยทำการผสมเป็นเนื้อเดียวกันบนเครื่อง Magnetic Stirrer
3. หลังจากสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 40 มิลลิลิตร กวนผสมต่อแล้วเก็บสารในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร

8. การเตรียม 1.7% Nutrient Agar

สารเคมีที่ใช้

1. Nutrient Broth 3.25 กรัม
2. Agar 4.25 กรัม
3. น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง Nutrient Broth ปริมาณ 3.25 กรัม บรรจุลงในขวด Duran ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
2. ชั่ง Agar ปริมาณ 4.25 กรัม บรรจุลงในขวด Duran ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
3. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตรลงไป ปิดฝา หุ้มฝาด้วยฟอยล์แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อด้วยการเข้าเครื่อง Autoclave

9. การเตรียม 1.7% Mueller Hinton Agar

สารเคมีที่ใช้

1. Mueller Hinton Broth 5.25 กรัม
2. Agar 4.25 กรัม
3. น้ำกลั่น

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง Mueller Hinton Broth ปริมาณ 5.25 กรัม บรรจุลงในขวด Duran ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
2. ชั่ง Agar ปริมาณ 4.25 กรัม บรรจุลงในขวด Duran ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
3. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตรลงไป ปิดฝา หุ้มฝาด้วยฟอยล์แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อด้วยการเข้าเครื่อง Autoclave

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ ข-1 ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิกและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

ความเข้มข้นของกรดแกลลิก (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ± SE
40	0.23 ± 0.01
80	0.44 ± 0.02
120	0.64 ± 0.02
160	0.85 ± 0.02
200	1.07 ± 0.01

หมายเหตุ : ± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ข-2 ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระและค่า IC_{50} ทดสอบด้วยวิธี DPPH

ความเข้มข้นโทรลอกซ์ (µg/ml)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ± SE	IC_{50} (µg/ml)
5	19.14 ± 2.27	16.04
10	33.43 ± 1.34	
15	47.27 ± 2.25	
20	60.75 ± 1.73	
25	76.65 ± 2.01	
30	92.66 ± 0.63	

หมายเหตุ : ± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ข-3 ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ และค่า IC_{50} ทดสอบด้วยวิธี ABTS

ความเข้มข้น (µg/ml)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ± SE	IC_{50} (µg/ml)
10	12.55 ± 0.68	
30	31.84 ± 2.30	
50	55.24 ± 2.62	45.52
70	76.52 ± 2.86	
90	97.24 ± 0.79	

หมายเหตุ : ± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ ข-4 ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ทดสอบด้วยวิธี FRAP

ความเข้มข้นของโทรลอกซ์ (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ± SE
40	0.27 ± 0.05
80	0.45 ± 0.09
120	0.59 ± 0.11
160	0.76 ± 0.12
200	0.91 ± 0.17

หมายเหตุ : ± SE คือ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

1. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

ตารางภาคผนวกที่ ค-1.1 ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติจากสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์ในการหาปริมาณฟีนอลิคทั้งหมด

Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
สักสยามินทร์	9	178.35	14.80	4.93
มเหสักข์	9	214.36	12.61	4.20

ตารางภาคผนวกที่ ค-1.2 ตารางแสดงค่าสถิติโดยใช้สูตร T-test แบบ Independent ในการหาความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิคทั้งหมดระหว่างสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์

	Levene's Test for Equality of Variances		T-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	0.001	0.97	-5.55	16	0.000	-36.010	6.483	-49.75	-22.26
Equal variances not assumed			-5.55	15.60	0.000	-36.010	6.483	-49.78	-22.23

หมายเหตุ : ระดับความเชื่อมั่น ≤ ร้อยละ 0.05

ระดับความเชื่อมั่น > ร้อยละ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค (ต่อ)

2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ตารางภาคผนวกที่ ค-2.1 ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติจากสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
สักสยามินทร์	3	178.99	6.53	3.77
มเหสักข์	3	270.65	14.76	8.52

ตารางภาคผนวกที่ ค-2.2 ตารางแสดงค่าสถิติโดยใช้สูตร T-test แบบ Independent ในการหาความสัมพันธ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ระหว่างสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์

	Levene's Test for Equality of Variances		T-test for Equality of Means						
								95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Equal variances assumed	1.594	0.275	-9.83	4	0.001	-91.657	9.322	-117.54	-65.78
Equal variances not assumed			-9.83	2.75	0.003	-91.657	9.322	-122.88	-60.44

หมายเหตุ : ระดับความเชื่อมั่น ≤ ร้อยละ 0.05

ระดับความเชื่อมั่น > ร้อยละ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค (ต่อ)

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS

ตารางภาคผนวกที่ ค-3.1 ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติจากสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS

Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
สักสยามินทร์	3	253.05	3.44	1.99
มเหสักข์	3	347.49	5.37	3.10

ตารางภาคผนวกที่ ค-3.2 ตารางแสดงค่าสถิติโดยใช้สูตร T-test แบบ Independent ในการหาความสัมพันธ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ระหว่างสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์

	Levene's Test for Equality of Variances		T-test for Equality of Means						
								95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Equal variances assumed	0.696	0.451	-25.63	4	0.000	-94.447	3.685	-104.68	-84.22
Equal variances not assumed			-25.63	3.41	0.000	-94.447	3.685	-105.42	-83.47

หมายเหตุ : ระดับความเชื่อมั่น ≤ ร้อยละ 0.05

ระดับความเชื่อมั่น > ร้อยละ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค (ต่อ)

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของสารต้านอนุมูลอิสระ FRAP

ตารางภาคผนวกที่ ค-4.1 ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติจากสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์ในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP

Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
สักสยามินทร์	9	121.46	16.85	5.62
มเหสักข์	6	198.28	4.54	1.85

ตารางภาคผนวกที่ ค-4.2 ตารางแสดงค่าสถิติโดยใช้สูตร T-test แบบ Independent ในการหาความสัมพันธ์ในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ระหว่างสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์

	Levene's Test for Equality of Variances		T-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	5.305	0.03	-10.783	13	0.000	-76.814	7.124	-92.204	-61.424
Equal variances not assumed			-12.986	9.652	0.000	-76.814	5.915	-90.058	-63.569

หมายเหตุ : ระดับความเชื่อมั่น ≤ ร้อยละ 0.05

ระดับความเชื่อมั่น > ร้อยละ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค (ต่อ)

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion

5.1 *Bacillus cereus*

ตารางภาคผนวกที่ ค-5.1.1 ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติจากสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*

Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
สักสยามินทร์	6	14.10	0.55	0.22
มเหสักข์	6	13.72	1.96	0.80

ตารางภาคผนวกที่ ค-5.1.2 ตารางแสดงค่าสถิติโดยใช้สูตร T-test แบบ Independent ในการหาความสัมพันธ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ระหว่างสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์

	Levene's Test for Equality of Variances		T-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	6.88	0.025	0.447	10	0.664	0.372	0.832	-1.482	2.225
Equal variances not assumed			0.447	5.77	0.671	0.372	0.832	-1.683	2.427

หมายเหตุ : ระดับความเชื่อมั่น ≤ ร้อยละ 0.05

ระดับความเชื่อมั่น > ร้อยละ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค (ต่อ)

5.2 Bacillus subtilis

ตารางภาคผนวกที่ ค-5.2.1 ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติจากสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*

Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
สักสยามินทร์	6	13.84	0.80	0.33
มเหสักข์	6	12.69	0.62	0.25

ตารางภาคผนวกที่ ค-5.2.2 ตารางแสดงค่าสถิติโดยใช้สูตร T-test แบบ Independent ในการหา ความสัมพันธ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ระหว่างสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์

	Levene's Test for Equality of Variances		T-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	1.392	0.26	2.785	10	0.019	1.153	0.414	0.230	2.076
Equal variances not assumed			2.785	9.385	0.020	1.153	0.414	0.222	2.084

หมายเหตุ : ระดับความเชื่อมั่น ≤ ร้อยละ 0.05

ระดับความเชื่อมั่น > ร้อยละ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค (ต่อ)

5.3 Micrococcus luteus

ตารางภาคผนวกที่ ค-5.3.1 ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติจากสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *M. luteus*

Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
สักสยามินทร์	8	15.52	0.91	0.32
มเหสักข์	4	11.74	0.83	0.41

ตารางภาคผนวกที่ ค-5.3.2 ตารางแสดงค่าสถิติโดยใช้สูตร T-test แบบ Independent ในการหาความสัมพันธ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *M. luteus* ระหว่างสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์

	Levene's Test for Equality of Variances		T-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	0.136	0.72	6.978	10	0.000	3.786	0.543	2.577	4.995
Equal variances not assumed			7.223	6.678	0.000	3.786	0.524	2.535	5.038

หมายเหตุ : ระดับความเชื่อมั่น ≤ ร้อยละ 0.05

ระดับความเชื่อมั่น > ร้อยละ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค (ต่อ)

5.4 *Staphylococcus aureus*

ตารางภาคผนวกที่ ค-5.4.1 ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติจากสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
สักสยามินทร์	6	10.79	0.42	0.17
มเหสักข์	6	10.36	0.61	0.25

ตารางภาคผนวกที่ ค-5.4.2 ตารางแสดงค่าสถิติโดยใช้สูตร T-test แบบ Independent ในการหาความสัมพันธ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ระหว่างสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์

	Levene's Test for Equality of Variances		T-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	1.020	0.336	1.431	10	0.183	0.430	0.300	-0.240	1.100
Equal variances not assumed			1.431	8.869	0.187	0.430	0.300	-0.251	1.111

หมายเหตุ : ระดับความเชื่อมั่น ≤ ร้อยละ 0.05

ระดับความเชื่อมั่น > ร้อยละ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค (ต่อ)

5.5 Staphylococcus epidermidis

ตารางภาคผนวกที่ ค-5.5.1 ตารางแสดงข้อมูลทางสถิติจากสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis*

Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
สักสยามินทร์	6	14.14	0.60	0.25
มเหสักข์	6	15.64	0.59	0.24

ตารางภาคผนวกที่ ค-5.5.2 ตารางแสดงค่าสถิติโดยใช้สูตร T-test แบบ Independent ในการหาความสัมพันธ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ระหว่างสารสกัดเมทานอลของสักสยามินทร์และมเหสักข์

	Levene's Test for Equality of Variances		T-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	0.128	0.72	-4.359	10	0.001	-1.502	0.345	-2.269	-0.734
Equal variances not assumed			-4.359	9.99	0.001	-1.502	0.345	-2.269	-0.734

หมายเหตุ : ระดับความเชื่อมั่น ≤ ร้อยละ 0.05

ระดับความเชื่อมั่น > ร้อยละ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้