รายงานการวิจัย

การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบและผลของโคลงเคลง และโคลงเคลงช้าง

Bio-activity investigation of extracts of *Melastoma villosum* lodd. and *Melastoma sanguineum* Sims. leaf and fruit

ลักษมี วิทยา Luksamee Vittaya

ชาคริยา ฉลาด Chakhriya chalad

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2565

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2565 เป็นงานวิจัยที่นำเอาความรู้พื้นฐานทางเคมีค้นคว้าสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติเช่นสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีบทบาทต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย งานวิจัยนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์ และผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลจากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์เพื่อต่อยอดขยายผลและนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ทางอื่นได้ต่อไปในอนาคต

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยที่ให้การสนับสนุนในการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่ายที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้การช่วยเหลือเป็นอย่างดี ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยที่ช่วยในการทำงานวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี คุณเทพวลี คะนานทอง ผู้ช่วยนักวิจัย ณ สำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพืชพันธุ์ คอยประสานงานและชี้แนะแนวทางการจัดส่งตัวอย่างพืชเพื่อเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย (voucher specimen) ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ทุกประการ ตลอดจนครอบครัวและผองเพื่อนที่ให้ความห่วงใย เป็นกำลังใจเสมอมา ประโยชน์อันใดที่เกิดจากงานวิจัยนี้ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของท่านและหน่วยงาน ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาส นี้

ลักษมี วิทยา

ชาคริยา ฉลาด

สิงหาคม 2566

การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง

ลักษมี วิทยา[1] และ ชาคริยา ฉลาด[1]

บทคัดย่อ

โคลงเคลงและโคลงเคลงช้างเป็นพืชที่เจริญเติบโตในพื้นที่ ๆ มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง บนพื้นที่ป่าชายหาดบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ภูมิปัญญาชาวบ้านนำส่วนพืชเช่นใบ ราก ดอก ผล เป็นสมุนไพรในการรักษา อย่างไรก็ตามการศึกษาผลทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับส่วนต่างๆ ของโคลงเคลงทั้งสองชนิดมีไม่มากนัก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากผลและใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง โดยนำผลและใบของพืชทั้งสองชนิดมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์แบบแช่หมัก 3 ชนิดคือเฮกเซน เอทิลอะซีเตทและเมทานอลตามลำดับขั้ว นำสารสกัดหยาบที่ผ่านการระเหยแห้ง ตรวจสอบพฤกษเคมีบางชนิด และตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิก และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดผลและใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้างที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตทและเมทานอล มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระได้ดี แสดงด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุด (IC_{50}) สอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ต้านยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 7 ชนิด (*Bacillus cereus Staphylococcus aureus Staphylococcus epidermidis Escherichia coli Samolnella typhi klebsiella pueumonaie Vibrio haveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus*) ด้วยวิธี disc diffusion และตรวจสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) พบว่าส่วนใหญ่สารสกัดหยาบเอทิลอะซีเตทและเมทานอลจากผลและใบออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดหยาบเฮกเซน ยกเว้นเชื้อ *E. coli* ไวต่อการยับยั้งจากสารสกัดใบโคลงเคลงจากเฮกเซน และเชื้อ *V. haveyi* ที่ไวต่อการยับยั้งจากสารสกัดหยาบเฮกเซนจากผลและใบโคลงเคลงและผลโคลงเคลงช้าง จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่าการมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูง มีส่วนช่วยในการดักจับอนุมูลอิสระและส่งผลต่อการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบางชนิดได้ดี ดังนั้นควรเลือกชนิดพืช ส่วนพืชจากตัวทำละลายเพื่อการประยุกต์ใช้ และหากมีการแยกสารให้บริสุทธิ์สามารถนำมาศึกษากลไกการออกฤทธิ์เพื่อเป็นแนวทางการนำไปประโยชน์ต่อไป

คำสำคัญ: สารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย อนุมูลอิสระ โคลงเคลง โคลงเคลงช้าง

.....

[1]อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.สิเกา จ.ตรัง

Bio-activity investigation of extracts of *Melastoma villosum* lodd. and *Melastoma sanguineum* Sims. leaf and fruit

Luksamee Vittaya and Chakhriya chalad

Abstract

Melastoma villosum and *Melastoma sanguineum* are plant that grew up in highly biodiverse areas, particularly in the coastal forest regions near Rajamangala University of Technology Srivijaya. Folk wisdom uses plant parts such as leaves, roots, flowers, and fruits as herbal remedies for medicinal purposes. However, there is rare research on the pharmacological effects related to different parts of both plants in this regard. Therefore, the aim of this work was to investigate the phytochemical screening and biological activities from leaves and fruits extracts of both plant species. The plants were extracted with subsequentially polarity of three organic solvents (hexane, ethyl acetate, and methanol) by maceration method. Dried crude extracts were analyzed phytochemicals and phenolics compounds were considered. For biological activities, it was found that each part of the extracts exhibited varying abilities to scavenge free radicals. The ethyl acetate and methanolic extracts of leaf and fruit from *M. villosum* and *M. sanguineum* showed particularly the lowest minimum concentration (IC_{50}) values for scavenging free radicals. These findings align with the results of the antibacterial activity against seven pathogenic bacteria (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae, Vibrio haveyi*, and *Vibrio parahaemolyticus*) using the disc diffusion method. The efficacy of the extracts was determined by the minimum antibacterial concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values. It was found that most of the crude extracts from fruit and leaf obtained using ethyl acetate and methanol exhibited antibacterial activities better than the hexane extract except *E. coli* and *V. haveyi* which showed higher resistance to hexane extracts of the *M. villosum* leaf and fruit, respectively as well as hexane extracts of *M. sanguineum*. From the study results, it is evident that having a high quantity of phenolic compounds contributes significantly to antioxidant

activity and affects antibacterial activity against certain bacteria as well. Therefore, it is advisable to select plant species and parts of the plants from the solvent for application. Additionally, isolation of the extracts is further studied to purified and to determine their mechanisms of activities which providing potential avenues for further utilization.

Keywords: Phenolic, Antibacterial, Antioxidant, *Melastoma villosum*, *Melastoma sanguineum*

.....

Faculty of Science and Fisheries Technology. Rajamangala University of Technology Srivijaya, Sikao, Trang.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ ภาษาไทย	ข
บทคัดย่อ ภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
1.3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
1.4 วัตถุประสงค์	7
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 วิธีดำเนินงานวิจัย	9
2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย	9
2.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดลอง	9
2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดจากใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง	9
2.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์พฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	10
2.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย	10
2.6 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	11
2.7 วิธีดำเนินการวิจัย	12
บทที่ 3 ผลการวิจัย และอภิปรายผล	20
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย	34
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	40
ภาคผนวก ก ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสารสกัดส่วนต่างๆ ของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง	41
ภาคผนวก ข ข้อมูลทางสถิติของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	44

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3.1 :	ผลผลิตร้อยละของสารสกัดผลและใบของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง	20
ตารางที่ 3.2 :	การตรวจสอบเชิงคุณภาพของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดใบและผลโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง	22
ตารางที่ 3.3 :	ปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดผลและใบของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง	24
ตารางที่ 3.4 :	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลและใบของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง	25
ตารางที่ 3.5 :	ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดผลและใบของโคลงเคลง (MV) และโคลงเคลงช้าง (MC)	29
ตารางที่ 3.6 :	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดผลและใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง	33

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

สารบัญตารางภาคผนวก

		หน้า
ตารางผนวก ก1 :	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผลและใบของโคลงเคลง ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร	41
ตารางผนวก ข1 :	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แบบ One-way ANOVA โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 22	44
ตารางผนวก ข2 :	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิก	44
ตารางผนวก ข3 :	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แบบ One-way ANOVA โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 22	45
ตารางผนวก ข4 :	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	45
ตารางผนวก ข5 :	การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*	46
ตารางผนวก ข6 :	การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*	47
ตารางผนวก ข7 :	การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis*	48
ตารางผนวก ข8 :	การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*	49
ตารางผนวก ข9 :	การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Samonella typhi*	50
ตารางผนวก ข10 :	การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *klebsiella pueumonaie*	51
ตารางผนวก ข11 :	การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. haveyi*	52
ตารางผนวก ข12 :	การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. parahamolyticus*	53

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1.1 :	ส่วนต่างๆ ของโคลงเคลง (a) ผล (b) ดอก (c) ใบ	3
ภาพที่ 1.2 :	ส่วนต่างๆ ของโคลงเคลงช้าง (a) ลำต้น (b) ดอก (c) ผลและใบ	4
ภาพที่ 2.1 :	ขั้นตอนการสกัดส่วนใบของโคลงเคลง	13
ภาพที่ 2.2 :	ขั้นตอนการสกัดส่วนผลของโคลงเคลง	13
ภาพที่ 2.3 :	ขั้นตอนการสกัดส่วนใบของโคลงเคลงช้าง	14
ภาพที่ 2.4 :	ขั้นตอนการสกัดส่วนผลของโคลงเคลงช้าง	14
ภาพที่ 3.1 :	ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดใบและผลของโคลงเคลงต่อเชื้อ *B. cereus* (A), *S. aureus* (B), *S. epidermidis* (C), *E. coli* (D), *Samonella typhi* (E), *klebsiella pueumonaie* (F), *V. haveyi* (G) และ *V. parahamolyticus* (H) เมื่อ MVLH, MVLE, MVILM คือใบจากการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตทและเมทานอล ตามลำดับ	31
ภาพที่ 3.2 :	ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดใบและผลของโคลงเคลงช้างต่อเชื้อ *B. cereus* (A), *S. aureus* (B), *S. epidermidis* (C), *E. coli* (D), *Samonella typhi* (E), *klebsiella pueumonaie* (F), *V. haveyi* (G) และ *V. parahamolyticus* (H) เมื่อ MVLH, MVLE, MVILM คือใบจากการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตทและเมทานอล ตามลำดับ	31

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

สารบัญภาพภาคผนวก

หน้า

ภาพผนวก ก1 : กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร 41

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือสารที่ออกฤทธิ์ส่งผลต่อสิ่งมีชีวิต คน สัตว์และพืช สารมากมายจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติมีฤทธิ์ทางชีวภาพและนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่นฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (สิทธิโชค, 2552) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่จะนำมาใช้ประโยชน์ได้ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจงโดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อร่างกายหรือมีผลข้างเคียงน้อย พืชที่เจริญเติบโตในพื้นที่ ๆ มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง เช่น ในพืชที่บริเวณป่าชายหาดหรือป่าชายเลน จะเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายของพืชที่เจริญเติบตามธรรมชาติโดยไม่ต้องใช้สารเคมี เป็นแหล่งอาหารที่ดีและยังเป็นแหล่งของยา รวมถึงเป็นแหล่งของแร่ธาตุ วิตามินเป็นต้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะพบในพืชซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีหลากหลายและจัดแบ่งออกได้หลายกลุ่มได้แก่ แอลคาลอย์ แทนนิน ฟลาโวนอยด์ สเตอรอยด์ เทอร์พีนอยด์ ซาโปนินและกรดไขมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบฟีนอลิกเป็นเมทาบอไลต์ทุติยภูมิที่สำคัญของพืช มีผลต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดี (Mahmoudi et al., 2016) ช่วยในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน กำจัดอนุมูลอิสระ ลดความเครียดและการป้องกันการเกิดโรคได้ (พงศ์ศักดิ์และปาริชาติ, 2553) ดังนั้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาพืชสมุนไพรที่มีสารประกอบฟีนอลิกสามารถทำลายแบคทีเรียก่อโรคใช้แทนยาปฏิชีวนะจึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก

โคลงเคลง (*Melastoma villosum* lodd.) และโคลงเคลงช้าง (*Melastoma sanguineum* Sims.) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ MELASTOMACEAE พืชสองชนิดนี้เป็นพืชป่าชายเลนที่ขึ้นอยู่บริเวณริมชายฝั่งทะเล และริมหาด ได้มีการรายงานข้อมูลเบื้องต้นพบว่าส่วนต่างๆ ของพืชสามารถนำมาใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรค เช่น ใบต้มน้ำดื่มแก้โรคท้องร่วง โรคบิด และระดูขาว ใช้รูดปลาไหลขจัดเมือกได้ดี รากใช้เป็นยาขับพิษไข้ บำรุงธาตุ เจริญอาหาร บำรุงร่างกาย บำรุงตับไต แก้อาการร้อนในกระหายน้ำ ปรุงเป็นยาแก้ปวด รักษาโรคมะเร็ง ดอกเป็นยาระงับประสาทและห้ามเลือด ผลรสหวานฝาดรับประทานได้ นอกจากนี้ยังพบสารโพลีฟีนอล แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเป็นแหล่งแคลอทีนอยด์และวิตามินซีที่สำคัญ อย่างไรก็ตามการศึกษาผลทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับส่วนต่างๆ ของโคลงเคลงทั้งสองชนิดมีไม่มากนัก ทั้งตัวทำละลายที่ใช้เพื่อเตรียมสารสกัดไม่หลากหลาย ดังนั้นผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญต่อการศึกษาหาปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดส่วนใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง มาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์สามชนิดตามลำดับขั้ว ข้อมูลดังกล่าวจะนำไปสู่การเลือกส่วนพืชและตัวทำละลายที่มีผลต่อการสกัดสารสำคัญ

ออกจากพืชที่แสดงผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี และเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานคลังความรู้ของพืชจากป่าชายเลนที่สามารถนำไปศึกษาในขั้นสูง อาจนำไปสู่การศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมี การแยกสารจากส่วนพืชที่แสดงฤทธิ์ดีที่สุด เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ ที่อาจนำไปรักษาโรคได้ในอนาคต หรือเพื่อเพิ่มแนวทางในการนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้ทางด้านเภสัชวิทยา ด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอางหรือด้านอาหารต่อไป

1.2 ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

พืชพรรณที่มีบริเวณพื้นที่ดินเค็มหรือบริเวณป่าชายเลนพบได้ทั่วไปในภาคใต้ซึ่งเป็นแหล่งของสมุนไพรหลายชนิดเช่นโกงกาง จิกทะเล ช้าเลือดและโคลงเคลง เป็นต้น พืชเหล่านี้บ้างนำมาประกอบอาหาร บ้างถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรเพื่อบำบัดอาการต่างๆ ในทางเภสัชกรรมพืชบางชนิดถูกนำมาประยุกต์ใช้ซึ่งแรกเริ่มได้มาจากภูมิปัญญาท้องถิ่นได้แก่การผลิตยาของโรงพยาบาลอภัยภูเบศร์และแพทย์แผนโบราณของกระทรวงสาธารณสุข นอกจากนี้ยังมีการนำสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ด้านอื่นเช่น สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ก็มีงานวิจัยเด่นด้านการนำพืชสมุนไพรมาใช้เป็นสารต้านมะเร็ง งานวิจัยด้านสารสกัดในพืชและกระบวนการสกัดเพื่อให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพ (active ingredient) รวมทั้งการวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดเป็นเรื่องที่น่าสนใจและชนิดของพืชในประเทศไทยก็ยังมีอีกมากมายที่ยังไม่ได้ถูกนำมาศึกษาวิเคราะห์สารที่มีประสิทธิภาพสำหรับประโยชน์ที่หลากหลาย ดังนั้นเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการค้นหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ การทำวิจัยสมุนไพรจึงนับว่าเป็นจุดที่สำคัญ

โคลงเคลง (*Melastoma villosum* lodd.)

โคลงเคลงพบขึ้นทั่วไปบริเวณป่าชายเลนที่เป็นที่ดอนหรือบริเวณป่าชายเลนตอนในมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Melastoma villosum* lodd. อยู่ในวงศ์ MELASTOMACEAE มีชื่อพื้นเมืองคือ โคลงเคลงยวน (ตะวันออก) โคลงเคลงขน (ปราจีนบุรี) เอ็นอ้า (อุบลราชธานี) พญารากขาว (กลาง) สาเหร่มะเร กะเร เบร้ (ใต้) โคลงเคลงมีลักษณะทั่วไปเป็นไม้พุ่มสูง 1-2 เมตรแตกกิ่งมากทรงพุ่มแน่นทึบกิ่งมีสีคล้ายราสนิมและมีขนปกคลุมใบเป็นใบเดี่ยวออกตรงข้ามแผ่นใบรูปขอบขนานแกมรูปไข่หรือรูปใบหอกแกมรูปไข่ขนาด 1.2-2.3 x 4-8 ซม. ปลายใบแหลมฐานใบกลมขอบใบเรียบมีเส้นใบออกจากโคนใบ 4-5 เส้นแผ่นใบด้านบนสีเขียวเข้มมีขนบางๆด้านท้องใบสีซีดมีขนหนาแน่นก้านใบยาว 0.4-0.8 ซม. มีขนปกคลุมเมื่อจับแผ่นใบจะรู้สึกสากมือดอกออกเป็นช่อกระจุกสั้นๆ 3-6 ซม. ที่ปลายกิ่งช่อดอกมีขนาดใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลาง4-6 ซม. แต่ละช่อมี 3-6 ดอกก้านดอกย่อยยาว 0.5 ซม. วงกลีบเลี้ยวยาว 0.7-1 ซม. สีม่วงแดงมีขนปุยปกคลุมกลีบดอกมีขนาดใหญ่ 5 กลีบแต่ละกลีบไม่ติดกันสีชมพูถึงสีม่วงแดงเข้มขนาด 1.5-2.3 ซม. เกสรเพศผู้ 10 อันขนาดใหญ่ 5 อันมีก้านสีเหลืองและสีม่วง

ส่วนบนโค้งมีสีเหลืองและเหยียดตรงผลเป็นผลสดมีเมล็ดหลายเมล็ดฝังอยู่ในเนื้อผลที่มีสีม่วงผลแก่แตกออกไม่เป็นระเบียบออกดอกและผลระหว่างเดือนมิถุนายน-สิงหาคม(ภาพที่1-3)

(a) (b) (c)

ภาพที่ 1.1 ส่วนต่างๆ ของโคลงเคลง (a) ผล (b) ดอก (c) ใบ

โคลงเคลงมีสรรพคุณ เป็นอาหารสัตว์ ผลรับประทานได้เป็นสมุนไพร ราก รสขม บำรุงธาตุ เจริญอาหาร บำรุงกำลัง แก้อ่อนเพลีย บำรุงตับไตและดี เพิ่มภูมิคุ้มกันโรค ชาวบ้านพื้นเมืองภาคใต้ใช้ใบผสมเปลือกกล้วยตำคั้นเอาน้ำดื่มแก้บิด มวนท้อง (http://nutrition.dld.go.th/exhibision/native_grass/other/Melastoma%20%20saigonense. htm)

โคลงเคลงช้าง (*Melastoma sanguineum* Sims)

โคลงเคลงช้างพบตามพื้นที่บริเวณตอนบนของป่าชายเลนที่ติดกับป่าบก หินหรือทราย ริมลำธาร ในป่าดิบแล้งและป่าดิบชื้น มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Melastoma sanguineum* Sims อยู่ในวงศ์ MELASTOMACEAE มีชื่อพื้นเมืองคือ เภรีช้าง พังเคร่ขน พังเคร่ช้าง เมรีช้าง (ภาคใต้) โคลงเคลงช้างมีลักษณะทั่วไปเป็นไม้พุ่ม สูง 1-2.5 ม. กิ่งเป็นเหลี่ยม มีขนแข็งสีแดงหรือสีน้ำตาลยาวปกคลุม ใบรูปใบหอก ยาว 8-20 ซม. มีขนแข็งเอนทั้งสองด้าน เส้นใบ 2-3 คู่ ออกจากโคนใบ ดอกออกตามซอกใบ ฐานดอกรูปถ้วย ยาวประมาณ 1-1.5 ซม. มีขนยาวแข็งหนาแน่น กลีบดอกรูปไข่กลับ ยาว 2-4.5 ซม. เกสรเพศผู้ 10 อัน มี 2 ขนาด ด้านนอกอับเรณูยาวกว่า สีม่วง รยางค์โค้งขึ้น เกสรด้านในสีม่วงหรือสีเหลือง รยางค์สั้น รังไข่ตอนปลายมีขนแข็งสีน้ำตาลแดง ผลแบบแคปซูลมีเนื้อรูประฆัง มีขนแข็งปกคลุม แตกออกด้านยาวเมื่อแก่จัด ทำให้เห็นเมล็ดสีส้มที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดหนาสีเหลือง เมล็ดมีขนาดเล็ก ยาว 1.5-2.5 ซม. เปลือกสีน้ำตาลปนเทา โคลงเคลงช้างพบที่จีนตอนใต้ พม่า และภูมิภาคมาเลเซีย ในไทยพบทุกภาค

(a) (b)

(c)

ภาพที่ 1.2 ส่วนต่างๆ ของโคลงเคลงช้าง (a) ลำต้น (b) ดอก (c) ผลและใบ

โคลงเคลงช้างมีสรรพคุณเอาเมล็ดมาบดให้ละเอียดและผสมน้ำนำมาสระผมหรือทาบริเวณที่เป็นหิด ใบ ต้มน้ำดื่มแก้โรคท้องร่วง โรคบิด และระดูขาว ใช้รูดปลาไหลขจัดเมือกได้ดี รากใช้เป็นยาขับพิษไข้ บำรุงธาตุ เจริญอาหาร บำรุงร่างกาย บำรุงตับไต แก้อาการร้อนในกระหายน้ำ ปรุงเป็นยาแก้ปวด รักษาโรคมะเร็ง ดอกเป็นยาระงับประสาทและห้ามเลือด ผลรสหวานฝาดรับประทานได้ (ณิฎฐารัตน์และคณะ, 2555) นอกจากนี้ยังพบสาร polyphenol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการสร้างเม็ดสีและกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในผิวของสาร Ellagic acid จากงานวิจัยของ Dey และคณะ (2005) และสารในเมล็ดพบฟีนอลิก แคลอทีนอยด์และวิตามินซีเป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอสระที่ดี (Huang และคณะ, 2010)

1.3 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บุหรัน พันธุ์สวรรค์ (2556) อนุมูลอิสระหมายถึงสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวในอะตอมหรือโมเลกุลเป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่างๆ มากมาย ได้แก่โรคชราโรคมะเร็งโรคหัวใจขาดเลือดโรคความจำเสื่อมโรคข้ออักเสบโรคภูมิแพ้โรคความดันโลหิตโรคเหงือกโรคเกี่ยวกับสายตาเกิดความผิดปกติของปอดและระบบประสาทเป็นต้นธรรมชาติ หรือร่างกายของสิ่งมีชีวิตจึงมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งกลไกในการต้านอนุมูลอิสระมีหลายรูปแบบ

เช่น การดักจับอนุมูลอิสระการยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอนการจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันการหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระการเสริมฤทธิ์ และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ ทั้งนี้การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพและปริมาณมีหลายวิธีด้วยกันแต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน ปกติมักใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบและสรุปผลทั้งนี้เพื่อให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องและแม่นยำ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพที่นิยม ได้แก่ การทำให้เกิดสีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงส่วนวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณที่นิยม ได้แก่การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอชการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระวิธีที่ได้นำเสนอในบทความนี้ ถือได้ว่าเป็นวิธีที่ง่ายสะดวกรวดเร็วและสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างได้หลายชนิด

Alwash และคณะ (2013) ศึกษาพฤติกรรมการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากโคลงเคลง *Melastoma Malabathricum* พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดคือStaphylococcus aureusreference strain, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* reference strain (MRSA), *Pseudomonas aeruginosaisolates* และ *P. aeruginosareference* strain และทดสอบความเป็นพิษของสาร นอกจากนี้สารสกัดส่วนใบของ *M. Malabathricum* มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี

Fu และคณะ (2010) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ป่า 56 ชนิดจากประเทศจีนใต้ ซึ่งสกัดจากtetrahydrofuran และ 50:3.7:46.3 (v/v) เมทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีรีดิวส์เหล็ก (FRAP) และวิธี TEAC ตรวจสอบปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu ผลที่ได้พบว่าผลของ *Eucalyptus robusta*, *Euryanitida, Melastoma sanguineum*, *Melaleuca leucadendron*, *Lagerstroemia indica*, *Caryotamitis, Lagerstroemia speciosa* and *Gordonia axillaris* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิก

Huang และคณะ (2010) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชส่วนผลกินได้ 13 ชนิดในประเทศฮ่องกง รวมถึงคุณค่าทางโภชนาการและตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิกแคโรทีนอยด์และวิตามินซีพบองค์ประกอบของโปรแอนโทรไซยานินฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก แสดงให้เห็นว่าพืชเหล่านี้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกสูง

Kannan และคณะ (2010) วิเคราะห์ทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟีขององค์ประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของหญ้าทะเลจากอ่าวทะเลประเทศอินเดียตอนใต้ พบว่าสารสกัดเมทานอลของหญ้าทะเลสี่ชนิดคือ *Enhalus acoroides*, *Thalassia hemprichii*, *Halodule pinifolia* และ

Syringodium isoetifolium มีสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบโดยวิธี TLC โดย Halodulepinifolia มีจำนวนสารต้านอนุมูลอิสระดีอันเป็นผลเนื่องมาจากองค์ประกอบทางพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ผลการต้านอนุมูลอิสระสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบ และเพื่อให้งานมีความสมบูรณ์มากขึ้น การศึกษาแหล่งที่อยู่ของหญ้าทะเลเหล่านี้ ต่อผลของปริมาณฟีนอลิกและนำไปสู่การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีก็นับเป็นเรื่องที่น่าสนใจ

Lee และคณะ (2013) พบสารฟลาโวนอยด์ชนิดใหม่หนึ่งชนิด 2,˝4˝-O-diacetylquercitrin และสารฟลาโวนอยด์ที่เป็นที่รู้จัก 6 ชนิดของโคลงเคลงช้าง ศึกษาโครงสร้างสารโดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และสารประกอบเหล่านี้ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยากับหนูได้ดี

Lohézic-Le Dévéhata และคณะ (2002) ศึกษาสารสกัดจากพืชสิบชนิดในประเทศอินโดนีเซียและศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง พบว่าโคลงเคลง *Melastoma Malabathricum* มีองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์และแทนนิน ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเซลล์มะเร็งหลายชนิด

Mulata และคณะ (2014) ศึกษาการนำส่วนใบและเมล็ดของพืช *Calpurnia aurea* ทดสอบพฤกษเคมี เนื่องจากพืชชนิดนี้มีคุณสมบัติหลากหลายเช่น รักษามาลาเรีย เบาหวาน โรคที่เกิดจากเชื้อรา พบสารสำคัญหลายชนิด เช่น แทนนินฟลาโวนอยด์เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน สเตอรอยด์ ไกลโคไซด์ อัลคาลอยด์ แอนทาควิโนน และเรซิน และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี (Thin layer chromatography) ร่วมกับวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) นอกจากนี้พบฟลาโวนและฟีนอลในใบในปริมาณมากกว่าในเมล็ด แต่พบแทนนินและอัลคาลอยด์ในเมล็ดมากกว่าในใบ การทราบถึงองค์ประกอบเหล่านี้จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ต่อไป

Mazura และคณะ (2007) ศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารที่เป็นองค์ประกอบของโคงเคลง *Melastoma malabathricum* L. คือ quercetin, quercitrin, α-amyrinและ betulinic acid สามารถยับยั้ง PAF receptor binding ด้วยค่า IC_{50} 33.0, 45.4, 20.0, and 22.2 mM ตามลำดับ ให้ค่าที่ใกล้เคียงกับยามาตรฐาน Cedrol (13.1 mM) ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าฟลาโวนอยด์และไตรเทอร์พีน จากโคลงเคลง *M. malabathricum* มีบริเวณที่สามารถจับ PAF ซึ่งต้านการอักเสบได้

Rahim และคณะ (2008) รายงานฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากส่วนสกัดหยาบจากเปลือกในตัวทำละลายเอทานอลของโกงกางใบเล็ก โดยวิธี DPPH และ ABTS โดยเทียบกับสารมาตรฐาน butylatedhydroxytoluene (BHT) และวิตามินซี ผลที่ได้พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสอดคล้องกับปริมาณสารแทนนินที่พบจากเปลือก และผลจากการวิเคราะห์ HPLC ของต้นโกงกางใบเล็กพบว่า Catechin เป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุดของ Flavanoid monomers

Sernaและคณะ (2015) ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกของพืชสปีชีซ์ MELASTIMACEAE ในดอกซึ่งมีพฤกษเคมีหลายชนิด เช่น เทอร์พีนอยด์ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ควินโนน ลิกนิน ไกลโคด์ โครงสร้างสารตรวจสอบโดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีเช่น ESI-MS, ^{1}H-, ^{13}C-NMR spectra and two-dimensional experiments, COSY, TOCSY, J-resolved, NOESY, HMQC, DEPT, and HMBC

Susanti และคณะ (2007) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฟลาโวนอยด์ จากดอกโคลงเคลง *Melastoma malabathricum* L. พบสารไกลโคไซด์หลายชนิดในสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเอทิล อะซีเตทและเมทานอล ทดสอบความเป็นพิษและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารกลุ่มไกลโคไซด์ที่แยกได้ดังกล่าวแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี และต้านเซลล์มะเร็งเต้านมได้ดีมาก

1.4 วัตถุประสงค์

1. เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดส่วนใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตทและเมทานอล
2. เพื่อศึกษาพฤติกรรมการดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง โดยวิธี DPPH จากเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดส่วนใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้างกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยวิธี Disc diffusion
4. เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC/MBC)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลพื้นฐานขององค์ประกอบที่เป็นสารสำคัญจากส่วนต่าง ๆ ของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้างที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค
2. ได้แนวทางการนำสารสกัดส่วนที่ออกฤทธิ์ไปประยุกต์ใช้งานทางด้านเภสัชวิทยา ทางการแพทย์ เครื่องสำอางหรือด้านอาหาร
3. นำไปต่อยอดงานทางด้านเกษตร สิ่งทอ หรืออุตสาหกรรมประมงในด้านนำไปเป็นส่วนผสมอาหารสัตว์น้ำ
4. เป็นแหล่งข้อมูลต่อยอดองค์ความรู้ สู่บุคคลที่สนใจ หรือกับนักศึกษาสาขาอุตสาหกรรมอาหาร สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล และสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม ถือเป็นการบูรณาการกับการเรียนการสอน

5. ถ่ายทอดความรู้สู่นักเรียนโครงการพิเศษที่เน้นทางด้านวิทยาศาสตร์ผ่านกิจกรรมค่ายบริการวิชาการของหน่วยงาน

6. ได้เผยแพร่ในงานประชุมทางวิชาการ หรือได้ตีพิมพ์งานวิจัย

บทที่ 2
วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย

ใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง เก็บภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง และส่งตรวจสอบพันธุ์พืช ณ สำนักหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพืชพันธุ์ (โคลงเคลง รหัส BKF.194838 และ โคลงเคลงช้าง รหัส BKF.194785) นำส่วนของพืชมาล้างทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้งและนำไปบดให้มีขนาดเล็ก ก่อนนำไปสกัดสาร

2.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดลอง

ศูนย์จุลินทรีย์ ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ (ศคช.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

2.2.1 *Bacillus cereus* TISTR036

2.2.2 *Staphylococcus aureus* TISTR746

2.2.3 *Staphylococcus epidermidis* TISTR518

2.2.4 *Escherichia coli* (*E. coli*) TISTR527

2.2.5 *Samonella Typhimurium* TISTR 2517

2.2.6 *klebsiella pueumonaie subsp. pneumoniae* TISTR 1383

จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.7 *Vibrio parahaemolyticus*

2.2.8 *Vibrio harveyi*

2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมสารสกัด

2.3.1 ขวดโหลแก้ว

2.3.2 ผ้าขาวบาง

2.3.3 อุปกรณ์หั่น เช่น มีด กรรไกร

2.3.4 อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่นบีกเกอร์ กรบอกตวง กรวยแก้ว

2.3.5 หลอดเซนตริฟิว (Centrifuge tube)

2.3.6 กระดาษอลูมิเนียมฟอยด์

2.3.7 กระดาษกรอง Whatman No.1

2.3.8 ขวดก้นกลม (Round bottom flask)

2.3.9 เครื่องระเหยตัวทำละลาย (Rotary Evaporator)

2.3.10 ตู้ดูดความชื้น

2.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์พฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.4.1 หลอดทดลอง (Test tube)

2.4.2 หลอดหยด (Dropper)

2.4.3 ขวดรูปชมพู่ (Elrenmayer flask)

2.4.4 แท่งแก้วคน (Stirring rod)

2.4.5 บีกเกอร์ (Beaker)

2.4.6 ปากคีบ (Forcep)

2.4.7 ขวดแก้วขนาดเล็ก (Vial)

2.4.8 กระจกนาฬิกา (Watch glasses)

2.4.9 เครื่องดูดสารละลายอัตโนมัติ (Autopipette)

2.4.10 กรวยแก้ว

2.4.11 กระดาษอลูมิเนียมฟอยด์

2.4.12 กระบอกตวง

2.4.13 เตาให้ความร้อน (Stirrer hot plate)

2.4.14 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.4.15 ตู้ดูดความชื้น

2.4.16 UV-5100 Spectrophotometer

2.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

2.5.1 เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง

2.5.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

2.5.3 เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

2.5.4 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow)

2.5.6 ตู้เย็น

2.5.7 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

2.5.8 เตาให้ความร้อน (Stirrer hot plate)

2.5.9 เครื่องเขย่า (Rotary shaker)

2.5.10 เครื่องดูดสารละลายอัตโนมัติ (autopipette)

2.5.11 ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)

2.5.12 สำลีพันไม้ (cotton swab)

2.5.13 ปากคีบ (forcep)

2.6 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.6.1 สารเคมี

สารเคมีจาก Difco

- Nutrient Agar
- Tryptic Soy Agar
- Tryptic Soy Broth
- Antibiotic Disc 6 mm จาก MN Germany

สารเคมีจาก Loba Chemie laboratory reagents & Fine Chemicals

- Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent
- BHT (Butylated hydroxy toluene)

สารเคมีจาก Sigma-Aldrich

- Gallic acid
- DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydr-zyl)

สารเคมีจาก Ajex Finechem Pty Ltd

- Sodium carbonate anhydrous, Na_2CO_3
- Ascorbic acid (Vit C)

2.3.2 ตัวทำละลาย

ตัวทำละลายจาก Lab. Scan analytical science

- Acetone, CH_3OCH_3, A.R.grade
- Chloroform, $CHCl_3$, A.R. grade
- Dichloromethane, CH_2Cl_2, A.R. grade
- Ethanol, EtOH, A.R.grade
- Hexane, C_6H_{14}, A.R. grade
- Methanol, MeOH, A.R.grade
- Ethyl acetate, EtOAc, A.R. grade

ตัวทำละลายจาก Merck

- Dimethyl sulphoxide, DMSO, A.R. grade
- Absolute Ethanol, A.R. grade

2.7 วิธีดำเนินการวิจัย

2.7.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บส่วนใบและผลของพืชวงศ์ MELASTOMACEAE สองชนิดคือโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง ในบริเวณหาดราชมงคล มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง พร้อมระบุพิกัด จากนั้นนำใบและผลผึ่งลมจนแห้ง

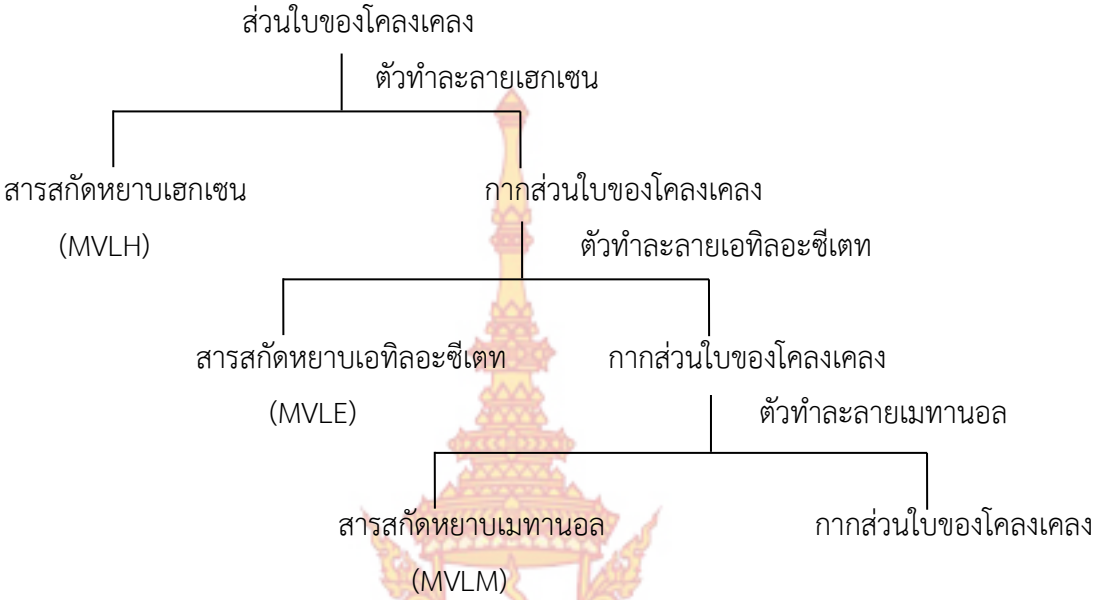
2.7.2 การเตรียมพืชแห้ง

นำส่วนใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง ที่ปราศจากสิ่งเจือปน เช่น ดิน ฝุ่นละออง นำไปผึ่งลมให้แห้ง บดหยาบและนำไปชั่งน้ำหนักก่อนนำไปสกัด

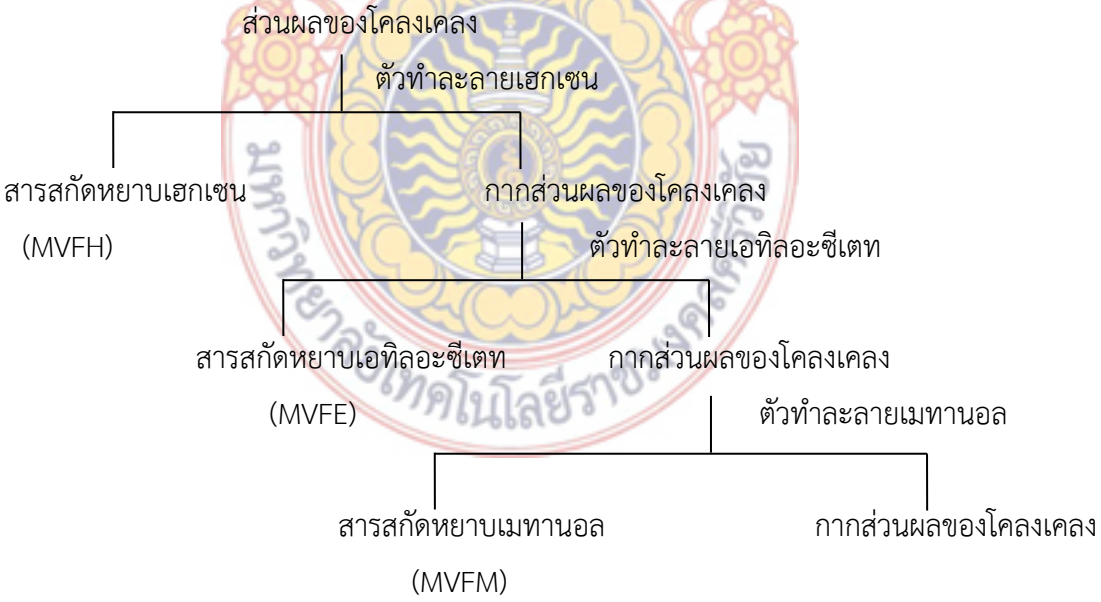
2.7.3 การเตรียมสารสกัดหยาบใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง

นำส่วนใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง ที่ผ่านการบดหยาบมาแช่ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (hexane), เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) และเมทานอล (methanol) ตามลำดับขั้ว โดยมีวิธีการละเอียดดังนี้ คือ นำส่วนพืชที่ชั่งน้ำหนักมาห่อด้วยผ้าขาวและวางลงในขวดโหลแก้ว จากนั้นตวงตัวทำละลายเฮกเซนและเทจนท่วมส่วนพืช ปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน กรองสารด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อกำจัดเศษพืชที่ในสารละลาย และนำเฉพาะส่วนของสารละลายที่กรองได้ระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vaccuum evaporator) ที่มีการควบคุมอุณหภูมิในช่วง 40-50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารสกัดหยาบที่ได้เข้มข้นขึ้น นำสารสกัดหยาบออกจากขวดก้นกลมและบรรจุในขวดแก้วขนาดเล็ก บันทึกเป็นสารสกัดหยาบ (crude) ในชั้นเฮกเซน จากนั้นนำกากของพืชวางในขวดโหลแก้วเช่นเดิม ตวงตัวทำละลายเอทิลอะซีเตทและเทลงในกากพืชเดิมจนท่วม ปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน กรองสารด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อกำจัดเศษพืชที่ในสารละลาย และนำเฉพาะส่วนของสารละลายที่กรองได้ระเหยตัวทำละลายออก นำสารสกัดหยาบออกจากขวดก้นกลมและบรรจุในขวดแก้วขนาดเล็ก บันทึกเป็นสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตท จากนั้นนำกากของพืชวางในขวดโหลแก้วเช่นเดิม ตวงตัวทำละลายเมทานอลและเทลงในกากพืชเดิมจนท่วม ปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน กรองสารด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อกำจัดเศษพืชที่ในสารละลาย และนำเฉพาะส่วนของสารละลายที่กรองได้ระเหยตัวทำละลายออก นำสารสกัดหยาบออกจากขวดก้นกลมและบรรจุในขวดแก้วขนาดเล็ก บันทึกเป็นสารสกัดหยาบ ในชั้นเมทานอล นำสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตท และเมทานอล จากส่วนพืชเก็บในโถดูดความชื้น และเก็บในตู้เย็นเพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป

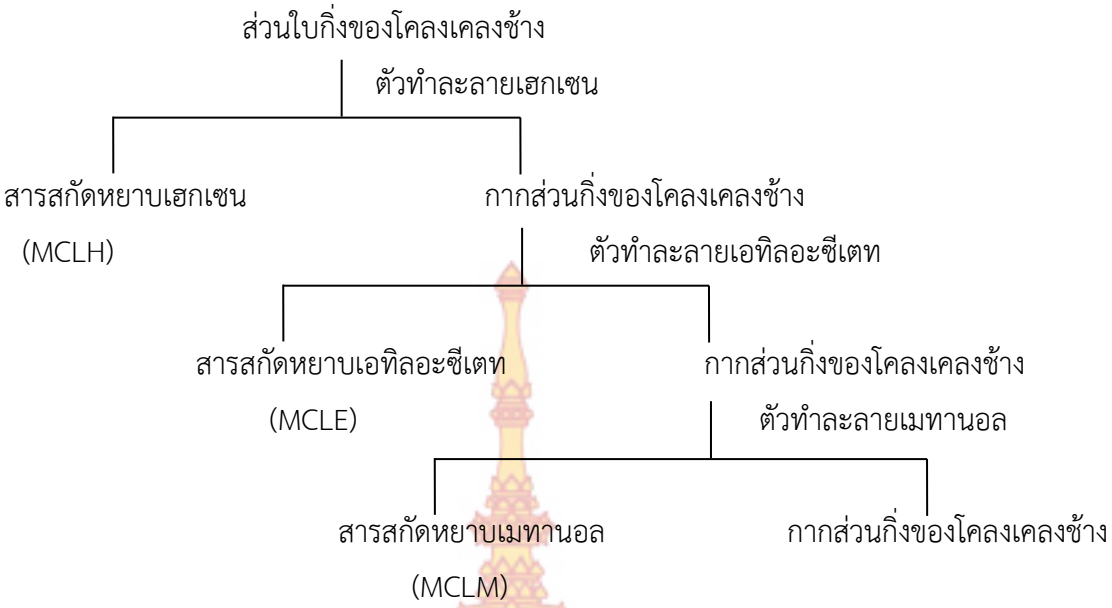
และวิธีการสกัดส่วนใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง พร้อมรหัสแต่ละส่วนพืช แสดงดังภาพที่ 2.1 2.2 2.3 และ 2.4 ตามลำดับ



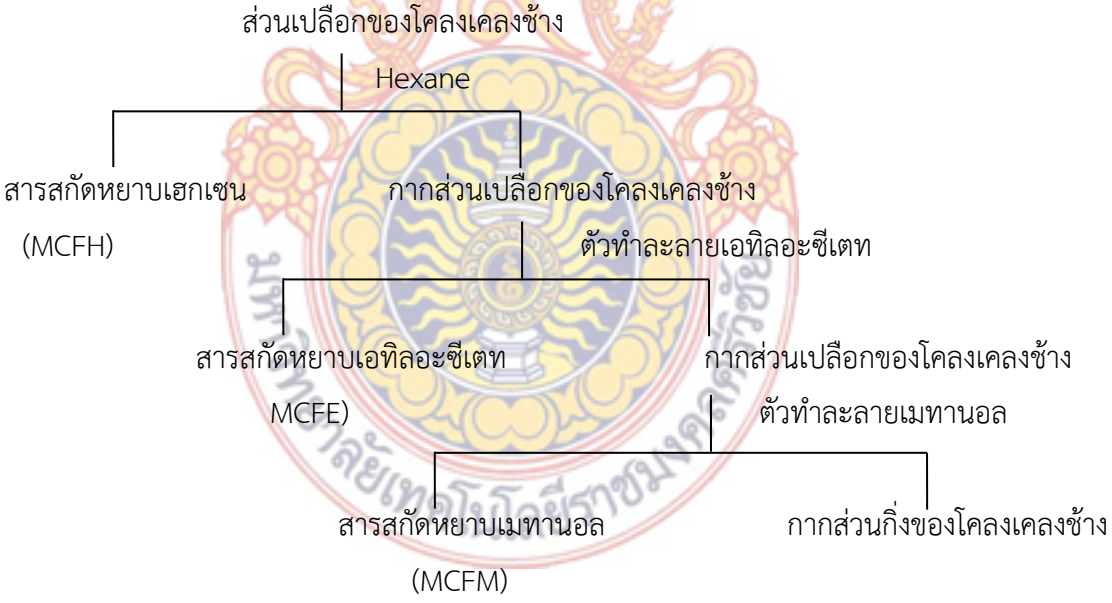
ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการสกัดส่วนใบของโคลงเคลง



ภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการสกัดส่วนผลของโคลงเคลง



ภาพที่ 2.3 ขั้นตอนการสกัดส่วนกิ่งของโคลงเคลงช้าง



ภาพที่ 2.4 ขั้นตอนการสกัดส่วนเปลือกของโคลงเคลงช้าง

2.7.4 ทดสอบสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ทดสอบสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบส่วนใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง จากปฏิกิริยาการเกิดสีและตะกอนอ้างอิงตามวิธีการของ Vittaya และคณะ (2019), Kujur และคณะ (2010) และ Mulata และคณะ (2015) ดังนี้:

<u>การตรวจสอบคาร์โบไฮเดรต</u> : การทดสอบโมลิส

นำสารสกัด 2 มิลลิลิตร มาหยดสารละลายของ α-naphthol ที่เตรียมในตัวทำละลายแอลกอฮอล์ 2 หยด เขย่าและเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นตามด้านข้าง ลงไป 1 มิลลิลิตร จะปรากฏวงแหวนสีน้ำตาล

<u>การตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซิงส์</u> : การทดสอบเฟลิ่ง

ผสมสารละลายเฟลิ่ง A กับสารละลายเฟลิ่ง B อย่างละ 1 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลา 1 นาที เติมสารสกัดลงไป 2 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำร้อนเป็นเวลา 5-10 นาที ปรากฏพบตะกอนสีแดงอิฐ

<u>ตรวจหากรดอะมิโน</u> :

การทดสอบของ Ninhydrin

นำสารสกัด 2 มิลลิลิตร เติม 25% Ninhydrin 2 มิลลิลิตร นำมาต้ม 5 นาที สังเกตเห็นสีน้ำเงินหรือสีม่วง แสดงว่ามีกรดอะมิโน

<u>ทดสอบปริมาณฟีนอลิก</u> : วิธีทดสอบเฟอร์ริก คลอไรด์ ($FeCl_2$ test)

นำสารสกัดมา 2 มิลลิลิตร หยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) 1% 2-3 หยด ลงไปในสารสกัด หากปรากฏสารละลายสีเขียวดำ แสดงว่าพบฟีนอลิก

<u>การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์</u> :

ใช้การทดสอบซาลโควสกี (Salkowski test) นำสารสกัด 2 มิลลิลิตร สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ครั้งละ 2 มิลลิลิตร 2-3 ครั้ง เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เขย่า ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc.H_2SO_4) หากเกิดสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลายแสดงว่าพบเทอร์พีนอยด์

<u>การตรวจสอบแอนทราควิโนน</u> :

นำสารสกัดมา 2 มิลลิลิตร สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม เติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH_3) 2-3 หยด สังเกตสีชมพูแดงที่เกิดขึ้นแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

<u>การตรวจสอบซาโปนิน</u> :

ใช้การทดสอบฟอง โดยนำสารสกัดมา 2 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด นำมาเติมน้ำกลั่น 2-3 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง หากมีฟองเกิดขึ้นแสดงว่าพบซาโปนิน

<u>การตรวจสอบฟลาโวนอยด์</u> :

นำสารสกัดมา 2 มิลลิลิตร ใส่โลหะซิงค์ 0.1 กรัมและสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) 8 มิลลิลิตร หากพบสารละลายแดง แสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

<u>ตรวจสอบแทนนิน</u> :

นำสารสกัดมา 2 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ หยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) 2-3 หยด ลงไปในของเหลว หากปรากฏสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

<u>การตรวจสอบแอลคาลอยด์</u> :

นำสารสกัดมา 2 มิลลิลิตร ไปหยดน้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) ปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบแอลคาลอยด์

2.7.5 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดหยาบโดยดัดแปลงจากวิธีของ Vittaya และคณะ (2019) ดังนี้ โดยให้สารประกอบฟีนอลิกทำปฏิกิริยากับ Folin- Ciocalteu Reagent และใช้แกลลิกเป็นสารมาตรฐานโดยนำสารสกัดที่เตรียมความเข้มข้น 1 mg/mL มา 0.2 mL เติมน้ำกลั่น 2.5 mL ตามด้วยสารละลาย Folin- Ciocalteu Reagent 200 ไมโครลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 1 นาที เติม Na_2CO_3 ความเข้มข้น 7% ปริมาตร 2 mL เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกเพื่อคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/g extract)

2.7.6 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydr-zyl) assay เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Seethalaxmi *et* al (2012) โดยใช้ BHT (Butylated hydroxy toluene) และกรดแอสคอร์บิค (Ascorbic acid: Vit C) เป็นสารมาตรฐาน ดังนี้

2.7.6.1 การเตรียมสารเคมี

2.7.6.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน DPPH (มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียรชนิดหนึ่งเมื่อเตรียมเป็นสารละลายจะมีสีม่วงใช้เป็นรีเอเจนต์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพราะเมื่อ DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารสกัดจากพืชหรือ BHT ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสีของสารละลายสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง) ความเข้มข้น $6x10^{-5}$ โมลาร์ ในเมทานอล

2.7.6.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT (ใช้เป็นสารมาตรฐานที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) ความเข้มข้น 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.562 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเมทานอล

2.7.6.1.3 เตรียมสารละลายตัวอย่างพืชให้ได้ ความเข้มข้น 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.562 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิต ในเมทานอล

2.7.6.2 การตรวจวัดสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณทำได้โดย

2.7.6.2.1 เตรียมสารละลายที่จะวัดค่าการดูดกลืนแสงจากสารละลายที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 2.7.5.1.1 ได้แก่ สารละลายควบคุมคือสารละลายมาตรฐาน DPPH กับตัวทำละลายเมทานอล (1:1) และสารละลาย DPPH กับสารละลายมาตรฐาน BHT และ Vit C (1:1) กับสารละลายมาตรฐาน DPPH และสารละลายตัวอย่างพืชที่จะทำการทดสอบ (1:1) เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.7.6.2.2 นำสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อที่ 2.7.5.2.1 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง

2.7.6.2.3 การคำนวณความสามารถฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

- หาค่า 50% Effective concentration (IC_{50} = ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์, มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
- สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นต่างๆ ของสารตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสง
- หาค่า IC_{50} จากกราฟ ที่แสดงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์
- ใช้ค่า IC_{50} ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างตัวอย่างพืชที่ทดสอบกับสารมาตรฐาน BHT
- คำนวณ %Radical Scavenging (เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ)

สมการ $\%\text{Radical Scavenging} = [(A_B - A_A)/ A_B] \times 100$

เมื่อ A_A = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

A_B = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

2.7.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเบื้องต้นของสารสกัดทั้ง 12 ชนิดโดยวิธี disc Diffusion (NCCLS, 2009)

2.7.7.1 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Samonella typhi* และ *klebsiella pueumonaie* จากศูนย์จุลินทรีย์ ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ (ศคช.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi* จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.7.7.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานโดยการ streak เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus Escherichia coli Staphylococcus aureus Staphylococcus epidermidis Salmonella typhi* และ *klebsiella pneumonia* กับ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi* บนอาหารแข็ง tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนด ทำการเขี่ยเชื้อ 3 -5 single colonies โดยใช้ loop และใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Müller-Hinton broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบเชื้อให้มีความขุ่นมาตรฐาน McFarland No.0.5 โดยใช้เครื่อง spectrophotometer วัดค่า absorbance ที่ 625 nm จะได้ค่า OD ระหว่าง 0.08-0.10 ถ้าเชื้อขุ่นมากกว่าความขุ่นมาตรฐานให้เจือจางด้วย sterile sodium chloride 0.85% (0.85% NaCl) เชื้อที่มีความขุ่นเท่ากับความขุ่นมาตรฐานนี้จะมีจำนวนเชื้อ ประมาณ $1.5x10^8$ CFU/ml

2.7.7.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด

ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด โดยวิธี disc diffusion (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009) นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมได้จากข้อ 2.7.7.2 มาพันไม้สำลีที่ปราศจากเชื้อ (sterile cotton swab) จุ่มลงในเชื้อที่อยู่ในอาหาร MHB นำมา swab เป็น 3 ระนาบ (Three dimension swab) ให้เชื้อกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร Müller-Hinton agar (MHA) ปล่อยให้ผิวหน้าอาหาร MHA แห้ง (3-5 นาที) และใช้ปากคีบปราศจากเชื้อ (sterile forceps) คีบแผ่น paper disc ที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร วางบนผิวของอาหาร MHA ที่ swab เชื้อแล้ว ทำการกดเบาๆ ให้แผ่น paper disc ติดกับวุ้น โดยให้แผ่น paper disc ห่างกัน 15-20 มิลลิเมตร และห่างจากขอบจานอาหาร 15 มิลลิเมตร (ในหนึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อจะวางแผ่น paper disc ทั้งหมด 6 แผ่น)

นำสารสกัดที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นดูดสารสกัดที่เตรียมได้แล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงกลางแผ่น paper disc จะได้ปริมาณสารสกัด 1.0 มิลลิกรัมต่อ disc นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดลองโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (vernier calipers) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (clear zone) หรือบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) รอบแผ่น paper disc ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สำหรับชุดควบคุม negative control ใช้เป็น DMSO และ positive control ใช้เป็นยาปฏิชีวนะ gentamicin (30 มิลลิกรัมต่อ disc) โดยบันทึกผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสของการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) เป็นมิลลิเมตร

2.7.8 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration, MIC)

ทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี micro dilution method (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009) เตรียมเชื้อแบคทีเรียตามวิธีการ ข้อ 2.7.7.2 และเตรียมสารสกัดแต่ละชนิดให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ใส่ใน 96 well plate หลุมที่ 2 -12 หลุมละ 100 ไมโครลิตร และนำสารสกัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่ 1 และ 2 ทำการเจือจางสารสกัดจากหลุมที่ 2 ลงครั้งละ 2 เท่า ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่ใส่ไว้ก่อนหน้านี้ จนถึงหลุมที่ 11 จะได้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดอยู่ระหว่าง 0.098-50 mg/ml จากนั้นเติมเชื้อที่ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 1×10^8 CFU/ml ลงในหลุมที่ 1 - 12 แต่ละหลุมปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำ 96 well plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม 10 ไมโครลิตร ของ 0.18% resazurin indicator ลงไปในแต่ละหลุม บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ อ่านผลการทดสอบเมื่อครบเวลาที่กำหนด

โดยการอ่านผลการทดสอบค่า MIC อาศัยการเปลี่ยนสีของ resazurin ตามวิธีของ Drummond and Waigh (2000) คือ ถ้าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (ผลบวก) resazurin จะมีสีน้ำเงินหรือสีม่วงเหมือนเดิม แต่ถ้าสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (ผลลบ) เชื้อจะสามารถเจริญเติบโตและเปลี่ยนสี resazurin ให้เป็นสีชมพู โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (โดยเลือกค่า MIC ที่เหมือนกันอย่างน้อย 2 ซ้ำ)

ใช้ยาปฏิชีวนะ gentamicin เป็น positive control การเตรียมยา gentamicin เตรียมที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางลงครั้งละ 2 เท่า และเติมเชื้อลงไป ความเข้มข้นสุดท้ายของยาจะมีค่าความเข้มข้นระหว่าง 0.125-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.7.9 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentra-tion, MBC)

ทดสอบหาค่า MBC โดยใช้วิธี drop plate (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009) หยดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจากการทดสอบหาค่า MIC ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA โดยใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดสอบหาค่า MBC โดยบันทึกค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ คือ ไม่มีโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เพื่อยืนยันผลการทดลอง

2.7.10 รวบรวมข้อมูลการทดลองและสรุปงานวิจัย

2.7.11 เขียนรายงานวิจัย

บทที่ 3
ผลการทดลองและการอภิปรายผล

โคลงเคลงและโคลงเคลงช้างเป็นพืชตระกูล Melastomaceae มีการนำส่วนผลมาบริโภคและนำส่วนใบช่วยในการรักษาตามภูมิปัญญาชาวบ้าน การตรวจสอบทางวิทยาศาสตร์เพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์จากพืชที่มีสรรพคุณทางยา จะเป็นข้อมูลสำคัญเพื่ออธิบายประสิทธิภาพของพืชสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ งานวิจัยนี้ได้นำผลและใบที่แห้งมาบดหยาบ และแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นขั้วต่างกันสามชนิดคือเฮกเซน (Hexane) เอทิลอะซีเตท (Ethyl acetate) และเมทานอล (Methanol) ตามลำดับ การกรองสารและการทำสารให้เข้มข้นจนแห้งจะช่วยรักษาสภาพ และเก็บไว้ใช้ได้เป็นระยะเวลานานโดยยังคงรักษาคุณค่าไว้ได้ในที่เย็น ปริมาณหรือน้ำหนักที่ได้จากการสกัดผลและใบแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ผลผลิตร้อยละของสารสกัดผลและใบของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง

พืช	ส่วนพืช	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ตัวทำละลาย	สีของสารละลาย	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละผลผลิต (%)
โคลงเคลง	ผล	2,000	เฮกเซน	เขียวอมเหลืองอ่อน	9.99	0.45
			เอทิลอะซีเตท	เขียวอ่อน	16.65	0.76
			เมทานอล	น้ำตาล	401.17	18.24
	ใบ	1,000	เฮกเซน	เขียวเข้ม	2.09	0.22
			เอทิลอะซีเตท	เขียว	9.86	0.98
			เมทานอล	เขียว	77.9	7.79
โคลงเคลงช้าง	ผล	420	เฮกเซน	เหลืองอ่อน	0.96	0.23
			เอทิลอะซีเตท	เหลืองอมเขียว	2.39	0.57
			เมทานอล	น้ำตาลอ่อน	75.58	17.99
	ใบ	1,000	เฮกเซน	เขียว	9.81	0.98
			เอทิลอะซีเตท	เขียว	31.98	3.20
			เมทานอล	น้ำตาลอ่อน	143.51	14.75

จากตารางที่ 3.1 แสดงข้อมูลน้ำหนักแห้งและน้ำหนักของสารสกัดหยาบจากผลและใบของโคลงเคลงจากตัวทำละลายสามชนิด ผลที่ได้พบว่าปริมาณสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล

มีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากเอทิลอะซีเตท และปริมาณสารสกัดที่น้อยที่สุดคือเฮกเซน แนวโน้มของปริมาณผลผลิตนี้พบในโคลงเคลงช้างเช่นเดียวกัน สามารถอธิบายความสามารถในการละลายได้ของสารได้ดังนี้ เมื่อนำส่วนพืชแช่ในตัวทำละลายจะเกิดกระบวนการสารละลายขึ้น โดยอนุภาคของตัวทำละลายจะกระจายตัวเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างอนุภาคของตัวถูกละลายในส่วนผลหรือใบ และหากแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของตัวทำละลายกับตัวถูกละลายมีมาก สารเหล่านั้นก็จะละลายของมาในตัวทำละลาย ซึ่งโดยปกติแล้วการที่ตัวถูกละลายจะละลายในตัวทำละลายหนึ่ง ๆ ได้นั้น สารทั้งสองชนิดจะต้องมีสมบัติเหมือนกัน ตามกฎ “like dissolves like” คือตัวถูกละลายที่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว เพราะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลมีขั้วเป็นแรงไดโพล-ไดโพล (dipole-dipole) แต่จะไม่ละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เอทานอล (CH_3CH_2OH) ละลายในน้ำ (H_2O) แต่ไม่ละลายในเฮกเซน (C_6H_{14}) ในทางตรงข้าม ตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เพราะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลไม่มีขั้วเป็นแรงแวนเดอร์วาลล์ (Van der Waals force) เหมือนกัน แต่จะไม่ละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) ละลายในเบนซีน (C_6H_6) ไม่ละลายในน้ำ แต่ถ้าในกรณีที่สารหนึ่งมีขั้วน้อยกว่าอีกสารตัวหนึ่ง ความสามารถในการละลายก็ลดลง หรืออาจจะกล่าวอีกนัยคือละลายได้เพียงบางส่วนเท่านั้น (https://citly.me/ZB9vN)

ผลจากการศึกษานี้คล้ายกับงานวิจัยที่ได้มีการรายงานก่อนหน้าแล้วเช่น งานของ Vittaya และคณะ (2019) สกัดสารสำคัญจากเถาและเหง้าองุ่นป่า พบว่าสารสำคัญจากการสกัดโดยการใช้ตัวทำละลายขั้วต่ำของเฮกเซนให้สารปริมาณน้อยที่สุด เป็นสารจำพวกเทอร์พีนอยด์และแอลคาลอยด์ และตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท หรือเมทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายขั้วกลางและสูง จะให้สารจำพวกเทอร์พีนอยดี ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน ฟีนอลิก และแอลคาลอยด์ เป็นต้น

ดังนั้นโคลงเคลงและโคลงเคลงช้างที่สกัดได้จากตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วที่ต่างกันข้างต้นให้ปริมาณสารที่ได้แตกต่างกัน สามารถอธิบายได้ในทำนองเดียวกัน และจะนำไปหาพฤกษเคมีในพืชเพื่อที่ผลที่ได้ดังกล่าวจะสามารถนำไปอธิบายความสัมพันธ์ของการมีสารสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ได้ต่อไป

3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดส่วนใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง

3.1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดส่วนผลและใบของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง

จากตารางที่ 3.1 สารสกัดหยาบส่วนผลและใบจากโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง มีทั้งหมด 12 ส่วน นำมาตรวจสอบพฤกษเคมีบางชนิดและแสดงผลการตรวจสอบได้ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 การตรวจสอบเชิงคุณภาพของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดใบและผล โคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง

ชนิดพืช	ส่วนพืช	ตัวทำละลาย	เทอร์พีนอยด์	แอนทราควิโนน	ซาโปนิน	ฟลาโวนอยด์	ฟีนอลิก	แอลคาลอยด์
โคลงเคลง	ผล	เฮกเซน	+	-	-	-	-	-
		เอทิลอะซีเตท	+	-	-	-	-	-
		เมทานอล	-	-	+	+	+	-
	ใบ	เฮกเซน	+	-	-	-	-	-
		เอทิลอะซีเตท	+	-	+	+	+	-
		เมทานอล	-	-	+	+	+	-
โคลงเคลงช้าง	ผล	เฮกเซน	+	-	-	-	-	-
		เอทิลอะซีเตท	+	+	+	+	+	+
		เมทานอล	-	+	+	+	+	+
	ใบ	เฮกเซน	+	-	-	-	-	+
		เอทิลอะซีเตท	+	+	-	+	+	+
		เมทานอล	-	+	+	+	+	+

“+” พบสารสำคัญ และ “-” ไม่พบสารสำคัญ

สารสำคัญในพืชแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือสารเมทาบอไลต์ปฐมภูมิ เช่น คาร์บอไฮเดรต โปรตีน ไขมัน น้ำตาลเป็นต้น และสารเมทาบอไลต์ทุติยภูมิเช่นสารฟีนอลิก ฟลาโวนายด์ แอลคาลอยด์ เทอร์พีนอยเป็นต้น และจากการค้นคว้าวิจัยพบว่าสารกลุ่มหลังมีบทบาทสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง เนื่องจากการเจริญเติบโตของพืชที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง จะมีการผลิตสารออกมาเพื่อป้องกันหรือรักษาตัวเองให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ สารเหล่านี้มีโครงสร้างซับซ้อนและหลากหลายชนิดมีความเป็นขั้วแตกต่างกัน ดังนั้นการสกัดสารจากพืช โดยเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นขั้วต่างกันจะมีผลต่อการดึงสารสำคัญออกมาได้แตกต่างกันจริงหรือไม่ เป็นสิ่งที่ผู้วิจัยสนใจศึกษาทดลอง

จากตารางที่ 3.2 ตรวจสอบสารเมทาบอไลต์ทุติยภูมิ 6 ชนิดกับสารสกัด 12 ส่วนจากผลและใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง พบเทอร์พีนอยจากส่วนผลและใบที่สกัดจากเฮกเซนและเอทิลอะซีเตท พบแอนทราควิโนเฉพาะผลและใบโคลงเคลงช้างที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทกับเมทานอล พบซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน ในสารสกัดผลโคลงเคลงจากเมทานอล และในใบโคลงเคลงกับผลและใบโคลงเคลงช้างมาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทและเมทานอล ขณะที่พบแอลคาลอยด์เฉพาะผลโคลงเคลงช้างที่สกัดจากเอทิลอะซีเตทและเมทานอล กับใบจากตัวทำละลายทั้งสาม จากผลนี้สรุปได้ว่าผลของโคลงเคลงช้างจากสารสกัดเอทิลอะซีเตท พบสารเมทาบอไลต์ทุติยภูมิทุกชนิดข้างต้น การพบองค์ประกอบของสารเมทาบอไลต์ทุติยภูมิดังกล่าวคาดว่าจะนำไปอธิบายผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

3.1.2 วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดส่วนใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง

เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิก เป็นสารที่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดหยาบทำได้โดยนำกรดแกลลิกตัวแทนสารประกอบฟีนอลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารมาตรฐานทำปฏิกิริยากับ Folin- Ciocalteu Reagent นำค่าที่ได้พล็อตกราฟ ให้ค่าสมการ $y = 0.004x - 0.0196$ ($R^2 = 0.9971$) และนำไปเทียบกับสารตัวอย่างเพื่อคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก (มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ :mg GAE/g extract) ในสารสกัดผลและใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดผลและใบของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง

ชนิดพืช	ส่วนพืช	สารสกัด	ปริมาณฟีนอลิกรวม (มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ)
โคลงเคลง	ผล	เฮกเซน	0.062 ± 0.004 [f]
		เอทิลอะซีเตท	0.727 ± 0.065 [d]
		เมทานอล	2.066 ± 0.168 [a]
	ใบ	เฮกเซน	0.069 ± 0.008 [f]
		เอทิลอะซีเตท	0.995 ± 0.076 [c]
		เมทานอล	1.892 ± 0.136 [b]
โคลงเคลงช้าง	ผล	เฮกเซน	0.073 ± 0.008 [f]
		เอทิลอะซีเตท	0.950 ± 0.080 [c]
		เมทานอล	2.169 ± 0.160 [a]
	ใบ	เฮกเซน	0.073 ± 0.009 [f]
		เอทิลอะซีเตท	0.477 ± 0.036 [e]
		เมทานอล	1.999 ± 0.149 [ab]

หมายเหตุ: ทำการทดลอง 3 ซ้ำ; ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน; [a-k] ตัวเลขที่มีอักษรกำกับในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 3.3 พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากผลและใบของโคลงเคลงอยู่ในช่วง 0.062 – 2.066 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ ขณะที่ปริมาณนี้จะพบอยู่ในช่วง 0.073 - 2.169 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบในผลและใบของโคลงเคลงช้าง เมื่อพิจารณาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดพบว่าสารสกัดที่ได้จากเมทานอลจะให้ปริมาณฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือเอทิลอะซีเตท และเฮกเซนให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุด นอกจากนี้หากพิจารณาส่วนพืชพบว่าในตัวทำละลายเมทานอลสารสกัดจากผลจะมีปริมาณฟีนอลิกมากกว่าใบ เป็นไปในทิศทางเดียวกันในพืชสองชนิด ผลที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Vittaya และคณะ (2022) ตัวทำละลายเมทานอลสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากส่วนพืชได้ในปริมาณที่มากที่สุดเมื่อเทียบกับเอทิลอะซีเตทและเฮกเซน

3.2 ศึกษาพฤติกรรมการดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง โดยวิธี DPPH จากเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

DPPH เป็นสารที่ใช้แทนอนุมูลอิสระ สำหรับตรวจสอบประสิทธิภาพการดักจับอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบในพืช หากสารสกัดใดสามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ดี สีของ DPPH จะเปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นสีเหลือง และลดปริมาณความเข้มข้นของ DPPH ลงครึ่งหนึ่ง จากนั้นจะนำสารสกัดดังกล่าวมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ (IC_{50}) และทำให้ DPPH เปลี่ยนสีและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเป็นสารดักจับอนุมูลอิสระกับสารมารตรฐานของ BHT และวิตามินซี ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลและใบของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง

ชนิดพืช	**ส่วนพืช**	**สารสกัด**	**ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)**
โคลงเคลง	ผล	เฮกเซน	> 50
		เอทิลอะซีเตท	18.17 ± 0.29 ^{e}
		เมทานอล	5.37 ± 0.21 ^{b}
	ใบ	เฮกเซน	> 50
		เอทิลอะซีเตท	14.49 ± 0.16 ^{d}
		เมทานอล	5.56 ± 0.09 ^{b}
โคลงเคลงช้าง	ผล	เฮกเซน	> 50
		เอทิลอะซีเตท	5.56 ± 0.02 ^{b}
		เมทานอล	4.16 ± 0.07 ^{a}
	ใบ	เฮกเซน	> 50
		เอทิลอะซีเตท	28.59 ± 0.45 ^{f}
		เมทานอล	5.45 ± 0.00 ^{b}
BHT	-	-	11.21 ± 0.02 ^{c}
Vitamin C	-	-	4.48 ± 0.06 ^{a}

ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากข้อมูลการทดลอง 3 ซ้ำ $^{a-k}$ ตัวเลขที่มีอักษรกำกับในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 3.4 สารสกัดผลและใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายเฮกเซนดักจับอนุมูลอิสระได้น้อย ไม่นำมาค่า IC_{50} ขณะที่สารสกัดผลและใบจากเอทิลอะซีเตทและเมทานอลนำมาหาค่า IC_{50} ได้ เมื่อพิจารณาจากตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดผลและใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้างที่สกัดจากเมทานอลมีประสิทธิภาพการดักจับอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเอทิลอะซีเตท และผลของโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายเมทานอลดักจับอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด และดีกว่าสารมาตรฐาน BHT และดีเทียบเท่ากับวิตามินซี รองลงมาคือผลและใบโคลงเคลงจากตัวทำละลายเมทานอล กับผลและใบโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายเอทิลอะซีเตทและเมทานอลตามลำดับ

การที่สารสกัดดักจับอนุมูลอิสระได้ดี เป็นผลจากการมีสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติ เช่น ฟีนอลิกในปริมาณมาก จากตารางที่ 3.3 สารสกัดผลโคลงเคลงและโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายเมทานอลมีปริมาณสารฟีนอลิกสูง ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้มาก ส่งผลต่อประสิทธิภาพของสารในการดักจับอนุมูลอิสระได้ดี ดังนั้นในงานวิจัยนี้สารที่มีประสิทธิภาพสูงซึ่งพบจากสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายขั้วสูงเช่นเดียวกับขั้วของตัวทำละลายเมทานอล มีความน่าสนใจในการนำไปแยกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป

3.3 ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดส่วนใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้างกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยวิธี Disc diffusion

ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเบื้องต้นของสารสกัดผลและใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง โดยวิธี disc Diffusion (CLSI, 2009)

จากตารางที่ 3.5 สารสกัดผลและใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 7 ชนิดดังนี้

1. เชื้อ *B. cereus* ด้วยค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสในช่วง 8.82 – 11.46 มิลลิเมตร
2. เชื้อ *S. aureus* ด้วยค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสในช่วง 8.49 – 19.12 มิลลิเมตร
3. เชื้อ *S. epidermidis* ด้วยค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสในช่วง 7.58 – 13.18 มิลลิเมตร
4. เชื้อ *E. coli* ด้วยค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสในช่วง 0.00 – 9.93 มิลลิเมตร
5. เชื้อ *S. typhi* ด้วยค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสในช่วง 7.43 – 20.65 มิลลิเมตร
6. เชื้อ *K. pneumoniae* ด้วยค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสในช่วง 7.98 – 11.34 มิลลิเมตร
7. เชื้อ *V. harveyi* ด้วยค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสในช่วง 0.00 – 8.73 มิลลิเมตร
8. เชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วยค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสในช่วง 6.97 – 22.73 มิลลิเมตร

นอกจากนี้อิทธิพลจากชนิดพืช ส่วนพืช ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และอันตรกิริยาระหว่างกันแตกต่างกันในแต่ละเชื้อแบคทีเรีย แสดงผลตามตารางที่ 3.5 ดังนี้ สำหรับเชื้อ *B. cereus* เฉพาะ

ประเภทตัวทำละลายมีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) โดยสารสกัดผลและใบโคลงเคลงจากตัวทำละลายเมทานอลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสูงสุด

สำหรับเชื้อ *S. aureus* ชนิดพืชและอันตรกิริยาระหว่างชนิดพืชกับประเภทของตัวทำละลายมีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และส่วนพืช ตัวทำละลาย กับอันตรกิริยาระหว่างชนิดพืชกับส่วนพืช และส่วนพืชกับตัวทำละลาย มีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) นอกจากนี้อันตรกิริยาระหว่างชนิดพืช ส่วนพืช และตัวทำละลาย ผลต่อการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.001$) โดยสารสกัดผลและใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายเมทานอล และผลโคลงเคลงช้างจากเอทิลอะซีเตทยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสูงสุด

สำหรับเชื้อ *S. epidermidis* ส่วนพืช ตัวทำละลาย มีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.005$ และ $P = 0.001$) ขณะที่อันตรกิริยาระหว่างชนิดพืชกับส่วนพืช ($P < 0.05$) และอันตรกิริยาระหว่างชนิดพืชกับตัวทำละลาย และ ส่วนพืชกับตัวทำละลาย และชนิดพืช ส่วนพืช ตัวทำละลายมีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) โดยสารสกัดผลโคลงเคลงจากตัวทำละลายเมทานอลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสูงสุด

สำหรับเชื้อ *E. coli* ชนิดพืช ส่วนพืช ตัวทำละลาย และอันตรกิริยาระหว่างชนิดพืชกับส่วนพืช ชนิดพืชกับตัวทำละลาย และส่วนพืชกับตัวทำละลาย รวมถึงชนิดพืช ส่วนพืช ตัวทำละลาย มีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) โดยสารสกัดใบโคลงเคลงจากตัวทำละลายเฮกเซนยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสูงสุด

สำหรับเชื้อ *S. typhi* เฉพาะชนิดพืชกับตัวทำละลาย มีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ) นอกจากนี้อันตรกิริยาระหว่างชนิดพืชกับตัวทำละลาย ($P < 0.05$) ระหว่างส่วนพืชกับตัวทำละลาย $P < 0.001$ และระหว่างชนิดพืช ส่วนพืช ตัวทำละลาย ($P < 0.05$) โดยสารสกัดใบโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายเมทานอลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสูงสุด

สำหรับเชื้อ *K. pneumoniae* เฉพาะประเภทของตัวทำละลายมีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) และอันตรกิริยาระหว่างชนิดพืชกับส่วนพืชมีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) โดยสารสกัดผลโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายเมทานอลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสูงสุด

สำหรับเชื้อ *V. harveyi* ทั้งชนิดพืชและประเภทของตัวทำละลายมีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) นอกจากนี้อันตรกิริยาระหว่างชนิดพืชกับส่วนพืช ชนิดพืชกับตัวทำละลาย ส่วนพืชกับตัวทำละลายมีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เช่นกัน โดยสารสกัดผลโคลงเคลงและ สารสกัดผลกับใบโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายเฮกเซนยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสูงสุด

สำหรับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้งส่วนพืชและประเภทของตัวทำละลายมีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) นอกจากนี้อันตรกิริยาระหว่างส่วนพืชกับตัวทำละลายมีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) และอันตรกิริยาของส่วนพืชกับตัวทำละลาย กับอันตรกิริยาของชนิดพืช ส่วนพืชและตัวทำละลายมีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เช่นกัน โดยสารสกัดผลโคลงเคลงและ สารสกัดใบโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายเมทานอลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสูงสุด

จะเห็นได้ว่าชนิดพืช ส่วนพืช และประเภทของตัวทำละลาย มีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิดได้ดีแตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่ผลและใบโคลงเคลงกับโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายเมทานอลออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกับแบคทีเรียแกรมบวกของ *B. cereus S. aureus* และ *S. epidermidis* ขณะที่ผลและใบโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายเมทาทอลออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบของ *S. typhi K. pneumoniae* และ *V. parahaemolyticus* ได้ดีกว่า ยกเว้น *E. coli* จากใบและผลโคลงเคลงจากตัวทำละลายเฮกเซน และ *V. haveyi* จากผลกับใบโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายเฮกเซน ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดี

เป็นไปได้ว่าสารพฤกษเคมีที่สกัดจากส่วนผลและใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้างด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน มีโครงสร้างและองค์ประกอบหลากหลายจำเพาะกับการผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายเป็นที่มาของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ต่างกัน (Abed และคณะ, 2013).

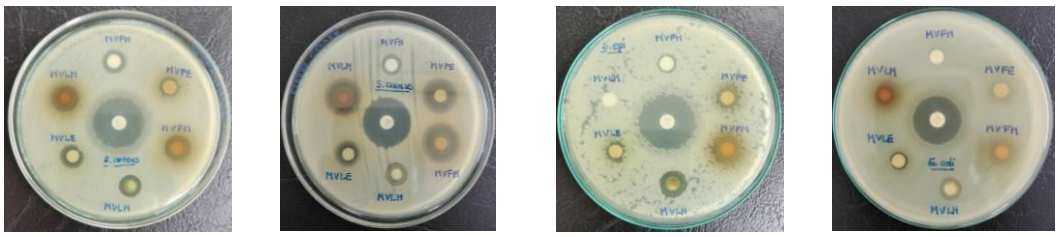
ดังนั้นเพื่อเป็นแนวทางการนำสารสกัดไปใช้ให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด จำเป็นต้องคำนึงถึงชนิดพืช ส่วนพืช และประเภทของตัวทำละลาย เพื่อใช้สำหรับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแต่ละชนิด

ตารางที่ 3.5 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดผลและใบของโคลงเคลง (MV) และโคลงเคลงช้าง (MC)

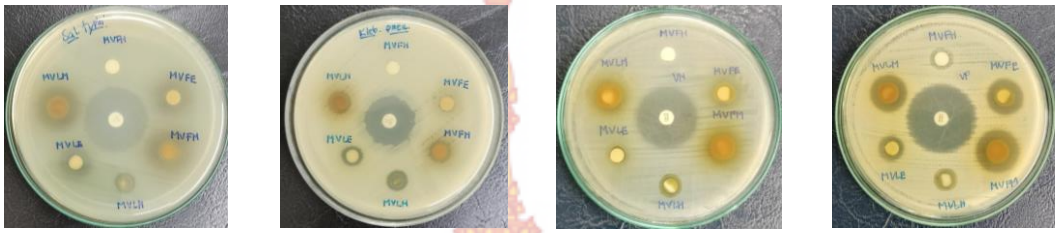
พืช	ส่วนพืช	ตัวทำละลาย	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร)							
			B. cereus	*S. aureus*	*S. epidermidis*	*E. coli*	*S. typhi*	*K. pneumoniae*	*V. harveyi*	*V. parahaemolyticus*
MV	F	H	8.82 ± 1.73 d	9.79 ± 0.29 e	9.29 ± 0.46 ef	0.00 ± 0.00 f	7.43 ± 0.16 f	7.98 ± 0.66 g	8.05 ± 1.42 b	10.15 ± 0.63 g
		E	8.80 ± 0.20 d	16.48 ± 0.21 c	9.17 ± 0.62 efg	0.00 ± 0.00 f	13.34 ± 0.89 d	8.74 ± 0.98 fg	0.00 ± 0.00 d	16.24 ± 1.11 e
		M	11.46 ± 0.67 b	18.64 ± 0.66 b	13.18 ± 0.56 b	0.00 ± 0.00 f	16.48 ± 0.54 c	11.06 ± 0.86 bcd	0.00 ± 0.00 d	20.38 ± 0.41 c
	L	H	9.45 ± 0.90 cd	10.50 ± 0.24 e	12.02 ± 0.18 bc	9.93 ± 0.53 b	8.22 ± 0.22 f	8.91 ± 0.97 efg	0.00 ± 0.00 d	6.97 ± 0.21 i
		E	8.88 ± 1.44 d	13.03 ± 1.17 d	8.64 ± 0.44 fg	0.00 ± 0.00 f	11.95 ± 0.66 de	9.93 ± 0.88 def	0.00 ± 0.00 d	12.47 ± 0.64 f
		M	11.40 ± 0.67 b	18.50 ± 0.53 b	6.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 f	16.15 ± 0.33 c	10.70 ± 0.46 bcd	0.00 ± 0.00 d	17.64 ± 0.33 de
MC	F	H	9.17 ± 0.86 d	10.06 ± 1.06 e	8.50 ± 0.52 fg	7.63 ± 0.22 cd	7.92 ± 0.34 f	8.44 ± 0.4 g	8.27 ± 0.38 b	7.86 ± 0.39 hi
		E	10.22 ± 0.68 bcd	17.83 ± 1.43 b	9.44 ± 1.76 ef	0.00 ± 0.00 f	16.18 ± 2.28 c	10.00 ± 0.85 cde	0.00 ± 0.00 d	19.44 ± 1.30 cd
		M	11.10 ± 0.33 bc	19.12 ± 0.56 b	10.48 ± 1.35 de	0.00 ± 0.00 f	17.96 ± 2.59 c	11.34 ± 0.5 b	0.00 ± 0.00 d	19.60 ± 0.68 cd
	L	H	8.94 ± 0.17 d	8.49 ± 0.16 f	9.11 ± 1.02 efg	7.42 ± 0.45 d	7.86 ± 0.64 f	7.98 ± 0.14 g	8.73 ± 0.50 b	8.69 ± 0.80 gh
		E	8.93 ± 1.07 d	9.33 ± 0.21 ef	7.58 ± 0.55 g	6.71 ± 0.33 e	10.49 ± 1.38 e	8.03 ± 0.38 g	6.42 ± 0.11 c	9.28 ± 1.99 gh
		M	10.84 ± 0.85 bc	18.84 ± 0.67 b	11.45 ± 0.96 cd	7.99 ± 0.59 c	20.65 ± 1.05 b	11.21 ± 0.59 bc	6.40 ± 0.11 d	22.73 ± 1.98 b
	GM	-	23.16 ± 00.88 a	23.48 ± 0.29 a	24.51 ± 0.24 a	20.85 ± 0.17 a	27.68 ± 0.36 a	22.66 ± 0.52 a	-	-
	TC		-	-	-	-	-	-	25.42 ± 0.93 a	30.29 ± 0.52 a

พืช ส่วนพืช ตัวทำละลาย		เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร)															
		B. cereus		*S. aureus*		*S. epidermidis*		*E. coli*		*S. typhi*		*K. pneumoniae*		*V. harveyi*		*V. parahaemolyticus*	
	df	*F*	*P*	*F*	*P*	*F*	*P*	*F*	*P*	*F*	*P*	*F*	*P*	*F*	*P*	*F*	*P*
Species (SP)	1	0.041	0.841	5.113	0.033	1.017	0.323	1209.191	< 0.001	9.753	0.005	0.051	0.824	195.640	< 0.001	2.127	0.158
Plant parts (PP)	1	0.386	0.540	83.610	< 0.001	9.388	0.005	1835.255	< 0.001	2.775	0.109	0.336	0.568	1.120	0.300	38.270	< 0.001
Solvent (S)	2	20.133	< 0.001	471.556	< 0.001	10.354	0.001	959.550	< 0.001	207.498	< 0.001	49.265	< 0.001	420.339	< 0.001	248.180	< 0.001
SP x PP	1	1.784	0.194	26.682	< 0.001	7.516	0.011	64.222	< 0.001	0.795	0.382	9.603	0.005	184.604	< 0.001	1.863	0.185
SP x S	2	1.327	0.284	4.053	0.030	10.647	0.000	19.070	< 0.001	4.996	0.015	0.932	0.407	52.882	< 0.001	3.234	0.057
PP x S	2	0.583	0.566	61.272	0.000	23.541	0.000	21.051	< 0.001	13.326	< 0.001	0.667	0.523	122.087	< 0.001	26.285	< 0.001
SP x PP x S	2	0.305	0.740	8.693	0.001	33.272	0.000	944.430	< 0.001	7.025	0.004	4.452	0.023	48.862	< 0.001	19.893	< 0.001
Error	24																

MV = โคลงเคลง, MC = โคลงเคลงช้าง, F = ผล, L = ใบ, H = เฮกเซน, E = เอทิลอะซีเตท, M = เมทานอล, ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, GM = Gentamycin, TE = Tetracycline, SP = ชนิดพืช, PP = ส่วนพืช, S = ตัวทำละลาย

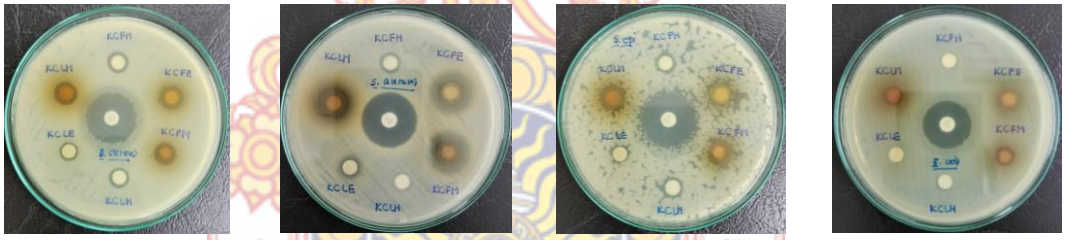


(A) (B) (C) (D)

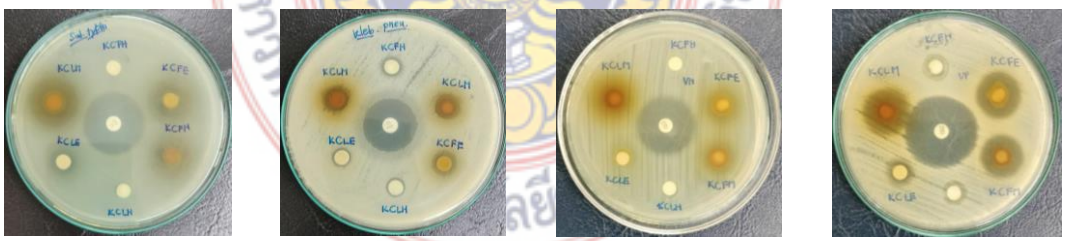


(E) (F) (G) (H)

ภาพที่ 3.1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดใบและผลของโคลงเคลงต่อเชื้อ *B. cereus* (A), *S. aureus* (B), *S. epidermidis* (C), *E. coli* (D), *Samonella typhi* (E), *klebsiella pueumonaie* (F), *V. harveyi* (G) และ *V. parahaemolyticus* (H) เมื่อ MVLH, MVLE, MVILM คือใบจากการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตทและเมทานอล ตามลำดับ



(A) (B) (C) (D)



(E) (F) (G) (H)

ภาพที่ 3.2 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดใบและผลของโคลงเคลงช้างต่อเชื้อ *B. cereus* (A), *S. aureus* (B), *S. epidermidis* (C), *E. coli* (D), *Samonella typhi* (E), *klebsiella pueumonaie* (F), *V. harveyi* (G) และ *V. parahaemolyticus* (H) เมื่อ MVLH, MVLE, MVILM คือใบจากการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตทและเมทานอล ตามลำดับ

3.4 เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC/MBC)

ตารางที่ 3.6 ตรวจสอบค่า MIC และ MBC ของสารสกัดผลและใบโคลงเคลงกับโคลงเคลงช้าง กับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแต่ละชนิดพบว่าสารสกัดใบโคลงเคลงและโครงเคลงช้างจากตัวทำละลายเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ดีที่สุด (MIC = 3.125) ขณะที่เฉพาะสารสกัดใบโคลงเคลงจากตัวทำละลายเอทิลอะซีเตทและเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ดีที่สุด (MIC = 3.125)

สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* สารสกัดผลและใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารสกัดผลโคลงเคลงจากเอทิลอะซีเตท (MIC = 0.098) และสารสกัดใบโคลงเคลงจากเอทิลอะซีเตทและเมทานอล (MIC = 0.098) อีกทั้งสารสกัดผลโคลงเคลงจากเอทิลอะซีเตท (MIC = 0.195)

สำหรับเชื้อ *E. coli* สารสกัดใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้างจากเอทิลอะซีเตทและเมทานอลตามลำดับ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี (MIC = 1.563)

สำหรับเชื้อ *S. typhi* สารสกัดใบโคลงเคลงจากเมทานอล (MIC = 0.391) และสารสกัดผลโคลงเคลงจากเอทิลอะซีเตทและเมทานอล (MIC = 0.781) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี

สำหรับเชื้อ *K. pneumoniae* เฉพาะสารสกัดใบโคลงเคลงจากมทานอล (MIC = 1.563) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี

สำหรับเชื้อ *V. harveyi* สารสกัดใบโคลงเคลงจากเอทิลอะซีเตทและเมทานอล และใบโคลงเคลงช้างจากเมทานอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี (MIC = 12.5)
สำหรับเชื้อ *V. parahaemolyticus* เฉพาะสารสกัดผลโคลงเคลงช้างจากเอทิลอะซีเตทและเมทานอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี (MIC = 12.5)

การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนี้เชื่อว่าเป็นผลมาจากสารพฤกษเคมีหรือเมทาบอไลต์ทุติยภูมิเช่น สารประกอบฟีนอลิก (Niharika และคณะ 2021) หรือ Bodiba และคณะ (2018) ซึ่งใบของหยีทะเลจากเมทานอล และ Panigrahi และ Mahapatra (2016) ยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. aureus* ได้ดี และรายงานว่าเป็นผลมาจากสารพวกแอลคาลอยด์ แอนทราควิโนน ไกลโคไซด์ และฟลาโวนอยด์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ศึกษาที่พบว่าสารประกอบฟีนอลิกพบมากจากส่วนพืชที่สกัดด้วยตัวทำละลายขั้วกลางถึงสูง โดยเฉพาะขั้วสูงจะพบสารกลุ่มนี้มากที่สุด เป็นไปได้ว่าจะมีบทบาทต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยการทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเสียสภาพไป

ตารางที่ 3.6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดผลและใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง

พืช	ส่วนพืช	ตัวทำละลาย	MIC/MBC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)															
			B. cereus		*S. aureus*		*S. epidermidis*		*E. coli*		*S. typhi*		*K. pneumoniae*		*V. harveyi*		*V. parahaemolyticus*	
			MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
MV	F	H	25	>100	25	>100	0.781	>100	25	>100	12.5	>100	25	>100	50	>100	25	>100
		E	6.25	>100	6.25	>100	0.098	25	3.125	>100	0.781	25	3.125	25	25	>100	6.25	100
		M	12.5	50	6.25	>100	0.195	25	6.25	>100	0.781	25	3.125	50	25	>100	1.563	100
	L	H	3.125	>100	6.25	>100	3.125	100	6.25	>100	6.25	>100	12.5	>100	25	>100	3.125	100
		E	3.125	>100	3.125	>100	0.098	50	1.563	>100	3.125	50	3.125	50	12.5	>100	6.25	100
		M	3.125	50	3.125	>100	0.098	25	3.125	100	0.391	25	1.563	25	12.5	>100	6.25	100
MC	F	H	25	>100	25	>100	1.563	>100	25	>100	25	100	12.5	>100	50	>100	50	100
		E	12.5	50	6.25	100	1.563	25	3.125	>100	6.25	25	12.5	25	50	>100	12.5	50
		M	12.5	100	6.25	100	3.125	50	6.25	>100	3.125	25	3.125	50	25	>100	12.5	50
	L	H	12.5	>100	50	>100	12.5	>100	50	>100	25	100	25	>100	100	>100	50	>100
		E	12.5	>100	25	>100	12.5	100	25	>100	12.5	50	12.5	100	25	>100	12.5	>100
		M	3.125	50	12.5	100	3.125	50	1.563	>100	6.25	25	6.25	25	12.5	>100	3.125	100

MV = โคลงเคลง, MC = โคลงเคลงช้าง, F = ผล, L = ใบ, H = เฮกเซน, E = เอทิลอะซีเตท, M = เมทานอล, ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, GM = Gentamycin, TE = Tetracycline, SP = ชนิดพืช, PP = ส่วนพืช, S = ตัวทำละลาย

บทที่ 4
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผล

นำส่วนผลและใบที่แห้งของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้างมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ขั้วต่ำ ขั้วกลางและขั้วสูงตามลำดับ (เฮกเซน เอทิลอะซีเตทและเมทานอล) โดยวิธีการแช่ และนำมาทดสอบพฤกษเคมีของสารเมทาบอไลต์ทุติยภูมิคือ เทอร์พีนอยด์ แอนทราควิโนน ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิกและแอลคาลอยด์ พบว่าสารสกัดที่ได้มีองค์ประกอบของสารดังกล่าวข้างต้นต่างกัน โดยเทอร์พีนอยด์จะพบในสารสกัดที่ได้จากขั้วต่ำและขั้วกลาง ขณะที่องค์ประกอบอื่นๆ ส่วนใหญ่จะพบในสารสกัดที่ได้จากขั้วกลางและขั้วสูง เพื่อตรวจสอบปริมาณสารสำคัญของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเชื่อว่ากลุ่มไฮดรอกซิล (-OH) มีส่วนสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระที่เป็นตัวการในการเกิดโรคภัยหรือการเจ็บป่วยต่างๆ ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี พบว่าสารสกัดผลและใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายขั้วกลางและขั้วสูง มีปริมาณสารประกอบดังกล่าวในปริมาณที่มากกว่าสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายเฮกเซน

เมื่อศึกษาพฤติกรรมการดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนผลและใบของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง โดยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดผลและใบโคลงเคลงและโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายขั้วกลางและขั้วสูง ดักจับอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายเฮกเซน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล มีประสิทธิภาพในการดักจับอนุมูลอิสระได้สูงสุด ให้ค่าความเข้มข้นในการยับยั้งต่ำพอๆ กับวิตามินซีซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดส่วนใบและผลของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้างกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 7 ชนิด โดยวิธี Disc diffusion พบว่าชนิดพืช ส่วนพืช และประเภทของตัวทำละลาย มีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดีแตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่ผลและใบโคลงเคลงกับโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายเมทานอลออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกับแบคทีเรียแกรมบวกของ *B. cereus S. aureus* และ *S. epidermidis* ขณะที่ผลและใบโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายเมทาทอลออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบของ *S. typhi K. pneumoniae* และ *V. parahaemolyticus* ได้ดีกว่า ยกเว้น *E. coli* ใบและผลโคลงเคลงจากตัวทำละลายเฮกเซนและ *V. harveyi* ที่ผลกับใบโคลงเคลงช้างจากตัวทำละลายเฮกเซน ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดี ซึ่งเชื่อว่าสารพฤกษเคมีในพืชมีส่วนในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียจนทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อ

แบคทีเรียได้ (MIC/MBC) แตกต่างกันด้วยเช่นเดียวกัน เป็นผลมาจากสารพฤกษเคมีหรือเมทาบอไลต์ทุติยภูมิ ซึ่งมีบทบาทหรือเป็นกลไกสำคัญในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

ดังนั้นการแยกสารเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของโคลงเคลง และโคลงเคลงช้าง ที่สกัดจากตัวทำละลายเอทิลอะซีเตทและเมทานอล น่าสนใจเพื่อศึกษาต่อและเพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ สำหรับนำไปศึกษาหาสารออกฤทธิ์ที่ใช้ในทางเภสัชหรือทางการแพทย์ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์ วรินทรชวศิริ วิโรจน์ ธีนธนาธร. 2555. หนังสือพรรณไม้สมุนไพรในป่าชายเลนบ้านทุ่งตะแซะ จังหวัดตรัง. พิมพ์ครั้งที่ 1. ห้างประสุขชัยการพิมพ์.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556. อนุมลอิสระ สารต้านอนมูลอิสระและการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.21(3): 275-286.

พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และ ปาริชาติ พุ่มขจร. 2553. การใช้สมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรคในปลา. วารสาร วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 12(4): 63-71.

สิทธิโชค จันทร์ย่อง. 2552. พันธุ์ไม้ป่าชายเลนและป่าชายหาดชายฝั่งอ่าวสิเกา จังหวัดตรัง. นีโอพ้อยท์. 138 น.

Abed, S.A., Sirat, H.M., Taher, M. 2013. Total phenolic, antioxidant, antimicrobial activities and toxicity study of Gynotroches axillaris Blume Rhizophoraceae). EXCLI J. 12: 404–412.

Alwash, M.S., Ibrahim, N. and Ahmad, W.Y. 2013.Bio-guided study on *Melastoma Malabathricum* linn leaves and elucidation of its biological activities. American Journal of Applied Sciences 10 (8): 767-778.

Alwash, M.S., Ibrahim, N. and Ahmad, W.Y. 2013. Identification and mode of action of antibacterial components from *Melastoma Malabathricumlinn* leaves. American Journal of Infectious Diseases 9(2): 46-58.

Bodiba, D.C., Prasad, P., Srivastava, A., Crampton, B., Lall, N. 2018. Antibacterial activity of Azadirachta indica, Pongamia pinnata, Psidium guajava and Mangifera indica and their mechanism of action against Streptococcus mutans. S. Afr. J. Bot. 115: 280. doi.org/10.1016/j.sajb.2018.02.021

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard-eighth edition. CLSI documents M07-A8. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa.

Dey, S.K., Shoeb, M., Nahar, N., Mosihuzzamam, M. and Sultana, N. 2005. Biological and chemical studies on Calycopteris floribunda leaves. Dhaka Univ. Journal of Pharmaceutical Science. 4(2): 103-106.

Drummond, A. J. and Waigh, R. D. 2000. The development of microbiological methods for phytochemical screening. Recent Research Developments in Phytochemistry 4: 143 – 152

Huang, W.-Y., Cai, Y.-Z., Corke, H., Sun, M. 2010. Survey of antioxidant capacity and nutritional quality of selected edible and medicinal fruit plants in Hong Kong. Journal of Food Composition and Analysis. 23: 510–517.

Kannan, R.R.R.; Arumugam, R.; Meenakshi, S. and Anantharaman, P. 2010. Thin layer chromatography analysis of antioxidant constituents from seagrasses of Gulf of Mannar Biosphere Reserve, South India. International Journal of Chem Tech Research. 2(3): 1526-1530.

Kujur, R.S., Singh, V., Ram, M., Yadava, H.N., Singh, K.K., Kumari, S. and Roy, B.K. 2010. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of Stevia rebaudiana in alloxan-induced diabetic rats. Pharmacognosy Research. 2(4): 258–263.

Lee, Ik.-S., Kim, I.-S., Lee, Y.-M.,Lee, Y.,Kim, J.-H.and Kim, J.S. 2013. 2″,4″-O Diacetylquercitrin, a Novel Advanced Glycation End-Product Formation and Aldose Reductase Inhibitor from *Melastoma sanguineum*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin.61(6): 662–665.

Like dissolves like. https://citly.me/ZB9vN (3/08/66)

Lohézic-Le Dévéhata, F., Bakhtiar, A., Bézivina, C., Amoros, M. and Boustie, J. Antiviral and cytotoxic activities of some Indonesian plants. Fitoterapia 73 (2002) .400-405.

Mazura, M.P., Susanti, D. and Rasadah, M.A. 2007. Anti-inflammatory Action of Components from

Mahmoudi, S., Khali, M., Benkhaled, A., Benamirouche, K., Baiti, I. 2016. Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts from ten Algerian Ficus carica L. varieties. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 6: 239–245.

Melastoma villosum http://nutrition.dld.go.th/exhibision/native_grass/other/Melastoma%20%20 saigonense.htm (15/04/64)

Melastoma sanguineum Sims. http://www.dnp.go.th/Botany/stamp.aspx?StampGroupCode=0004 (15/04/64)

Mulata, H.N.; Gnanasekaran, N.; Melaku, U. and Daniel, S. 2015. Phytochemical Screening and Assessment of In Vitro Antioxidant Activities of Calpurnia Aurea Seeds and Leaves. International Journal of pharmacy and pharmaceutical research. 2(2): 1-12.

Niharika, P., Radhika, G., Sri, A.K., Fathima, S., Elisha, Y. 2021. Antimicrobial activity of hydro-alcoholic bark extract of *Pongamia pinnata.* IJPSR. 12: 1149–1154. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.12(2).1149-54

Panigrahi, S., Mahapatra, S. 2016. Evaluation of antibacterial activity of Pongamia pinnata L., Curcuma longa L. and Mentha arvenis L. against Staphylococcus aureus. Int. J. ChemTech Res. 9: 205–212.

Rahim, A.A., Rocca, E., Steinmetz, J., Jain Kassim, M., Sani Ibrahim, M. and Osman, H. 2008.Antioxidant activities of mangrove Rhizophora apiculata bark extracts. Food Chemistry. 107(1): 200-207.

Seethalaxmi, M.S., Shubharani, R., Nagananda, G.S. & Sivaram, V. 2012. Phytochemical analysis and free radical scavenging potential of Baliospermum montanum (Willd.) Muell. Leaf. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 5(2): 135-137.

Serna, D.M.O. and Martínez, J.H.I. 2015.Phenolics and Polyphenolics from Melastomataceae Species. Molecules. 20, 17818-17847.

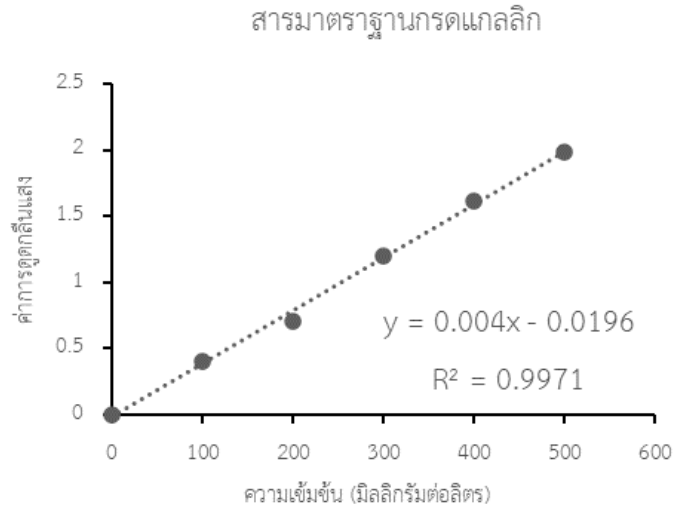
Susanti, D., Sirat, H.M., Ahmad, F., Ali, R.M., Aimi, N. and Kitajim, M. 2007. Antioxidant and cytotoxic flavonoids from the flowers of Melastoma malabathricum L. Food Chemistry. 103: 710–716.

Vittaya L, Aiamyang S, Ui- eng J, Knongsai S, Leesakul N. 2019. Effect of Solvent Extraction on Phytochemical Component and Antioxidant Activity of Vine and Rhizome *Ampelocissus martini*. Science & Technology Asia. 24(3): 17-26.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสารสกัดส่วนต่างๆ ของโคลงเคลงและโคลงเคลงช้าง



ภาพผนวก ก1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

ตารางผนวก ก1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดผลและใบของโคลงเคลง ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

สารสกัด	ตัวทำละลาย	ความยาวคลื่นที่ 765 nm			ค่าเฉลี่ย	SD
		1	2	3		
ผล	เฮกเซน	0.034	0.030	0.027	0.030	0.004
	เอทิลอะซิเตท	0.503	0.584	0.600	0.562	0.052
	เมทานอล	1.480	1.691	1.729	1.633	0.134
ใบ	เฮกเซน	0.028	0.038	0.040	0.035	0.060
	เอทิลอะซิเตท	0.707	0.815	0.808	0.777	0.109
	เมทานอล	1.368	1.559	1.555	1.494	0.006

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

1. การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากส่วนใบของโคลงเคลงในตัวทำละลายเฮกเซน

จากสมการ $x = \frac{(y + 0.0196)}{0.004}$

แทนค่า $y = 0.034$

$x = \frac{(0.034 + 0.0196)}{0.004}$

$x = 13.40$

ในส่วนสารสกัดเฮกเซนที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณสารฟีนอลิกเท่ากับ 13.40 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อ 0.2 มิลลิกรัมสารสกัดหยาบ

∴ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก = 13.40 x 5 = 67 ไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ หรือเท่ากับ 0.067 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ

ตารางผนวก ก1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	SD	ปริมาณฟีนอลิกรวม (mg)			เฉลี่ย	SD	ปริมาณฟีนอลิกรวม (μg) GAE/ g crude			เฉลี่ย	SD	ปริมาณฟีนอลิกรวม (mg) GAE/g crude			เฉลี่ย	SD
	1	2	3			1	2	3			1	2	3			1	2	3		
MVFH	0.034	0.030	0.027	0.030	0.004	13.400	12.400	11.650	12.483	0.878	67.000	62.000	58.250	62.417	4.390	0.067	0.062	0.058	0.062	0.004
MVFE	0.503	0.584	0.600	0.562	0.052	130.650	150.900	154.900	145.483	13.001	653.250	754.500	774.500	727.417	65.004	0.653	0.755	0.775	0.727	0.065
MVFW	1.480	1.691	1.729	1.633	0.134	374.900	427.650	437.150	413.233	33.536	1874.500	2138.250	2185.750	2066.167	167.679	1.875	2.138	2.186	2.066	0.168
MVLH	0.028	0.038	0.040	0.035	0.006	11.900	14.400	14.900	13.733	1.607	59.500	72.000	74.500	68.667	8.036	0.060	0.072	0.075	0.069	0.008
MVLE	0.707	0.815	0.808	0.777	0.060	181.650	208.650	206.900	199.067	15.109	908.250	1043.250	1034.500	995.333	75.543	0.908	1.043	1.035	0.995	0.076
MVLM	1.368	1.559	1.555	1.494	0.109	346.900	394.650	393.650	378.400	27.284	1734.500	1973.250	1968.250	1892.000	136.422	1.735	1.973	1.968	1.892	0.136
MCFH	0.032	0.042	0.043	0.039	0.006	12.900	15.400	15.650	14.650	1.521	64.500	77.000	78.250	73.250	7.603	0.065	0.077	0.078	0.073	0.008
MCFE	0.667	0.769	0.786	0.741	0.064	171.650	197.150	201.400	190.067	16.090	858.250	985.750	1007.000	950.333	80.451	0.858	0.986	1.007	0.950	0.080
MCFM	1.568	1.775	1.803	1.715	0.128	396.900	448.650	455.650	433.733	32.090	1984.500	2243.250	2278.250	2168.667	160.450	1.985	2.243	2.278	2.169	0.160
MCLH	0.031	0.042	0.044	0.039	0.007	12.650	15.400	15.900	14.650	1.750	63.250	77.000	79.500	73.250	8.750	0.063	0.077	0.080	0.073	0.009
MCLE	0.329	0.378	0.380	0.362	0.029	87.150	99.400	99.900	95.483	7.221	435.750	497.000	499.500	477.417	36.106	0.436	0.497	0.500	0.477	0.036
MCLM	1.444	1.627	1.668	1.580	0.119	365.900	411.650	421.900	399.817	29.816	1829.500	2058.250	2109.500	1999.083	149.082	1.830	2.058	2.110	1.999	0.149

MV คือ โคลงเคลง; F, L คือ ผลและใบ; H, E, M คือ ตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตท และเมทานอล ตามลำดับ

MC คือ โคลงเคลงช้าง; F, L คือ ผลและใบ; H, E, M คือ ตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตท และเมทานอล ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ภาคผนวก ข
ข้อมูลทางสถิติของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตารางผนวก ข1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แบบ One-way ANOVA โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 22

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	24.281	11	2.207	235.198	.000
Within Groups	.225	24	.009		
Total	24.507	35			

ตารางผนวก ข2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

			Subset for alpha = 0.05					
samples		N	f	e	d	c	b	a
Duncan[a]	MVFH	3	.06242					
	MVLH	3	.06867					
	MCFH	3	.07325					
	MCLH	3	.07325					
	MCLE	3		.47742				
	MVFE	3			.72742			
	MCFE	3				.95033		
	MVLE	3				.99533		
	MVLM	3					1.89200	
	MCLM	3					1.99908	1.99908
	MVFM	3						2.06617
	MCFM	3						2.16867
	Sig.		.902	1.000	1.000	.575	.188	.052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางผนวก ข3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แบบ One-way ANOVA โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 22

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	9	.000	4701.923	.000
Within Groups	.000	20	.000		
Total	.002	29			

ตารางผนวก ข4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

		Subset for alpha = 0.05					
	N	f	e	d	c	b	a
MCFM	3	.0042					
MVFM	3		.0054				
MCLM	3		.0055				
MVLM	3		.0056				
MCFE	3		.0056				
BHT	3			.0112			
MVLE	3				.0145		
MVFE	3					.0182	
MCLE	3						.0286
Sig.		1.000	.309	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางผนวก ข5 การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: BC

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	39.236[a]	11	3.567	4.264	.001	.662
Intercept	3482.377	1	3482.377	4163.392	.000	.994
SP	.034	1	.034	.041	.841	.002
PP	.323	1	.323	.386	.540	.016
S	33.680	2	16.840	20.133	.000	.627
SP * PP	1.492	1	1.492	1.784	.194	.069
SP * S	2.220	2	1.110	1.327	.284	.100
PP * S	.975	2	.488	.583	.566	.046
SP * PP * S	.511	2	.255	.305	.740	.025
Error	20.074	24	.836			
Total	3541.687	36				
Corrected Total	59.310	35				

a. R Squared = .662 (Adjusted R Squared = .506)

ตารางผนวก ข6 การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: SA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	630.826[a]	11	57.348	109.687	.000	.980
Intercept	7275.237	1	7275.237	13915.021	.000	.998
SP	2.673	1	2.673	5.113	.033	.176
PP	43.714	1	43.714	83.610	.000	.777
S	493.090	2	246.545	471.556	.000	.975
SP * PP	13.950	1	13.950	26.682	.000	.526
SP * S	4.238	2	2.119	4.053	.030	.252
PP * S	64.071	2	32.035	61.272	.000	.836
SP * PP * S	9.090	2	4.545	8.693	.001	.420
Error	12.548	24	.523			
Total	7918.611	36				
Corrected Total	643.374	35				

a. R Squared = .980 (Adjusted R Squared = .972)

ตารางผนวก ข7 การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: SE

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	127.702[a]	11	11.609	15.777	.000	.879
Intercept	3298.013	1	3298.013	4481.995	.000	.995
SP	.748	1	.748	1.017	.323	.041
PP	6.908	1	6.908	9.388	.005	.281
S	15.237	2	7.619	10.354	.001	.463
SP * PP	5.530	1	5.530	7.516	.011	.238
SP * S	15.668	2	7.834	10.647	.000	.470
PP * S	34.644	2	17.322	23.541	.000	.662
SP * PP * S	48.966	2	24.483	33.272	.000	.735
Error	17.660	24	.736			
Total	3443.376	36				
Corrected Total	145.362	35				

a. R Squared = .879 (Adjusted R Squared = .823)

ตารางผนวก ข8 การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: EC

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	568.846[a]	11	51.713	636.079	.000	.997
Intercept	393.824	1	393.824	4844.084	.000	.995
SP	98.307	1	98.307	1209.191	.000	.981
PP	149.206	1	149.206	1835.255	.000	.987
S	156.023	2	78.011	959.550	.000	.988
SP * PP	5.221	1	5.221	64.222	.000	.728
SP * S	3.101	2	1.550	19.070	.000	.614
PP * S	3.423	2	1.711	21.051	.000	.637
SP * PP * S	153.564	2	76.782	944.431	.000	.987
Error	1.951	24	.081			
Total	964.621	36				
Corrected Total	570.797	35				

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .995)

ตารางผนวก ข9 การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Samonella typhi*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ST

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	685.759[a]	11	62.342	43.547	.000	.952
Intercept	5976.836	1	5976.836	4174.910	.000	.994
SP	13.963	1	13.963	9.753	.005	.289
PP	3.973	1	3.973	2.775	.109	.104
S	594.111	2	297.055	207.498	.000	.945
SP * PP	1.138	1	1.138	.795	.382	.032
SP * S	14.306	2	7.153	4.996	.015	.294
PP * S	38.155	2	19.077	13.326	.000	.526
SP * PP * S	20.114	2	10.057	7.025	.004	.369
Error	34.359	24	1.432			
Total	6696.954	36				
Corrected Total	720.118	35				

a. R Squared = .952 (Adjusted R Squared = .930)

ตารางผนวก ข10 การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *klebsiella pueumonaie*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: KP

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	58.420[a]	11	5.311	10.966	.000	.834
Intercept	3266.885	1	3266.885	6745.155	.000	.996
SP	.025	1	.025	.051	.824	.002
PP	.163	1	.163	.336	.568	.014
S	47.721	2	23.861	49.265	.000	.804
SP * PP	4.651	1	4.651	9.603	.005	.286
SP * S	.903	2	.451	.932	.407	.072
PP * S	.646	2	.323	.667	.523	.053
SP * PP * S	4.312	2	2.156	4.452	.023	.271
Error	11.624	24	.484			
Total	3336.929	36				
Corrected Total	70.044	35				

a. R Squared = .834 (Adjusted R Squared = .758)

ตารางผนวก ข11 การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. haveyi*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: VH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	504.482[a]	11	45.862	151.791	.000	.986
Intercept	247.695	1	247.695	819.806	.000	.972
SP	59.110	1	59.110	195.640	.000	.891
PP	.338	1	.338	1.120	.300	.045
S	254.001	2	127.001	420.339	.000	.972
SP * PP	55.776	1	55.776	184.604	.000	.885
SP * S	31.956	2	15.978	52.882	.000	.815
PP * S	73.774	2	36.887	122.087	.000	.911
SP * PP * S	29.526	2	14.763	48.862	.000	.803
Error	7.251	24	.302			
Total	759.429	36				
Corrected Total	511.733	35				

a. R Squared = .986 (Adjusted R Squared = .979)

ตารางผนวก ข12 การวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. parahamolyticus*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: VP

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	1049.659[a]	11	95.424	57.950	.000	.964
Intercept	7349.347	1	7349.347	4463.166	.000	.995
SP	3.503	1	3.503	2.127	.158	.081
PP	63.017	1	63.017	38.270	.000	.615
S	817.339	2	408.670	248.180	.000	.954
SP * PP	3.068	1	3.068	1.863	.185	.072
SP * S	10.651	2	5.326	3.234	.057	.212
PP * S	86.566	2	43.283	26.285	.000	.687
SP * PP * S	65.515	2	32.757	19.893	.000	.624
Error	39.520	24	1.647			
Total	8438.526	36				
Corrected Total	1089.179	35				

a. R Squared = .964 (Adjusted R Squared = .947)