



รายงานผลการดำเนินงาน

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช

อันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
(อพ.สธ.)

โครงการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากต้นแปะ
และเสม็ดแดง

สนองพระราชดำริ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

ประจำปีงบประมาณ 2565

กิจกรรม \ เดือน	พ.ย. 64	ธ.ค. 64	ม.ค. 65	ก.พ. 65	มี.ค. 65	เม.ย. 65	พ.ค. 65	มิ.ย. 65	ก.ค. 65	ส.ค. 65	ก.ย. 65
ดำเนินโครงการ (D)											
ศึกษา เก็บข้อมูลเก็บตัวอย่างพืช และเตรียมสารสกัดตัวอย่างพืช (แปะ และเสม็ดแดง) จากพื้นที่ เขตจังหวัดบุรีรัมย์											
ทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด											
นำสารสกัดที่ได้ หรือพืชที่ศึกษา มาใช้ในการทำผลิตภัณฑ์ และ ทดสอบคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์											
ติดตามการนำความรู้ไปใช้ ประโยชน์ (C)											
รายงานการดำเนินงานโครงการ											
นำผลสรุปมาปรับปรุงเพื่อ วางแผนต่อไป (A)											

1.3 วัตถุประสงค์โครงการ

1.3.1 เพื่อสนองพระราชดำริ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.)

1.3.2 เพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด แปะ และเสม็ดแดง

1.3.3 เพื่อนำพืชในท้องถิ่นมาประยุกต์ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์

1.4 สถานที่ดำเนินการ

1.4.1 สวนพฤกษศาสตร์โรงเรียน มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ และพื้นที่ที่พบพืช (แปะ เสม็ดแดง) ในเขตจังหวัดบุรีรัมย์

1.4.2 สาขาวิชาเคมี และศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สนองพระราชดำริ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.)

1.5.2 ข้อมูลคุณสมบัติทางกายภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากแปะ และเสม็ดแดง

1.5.3 ได้ผลิตภัณฑ์จากสารสกัดแปะ และเสม็ดแดง

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แปะ

แปะ มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Vitex quinata* (Lour.) F.N.Will อยู่ในวงศ์ Lamiaceae เป็นต้นไม้ประจำจังหวัดบุรีรัมย์ ลักษณะเป็นไม้เนื้อแข็งทรงพุ่ม [1] มีรายงานการนำเปลือกมาใช้ประโยชน์ช่วยในการขับลม และนำมาชงดื่มเพื่อกระตุ้นความอยากอาหาร [2] ได้มีการศึกษาวิจัยใบของต้นแปะ โดยได้มีการแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม [3] มีการศึกษาสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในเหง้าแปะ พบสาร 5 ชนิดดังนี้ β -sitosterol, vitexin, 20-hydroxyecdysone, 20,22-monoacetone, 3,5-O-bicaffeoyl, quinic acid และ daucosterol [4] ลักษณะของต้นแปะแสดงดังรูปที่ 2.1

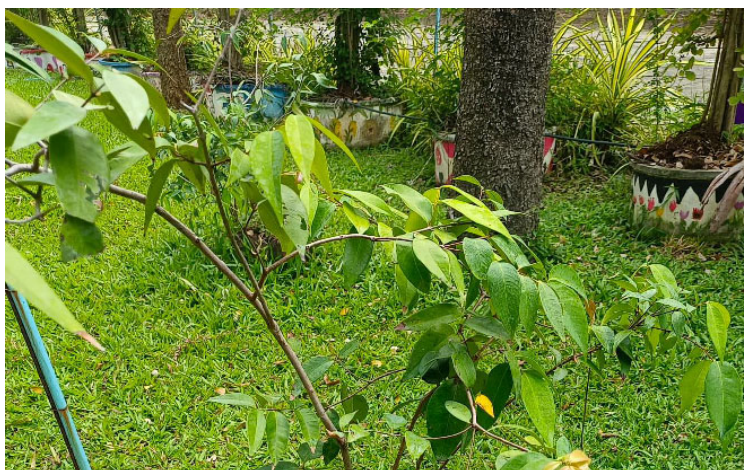


รูปที่ 2.1 ลักษณะของต้นแปะ

สุธีรา สุนทรารักษ์ และคณะ (2017) ทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* จากสารสกัดหยาบของผลต้นแปะด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ พบว่า สารสกัดจากผลต้นแปะมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด จึงนำสารสกัดของผลต้นแปะที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมาเตรียมสบู่อ่อน และนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ พบว่า อัตราส่วนผสมระหว่าง น้ำมันผสม : สารสกัดผลต้นแปะ ที่อัตราส่วน 350 : 25 มิลลิลิตร ผ่านเกณฑ์การยอมรับของ มอก. 29-2545 [5]

2.2 เสม็ดแดง

เสม็ดแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Syzygiumgratum* (Wight) S.N.Mitra var. *gratum* อยู่ในวงศ์ Myrtaceae ชื่ออื่น ไคร้เม็ด (เชียงใหม่ ภาคกลาง) เม็ก (ตะวันออก ตะวันออกเฉียงเหนือ) เสม็ดแดง เสม็ดขุน เสม็ด (สกลนคร สตุล) เสม็ดขาว เสม็ดเขา (ตราด) เม็ดขุน(นครศรีธรรมราช) ลักษณะเป็นไม้ต้น สูง ลำต้นสีน้ำตาลแดง ยอดอ่อนรับประทานเป็นผักได้ มีสรรพคุณ รากต้มน้ำดื่มแก้เบื่อเมา แก้ผดผื่นคัน ยอดอ่อนรับประทานสดใช้ขับลม เปลือกต้มน้ำทาแก้ลมพิษ ใบแก้ตาใช้พอกแก้ฟกช้ำ [6] ได้มีรายงานการวิจัยพบว่า สารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [7] สารสกัดด้วยน้ำจากเสม็ดแดงมีฤทธิ์ลดความดันโลหิต [8] ลักษณะของต้นเสม็ดแดงแสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ลักษณะของต้นเสม็ดแดง

ชัชวิน เพชรเลิศ และคณะ ทำการศึกษารสออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในส่วนสกัดย่อยและแฟรกชันย่อยต่าง ๆ ของใบเสม็ดแดงหลังจากที่ผ่านการทำโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ โดยอาศัยคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเป็นตัวนำทางในการทำให้สารบริสุทธิ์ และ

เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ พบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมีปริมาณฟีนอลิกที่สูงที่สุด และ
ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจึงถูกเลือกที่จะนำไป
แยกด้วยคอลัมน์ต่อไป หลังจากผ่านคอลัมน์แล้ว แพรกชั้นที่มีฤทธิ์ยังคงมีความสามารถในการกำจัด
อนุมูล DPPH ได้สูงขึ้น (94.36%) และมีค่า FRAP เท่ากับ 767.373 ± 3.272 มิลลิกรัมสมมูลของ
Trolox/กรัมของส่วนสกัด [9]

บทที่ 3

วิธีทดลอง

3.1 พืชตัวอย่าง

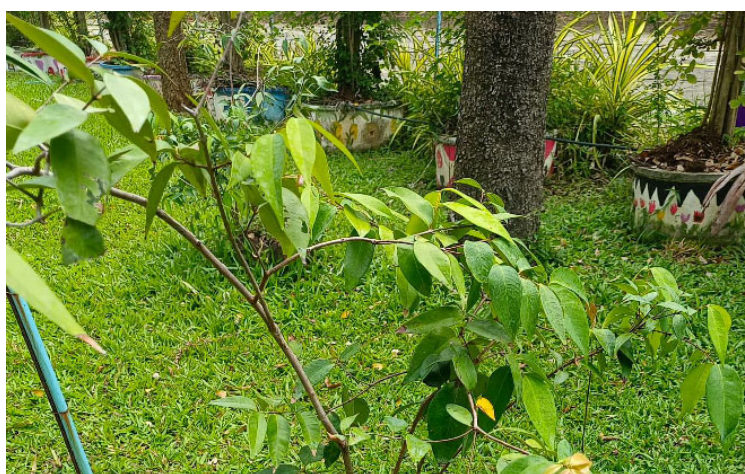
พืชตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยคือ แปะและเสม็ดแดง ส่วนที่นำมาใช้คือ ใบ ทำการเก็บในช่วงเดือน มกราคม พ.ศ. 2565

ต้นแปะ แหล่งที่เก็บคือ สวนพฤกษศาสตร์โรงเรียน มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าอ่างเก็บน้ำห้วยจระเข้มาก จ.บุรีรัมย์ แสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แหล่งเก็บต้นแปะ

เสม็ดแดง แหล่งที่เก็บคือ สวนพฤกษศาสตร์โรงเรียน มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ จ.บุรีรัมย์ แสดงดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แหล่งเก็บเสม็ดแดง

3.2 สารเคมี

- 1) เอทานอล (ethanol; C_2H_5OH)
- 2) น้ำกลั่น (distilled water)
- 3) 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (2,2-Diphenyl -1-picrylhydrazyl; DPPH)
- 4) โทรลอกซ์ (trolox) หรือ 6-ไฮดรอกซี-2,5,7,8-เตตระเมทิลคลอโรแมน-1-คาร์บอกซิลิกแอซิด (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchloroman-2-carboxylic acid)
- 5) โฟลินซิโอแคลทู (Folin Ciocalteu) หรือ โซเดียม 1,2-แนฟทาควิโนน-4-ซัลโฟเนต (sodium 1,2-naphthaquinone-4-sulfonate)
- 6) โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate; Na_2CO_3)
- 7) กรดแกลลิก (gallic acid) หรือ 3,4,5-ไตรไฮดรอกซีเบนโซอิก แอซิด (3,4,5-trihydroxybenzoic acid; $C_7H_6O_5$)
- 8) โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (potassium persulfate; $K_2S_2O_8$)
- 9) 2,2'-อะซิโน-บิส(3-เอทิลเบนโซไทอะโซลีน-6-ซัลโฟนิคแอซิด) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid); ABTS)

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1) เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance) ยี่ห้อ SATRORIUS รุ่น BSA2245S-CW
- 2) เครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary Evaporator) ยี่ห้อ HEIDOLPH รุ่น Hei-VAP Advantage
- 3) เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer) ยี่ห้อ Perkin-Elmer
- 4) บีกเกอร์ (beaker)
- 5) ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- 6) ขวดก้นกลม (round bottom flask)
- 7) ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask)
- 8) ปิเปตหลายปริมาตร (graduate pipette)
- 9) ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 10) กรวยแก้ว (glass funnel)
- 11) ช้อนตักสาร (spatula)
- 12) แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)

13) หลอดหยด (dropper)

14) ขวดสีชา (amber reagent bottle)

3.4 วิธีทดลอง

3.4.1 การสกัดพืชตัวอย่าง

ทำการสกัดพืชตัวอย่าง ได้แก่ ใบของต้นแปะและใบของต้นเสม็ดแดง ด้วยวิธีการแช่ (maceration) โดยมีขั้นตอนดังนี้

- 1) นำพืชมาล้างให้สะอาด และตากในที่ร่มให้แห้ง นำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด
- 4 ตำแหน่ง ลักษณะของใบพืชแห้งแสดงดังรูปที่ 3.3 และ 3.4

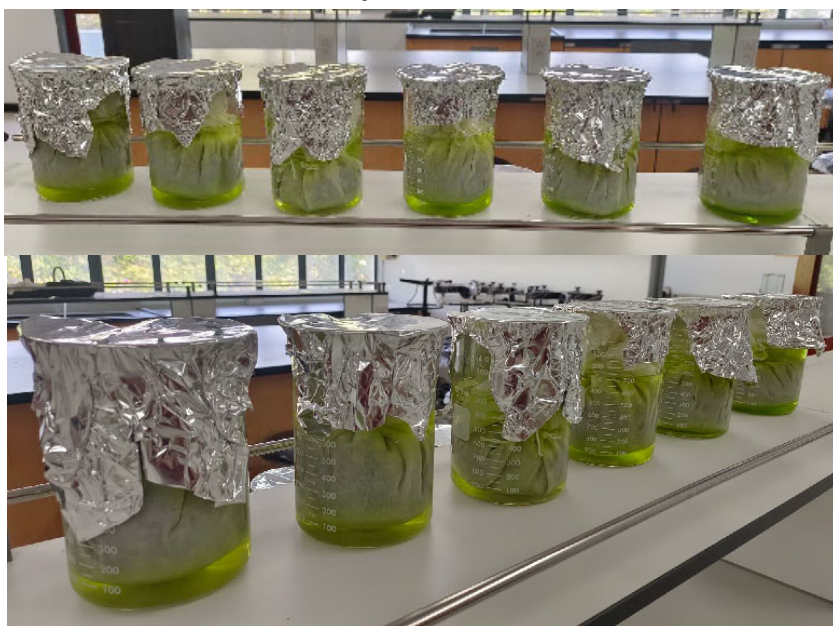


รูปที่ 3.3 ใบต้นแปะแห้ง



รูปที่ 3.4 ใบเสม็ดแดงแห้ง

2) นำพืชมาห่อด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นทำการสกัดด้วยวิธีการแช่ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ตัวทำละลายที่ใช้สกัดคือ เอทานอล ดังรูปที่ 3.5 และ 3.6



รูปที่ 3.5 การสกัดใบต้นแปะ

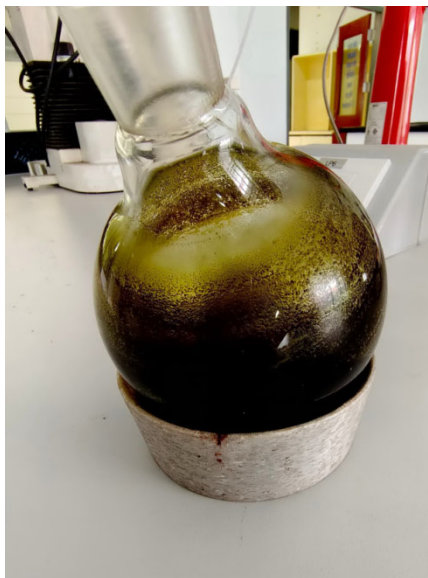


รูปที่ 3.6 การสกัดใบเสม็ดแดง

3) นำสารละลายที่ได้จากการสกัด มาทำการระเหยตัวทำละลายเอทานอลออก ด้วยเครื่องระเหยลดความดัน (rotary evaporator) ดังรูปที่ 3.7 จะได้สารสกัดพืช (crude ethanol extract) ดังรูปที่ 3.8 และ 3.9



รูปที่ 3.7 การระเหยตัวทำละลายเอทานอล



รูปที่ 3.8 สารสกัดไบทันแปะ



รูปที่ 3.9 สารสกัดไบทันแปะ

3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไบทันแปะและไบทันแปะ โดยวิธี DPPH radical scavenging assay มีหลักการดังนี้ สารที่ใช้เป็นอนุมูลอิสระคือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) มีสีม่วง ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (nm) เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง ดังนั้นถ้าพืชตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ความเข้มของสารละลายสีม่วงจะลดลงและเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลือง (ค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร มีค่าลดลง) คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชตัวอย่าง และสารมาตรฐาน trolox มีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1) เตรียมสารละลายสารสกัดพืชและสารมาตรฐาน trolox โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้นดังนี้ สารสกัดใบต้นแปะ: 10 25 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดใบเสม็ดแดง: 10 25 40 50 และ 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารมาตรฐาน trolox: 1 1.5 2 2.5 3 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2) ปิเปตสารสกัดพืชและสารมาตรฐาน trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดสีชา แล้วเติมสารละลาย DPPH 0.2 มิลลิโมลาร์ (mM) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3) ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4) นำสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดย Blank คือ เอทานอล ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาหาค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

5) นำค่าการดูดกลืนแสง (ค่าเฉลี่ย) มาคำนวณหาค่า %Inhibition จากสูตรคำนวณดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = \left[1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (ใช้เอทานอลแทนสารตัวอย่าง)

6) ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารสกัดใบต้นแปะ สารสกัดใบเสม็ดแดง และสารมาตรฐาน trolox แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับ %Inhibition เพื่อหาค่า IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (ถ้ามีค่า IC_{50} น้อยแสดงว่าสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี)

3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging assay มีหลักการดังนี้ สารที่ใช้เป็นอนุมูลอิสระคือ 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) การทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ABTS ในงานวิจัยนี้ทำได้โดยใช้สารเคมี potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) ซึ่งอนุมูลอิสระ ABTS ใน aqueous solution สารละลายมีสีเขียว ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เมื่ออนุมูลอิสระ ABTS ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนเป็นสารละลายใสไม่มีสี ดังนั้นถ้าพืชตัวอย่างมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้ความเข้มของสารละลายสีเขียวลดลงและเปลี่ยนเป็นสารละลายใสไม่มีสี คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชตัวอย่าง และสารมาตรฐาน trolox มีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1) การเตรียม ABTS⁺ working solution

1.1) เตรียม stock solution ของ ABTS⁺ โดยผสม ABTS 7.4 มิลลิโมลาร์ กับ Potassium persulfate 2.45 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยากันในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จะได้สารละลาย stock solution ของ ABTS⁺

1.2) เติมสารละลาย stock solution ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น

1.3) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยจะต้องทำการเจือจางเพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.7 ± 0.05 จะได้ ABTS⁺ working solution

2) วิธีทดสอบ

1.1) เตรียมสารละลายสารสกัดพืชและสารมาตรฐาน trolox โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้นดังนี้ สารสกัดใบต้นแปะ: 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดใบเสม็ดแดง: 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารมาตรฐาน trolox: 2 3 6 10 15 20 และ 35 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

1.2) ปิเปตสารสกัดพืชและสารมาตรฐาน trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ลงในขวดสีชา เติม ABTS⁺ working solution ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

1.3) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดย Blank คือ เอทานอล ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาหาค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

1.4) นำค่าการดูดกลืนแสง (ค่าเฉลี่ย) มาคำนวณหาค่า %Inhibition จากสูตรคำนวณดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = \left[1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (ใช้เอทานอลแทนสารตัวอย่าง)

1.5) รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ trolox ต่อสารสกัด 1 กรัม (mg of trolox equivalent (TE) / g extract)

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มใหญ่ที่พบในธรรมชาติ คณะผู้วิจัยทำการวิเคราะห์โดยวิธี Folin-Ciocalteu method ซึ่งเป็นวิธีการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic compound) มีหลักการดังนี้ สารละลาย Folin-Ciocalteu (Folin-ciocalteu's phenol reagent) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโมลิบดีนัม-ทังสแตน Mo(VI) ซึ่งจะมีสีเหลือง เมื่อทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ

Mo(V) ซึ่งจะมีสีน้ำเงิน ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยคณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu method ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน มีขั้นตอนดังนี้

1) การสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

1.1) เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 5 10 20 40 60 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย

1.2) เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่ความเข้มข้น 10 % (v/v) และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

1.3) ปิเปตสารละลายกรดแกลลิก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสาร Folin-Ciocalteu ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดสีชาเขย่าผสมให้เข้ากันนำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

1.4) เมื่อครบ 3 นาที นำมาเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 756 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาหาค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

1.5) นำค่าการดูดกลืนแสง (ค่าเฉลี่ย) ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมกับค่าการดูดกลืนแสง

2) การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดพืชตัวอย่าง

2.1) เตรียมสารละลายสารสกัดพืช โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้นดังนี้ สารสกัดใบต้นแปะ: 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดใบเสม็ดแดง: 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.2) เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่ความเข้มข้น 10 % (v/v) และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

2.3) ปิเปตสารละลายกรดแกลลิก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสาร Folin-Ciocalteu ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดสีชาเขย่าผสมให้เข้ากันนำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

2.4) เมื่อครบ 3 นาที นำมาเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 756 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาหาค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.5) นำค่าการดูดกลืนแสง (ค่าเฉลี่ย) ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (ค่าการดูดกลืนแสงของพืชตัวอย่างจะต้องอยู่ในช่วงกราฟของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก) โดยรายงานผลในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัดพืช 1 กรัม (mg GAE/g of extract)

3.4.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ดังนี้ *Candida albicans*, *Clostridium butyricum* และ *Pseudomonas aeruginosa* ใช้วิธีการทดสอบ การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารในการยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยเทคนิค minimum inhibitory concentration (MIC) broth dilution โดยส่งสารสกัดพืชตัวอย่างไปทดสอบฤทธิ์เชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวที่ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

1) การเตรียมสารสกัดพืชตัวอย่างสำหรับการทดสอบ

เตรียมสารสกัดพืชตัวอย่างให้มีความเข้มข้นสูงสุดสำหรับการทดสอบดังนี้ สารสกัดใบแปะ 21.9 mg/ml สารสกัดใบเสมีดแดง 25.9 mg/ml โดยละลายด้วยตัวทำละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้น 10% v/v ทั้งนี้ในระหว่างการทดสอบ สารตัวอย่างจะถูกเจือจางต่ออีก 10 ระดับๆละ 2 เท่า

2) การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (inoculums)

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ และสภาวะการบ่ม แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

เชื้อก่อโรค	อาหารที่ใช้	สภาวะการบ่ม
<i>Candida albicans</i> TISTR5554	Sabouraud Dextrose Broth (SDB)	30°C ใช้อากาศ 48 ชม.
<i>Clostridium butyricum</i> TISTR1032	Reinforced Clostridial Medium (RCM)	37°C ไม่ใช้อากาศ 48 ชม.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TISTR1995	Tryptic Soy Broth (TSB)	37°C ใช้อากาศ 24 ชม.

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบจาก Frozen stock 100 ไมโครลิตร ในอาหารและบ่มตามสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ดังตารางที่ 3.1 โดยเมื่อเชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตดีแล้ว ทำการปรับความขุ่นด้วย 0.85% normal saline ให้เท่ากับความขุ่นของสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5 (เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร)

3) วิธีการทดสอบ

3.1) นำหลอดทดลองปราศจากเชื้อ 12 หลอด เขียนหมายเลขกำกับที่หลอดจากหลอดที่ 1 ถึง 12

3.2) เตรียมส่วนประกอบของแต่ละหลอด ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของสารในแต่ละหลอดการทดลอง

หลอด ที่	ระดับความเข้มข้น ของสารทดสอบ	ส่วนประกอบของสารทดสอบในแต่ละหลอด
1	ความเข้มข้นสูงสุด	สารทดสอบ 2 มิลลิลิตร
2	ระดับการเจือจางที่ 1 (2x)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร + สารทดสอบ 1 มิลลิลิตร
3	ระดับการเจือจางที่ 2 (4x)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร + สารทดสอบจากหลอดที่ 2 ที่ผสมดีแล้ว 1 มิลลิลิตร
4	ระดับการเจือจางที่ 3 (8x)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร + สารทดสอบจากหลอดที่ 3 ที่ผสมดีแล้ว 1 มิลลิลิตร
5	ระดับการเจือจางที่ 4 (16x)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร + สารทดสอบจากหลอดที่ 4 ที่ผสมดีแล้ว 1 มิลลิลิตร
6	ระดับการเจือจางที่ 5 (32x)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร + สารทดสอบจากหลอดที่ 5 ที่ผสมดีแล้ว 1 มิลลิลิตร
7	ระดับการเจือจางที่ 6 (64x)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร + สารทดสอบจากหลอดที่ 6 ที่ผสมดีแล้ว 1 มิลลิลิตร
8	ระดับการเจือจางที่ 7 (128x)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร + สารทดสอบจากหลอดที่ 7 ที่ผสมดีแล้ว 1 มิลลิลิตร
9	ระดับการเจือจางที่ 8 (256x)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร + สารทดสอบจากหลอดที่ 8 ที่ผสมดีแล้ว 1 มิลลิลิตร
10	ระดับการเจือจางที่ 9 (512x)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร + สารทดสอบจากหลอดที่ 9 ที่ผสมดีแล้ว 1 มิลลิลิตร
11	ระดับการเจือจางที่ 10 (1024x)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร + สารทดสอบจากหลอดที่ 10 ที่ผสมดีแล้ว 1 มิลลิลิตร
12	หลอดควบคุม (ไม่มีสารทดสอบ)	อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร + 10% DMSO 1 มิลลิลิตร

3.3) เติมห้วเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้อ 2) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด แล้วนำทุกหลอดทดลองไปปั่นที่อุณหภูมิตามสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคนั้น ๆ ทำการตรวจผลการเจริญที่ 24-48 ชั่วโมง โดยสังเกตความขุ่นของสารในแต่ละหลอด

3.4) อ่านผลการทดสอบเพื่อให้ได้ค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

โดยค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นของสารในระดับต่ำที่สุด ที่มีผลให้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถเจริญเติบโต โดยบันทึกผลการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (control) ดังนี้

- บันทึกเครื่องหมาย + สำหรับหลอดที่สารมีความขุ่น แสดงถึงเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคมีการเจริญเติบโต หรือสารทดสอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้
 - บันทึกเครื่องหมาย - สำหรับหลอดที่สารไม่ขุ่นหรือใส แสดงถึงเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคไม่มีการเจริญเติบโต หรือสารทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้
- จากนั้นนำทุกหลอดมาตรวจสอบเพื่อยืนยันการมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบนอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์

3.5 การทำผลิตภัณฑ์

ในการทำผลิตภัณฑ์ จะแบ่งออกเป็น 2 ผลิตภัณฑ์ คือ สารสกัดแปะ จะทำสบู่มาก่อน 2 สูตร และ สารสกัดเสียดแต่ง นำมาใช้ในส่วนประกอบของยาหม่อง 2 ตำรับ โดยมีวิธีการดังนี้

3.5.1 การผลิตสบู่มาก่อนหลอมเทจากสารสกัดแปะ

การผลิตสบู่ ทำการผลิตสบู่ชนิดหลอมเท โดยเลือกเบสสบู่ 2 ชนิด ที่มีส่วนประกอบต่างกัน คือ สูตร 1 ใช้เบสสบู่ใส และสูตร 2 ใช้เบสสบู่ขุ่น

1) สูตร 1 สบู่ก้อนใส ทำการเลือกเบสสบู่ใสกลีเซอริน ที่มีส่วนประกอบพื้นฐานดังนี้

- เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol)
- น้ำมันมะพร้าว (Coconut oil)
- น้ำมันปาล์ม (Palm oil)
- น้ำกลั่น (Distill water)
- กลีเซอริน (Glycerin)
- กรดสเตียริก (Stearic acid)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
- น้ำตาล (Sucrose)
- ไตรเอทานอลามีน (Triethanolamine, TEA)
- น้ำมันละหุ่ง (Castor oil)
- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)
- สารสกัดแปะ

2) สูตร 2 สบู่ก้อนขุ่น ทำการเลือกเบสสบู่ขุ่น ที่มีส่วนประกอบพื้นฐานดังนี้

- น้ำมันรำข้าว (Rice bran oil)
- น้ำมันมะพร้าว (Coconut oil)
- น้ำมันปาล์ม (Palm oil)
- น้ำกลั่น (Distill water)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
- สารสกัดแปะ

3) หลอมเบสสบู่ 1 กิโลกรัม ด้วยหม้อตุ๋น เทสบู่ที่หลอมแล้วลงในภาชนะสำหรับเท รอให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 70 องศาเซลเซียส เติมสารสกัดแปะ 1 กรัม คนให้เข้ากัน เติมน้ำหอม และเทลงแม่พิมพ์ รอจนสบู่เซตตัว แกะออกจากแม่พิมพ์ และห่อด้วยฟิล์มใสเพื่อกันฝุ่นและสิ่งสกปรกอื่น ๆ

3.5.2 การผลิตยาหม่องจากสารสกัดเสม็ดแดง

ในการผลิตยาหม่อง ได้เลือกผลิตยาหม่อง 2 ตำรับ ที่มีเนื้อสัมผัสที่แตกต่างกัน คือ ตำรับที่ 1 ยาหม่องเนื้อธรรมดา และ ตำรับที่ 2 ยาหม่องเนื้อบาล์ม โดยมีส่วนผสมและวิธีการดังนี้

1) ยาหม่องตำรับที่ 1 มีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.3

- ชั่ง พิมเสน การบูร เมนทอล ผสมกัน คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- ชั่ง วาสลีน และพาราฟิน ให้ความร้อนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทลงภาชนะผสม เติมสารสกัดเสม็ดแดง คนให้เข้ากัน เติมส่วนผสมของพิมเสน การบูร เมนทอล ที่เข้ากันดีแล้ว คนให้เข้ากัน เติมน้ำมันระกำ เทลงภาชนะรอให้ยาหม่องเซตตัว

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบยาหม่องตำรับที่ 1

ลำดับ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
1	วาสลีน	500 กรัม
2	พาราฟิน	200 กรัม
3	เมนทอล	200 กรัม
4	พิมเสน	100 กรัม
5	การบูร	100 กรัม
6	น้ำมันระกำ	100 ซีซี
7	สารสกัดเสม็ดแดง	24 กรัม

2) ยาหม่องตำรับที่ 1 มีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.4

- ชั่ง พิมเสน การบูร เมนทอล ผสมกัน คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำมันยูคาลิปตัส และน้ำมันระกำ คนให้เข้ากัน
- ชั่ง วาสลีน และขี้ผึ้ง ให้ความร้อนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทลงภาชนะผสม เติมสารสกัดเสม็ดแดง คนให้เข้ากัน เติมส่วนผสมของพิมเสน การบูร เมนทอล และน้ำมันทั้ง 2 ชนิด คนให้เข้ากัน เทลงภาชนะรอให้ยาหม่องเซตตัว

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบยาหม่องตำรับที่ 2

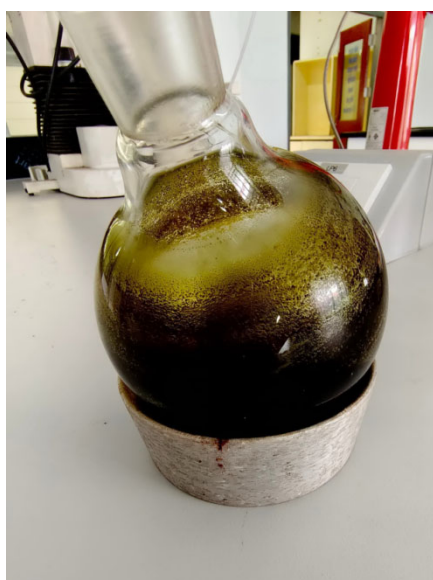
ลำดับ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
1	วาสลีน	100 กรัม
2	ขี้ผึ้ง	65 กรัม
3	เมนทอล	150 กรัม
4	พิมเสน	150 กรัม
5	การบูร	150 กรัม
6	น้ำมันระกำ	150 มิลลิลิตร
7	น้ำมันยูคาลิปตัส	15 มิลลิลิตร
8	สารสกัดเสม็ดแดง	16 กรัม

บทที่ 4

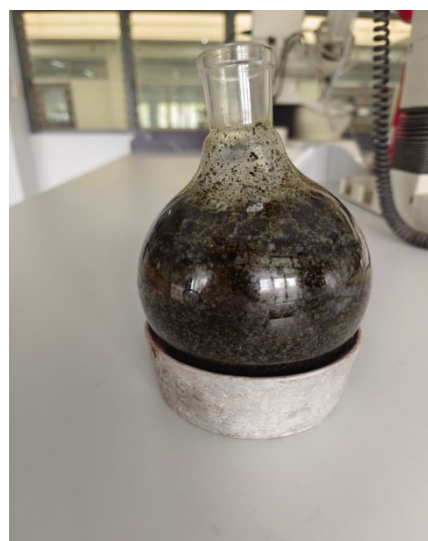
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ผลการสกัดสารสำคัญจากพืชตัวอย่าง

นำใบของต้นแปะและใบของเสม็ดแดงที่แห้งมาทำการสกัดด้วยวิธีการแช่ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ตัวทำละลายที่ใช้สกัดคือ เอทานอล 95% จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการสกัดมาทำการระเหยตัวทำละลายเอทานอลออก ด้วยเครื่องระเหยลดความดัน (rotary evaporator) จะได้สารสกัดพืช (crude ethanol extract) แสดงดังรูปที่ 4.1 ซึ่งมีลักษณะและร้อยละสารสกัด แสดงดังตารางที่ 4.1



สารสกัดใบต้นแปะ



สารสกัดใบเสม็ดแดง

รูปที่ 4.1 สารสกัดพืช

ตารางที่ 4.1 ผลการสกัดสารสำคัญจากพืชตัวอย่าง

พืชตัวอย่าง (ใบ)	ปริมาตร เอทานอล (ml)	ลักษณะ สารสกัด	น้ำหนักพืช แห้งที่ใช้ (g)	น้ำหนัก สารสกัด (g)	ร้อยละสาร สกัดต่อ น้ำหนัก พืชแห้ง
แปะ	7200	น้ำมันหนืด	167.8861	17.9813	10.7104

		สีเขียวเข้ม			
เสม็ดแดง	5200	ของแข็ง สีเขียวเข้ม	158.9429	43.0897	27.1102

จากผลการสกัดสารสำคัญจากใบของต้นแปะและใบของเสม็ดแดง แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายเอทานอลสามารถสกัดสารจากใบพืชทั้งสองชนิดได้ โดยตัวทำละลายเอทานอลสามารถสกัดสารจากใบของเสม็ดแดงได้มากกว่าใบของต้นแปะ

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

1) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Trolox

เตรียมสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 1 1.5 2 2.5 3 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่า %Inhibition แสดงดังตารางที่ 4.2

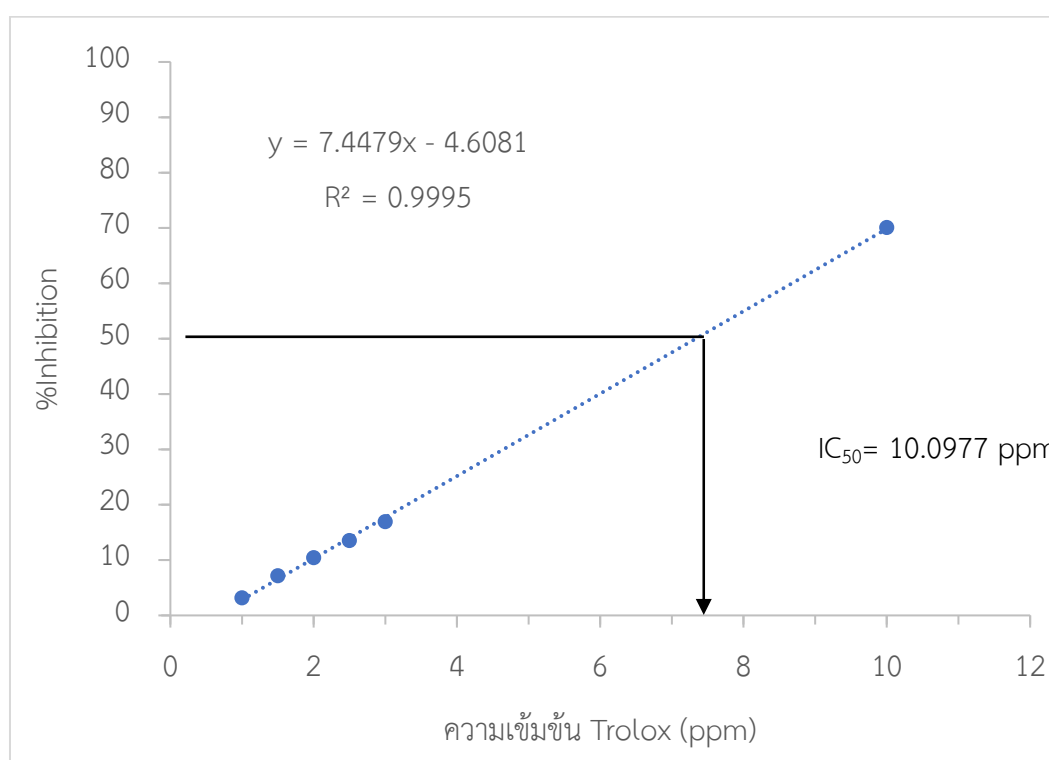
ตารางที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และค่าของ %Inhibition ของสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	%Inhibition
1	0.4094±0.0025	3.1693
1.5	0.3925±0.0011	7.1665
2	0.3787±0.0062	10.4305
2.5	0.3656±0.0092	13.5288

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	%Inhibition
3	0.3512±0.0095	16.9347
10	0.1265±0.0154	70.0804

หมายเหตุ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (A_{control}) = 0.4228 ± 0.0019

นำค่า %Inhibition ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox กับ %Inhibition เพื่อหาค่า IC_{50} แสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox กับ %Inhibition

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Trolox พบว่าสารมาตรฐาน Trolox ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.0977 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบของต้นแปะ

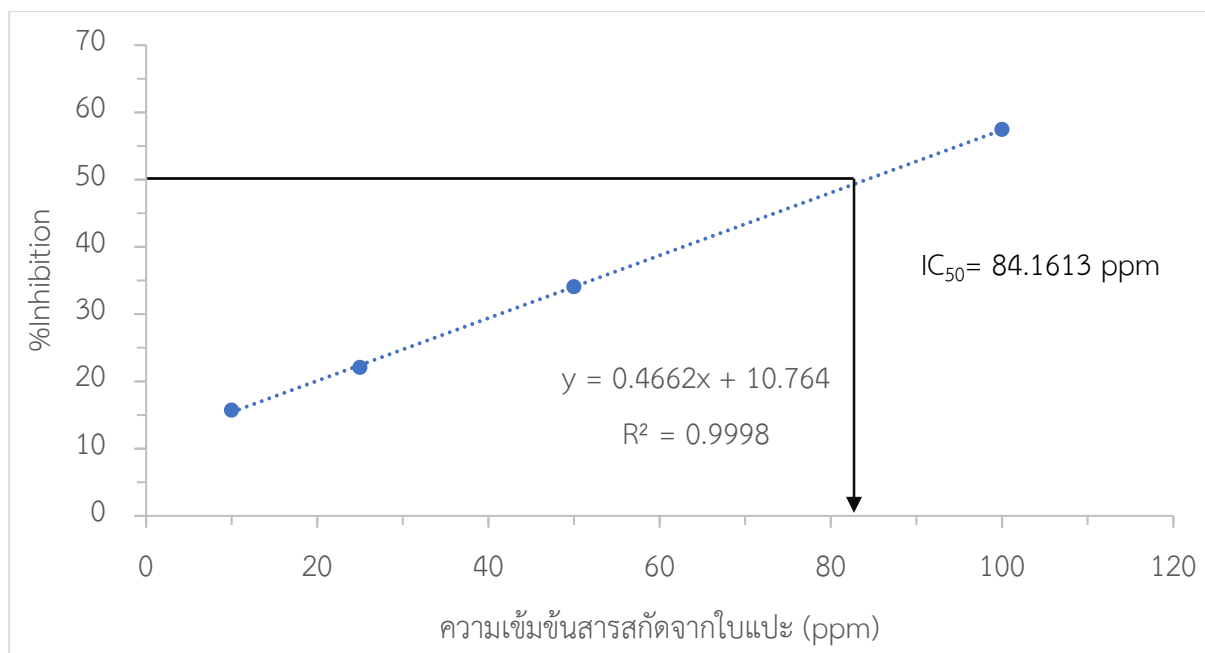
เตรียมสารสกัดใบต้นแปะ ที่ความเข้มข้น 10 25 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่า %Inhibition แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และค่าของ %Inhibition ของสารสกัดใบต้นแปะที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	%Inhibition
10	0.3563±0.0078	15.7285
25	0.3295±0.0035	22.0672
50	0.2788±0.0133	34.0586
100	0.1799±0.0013	57.4503

หมายเหตุ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (A_{control}) = 0.4228±0.0019

นำค่า %Inhibition ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดใบต้นแปะ กับ %Inhibition เพื่อหาค่า IC_{50} แสดงดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดใบต้นแปะ กับ %Inhibition

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบต้นแปะ พบว่าสารสกัดใบต้นแปะออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่า IC_{50} เท่ากับ 84.1613 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบของต้นเสม็ดแดง

เตรียมสารสกัดใบเสม็ดแดง ที่ความเข้มข้น 10 25 40 50 และ 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่า %Inhibition แสดงดังตารางที่ 4.4

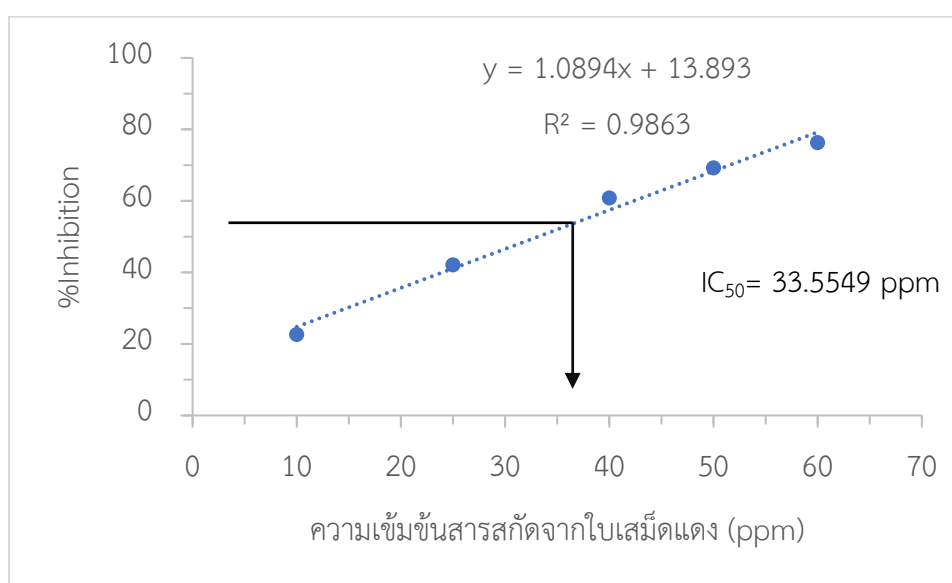
ตารางที่ 4.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และค่าของ %Inhibition ของสารสกัดใบเสม็ดแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	%Inhibition
10	0.3272±0.0053	22.6112
25	0.2448±0.0009	42.1003

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	%Inhibition
40	0.1658±0.0014	60.7852
50	0.1302±0.0085	69.2053
60	0.1002±0.0040	76.3008

หมายเหตุ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (A_{control}) = 0.4228±0.0019

นำค่า %Inhibition ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดใบเสมีดแดง กับ %Inhibition เพื่อหาค่า IC_{50} แสดงดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดใบเสมีดแดง กับ %Inhibition

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเสมีดแดง พบว่าสารสกัดใบเสมีดแดงออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่า IC_{50} เท่ากับ 33.5549 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน trolox สารสกัดใบต้นแปะ และสารสกัดใบเสมีดแดง ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay แสดงผลดังตารางที่ 4.5

(รายงานผลเป็นค่า IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ถ้ามีค่า IC_{50} น้อยแสดงว่าสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี)

ตารางที่ 4.5 ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Trolox สารสกัดใบต้นแปะ และสารสกัดใบเสม็ดแดง

สารตัวอย่าง	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
สารมาตรฐาน Trolox	10.0977
สารสกัดใบต้นแปะ	84.1613
สารสกัดใบเสม็ดแดง	33.5549

จากตารางที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบต้นแปะและสารสกัดใบเสม็ดแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดใบเสม็ดแดงออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดใบต้นแปะ (พิจารณาจากค่า IC_{50} ของสารสกัดใบเสม็ดแดงมีค่าน้อยกว่าสารสกัดใบต้นแปะ) อย่างไรก็ตามสารสกัดทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าสารมาตรฐาน trolox เนื่องจากสารมาตรฐาน trolox เป็นสารบริสุทธิ์ ในขณะที่สารสกัดทั้งสองชนิดมีสารที่เป็นองค์ประกอบมากมายหลายชนิด ซึ่งถ้านำสารสกัดทั้งสองชนิดมาทำการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้ค่า IC_{50} มีค่าน้อยลง ซึ่งจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากขึ้น

4.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging assay

1) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Trolox

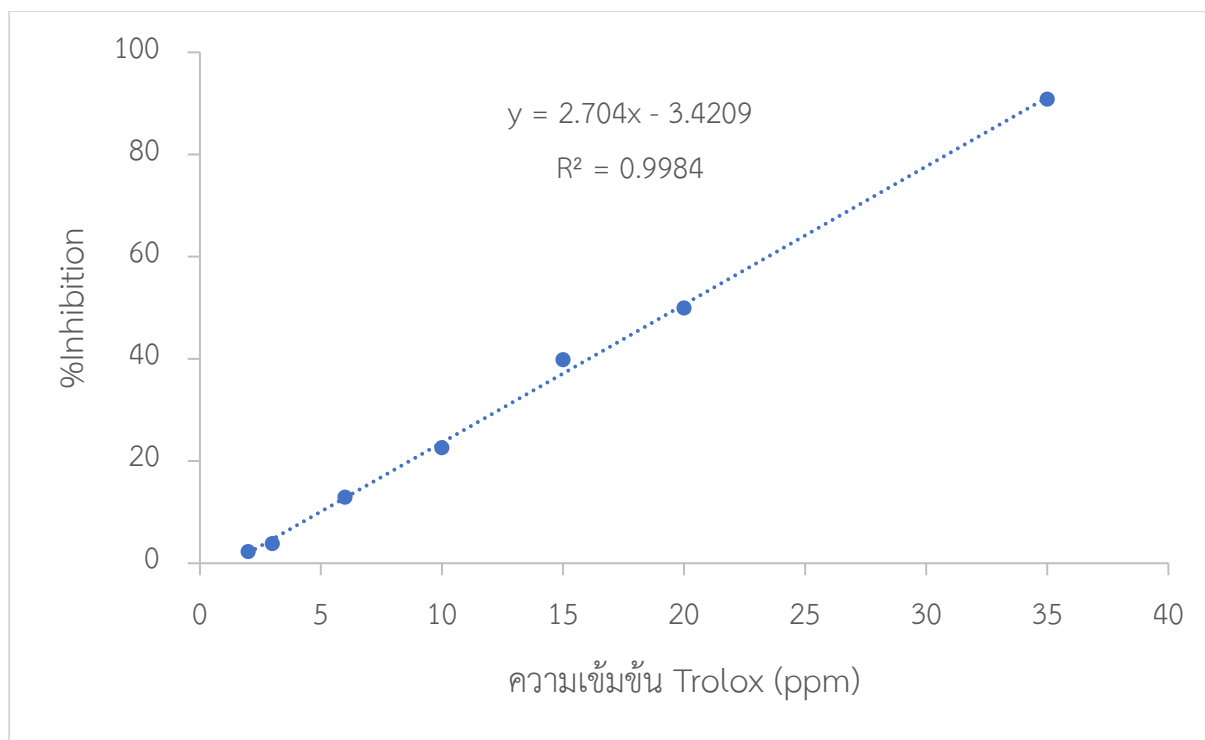
เตรียมสารมาตรฐาน Trolox ที่มีความเข้มข้น 2 3 6 10 15 20 และ 35 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ABTS เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหา ค่า %Inhibition แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และค่าของ %Inhibition ของสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	%Inhibition
2	0.4963±0.0027	2.2454
3	0.4883±0.0017	3.8212
6	0.4423±0.0041	12.8816
10	0.3930±0.0030	22.5921
15	0.3056±0.0304	39.8070
20	0.2541±0.0221	49.9508
35	0.0466±0.0099	90.8213

หมายเหตุ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (A_{control}) = 0.5077 ± 0.0038

นำค่า % Inhibition ที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox กับ % Inhibition แสดงดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox กับ % Inhibition

กราฟมาตรฐานดังกล่าวจะถูกนำไปใช้ในการคำนวณผลการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชตัวอย่าง โดยรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ trolox ต่อสารสกัด 1 กรัม (mg of trolox equivalent (TE) / g extract)

2) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบของต้นแปะและใบของเสม็ดแดง

เตรียมสารสกัดใบต้นแปะและใบเสม็ดแดง ที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ABTS เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่า %Inhibition แสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และค่าของ %Inhibition ของสารสกัดใบต้นแปะและสารสกัดใบเสม็ดแดง

สารสกัดพืช	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	%Inhibition
แปะ	20	0.4326±0.0021	14.7922001
เสม็ดแดง	20	0.3958±0.0035	22.0405751

จากนั้นนำค่าความเข้มข้นและ %Inhibition มาทำการคำนวณหาการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืช โดยรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ trolox ต่อสารสกัด 1 กรัม (mg of trolox equivalent (TE) / g extract) ดังนี้

สารสกัดใบต้นแปะ นำค่า% Inhibition ของสารสกัดไปแทนค่าในสมการของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox กับ % Inhibition

$$y = 2.704x - 3.4209 \quad (\text{แทนค่า } y = 0.4326)$$

$$x = 6.73561395$$

ความเข้มข้นของสารสกัดใบแปะที่ใช้ทดสอบคือ 20 µg/ml ปริมาตร 0.4 ml มีค่าเทียบเป็น trolox 6.73561395 µg หรือ 0.006735 mg

สารละลาย 1 ml มีสารสกัด 0.02 mg

ถ้าสารละลาย 0.4 ml มีสารสกัด 0.008 mg

สารสกัด 0.008 mg มีสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า trolox 0.006735 mg

ถ้าสารสกัด 17981.3 mg มีสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า trolox 15,138.00694 mg

สารสกัด 17.9813 g มีสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า trolox 15,138.00694 mg

ถ้าสารสกัด 1 g มีสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า trolox 841.8750 mg

ดังนั้นสารสกัดใบแปะมีการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 841.8750 mg of trolox equivalent (TE) / g extract

สารสกัดใบเสม็ดแดง นำค่า% Inhibition ของสารสกัดไปแทนค่าในสมการของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox กับ % Inhibition

$$y = 2.704x - 3.4209 \quad (\text{แทนค่า } y = 0.3958)$$

$$x = 9.416226014$$

ความเข้มข้นของสารสกัดใบแปะที่ใช้ทดสอบคือ 20 µg/ml ปริมาตร 0.4 ml มีค่าเทียบเป็น trolox 9.41622601 µg หรือ 0.009416226 mg

สารละลาย 1 ml มีสารสกัด 0.02 mg

ถ้าสารละลาย 0.4 ml มีสารสกัด 0.008 mg

สารสกัด 0.008 mg มีสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า trolox 0.009416226 mg

ถ้าสารสกัด 43089.7 mg มีสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า trolox 50717.7943 mg

สารสกัด 43.0897g มีสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า trolox 50717.7943 mg

ถ้าสารสกัด 1 g มีสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า trolox 1,177.0282 mg

ดังนั้นสารสกัดใบแปะมีการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 1,177.0282 mg of trolox equivalent (TE) / g extract

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบต้นแปะ และสารสกัดใบเสม็ดแดง ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay แสดงผลดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ผลการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบต้นแปะ และสารสกัดใบเสม็ดแดง

สารสกัดพืชตัวอย่าง	ค่าการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (mg of trolox equivalent/g extract)
สารสกัดใบต้นแปะ	841.8750
สารสกัดใบเสม็ดแดง	1,177.0282

จากตารางที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบต้นแปะและสารสกัดใบเสม็ดแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดใบเสม็ดแดงออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดใบต้นแปะ

4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

4.3.1 การสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

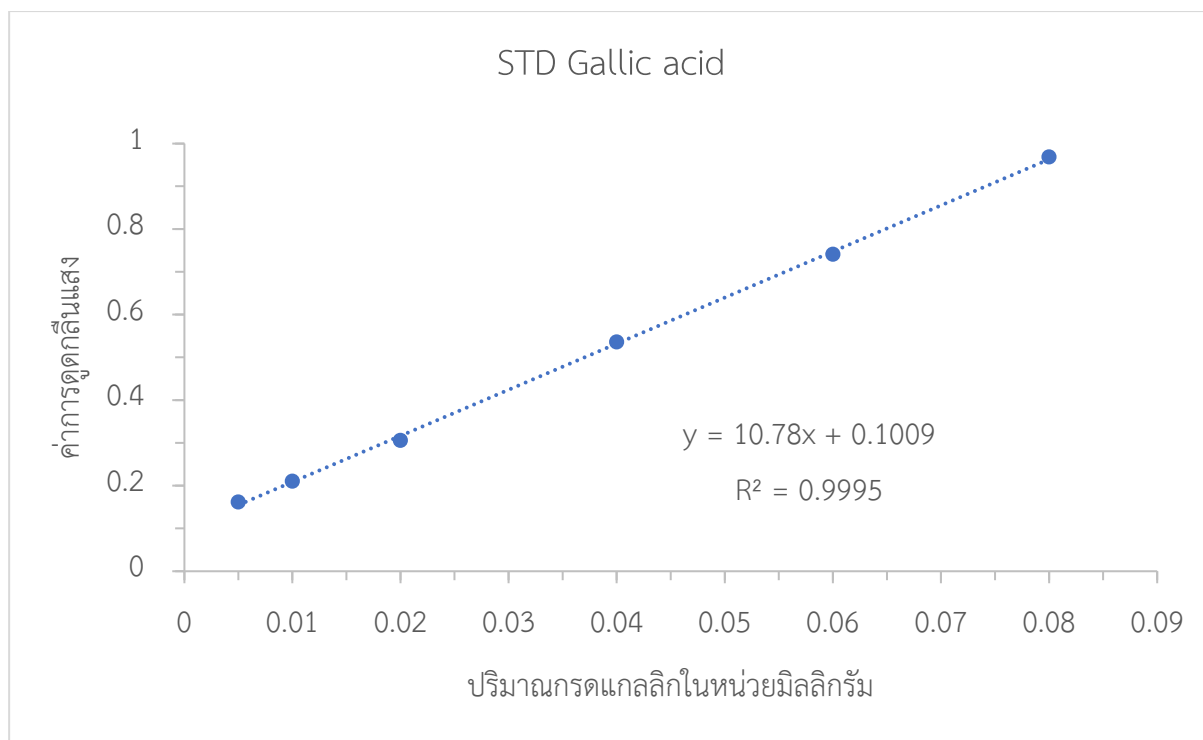
การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 5 10 20 40 60 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้สารละลายกรดแกลลิก 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและสารละลายโซเดียม

คาร์บอนไดออกไซด์ปริมาตร 4 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ แสดงดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และปริมาณกรดแกลลิกในหน่วย มิลลิกรัม (mg of gallic acid)

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	ปริมาณกรดแกลลิก (mg)
5	0.1617±0.0691	0.005
10	0.2102±0.0190	0.01
20	0.3057±0.0082	0.02
40	0.536±0.0106	0.04
60	0.7409±0.0095	0.06
80	0.9685±0.0182	0.08

นำค่าปริมาณกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัม (mg of gallic acid) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า mg of gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงดังรูปที่ 4.6 เพื่อนำไปใช้ในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดพืชตัวอย่าง



รูปที่ 4.6 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า mg of gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก

4.3.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดพืชตัวอย่าง

เตรียมสารสกัดใบแปะและเสม็ดแดงในเอทานอลที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin – Ciocalteu และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตจากกนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยใช้กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกและคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในสารสกัดพืช โดยรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัดพืช 1 กรัม (mg GAE/g of extract) แสดงดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรและปริมาณกรดแกลลิกในสารสกัดพืช

สารสกัดพืช	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	ปริมาณกรดแกลลิก
ใบแปะ	500	0.6135±0.0095	0.047551

ใบเสม็ดแดง	500	0.9205±0.0216	0.076030
------------	-----	---------------	----------

จากนั้นทำการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดพืชตัวอย่างในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัดพืช 1 กรัม (mg GAE/g of extract) ดังนี้

สารสกัดใบแปะ จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (ดังรูปที่ 4.6) พบว่าในสารสกัดใบแปะ ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีปริมาณกรดแกลลิกอยู่ 0.04763 มิลลิกรัม

ในสารละลาย 1 มิลลิลิตร	มีเนื้อสารสกัดอยู่ 500 ไมโครกรัม
แสดงว่า สารสกัด 500 ไมโครกรัม	มีปริมาณกรดแกลลิกอยู่ 0.04763 มิลลิกรัม
สารสกัด 0.0005 กรัม	มีปริมาณกรดแกลลิกอยู่ 0.04763 มิลลิกรัม
ถ้าสารสกัด 1.000 กรัม	จะมีปริมาณกรดแกลลิก 95.2690 มิลลิกรัม

ดังนั้นสารสกัดใบแปะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 95.2690 mg GAE/g of extract

สารสกัดใบเสม็ดแดง จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (ดังรูปที่ 4.6) พบว่าในสารสกัดใบ เสม็ดแดงความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีปริมาณกรดแกลลิกอยู่ 0.07611 มิลลิกรัม

ในสารละลาย 1 มิลลิลิตร	มีเนื้อสารสกัดอยู่ 500 ไมโครกรัม
แสดงว่า สารสกัด 500 ไมโครกรัม	มีปริมาณกรดแกลลิกอยู่ 0.07611 มิลลิกรัม
สารสกัด 0.0005 กรัม	มีปริมาณกรดแกลลิกอยู่ 0.07611 มิลลิกรัม
ถ้าสารสกัด 1.000 กรัม	จะมีปริมาณกรดแกลลิก 152.2263 มิลลิกรัม

ดังนั้นสารสกัดใบเสม็ดแดงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 152.2263 mg GAE/g of extract

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบต้นแปะ และสารสกัด ใบเสม็ดแดง ด้วยวิธี Folin – Ciocalteu method แสดงผลดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบต้นแปะ และสารสกัดใบเสม็ดแดง

สารสกัดพืชตัวอย่าง	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE /g of extract)
สารสกัดใบต้นแปะ	95.2690
สารสกัดใบเสม็ดแดง	152.2263

จากตารางที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบต้นแปะและสารสกัดใบเสม็ดแดงมีสารประกอบฟีนอลิก โดยสารสกัดใบเสม็ดแดงมีสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดใบต้นแปะ ซึ่งมีผลสอดคล้องกับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารสำคัญกลุ่มใหญ่ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นสารสกัดใบเสม็ดแดงซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดใบแปะ สารสกัดใบเสม็ดแดงจึงออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดใบแปะ

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

4.4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans*

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Candida albicans* โดยใช้วิธีการทดสอบ การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารในการยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยเทคนิค minimum inhibitory concentration (MIC) broth dilution โดยส่งสารสกัดพืชตัวอย่างไปทดสอบฤทธิ์ เชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวที่ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่ง ประเทศไทย (วว.) ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* ของสารสกัดใบแปะและใบเสม็ดแดง

[illegible]

สาร สกัด	ผลการ เจริญ ของเชื้อ ทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีต่อการเจริญของเชื้อ <i>Candida albicans</i>											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	เจริญ ของเชื้อ ทดสอบ												

เครื่องหมาย + หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโต หรือสารทดสอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
 เครื่องหมาย - หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ไม่มีการเจริญเติบโต หรือสารทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
 ได้

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Candida albicans* พบว่า สารสกัดใบ
 แพะและสารสกัดใบเสม็ดแดงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ได้

4.4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Clostridium butyricum*

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* โดยใช้วิธีการทดสอบ การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารในการยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยเทคนิค minimum inhibitory concentration (MIC) broth dilution โดยส่งสารสกัดพืชตัวอย่างไปทดสอบฤทธิ์เชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวที่ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Clostridium butyricum* ของสารสกัดใบแปะและใบเสม็ดแดง

สารสกัด	ผลการเจริญของเชื้อทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีต่อการเจริญของเชื้อ <i>Candida albicans</i>											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ใบแปะ	ความเข้มข้น (mg/ml)	21.90	10.95	5.48	2.74	1.37	0.68	0.34	0.17	0.09	0.04	0.02	0.00
	ผลการเจริญของเชื้อทดสอบ	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ใบเสม็ดแดง	ความเข้มข้น (mg/ml)	25.90	12.95	6.48	3.24	1.62	0.81	0.40	0.20	0.10	0.05	0.03	0.00
	ผลการเจริญของเชื้อทดสอบ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

เครื่องหมาย + หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโต หรือสารทดสอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
 เครื่องหมาย - หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ไม่มีการเจริญเติบโต หรือสารทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium butyricum* พบว่า สารสกัดใบแปะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Clostridium butyricum* ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.37

mg/ml ในขณะที่สารสกัดใบเสมีดแดงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Clostridium butyricum* ได้

4.4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้วิธีการทดสอบ การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารในการยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยเทคนิค minimum inhibitory concentration (MIC) broth dilution โดยส่งสารสกัดพืชตัวอย่างไปทดสอบฤทธิ์เชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวที่ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ของสารสกัดใบแปะและใบเสมีดแดง

สารสกัด	ผลการเจริญของเชื้อทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีต่อการเจริญของเชื้อ <i>Candida albicans</i>											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ใบแปะ	ความเข้มข้น (mg/ml)	21.90	10.95	5.48	2.74	1.37	0.68	0.34	0.17	0.09	0.04	0.02	0.00
	ผลการเจริญของเชื้อทดสอบ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ใบเสมีดแดง	ความเข้มข้น (mg/ml)	25.90	12.95	6.48	3.24	1.62	0.81	0.40	0.20	0.10	0.05	0.03	0.00
	ผลการเจริญของเชื้อทดสอบ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

เครื่องหมาย + หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโต หรือสารทดสอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
 เครื่องหมาย - หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ไม่มีการเจริญเติบโต หรือสารทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่า สารสกัดใบแปะและสารสกัดใบเสม็ดแดงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้

4.5 ผลการทำผลิตภัณฑ์จากสารสกัด

4.5.1 สบู่หอมเท 2 สูตร ที่มีส่วนผสมของสารสกัดแปะ

สูตรที่ 1 ในการทำสบู่สูตรเบสใส พบว่า สบู่ที่ได้มีลักษณะใสสีเขียวขี้ม้า กลิ่นตามน้ำหอมที่เติมลงไป ก้อนแข็ง

สูตรที่ 2 ในการทำสบู่สูตรเบสขุ่น พบว่า สบู่ที่ได้มีลักษณะขุ่น สีเขียวอ่อน มีกลิ่นตามน้ำหอมที่เติมลงไป ก้อนแข็ง

เมื่อนำสบู่ทั้ง 2 สูตร ไปทดสอบความคงทนของสบู่ โดยการนำสบู่ไปเก็บในที่ที่มีอุณหภูมิ ต่ำ (ตู้เย็น) สลับกับเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สลับกันทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 2 เดือน ได้ผลดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 ผลการทดสอบความคงทนของสบู่

สูตรสบู่	ลักษณะ	เวลา (เดือน)		
		0	1	2
สูตรที่ 1	สี	ใสสีเขียวขี้ม้า	ใสสีเขียวขี้ม้า	ใสสีเขียวขี้ม้า
	กลิ่น	กลิ่นน้ำหอม	กลิ่นน้ำหอม	กลิ่นน้ำหอม
	ความแข็ง	แข็ง	แข็ง	แข็ง
	ลักษณะอื่น ๆ	-	-	-
สูตรที่ 2	สี	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	เขียวอ่อนลง
	กลิ่น	กลิ่นน้ำหอม	กลิ่นน้ำหอม	กลิ่นน้ำหอม
	ความแข็ง	แข็ง	แข็ง	แข็ง
	ลักษณะอื่น ๆ	-	-	-

จากการทดสอบพบว่า สบู่ทั้ง 2 สูตร มีสี กลิ่น ความแข็ง ที่ไม่แตกต่างกันหลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 2 เดือน ยกเว้นสบู่สูตรที่ 2 ในระยะเวลา 2 เดือน มีสีที่อ่อนลงเล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างกันมากนัก เนื่องจากสบู่ที่ผลิตขึ้น ไม่มีการผสมสีสังเคราะห์ ใช้สีจากสารสกัดเพียงอย่างเดียว จึงอาจทำสีอ่อนลงเล็กน้อยเนื่องจากการสลายตัวของรงควัตถุในสารสกัด

4.5.2 ผลิตภัณฑ์ยาหม่อง 2 ตำรับ จากสารสกัดเสม็ดแดง

ตำรับที่ 1 ลักษณะของยาหม่องที่ได้ พบว่า มีสีเขียวอ่อนชุ่ม กลิ่นอ่อนกว่าตำรับที่ 2 เล็กน้อย เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีการแยกชั้นของส่วนผสม

ตำรับที่ 2 ยาหม่องมีเนื้ออ่อน (เนื้อบาล์ม) สีเขียวเข้ม กลิ่นหอม เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีการแยกชั้นของส่วนผสม

เมื่อนำยาหม่อง 2 ตำรับ มาประเมินคุณภาพของขี้ผึ้งไทย โดยตัดแปลงจากมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน มพช.770/2548 ในด้านลักษณะทั่วไป คือ ต้องเป็นเนื้อเดียวกัน กึ่งแข็ง ไม่แยกชั้น หรือมีตะกอน สีและกลิ่น คือ ต้องมีสีและกลิ่นที่ดีตามธรรมชาติของขี้ผึ้งสมุนไพร เป็นเวลา 2 เดือน ได้ผลดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 ผลการประเมินคุณภาพของขี้ผึ้งไทย

ตำรับยาหม่อง	ลักษณะ	เวลา (เดือน)		
		0	1	2
ตำรับที่ 1	ลักษณะทั่วไป	เนื้อแข็ง ไม่แยกชั้น ไม่มีตะกอน	เนื้อแข็ง ไม่แยกชั้น ไม่มีตะกอน	เนื้อแข็ง ไม่แยกชั้น ไม่มีตะกอน
	สีและกลิ่น	สีเขียวอ่อน กลิ่นหอม	สีเขียวอ่อน กลิ่นหอม	สีเขียวอ่อนลง กลิ่นหอม
ตำรับที่ 2	ลักษณะทั่วไป	เนื้อกึ่งแข็ง ใช้งาน เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่แยกชั้น ไม่มีตะกอน	เนื้อกึ่งแข็ง ใช้งาน เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่แยกชั้น ไม่มีตะกอน	เนื้อกึ่งแข็ง ใช้งาน เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่แยกชั้น ไม่มีตะกอน
	สีและกลิ่น	สีเขียวเข้ม กลิ่นหอม	สีเขียวเข้ม กลิ่นหอม	สีเขียวเข้ม กลิ่นหอม

จากการทดสอบพบว่า ยาหม่องทั้ง 2 ตำรับ มีความแตกต่างกันคือ ตำรับที่ 1 จะมีเนื้อแข็งมาก มีสีและกลิ่นที่อ่อนกว่าตำรับที่ 2 แต่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่แยกชั้น ไม่เกิดตะกอน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 การเก็บตัวอย่างพืช :ทำการเก็บในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2565

- 1) ต้นแปะ ทำการเก็บส่วนใบ แหล่งที่เก็บคือ สวนพฤกษศาสตร์โรงเรียน มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าอ่างเก็บน้ำห้วยจระเข้มาก จ.บุรีรัมย์
- 2) เสม็ดแดง ทำการเก็บส่วนใบ แหล่งที่เก็บคือ สวนพฤกษศาสตร์โรงเรียน มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์จ.บุรีรัมย์

5.2 ผลการสกัดสารจากพืชตัวอย่าง

คณะผู้วิจัยได้ทำการสกัดสารด้วยวิธีการแช่ที่อุณหภูมิห้อง ตัวทำละลายที่ใช้สกัดคือ เอทานอล ได้สารสกัดพืชตัวอย่าง 2 ชนิด ดังนี้

- 1) สารสกัดใบแปะ ร้อยละสารสกัดต่อน้ำหนักพืชแห้งคือ 10.7104
- 2) สารสกัดใบเสมีดแดง ร้อยละสารสกัดต่อน้ำหนักพืชแห้งคือ 27.1102

5.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพืชตัวอย่าง

1) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบแปะและสารสกัดใบเสมีดแดง 2 วิธี ได้แก่ DPPH radical scavenging assay และ ABTS radical scavenging assay ผลการทดสอบสรุปดังนี้

- 1.1) สารสกัดใบแปะออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยปริมาณการออกฤทธิ์เป็นดังนี้
 - วิธี DPPH radical scavenging assay มีค่า IC_{50} (ค่าที่แสดงถึงความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50%) เท่ากับ 84.1613 mg/ml
 - วิธี ABTS radical scavenging assay (รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ trolox ต่อสารสกัด 1 กรัม) เท่ากับ 90.1683 mg/gDW
- 1.2) สารสกัดใบเสมีดแดงออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยปริมาณการออกฤทธิ์เป็นดังนี้
 - วิธี DPPH radical scavenging assay มีค่า IC_{50} (ค่าที่แสดงถึงความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50%) เท่ากับ 33.5549 mg/ml
 - วิธี ABTS radical scavenging assay (รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ trolox ต่อสารสกัด 1 กรัม) เท่ากับ 319.0944 mg/gDW

2) การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มใหญ่ที่พบในธรรมชาติ) คณะผู้วิจัยทำการวิเคราะห์โดยวิธี Folin-Ciocalteu method ผลการวิเคราะห์สรุปดังนี้

2.1) สารสกัดใบแปะมีสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณ 95.1020 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัดพืช 1 กรัม (mg GAE/g of extract)

2.2) สารสกัดใบเสมีดแดงมีสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณ 152.0594 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัดพืช 1 กรัม (mg GAE/g of extract)

3) การทดสอบฤทธิ์ทางจุลชีววิทยา ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ดังนี้ *Candida albicans*, *Clostridium butyricum* และ *Pseudomonas aeruginosa* ใช้วิธีการทดสอบ การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารในการยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยเทคนิค minimum inhibitory concentration (MIC) broth dilution ผลการทดสอบสรุปดังนี้

3.1) ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Candida albicans* ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อราบริเวณอวัยวะที่มีความชื้นสูงๆ เช่น บริเวณอวัยวะเพศ รอบ ๆ ทวารหนัก ขาหนีบ ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดใบแปะและสารสกัดใบเสมีดแดงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ได้

3.2) ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิด botulinum toxin ซึ่งทำให้เกิดโรคโบทูลิซึม (โรคกล้ามเนื้ออ่อนแรงประสาท ทำให้มีอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง) ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดใบแปะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Clostridium butyricum* ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.37 mg/ml ในขณะที่สารสกัดใบเสมีดแดงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Clostridium butyricum* ได้

3.3) ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญในการติดเชื้อในโรงพยาบาล ก่อให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนในผู้ป่วยในโรงพยาบาล เช่น โรคปอดบวมในโรงพยาบาล ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดใบแปะและสารสกัดใบเสมีดแดงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* ได้

5.4 การทำผลิตภัณฑ์จากสารสกัดพืชตัวอย่าง

1) สารสกัดใบแปะ นำมาทำสบู่ก้อน 2 สูตร คือ สบู่ก้อนใส และสบู่ก้อนขุ่น โดยเติมสารสกัดใบแปะ 1% และแต่งกลิ่นสำหรับสบู่ จากการทดสอบทางกายภาพของสบู่ก้อนทั้ง 2 สูตร พบว่า สบู่มีสีเขียวยาวอ่อน ก้อนแข็ง และมีความคงทนของก้อนสบู่ ในด้าน สี กลิ่น ความแข็ง ไม่แตกต่างกันในระยะเวลา 2 เดือน

2) สารสกัดใบเสมีดแดง นำมาทำยาหม่อง 2 ตำรับ ที่มีเนื้อสัมผัสที่แตกต่างกัน และทำการเติมสารสกัดใบเสมีดแดง 2% และจากการทดสอบความคงทนของยาหม่อง ทั้ง 2 ตำรับ พบว่า คุณภาพ

ทางด้าน สี กลิ่น ความชื้นเหลว การแยกชั้น และการจับตัวเป็นก้อน ไม่มีความแตกต่างกันในระยะเวลา 2 เดือน

5.5 ข้อเสนอแนะ

- 1) ในการศึกษาฤทธิ์ทางจุลชีววิทยา อาจจะมีการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติม
- 2) การทำผลิตภัณฑ์ อาจจะมีการเพิ่มผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เพื่อการใช้ประโยชน์จากสารสกัดแปะ และเสม็ดแดง ที่เป็นพืชประจำจังหวัดบุรีรัมย์เพิ่มมากขึ้น
- 3) จากผลการวิจัย และการดำเนินโครงการนี้ ผู้เชี่ยวชาญทางด้านการท่องเที่ยวในชุมชนสามารถนำข้อมูลไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในการจัดกิจกรรมการท่องเที่ยวในจังหวัดบุรีรัมย์ เพื่อเพิ่มเอกลักษณ์และคุณค่าของพืชในจังหวัดเพิ่มมากขึ้น