

ปริมาณฟีนอลรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย
ของส่วนสกัดจากโสน


ปิยะดา พันธุ์สระน้อย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มีนาคม 2561
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

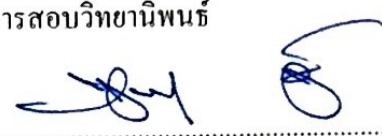
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ ปิยะดา พันธุ์สระน้อย ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีพวิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

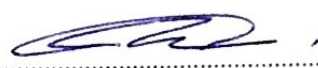

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิสาตรี คงเจริญสุนทร)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. ชัยวิน เพชรเลิศ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. จินตนา จิรถาวร)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิสาตรี คงเจริญสุนทร)


..... กรรมการ
(ดร. ชัยวิน เพชรเลิศ)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีพวิทยาศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพา


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 20 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2561

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ไปได้ด้วยดี ทั้งนี้เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสาตรี คงเจริญสุนทร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ชัชวิน เพชรเลิศ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำลั้งใจ คำแนะนำ และชี้แนวทางสำหรับการศึกษาค้นคว้า ตลอดจนช่วยแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์นี้อย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จินตนา จิรถาวร ประธานกรรมการพิจารณาวิทยานิพนธ์ จากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา คณะกรรมการพิจารณาวิทยานิพนธ์ ที่สละเวลาร่วมพิจารณาและให้คำแนะนำในการแก้ไขรายงานวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.เบญจวรรณ ชิวปริษา ที่ช่วยระบุสายพันธุ์โสน

ขอขอบพระคุณ โรงพยาบาลชลบุรี และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยเหลือให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการศึกษาในการวิจัย เจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยา รวมทั้งภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ รวมทั้งญาติพี่น้อง เพื่อน ๆ ทุกคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อนร่วมทำงานวิจัย ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คอยเป็นกำลังใจ กำลังกายและกำลังทุนทรัพย์ที่สำคัญตลอดมาในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้จนสำเร็จไปได้ด้วยดี

ปิยะดา พันธุ์สระน้อย

57920915: สาขาวิชา: ชีววิทยาศึกษา; วท.ม. (ชีววิทยาศึกษา)

คำสำคัญ: ส่วนสกัดจากโสน/ฟีนอลรวม/ฟลาโวนอยด์/ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ/ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย
ก่อโรค/แบคทีเรียฉวยโอกาส

ปิยะดา พันธุ์สระน้อย: ปริมาณฟีนอลรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ
แบคทีเรีย ของส่วนสกัดจากโสน (TOTAL PHENOLIC, ANTIOXIDANT, AND
ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF *Sesbania javanica* Miq. EXTRACTS)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วิสาศรี คงเจริญสุนทร, Ph.D., ชัชวิน เพชรเลิศ, Ph.D. 85 หน้า. ปี
พ.ศ. 2561.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ
ส่วนสกัดจากโสน (*Sesbania javanica* Miq.) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ FABACEAE โดยทำการหาปริมาณ
สารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวม ตรวจวัดเชิงคุณภาพของสาร โพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ โดย
ใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography, TLC) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ด้วยวิธี DPPH และ FRAP assay นอกจากนี้ยังศึกษาฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย
ฉวยโอกาส 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Agar diffusion susceptibility test ผลการวิจัยพบว่า ส่วนสกัดจากใบ
และดอกโสนประกอบด้วยปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเท่ากับ 35.93 ± 0.0004 และ
 34.81 ± 0.0008 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัด ตามลำดับ และปริมาณ
ฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 24.11 ± 0.002 และ 23.90 ± 0.004 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์เซตินต่อกรัม
ของส่วนสกัด ตามลำดับ ทั้งยังอุดมไปด้วยสาร โพลีฟีนอลในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ฟลาโวนที่มีหมู่
เมทิลไดไฮโดรฟลาโวนอยด์ ฟลาโวนอล โอ-กลัยโคไซด์ และ ฟลาวาโนน โอ-กลัยโคไซด์ เมื่อ
ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่า ใบและดอกโสนมีฤทธิ์ในการต้าน
อนุมูลอิสระที่ดี ($IC_{50} = 2.38$ และ 2.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ผลจากการทดสอบด้วยวิธี
FRAP พบว่า ส่วนสกัดใบและดอกโสนมีค่า FRAP value เท่ากับ 46.89 ± 0.003 และ 45.90 ± 0.003
มิลลิกรัมสมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของส่วนสกัด ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า ส่วนสกัด
จากใบและดอกโสนสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ดีที่สุด รองลงมาได้แก่
Escherichia coli ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Pseudomonas*
aeruginosa ATCC 27853 ตามลำดับ (ให้ค่า MIC เท่ากับ 20, 40, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ตามลำดับ) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ
ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีแม้ว่าจะยังไม่ดีเท่ากับเตตราซัยคลินซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้กันในปัจจุบัน
ก็ตาม ซึ่งมีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นอาหารเพื่อสุขภาพต่อไปได้

57920915: MAJOR: BIOLOGY EDUCATION; M.Sc. (BIOLOGY EDUCATION)

KEYWORDS: *Sesbania javanica* Miq. EXTRACT / PHENOLIC/FLAVONOID/

ANTIOXIDANT/ANTIBACTERIAL/OPPORTUNISTIC BACTERIA

PIYADA PANSANOI: TOTAL PHENOLIC, ANTIOXIDANT, AND

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF *Sesbania javanica* Miq. EXTRACT. ADVISORY

COMMITTEE: WISATRE KONGCHAREONSUNTORN, Ph.D., CHATCHAWIN

PETCHLERT, Ph.D. 85 P. 2018.

The objective of this study was to investigate both antioxidant and antibacterial activities of *Sesbania javanica* Miq. that belongs to a family of FABACEAE. The total phenolic and flavonoid contents were determined and polyphenols were analyzed by thin layer chromatography (TLC). The antioxidant activity was assayed by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging effect and the reducing power of iron (FRAP assay). Moreover, antibacterial activity against four opportunistic bacteria was also investigated by agar diffusion susceptibility test. The results revealed that the total phenolic contents of leaf and flower extracts were 35.93 ± 0.0004 and 34.81 ± 0.0008 mg GAE/g extract, respectively. The total flavonoid contents of leaf and flower extracts were 24.11 ± 0.002 and 23.90 ± 0.004 mg QE/g extract, respectively. *S. javanica* Miq. extract contained various flavonoids including methyl dihydroflavonoid, flavonol *O*-glycosides and flavonone *O*-glycosides. Leaf and flower extracts exhibited the DPPH radical scavenging activity with the IC_{50} by 2.38 and 2.07 mg/mL, respectively. For the FRAP assay, leaf and flower extracts showed the FRAP value of 46.89 ± 0.003 and 45.90 ± 0.003 mgFeSO₄/g extract, respectively. *S. javanica* Miq. extracts displayed the best antibacterial activity against *Bacillus subtilis*, followed by *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, respectively (MICs = 20, 40, 40 and 80 mg/mL, respectively) although their activities were not as good as tetracyclin, an antibiotic drug used currently. However, they have an opportunity to develop as a functional food in the future.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 โสณ.....	4
2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของพืชที่นำมาศึกษา.....	4
2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของใบและดอกโสน.....	5
2.1.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชวงศ์โสนและความเป็นพิษ.....	6
2.2 อนุมูลอิสระ (Free radical).....	7
2.2.1 หลักการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	7
2.3 หลักการตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย.....	8
2.4 เชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษา.....	9
<i>Escherichia coli</i>	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	12
<i>Bacillus species</i>	16
2.5 การติดเชื้อแบคทีเรีย ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ.....	17

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
2.6 ภาวะเครียดออกซิเดชันและการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน.....	18
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....	26
3.1.1 เครื่องมือ.....	26
3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	26
3.1.3 สารเคมี.....	27
3.1.4 เชื้อตัวอย่าง.....	28
3.2 วิธีการทดลอง.....	28
3.2.1 การเก็บตัวอย่าง โสน.....	28
3.2.2 การสกัดสาร.....	28
3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม.....	28
3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์.....	29
3.2.5 การตรวจวัดเชิงคุณภาพของสาร โพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ โดยวิธี โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography, TLC).....	29
3.2.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH.....	30
3.2.7 การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)	30
3.2.8 การเตรียมยาปฏิชีวนะ.....	30
3.2.9 การเตรียมสารสกัดจากโสน.....	31
3.2.10 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและการหาค่า MIC.....	31
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	32
4 ผลการวิจัย.....	33
5 อภิปราย และสรุปผล.....	47
บรรณานุกรม.....	51
ภาคผนวก ก.....	58
ภาคผนวก ข.....	72

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก ค.....	74
ภาคผนวก ง.....	78
ภาคผนวก จ.....	80
ภาคผนวก ฉ.....	82
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	85

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 โรคที่เกิดจาก <i>E. coli</i> และปัจจัยการก่อโรค.....	10
2-2 การติดเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> โดยทั่วไป และปัจจัยเสี่ยง.....	12
2-3 โรคที่เกิดจากเชื้อกลุ่ม <i>Staphylococcus</i>	13
2-4 โรคที่เกิดจากเชื้อกลุ่ม <i>Bacillus</i>	17
2-5 ฤทธิ์ทางชีวภาพของ โสน และพีชวงศ์โสน.....	22
2-6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพีชวงศ์โสน.....	24
2-7 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของพีชวงศ์โสน.....	25
3-1 ชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้แยกสาร โพลีฟีนอล.....	29
4-1 ปริมาณส่วนสกัดและร้อยละผลผลิต (% yield) ส่วนของ โสน.....	33
4-2 ผลการตรวจวัดเชิงคุณภาพของสาร โพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ ของส่วนสกัดจากใบ และดอก โสน.....	36
4-3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพส่วนสกัดจากใบ โสนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก.....	40
4-4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพส่วนสกัดจากดอก โสนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก.....	41
4-5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพยาเตร้าซัยคลินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก.....	42
4-6 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพยาแอมพิซิลลินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก.....	44
4-7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพส่วนสกัดจาก โสน และยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก.....	46
ก-1 การวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดจากใบและดอก โสน..	59
ก-2 การวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณฟลาโวนอยด์ของส่วนสกัดจากใบและดอก โสน..	60
ก-3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากใบและดอก โสน โดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH).....	61
ก-4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากใบและดอก โสน โดยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP).....	62

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ก-5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของส่วนสกัดจากใบ โสน.....	63
ก-6 ผลของส่วนสกัดจากใบ โสน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Turkey's test.....	64
ก-7 ผลของส่วนสกัดจากใบ โสน ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Turkey's test.....	65
ก-8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของส่วนสกัดจากดอก โสน.....	66
ก-9 ผลของส่วนสกัดจากดอก โสน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Turkey's test.....	67
ก-10 ผลของส่วนสกัดจากดอก โสน ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Turkey's test.....	67
ก-11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน.....	68
ก-12 ผลของยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Turkey's test.....	69
ก-13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน.....	70
ก-14 ผลของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Turkey's test.....	71
ค-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกรวม ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	75
ค-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณ ฟลาโวนอยด์รวม ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	75
ค-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 596 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหาความสามารถ ในการรีดิวซ์ไอออนโลหะ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	75
ค-4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ การกำจัดอนุมูล DPPH.....	76
ค-5 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และความเข้มข้น ของสารทดสอบที่ทำให้อนุมูล DPPH ลดลง 50%.....	77

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 ลักษณะทั่วไปของโสน.....	4
2-2 องค์ประกอบทางเคมีของใบและดอกโสน.....	5
4-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกในการหาปริมาณฟีนอลิกรวม ของส่วนสกัดจากโสน.....	34
4-2 ปริมาณฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดจากโสน.....	34
4-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์เซดินในการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ของส่วนสกัดจากโสน.....	35
4-4 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดจากโสน.....	35
4-5 กราฟเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของ BHT ส่วนสกัดจากใบและดอกโสน.....	37
4-6 ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ของ BHT ส่วนสกัดจากใบและดอกโสน.....	37
4-7 กราฟมาตรฐานของสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟตในการหาความสามารถ ในการรีดิวซ์ไอออนโลหะของส่วนสกัดจากโสน.....	38
4-8 ความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนโลหะของส่วนสกัดจากโสน.....	38
ข-1 ลักษณะทางกายภาพของส่วนสกัดจากลำต้น ใบ และดอกโสน.....	73
ง-1 แผ่น TLC เมื่อตรวจสอบด้วยตาเปล่า.....	79
ง-2 แผ่น TLC เมื่อนำไปส่องด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร.....	79
จ-1 Inhibition zone ประสิทธิภาพของส่วนสกัดจากโสนที่ความเข้มข้น 80, 40, 20, 10 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีต่อเชื้อ <i>E. coli</i>	81
จ-2 Inhibition zone ประสิทธิภาพของส่วนสกัดจากโสนที่ความเข้มข้น 80, 40, 20, 10 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีต่อเชื้อ <i>B. subtilis</i>	81

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ผักพื้นบ้านในประเทศไทยใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารที่คนบริโภคกันทั่วไปมากมาย โดยเฉพาะพืชในวงศ์ FABACEAE สกุล *Sesbania* เช่น ดอกแค และดอกโสน มีคุณสมบัติป้องกันโรคตามธรรมชาติ เนื่องจากประกอบไปด้วยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแทนนิน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Sroka, 2005) ด้านการอักเสบ (Recio, Andújar, & Ríos, 2012) และต้านแบคทีเรีย (อุไร จิรมงคลการ, 2547) ทั้งยังหาได้ง่าย ราคาถูก มีคุณค่าทางโภชนาการ และเป็นที่ยอมรับประทาน

พืชสกุล *Sesbania* ในประเทศไทยมีประมาณ 5 ชนิด คือ แคบ้าน (*S. grandiflora*) โสนคางคก (*S. bispinosa*) สมี (*S. sesban*) โสนอินเดีย (*S. speciosa*) และ โสนกินดอก (*S. javanica*) สำหรับดอกโสนที่ใช้รับประทานเป็นอาหาร คือ โสนหินหรือโสนกินดอก เป็นไม้ล้มลุก มีลักษณะเป็นพุ่ม อายุปีเดียว ขึ้นตามหนองน้ำ ริมแม่น้ำ ลำคลองหรือบริเวณที่มีน้ำขังทั่วไป จะออกดอกในช่วงปลายฤดูฝนประมาณเดือนกันยายน-ตุลาคม (ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้, 2557) มีการนำไปใช้ไปใช้เป็นยาพื้นบ้าน เช่น แก้อ่อนใน กระจายน้ำ ขับปัสสาวะ ลดความร้อนในร่างกายแก้กระษัย ไตพิการ ปอกแก้ปวดฝี ถอนพิษ สมานแผลในลำไส้ แก้ประจำเดือนผิดปกติ (เพ็ญญา ทรัพย์เจริญ, 2549; สุธรรม อารีกุล, 2552) ฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของพืชสกุล *Sesbania* ได้แก่ ฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารสำคัญที่พบได้แก่ ฟลาโวนอล-กลัยโคไซด์ เคอร์เซติน-แรมโนซิล-รูตินโไซด์ เบต้า-ไซโตสเตอรอล พรูเนติน จินิสทิน ไซโตสเตอรอล-กลูโคไพราโนไซด์ และกรดไฮดรอกซีซินนามิก (Tangvarasittichai, Sriprang, Harnroongroj, & Changbumrung, 2005; อุทัยวรรณ เลิศศักดิ์ศรีสกุล, 2550)

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีผู้สนใจศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนต่าง ๆ ของแค (*S. grandiflora*) พืชสกุลเดียวกับโสน พบว่าแคมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านแบคทีเรียก่อโรค ปกป้องความเสียหายต่อหัวใจ (Ouattara et al., 2011; Lee et al., 2014; Ramesh et al., 2008; Ramesh et al., 2010) ต้านภาวะเครียด (Kasture & Deshmukh, 2002; Doddola et al., 2008; Kumar & Naheed, 2012) เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis (Laladhas et al., 2010) ลดการอักเสบ รักษาบาดแผล (Patil et al., 2011; Karthikeyan et al., 2011) เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของโสมยังมีผู้สนใจศึกษาไม่มากนัก โดยมี รายงานการศึกษาถึงฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของดอกโสม (Tangvarasittichai et al., 2005) พบว่า ดอกโสมมีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ (mutation) ที่เกิดจาก aflatoxin B1 (AFB1) และ benzo(a)pyrene [B(a)P] และมีรายงานการศึกษาโครงสร้างและฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสารสำคัญ จากดอกและใบโสม (อุทัยวรรณ เลิศศักดิ์ศรีสกุล, 2550) โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย HPLC และ TLC พบว่า ดอกและใบโสมประกอบด้วยสารฟลูโวนอนิน จินิสทีน และกรดไฮดรอกซีซินนามิก ซึ่งมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH

งานวิจัยนี้ได้สังเกตเห็นความสำคัญของผักพื้นบ้านที่ใช้รับประทานกันทั่วไปคือ โสม เนื่องจากการศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระที่ผ่านมา เป็นการศึกษาเพียงเบื้องต้นเท่านั้น ยังขาดข้อมูล ในด้านกลไกการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย ปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ รวมในโสม เพราะถ้าโสมอุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ สามารถต้านแบคทีเรียและ ต้านอนุมูลอิสระได้ดี ก็น่าจะส่งผลดีต่อผู้บริโภคในแง่ของการรับประทานผักเพื่อป้องกันโรคไป ด้วยในตัว นอกจากนี้ ข้อมูลวิจัยจากโสมจะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ อื่น ๆ เป็นการเพิ่มคุณค่าให้โสม หรือนำโสมไปพัฒนาต่อในด้านต่าง ๆ ได้ เช่น แยกสารบริสุทธิ์ จากโสมมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ หรือนำสารบริสุทธิ์จาก โสมมาใช้เสริมฤทธิ์ยาปฏิชีวนะ หรือเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ ป้องกันการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ของแบคทีเรียก่อโรค ด้านสุขภาพ เช่น ป้องกันโรคหัวใจ การเสื่อมของระบบประสาทและสมอง และป้องกันโรคเบาหวาน (Rattanasena, 2012) ด้านเศรษฐกิจ โดยการนำมาทำเป็นชาเพื่อสุขภาพ สามารถทำเองได้ง่าย รับประทานได้ด้วยตัวเอง หรือจะพัฒนาส่งเสริมให้เป็นสินค้าประจำ ท้องถิ่นต่อไปได้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากโสม รวมทั้งชนิดและปริมาณ สารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวม
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ของส่วน สกัดจากโสมกับยาปฏิชีวนะ

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. ส่วนสกัดจากโสมมีสารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระที่ แตกต่างกัน

2. ส่วนสกัดจากโสมมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ได้แตกต่างจากยาปฏิชีวนะ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เผยแพร่แก่ชุมชน เพื่อการเลือกบริโภค เห็นคุณค่าของผักพื้นบ้าน และช่วยส่งเสริมให้มีการอนุรักษ์ต้นโสมมากขึ้น
2. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป เช่น การศึกษาสารบริสุทธิ์ที่พบจากส่วนต่าง ๆ ของต้นโสม และนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ
3. สามารถนำโสมไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรมได้

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างลำต้น ใบ และดอกโสม ในช่วงเดือนมิถุนายน – ตุลาคม พ.ศ. 2558 จากบริเวณตำบลพระอาจารย์ อำเภองครักษ์ จังหวัดนครนายก จากนั้นนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล 80% แล้วทำการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม และฟลาโวนอยด์รวม ตรวจวัดเชิงคุณภาพของสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP assay นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ และ *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. subtilis* ด้วยวิธี agar well diffusion เปรียบเทียบกับยาแอมพิซิลลินและเตตราซัยคลิน

สถานที่ปฏิบัติการทดลองงานวิจัย

ห้องปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล และห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาชีววิทยา ห้องปฏิบัติการชีวเคมีและพิษวิทยาทางอาหารและโภชนาการ ภาควิชาชีวเคมีและห้องปฏิบัติการโครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โสน

2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของพืชที่นำมาศึกษา

ชื่อไทย โสน โสนหิน โสนกินดอก (กลาง) ผักสองแสง (เหนือ)

ชื่อสามัญ Sesbania

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Sesbania javanica* Miq.

ชื่อวงศ์ FABACEAE

ลักษณะทั่วไป เป็นพืชล้มลุก อายุฤดูเดียว สูงประมาณ 1-3 เมตร ลำต้นตั้งตรง ใบประกอบแบบขนนก มีใบย่อยขนาดเล็กคล้ายใบมะขามแต่แคบและยาวกว่า ดอกสีเหลือง ออกเป็นช่อตามซอกใบที่ปลายกิ่ง ลักษณะช่อห้อยลง แต่ละช่อมี 10-15 ดอก ลักษณะดอกคล้ายดอกถั่วมีกลีบดอก 5 กลีบ รูปร่างไม่เหมือนกัน กลีบนอกสุดมีขนาดใหญ่ที่สุด เกสรเพศผู้มี 10 อัน ผลเป็นฝักเรียวยาวแก่แล้วแตกเป็น 2 ซีก มีเมล็ดจำนวนมาก มีขนสั้นระหว่างเมล็ด

การกระจายพันธุ์ ฆาบน้ำนาข้าวที่น้ำขัง (อรุณี รอดลอย, สุจินต์ หนูขวัญ และยุพเยาว์ สายจันทร์, 2555)

การใช้ประโยชน์ ราก แก้วร้อนใน กระจายน้ำ ขับปัสสาวะ ตัน ลดความร้อนในร่างกาย แก้กษัย ไตพิการ ขับปัสสาวะ ใบ พอกแก้ปวดฝี ถอนพิษ ขับปัสสาวะ ดอก แก้วร้อนใน กระจายน้ำ สมานแผลในลำไส้ เมล็ด แก้ประจำเดือนผิดปกติ (เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2549; สุธรรม อารีกุล, 2552)



ก



ข

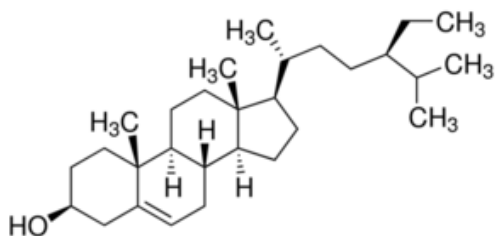


ก

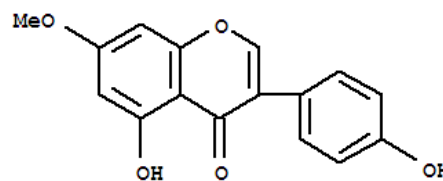
ภาพที่ 2-1 ลักษณะทั่วไปของโสน (ก คือ ลักษณะวิสัย, ข คือ ช่อดอกและการจัดเรียงตัวของใบ, ค คือ ดอกโสน) (อรุณี รอดลอย และคณะ, 2555)

2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของใบและดอกโสน (อุทัยวรรณ เดิศศักดิ์ศรีสกุล, 2550)

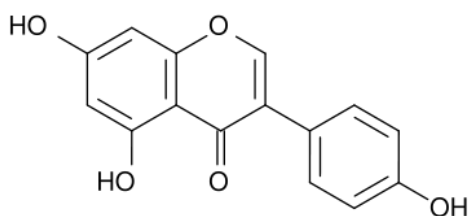
ใบและดอกโสน ประกอบด้วยสารบริสุทธิ์ 5 ชนิด คือ เบต้า-ซีโตสเตอรอล พรูเนติน จินิสทีน กรดไฮดรอกซีซินนามิก และซีโตสเตอรอล-กลูโคไพราโนไซด์ ซึ่งพรูเนติน จินิสทีน และกรดไฮดรอกซีซินนามิก มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ



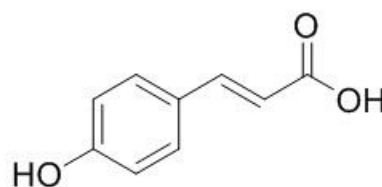
ก



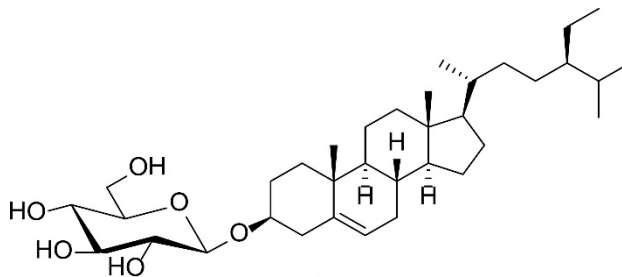
ข



ค



ง



จ

ภาพที่ 2-2 องค์ประกอบทางเคมีของใบและดอกโสน (ก คือ เบต้า-ซีโตสเตอรอล, ข คือ พรูเนติน, ค คือ จินิสทิน, ง คือ กรดไฮดรอกซีซินนามิก, จ คือ ซีโตสเตอรอล-กลูโคไพราโนไซด์) (อุทัยวรรณ เลิศศักดิ์ศรีสกุล, 2550)

2.1.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชวงศ์โสนและความเป็นพิษ

โสนมีฤทธิ์ในการยับยั้ง benzo (a) pyrene [B(a)P] ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มพอลิไซคลิก อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons ; PAHs) ที่เกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์ จากปฏิกิริยาที่เรียกว่าไพโรไลซิส (pyrolysis) B(a)P พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมเช่นเดียวกับ PAHs ตัวอื่น ๆ สารในกลุ่ม PAHs จัดเป็นสารพิษที่เป็นอันตรายในอาหาร (food hazard) เนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็ง (Tangvarasittichai et al., 2005)

ฤทธิ์ในการยับยั้ง Aflatoxin B1 (AFB1) ซึ่งเป็นกลุ่มสารพิษอีกชนิดหนึ่งที่มีกพบปนเปื้อนอยู่ในอาหาร สร้างขึ้นจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* (Tangvarasittichai et al., 2005)

สารพฤกษเคมีที่พบในแค (*S. grandiflora*) ซึ่งเป็นพืชวงศ์โสน ได้แก่ อาร์จินีน ซีสเทอีน ฮีสทีดีน ไอโซลิวซีน ฟินิลแอลานีน ทริปโตเฟน วาลีน ทรีโอนีน อะลานีน แอสพาราจีน กรดแอสปาร์ติก กรดโอเลอิก โนลิก น้ำตาลกลาเล็กโทส น้ำตาลแรมโนส กรดกลูคิวโรนิก ฟลาโวนอยด์ แคมพ์เฟอร์อล ลิวโคไซยาโนดิน ไซยาโนดิน เมทิลเอสเทอร์แคมพ์เฟอร์อล-รูติโนไซด์ แทนนิน และกัม ฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ ปกป้องหัวใจ ป้องกันโรคนิวในทางเดินปัสสาวะ ป้องกันโรคตับอักเสบ ลดความเครียด บรรเทาแผลในกระเพาะอาหาร ฆ่าพยาธิ และลดการอักเสบ เป็นต้น (Dayananda & Jaya, 2014; Kumar & Naheed, 2012)

การทดสอบความเป็นพิษต่อดับ ได้ทำการทดสอบในหนูทดลองที่ชักนำด้วยยา Erythromycin estolate เพื่อให้เกิดความเป็นพิษต่อดับ จากนั้นป้อนสารสกัดจากใบแค วันละ 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 15 วัน ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากใบแค

ทำให้ระดับบิลิรูบินคลอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ ฟอสโฟลิพิด กรดไขมันอิสระ และ TBARS ในหนูทดลองลดลง และไม่มีความเป็นพิษต่อตับ (Pari & Uma, 2003)

การนำพืชวงศ์โสนไปใช้เป็นยาพื้นบ้าน ได้แก่ รักษาอาการฟกช้ำ ตาแดง ไข้ทรพิษ ไข้หวัด ปวดศีรษะรักษาบาดแผล แก้เจ็บคอ แก้ร้อนใน โรคโลหิตจาง หลอดลมอักเสบ เยื่อบุตาอักเสบ โรคเรื้อน โรคเกาต์ และโรคไขข้อ (Kumar & Naheed, 2012)

2.2 อนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ (free radical) เป็นโมเลกุลที่มีอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (single หรือ unpaired electron) อยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมาก จึงจัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมี ชนิดที่พบบ่อยเช่น superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) hydroxyl radical (OH^{\bullet}) peroxy radical (ROO^{\bullet}) เป็นต้น อนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถผลิตขึ้นเองในร่างกายจากกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการฆ่าเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาวและระบบส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (signal transduction) นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเกิดขึ้นได้จากการได้รับสารเคมี สารพิษจากสิ่งแวดล้อม รังสี ยาบางชนิด อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่คงตัวจึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและกรดนิวคลีอิก ผลที่เกิดขึ้นหลังจากการทำปฏิกิริยาทำให้ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์เสียหาย และเซลล์อาจถูกทำลายได้ในที่สุด หากเป็นการทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดีเอ็นเอทำให้มีการสร้างยีนที่ผิดปกติจนอาจกลายเป็นเซลล์มะเร็ง (ไกรสิทธิ์ ดันติศิริพันธ์, ประภาศรี ภูวเสถียร และวิญญู เจริญศิริ, 2538; วาริน แสงกิตติโกมล, 2543; Rimm et al., 1996; Steinmetz & Pottor, 1996; Lander, 1997; Lionis, Faresjo, Skoula, Kapsokefalou, & Faresjo, 1998)

2.2.1 หลักการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity determination)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่สามารถวัดได้โดยตรง แต่สามารถตรวจสอบได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีวิธีการตรวจสอบที่หลากหลาย การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะประกอบไปด้วย สารตั้งต้น ได้แก่ อนุมูลอิสระและตัวริเริ่มปฏิกิริยา สารมัธยันตร์ (intermediate) และสารผลิตภัณฑ์ การวัดปริมาณสารเหล่านี้สามารถนำมาใช้ในตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพและการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ในแต่ละประเภทจะมีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน โดยปกติมักใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบและสรุปผล

1. วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพเป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการต่าง ๆ เช่น การทำให้เกิดสี การทำให้เกิดตะกอน ความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยมได้แก่ การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ เช่น Shinoda test และ Pew test โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC) และการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald, & Robards, 2002; บุหรีน พันธุ์สุวรรณค์, 2556)

2. วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ วิธีที่นิยมได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH[•]) วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS^{•+}) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ซึ่งวิธีการดังกล่าวข้างต้นจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนและวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากค่าการดูดกลืนแสง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น ABTS^{•+} และ DPPH[•] การคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระหาได้จากอัตราส่วนของการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน เช่น trolox, vitamin C และ ferrous sulfate หน่วยของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณแสดงได้ 2 แบบคือ (1) แบบปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง ซึ่งค่าตัวเลขสูงก็แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงและ (2) แบบปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50% (IC₅₀, 50 % of inhibitory concentration) โดยค่าตัวเลขต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ทั้งสองแบบสามารถแสดงหน่วยได้หลากหลายได้แก่ ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิกรัม มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัม ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิลิตร มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิลิตร เป็นต้น (Antolovich et al., 2002; บุหรีน พันธุ์สุวรรณค์, 2556)

2.3 หลักการตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ข้อปฏิบัติ ได้แก่ (Clinical and standard Institute, 2006)

1. แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ต้องได้มาจากการเพาะเลี้ยงและแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์
2. ระบุสกุลหรือชนิดของเชื้อแบคทีเรียอย่างถูกต้อง และใช้วิธีการที่เป็นมาตรฐาน

3. เชื้อแบคทีเรีย นับว่าเป็นสิ่งที่มีความสำคัญที่สุด ดังนั้น ควรเก็บเชื้อตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบครั้งต่อไป (เก็บเชื้อตัวอย่างด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilisation) หรือการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70 ถึง -80 องศาเซลเซียส

หลักการตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสามารถตรวจสอบได้ 2 วิธีคือ

1. Dilution Method เป็นการเจือจางยาให้มีความเข้มข้นที่ต่างกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาที่มีความเข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ มาทดสอบกับเชื้อ วิธีนี้สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อได้ (Minimal Inhibition Concentration, MIC) ซึ่งสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 วิธีคือ การเจือจางยาในอาหารเหลว (Broth dilution method) และการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution method) ซึ่งจะต้องใช้เวลาเครื่องมือและแรงงานในการทำมาก แต่ผลการทดลองที่ได้แน่นอนกว่า (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006; ชีรวุฒิ หวังอำนวยพร และรัชณี ไสยประจง, 2550)

2. Diffusion Method เป็นการทดสอบโดยทำให้ตัวยาจากที่หนึ่งซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจใช้แผ่นยาเป็นกระดาษกรองหรือเป็นเม็ดยาหรือเจาะหลุมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วใส่ยาลงไปเพื่อให้ยาซึมจากบริเวณหนึ่งที่มีความเข้มข้นสูงไปสู่ที่มีความเข้มข้นต่ำ อ่านผลการทดสอบโดยดูบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญ (clear zone หรือ inhibition zone) วิธีนี้ไม่สามารถอ่านผลเป็นค่าความเข้มข้นของยาโดยตรงได้ แต่ก็เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากทำได้ง่ายใช้เวลา น้อยและวิธีที่นิยมทดสอบมากที่สุดคือแบบที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (disc diffusion method) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006; ชีรวุฒิ หวังอำนวยพร และรัชณี ไสยประจง, 2550)

2.4 เชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษา

Escherichia coli

Escherichia coli หรือ *E. coli* จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ย้อมติดสีแกรมลบ เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) พบในลำไส้มนุษย์และสัตว์เลื้อยคุ่น *E. coli* ส่วนใหญ่ไม่ก่อโรค (pathogen) บางสายพันธุ์ก่อโรค เนื่องจากมีความสามารถในการสร้างสารพิษ (exotoxins) ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) หรือเรียกว่า Enterovirulent *Escherichia coli* group (EEC group) (Schroeder et al., 2002) มี 5 ประเภทคือ

- Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)
- Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)
- Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

- Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)
- Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) หรือ *E. coli* 0157:H7

การก่อโรคในแต่ละระบบเกิดจาก *E. coli* ต่างสายพันธุ์ซึ่งมีกลไกการก่อโรคและปัจจัยที่แตกต่างกันไปดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 โรคที่เกิดจาก *E. coli* และปัจจัยการก่อโรค

(ดัดแปลงจาก: กัทรัชย์ กิริติสิน, 2552; Holt, Krieg, Sneath, Staley, & Williams, 1994)

โรคที่เกิดจาก <i>E. coli</i>	ปัจจัยการก่อโรค
โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection)	พบในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย ผู้ป่วยมีอาการปัสสาวะบ่อยและแสบขัด พบเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวปนในปัสสาวะ จัดเป็น ascending infection เกิดจากการลุกลามของเชื้อสายพันธุ์ก่อโรค (uropathogenic <i>E. coli</i>) จากทางเดินอาหารผ่านทางอุจจาระของผู้ป่วยเข้าสู่ท่อปัสสาวะและย้อนขึ้นไปที่กระเพาะปัสสาวะทำให้เกิดโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ (cystitis)
โรคทางเดินอาหารอักเสบ (gastroenteritis)	รับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ โดยโรคที่พบบ่อยคือโรคท้องร่วง (diarrhea)
การติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia)	มักเกิดจากการบุกรุกของเชื้อเข้าสู่กระแสโลหิตในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อเฉพาะที่อยู่ก่อน เช่น ผู้ป่วยที่มีโรคติดเชื้อในทางเดินอาหารและผู้ป่วยที่มีอาการลำไส้ทะลุ ทำให้เชื้อประจำถิ่นรวมถึง <i>E. coli</i> สามารถเข้าสู่ช่องท้องและกระแสโลหิตได้ต่อไป ในรายที่มีอาการรุนแรงจะทำให้ความดันโลหิตลดต่ำจนเกิดภาวะช็อก (septic shock) และเสียชีวิตได้อย่างรวดเร็ว
โรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis)	<i>E. coli</i> เป็นสาเหตุสำคัญของโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบในทารกแรกเกิด โดยได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในช่องคลอดหรือทวารหนักของมารดาในระหว่างคลอด สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคมักพบการสร้างแคปซูลที่แอนติเจนชนิด K1

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

โรคที่เกิดจาก <i>E. coli</i>	ปัจจัยการก่อโรค
โรคปอดบวม (pneumonia)	เป็นการฉวยโอกาสติดเชื้อในผู้ที่มีความผิดปกติของร่างกายอยู่เดิม เช่น ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ติดเชื้อเรื้อรัง และผู้ที่มีโรคเรื้อรังในระบบทางเดินหายใจ รวมถึงมักเป็นสาเหตุก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล เป็นผลให้การติดเชื้อรุนแรงและมีอัตราการตายสูง การได้รับเชื้อส่วนใหญ่เกิดจากการสำลักเชื้อในทางเดินหายใจส่วนบนลงสู่ทางเดินหายใจส่วนล่าง

***Pseudomonas aeruginosa* (Gellatly & Hancock, 2013)**

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่พบตามพื้นดินและที่ชื้น มีความสามารถในการปรับตัวสูงเพื่อดำรงชีพในสภาวะที่เครียดในสภาวะธรรมชาติ หรือในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม รวมไปถึงในสถานพยาบาลต่าง ๆ จัดเป็นเชื้อที่พบในโรงพยาบาลมากเป็นอันดับสอง โดยแยกได้เชื้อได้จากผู้ป่วยโรคปอดอักเสบจากการใช้เครื่องช่วยหายใจ (Ventilator - Associated Pneumonia [VAP]) การติดเชื้อ *P. aeruginosa* ที่รุนแรงมักพบตามโรงพยาบาล และเกือบทั้งหมดพบในผู้ที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (Neutropenia) ผู้ที่มีแผลไหม้อย่างรุนแรง หรือผู้ป่วยโรคปอดเรื้อรัง ปัจจุบันการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *P. aeruginosa* มีข้อจำกัดมากเนื่องจากเชื้อ *P. aeruginosa* มีความทนทานต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้น ทำให้มีอัตราการเจ็บป่วยและเสียชีวิตสูงในสหรัฐอเมริกา

การติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในระบบทางเดินหายใจ

การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจถูกแบ่งออกเป็นสองแบบ ได้แก่ แบบเฉียบพลัน และแบบเรื้อรัง พบได้ทั้งในโรงพยาบาลและตามชุมชนต่าง ๆ (Arancibia et al., 2002) การติดเชื้อในโรงพยาบาลแบบเฉียบพลันโดยทั่วไปแล้วเป็นผลมาจากการบาดเจ็บโดยตรง เช่น การบาดเจ็บที่เยื่อเมือกเนื่องจากการใส่ท่อช่วยหายใจ หรือการสูดดมควันบุหรี่ ส่วนการติดเชื้อแบบเรื้อรังอาจส่งผลให้ผู้ป่วยมีภูมิคุ้มกันบกพร่อง

ตารางที่ 2-2 การติดเชื้อ *P. aeruginosa* โดยทั่วไป และปัจจัยเสี่ยง

(ดัดแปลงจาก: Gellatly & Hancock, 2013)

การติดเชื้อ	ปัจจัยเสี่ยง
เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน	แผลไฟไหม้ บาดแผลเปิด บาดแผลจากการผ่าตัด
ทางเดินปัสสาวะ	การใช้สายสวนปัสสาวะ
การติดเชื้อในกระแสเลือด	มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง
ภาวะแผลที่เท้าในผู้ป่วยโรคเบาหวาน	ผู้ป่วยโรคเบาหวาน การไหลเวียนเลือดในหลอดเลือดฝอยผิดปกติ
ทางเดินหายใจ/โรคปอดบวม	ผู้สูงอายุ ผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง (COPD) โรคปอดเรื้อรัง เครื่องช่วยหายใจ
ภาวะหูชั้นนอกอักเสบ (swimmer's ear)	การบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ มีน้ำอุดกั้นในช่องหู
การติดเชื้อที่กระจกตา (Keratitis)	การสวมใส่คอนแทกเลนส์ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ
โรคผื่นแพ้สัมผัส (Hot-tub rash)	การสัมผัสกับสิ่งสกปรก

Staphylococcus aureus (นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552; Crossley & Archer, 2009; Ryan & Ray, 2004)

Staphylococcus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะทรงขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร จัดอยู่ในสกุล Micrococcaceae ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ บางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูลทำให้โคโลนีเป็นเมือก (slime) ช่วยให้เชื้อมีความทนทานต่อการทำลายของยาปฏิชีวนะและภูมิคุ้มกันของร่างกาย อาศัยในร่างกายมนุษย์บริเวณผิวหนังและเยื่อเมือก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในจมูกของคนทั่วไป แต่ไม่เป็นอันตราย เชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะใช้กระบวนการหายใจ ส่วนสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะใช้การหมัก (fermentation) การเจริญของโคโลนีบนอาหารแข็งมีลักษณะกลมเรียบ ขุนและนูนเล็กน้อย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-4 มิลลิเมตร มีลักษณะโคโลนีเป็นสีเหลืองทอง สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี อาจมีชีวิตรอดได้ในหนองหรือเสมหะแห้งเป็นเวลานาน สามารถสร้างเอนไซม์ Catalase ได้ (catalase-positive) ซึ่งใช้เป็นคุณสมบัติในการจำแนกชนิดของ *S. aureus*

สมบัติทางเคมีที่สำคัญของเชื้อ *S. aureus* ได้แก่ การย่อยกรดดีเอมโนแกรมบวก สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสให้ผลบวกและฮีโมไลซิน (hemolysin) ชนิด β -hemolysin ทำให้เกิด

วงใสที่ชัดเจนบน blood agar สามารถใช้ mannitol และสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) ที่ทำให้พลาสมาเกิดการแข็งตัว โดยเปลี่ยนไฟบริโนเจน (fibrinogen) เป็นไฟบริน (fibrin) ซึ่งไฟบรินที่เกิดขึ้นจะช่วยป้องกันกระบวนการฟาโกไซโทซิสของเม็ดเลือดขาวและการเข้าจับของยาปฏิชีวนะได้ ทำให้ประสิทธิภาพในการก่อโรครุนแรงขึ้น

เชื้อกลุ่ม *Staphylococcus* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อบนผิวหนัง โดยเฉพาะโรคฝีหนอง นอกจากนี้ยังพบได้ทั่วไปตามร่างกายคน อุปกรณ์ทางการแพทย์ในโรงพยาบาลและชุมชน โดยเฉพาะเชื้อที่พบภายในโรงพยาบาลมักก่อโรคในลักษณะเชื้อฉวยโอกาสก่อโรคในผู้ป่วยที่มีร่างกายอ่อนแอหรือติดต่อทางบาดแผลถลอกหรือแผลจากการผ่าตัด เชื้อจะบุกรุกเข้าไปในเนื้อเยื่อชั้นในและเข้าสู่กระแสเลือดแพร่กระจายออกไปตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายและก่อให้เกิดโรคได้ดังตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2-3 โรคที่เกิดจากเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus*

(ดัดแปลงจาก: นิติพงษ์ สิริวงษ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552)

โรค	อาการ
โรคติดเชื้อที่ผิวหนัง	การเกิดตุ่มหนองที่ผิวหนัง (impetigo) มักเป็นตุ่มหนองคัน ๆ อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม พบบ่อยบริเวณใบหน้า แขนขา เมื่อตุ่มหนองแตกออกกลายเป็นรอยถลอกคัน ๆ และถ้ามีการติดเชื้อที่ต่อมไขมันจะทำให้เกิดการอักเสบ มีการสะสมของเม็ดเลือดขาวที่ตายแล้ว รวมทั้งแบคทีเรียที่เม็ดเลือดขาวกินเข้าไป ทำให้เกิดฝี (furuncle) และฝีฝักบัว (carbuncles) บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ epidermolytic toxin (ET) ที่ทำให้เกิดโรคผิวหนังหลุดลอกที่เรียกว่า Staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS)
โรคปอดบวม (staphylococcal pneumonia)	การติดเชื้อมักเกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่มีร่างกายอ่อนแอเช่น ป่วยเป็นไข้หวัดใหญ่ โรคหัด หรือคนที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้มีโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อสูงกว่าคนปกติ อาการของโรคอาจเกิดขึ้นทันทีที่ติดเชื้อ จึงจัดว่าเป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วย ทำให้มีอัตราการตายสูงโดยที่การติดเชื้อจะทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อและฝีจำนวนมากที่ปอด

ตารางที่ 2-3 (ต่อ)

โรค	อาการ
โรคที่เกิดจากสารพิษ (toxins)	สารพิษที่สร้างจาก <i>S. aureus</i> มีหลายชนิด เช่น hemolysin เป็นโปรตีนที่ทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือด ทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตก นอกจากนี้ยังพบว่าบางสายพันธุ์จะสร้างสารพิษ pantonvalentine leukocidin (PVL) เป็นโปรตีนที่ทำลายเม็ดเลือดขาว ทำให้เกิดโรคปอดอักเสบอย่างรุนแรง ประมาณร้อยละ 75 ของผู้ป่วยจะเสียชีวิตโดยพบได้จาก CA-MRSA (community-acquired methicillin resistant <i>S. aureus</i>) นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษโดยการสร้างเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่มีคุณสมบัติทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส นานถึง 30 นาที และทนต่อกรดในกระเพาะ ทำให้ผู้ป่วยมีอาการอาเจียนและท้องร่วงอย่างรุนแรง บางสายพันธุ์ทำให้เกิดกลุ่มอาการ toxic-shock syndrome โดยการสร้าง toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) ทำให้มีไข้สูง คลื่นไส้ อาเจียน มีความดันต่ำ มีผื่นแดงตามตัว การทำงานของไตมักจะล้มเหลวและเกิดอาการช็อค
การติดเชื้อที่กระดูก (osteomyelitis) และข้อ (pyoarthrosis)	การติดเชื้อที่กระดูก มักมีสาเหตุจากการติดเชื้อในกระแสเลือด และเมื่อเชื้อเข้าไปอยู่ในส่วนของไดอะฟิซิส (diaphysis) ของกระดูกยาว (long bones) จะทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงและมีการสะสมของหนองบริเวณผิวของกระดูก เกิดเป็นหนองใต้เยื่อหุ้มกระดูกข้อต่อ กระดูกที่มีหนองจากการติดเชื้อจะทำลายกระดูกอ่อนของข้อต่อทำให้เกิดความพิการของข้อต่ออย่างถาวร

ปัจจัยสำคัญที่มีส่วนช่วยให้เชื้อ *S. aureus* ก่อโรคได้ดี (virulence factors) ได้แก่ (นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552)

1. Capsule ทำหน้าที่ป้องกันกระบวนการฟาโกไซโทซิสของเม็ดเลือดขาวและช่วยในการเกาะติดกับอุปกรณ์ต่าง ๆ ทำให้แพร่ระบาดได้ง่าย
2. Coagulase ทำหน้าที่เปลี่ยนไฟบริโนเจนเป็นไฟบรินทำให้เชื้อเกาะกลุ่มกันและทำให้ไฟบรินมาล้อมรอบเชื้อเพื่อป้องกันกระบวนการฟาโกไซโทซิส

3. Exfoliatin toxin (ET) ทำให้เกิดการย่อยสลายของเซลล์ที่เกาะติดของชั้นหนังกำพร้าทำให้เกิดโรคผิวหนังหลุดลอก (Staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS)
4. Hyaluronidase ทำหน้าที่ย่อยกรดไฮยาลูโรนิกที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อทำให้เชื้อแพร่กระจายไปสู่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น
5. Hemolysin เป็นโปรตีนที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง
6. Leucosidin ทำหน้าที่ทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยการทำให้เกิดรูที่ cytoplasmic membrane
7. Lipase ทำหน้าที่ย่อยสลายไขมันที่สะสมที่ผิวหนังเพื่อการดำรงชีพ และการบุกรุกของเชื้อเข้าสู่ผิวหนัง
8. Protease ทำหน้าที่ย่อยสลายคอลลาเจนและโปรตีนอื่น ๆ ในเนื้อเยื่อ
9. Protein A ทำหน้าที่จับกับ Fc receptor ของแอนติบอดีและยับยั้งกระบวนการการฟาโกไซโทซิส
10. Toxic shock syndrome toxin (TSST) ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษมีอาการท้องร่วงอาเจียนและช็อค

สายพันธุ์ดื้อยาของ *S. aureus* (นิตินพษ์ ศิริวงษ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552)

การระบาดของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยา ถูกพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2483 จากการตรวจผลติดเชื้อไฟไหม้จากผู้ป่วยในอังกฤษ โดยพบว่าเชื้อคือยาซัลโฟนาไมด์ (sulphonamide) ได้ ดังนั้นจึงเปลี่ยนไปใช้ยาเพนนิซิลิน พบว่า ใช้ยับยั้งการติดเชื้อได้ผล หลังจากนั้นจึงมีการผลิตยาเพนนิซิลินเพิ่มมากขึ้นและมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่จากการใช้ยาเพนนิซิลินอย่างไม่ถูกวิธี ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาอันเนื่องมาจากเชื้อที่กลายพันธุ์ และสามารถสร้างเอนไซม์บีตาแลคตามเอส (β -lactamase) ซึ่งเกิดจากการควบคุมของยีนบนพลาสมิดและโครโมโซม โดยทำหน้าที่ทำลายวงแหวนบีตาแลคแตม (β -lactam ring) ที่เป็นโครงสร้างหลักของยาเพนนิซิลิน ทำให้ยาไม่สามารถทำงานได้ โดยพบว่าจากการคัดแยกเชื้อ *S. aureus* ในปี พ.ศ. 2489 พบเชื้อที่ดื้อยาเพนนิซิลินร้อยละ 6 จากในโรงพยาบาลของอังกฤษ และเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 50 ในปี พ.ศ. 2491 จากปัญหาการดื้อยาเพนนิซิลินที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทำให้มีการพัฒนายาชนิดใหม่คือ เตตราซัยคลิน (tetracycline) อิริโทรมัยซิน (erythromycin) คลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol) และสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) โดยในระยะแรกยาสามารถใช้รักษาอาการติดเชื้ออย่างได้ผล แต่ต่อมาพบว่าเชื้อสามารถเกิดการดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะที่สำคัญมี 3 ชนิดคือ methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA) และ vancomycin resistant *S. aureus* (VRSA)

Bacillus species (ภัทรชัย กิรติสิน, 2552; อิศยา จันทร์วิทย์ชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, 2556)

Bacillus species จัดอยู่ในวงศ์ Bacillaceae อยู่ในกลุ่มแอโรบัส (aerobes) หรือแฟคัลเททีฟแอนแอโรบัส (facultative anaerobes) มีรูปร่าง คีลสิแกรมบวก มีการเรียงตัวเป็นสายยาว มีคุณสมบัติคือ สามารถสร้างสปอร์ภายในเซลล์หรือ endospore บางครั้งอาจพบว่าเชื้อ *Bacillus* ที่มีอายุนานหลายวันจะมีการคีลสิได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (gram variable)

การสร้างสปอร์ (sporulation) ถูกสร้างขึ้นในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นการตอบสนองของเซลล์ต่อปัจจัยในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในการเจริญ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่ำ ความชื้น รวมถึงภาวะขาดแคลนอาหาร สปอร์เป็น โครงสร้างพิเศษที่มีผนังหนาและแข็งแรงมาก ภายในบรรจุ โครงสร้างพันธุกรรมและสารที่มีความจำเป็นสำหรับการดำรงเผ่าพันธุ์ เซลล์แม่ที่สร้างสปอร์จะสลายตัวไปหลังกระบวนการสร้างสปอร์เสร็จสมบูรณ์ โดยเซลล์ 1 เซลล์จะสร้างได้ 1 สปอร์ ลักษณะรูปร่าง ขนาด และตำแหน่งของสปอร์ภายในเซลล์อาจมีส่วนช่วยในการจำแนกสปีชีส์ สปอร์สามารถทนอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้เป็นเวลานานหลายปี เมื่อสปอร์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมอีกครั้ง จะงอก (germination) กลับมาเป็นเซลล์แบคทีเรียที่สามารถแบ่งตัวได้ (vegetative cell) ดังนั้นการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียจึงไม่จัดเป็นการสืบพันธุ์ เพราะไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยทั่วไปไม่พบการสร้างสปอร์เมื่อเชื้ออาศัยหรือก่อโรคอยู่ในคนหรือสัตว์

เชื้อ *Bacillus* จำแนกออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้ (อิสยา จันทร์วิทย์ชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, 2556)

กลุ่มที่ 1 เซลล์ที่มีขนาดความกว้างมากกว่าหรือเท่ากับ 0.9 ไมโครเมตร สปอร์รูปไข่ มีขนาดเล็ก ทำให้รูปร่างของเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง สปอร์อยู่ตรงกลางเซลล์หรือปลายเซลล์ เชื้อกลุ่มนี้ได้แก่ *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium* และ *B. mycoides*

กลุ่มที่ 2 เซลล์ที่มีขนาดความกว้างน้อยกว่า 0.9 ไมโครเมตร สปอร์รูปไข่ มีขนาดเล็ก ทำให้รูปร่างของเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง สปอร์อยู่ตรงกลางเซลล์หรือปลายเซลล์ เชื้อกลุ่มนี้ได้แก่ *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* และ *B. firmus*

กลุ่มที่ 3 เซลล์ที่มีขนาดความกว้างน้อยกว่า 0.9 ไมโครเมตร สปอร์รูปกลม มีขนาดใหญ่ ทำให้เซลล์โป่งออก สปอร์อยู่ปลายเซลล์ เชื้อกลุ่มนี้ได้แก่ *B. sphaericus*, *B. polymyxa*, *Geobacillus stearothermophilus* (*B. stearothermophilus*), *B. circulans*, *B. laterosporus*, *B. brevis* และ *B. alvei*

การติดเชื้อ *Bacillus* ในคนส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ที่เสพยาเสพติดทางเส้นเลือด และผู้ป่วยโรคมะเร็ง สามารถพบก่อโรคได้หลายระบบ ดังตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 โรคที่เกิดจากเชื้อกลุ่ม *Bacillus* (ดัดแปลงจาก: ภัทรชัย กิริติสิน, 2552; อิศยา จันทรวิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, 2556)

ชนิดของเชื้อ	โรคที่เกิดจากเชื้อ
<i>B. anthracis</i>	เป็นสาเหตุของโรค anthrax
<i>B. cereus</i>	ก่อโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร โรคติดเชื้อของตา โรคติดเชื้อตามระบบต่าง ๆ โรคติดเชื้อฉวยโอกาส เช่น โรคกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ การติดเชื้อบริเวณบาดแผล โรคปอดบวม
<i>B. thuringiensis</i>	ก่อโรคในแมลง ทำให้เกิดการติดเชื้อของแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก
<i>B. licheniformis</i>	ก่อโรคฝีในสมอง การติดเชื้อในกระแสเลือด โรคเยื่อช่องท้องอักเสบติดเชื้อ โรคติดเชื้อของตา และโรคท้องร่วง
<i>B. circulans</i>	ทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โรคกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ และการติดเชื้อของบาดแผล
<i>B. coagulans</i>	ทำให้เกิดโรคติดเชื้อของตาได้
<i>B. subtilis</i>	สามารถก่อโรคปอดบวมชนิดรุนแรง การติดเชื้อในกระแสเลือด โรคกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ การติดเชื้อของบาดแผลผ่าตัด และโรคท้องร่วง

2.5 การติดเชื้อแบคทีเรีย ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ

การอักเสบเป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรียและสิ่งที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย อาการที่ปรากฏของการอักเสบคือปวดบวมแดงและร้อน กระบวนการอักเสบประกอบด้วย การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดทำให้เลือดมาเลี้ยงเพิ่มขึ้นมีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังเนื้อเยื่อที่ถูกกระตุ้นเพิ่มมากขึ้น เพื่อกำจัดสิ่งเร้าที่ทำให้เกิดการอักเสบเหล่านี้ ในขณะที่มีปฏิกิริยาการอักเสบเกิดขึ้น เซลล์แมคโครฟาจ ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งจะหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบชนิดต่าง ๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) พรอสตาแกลนดิน E2 (prostaglandins E2) และไซโตไคน์ (cytokine) เป็นต้น เพื่อช่วยในการกำจัดสิ่งรุกราน ซึ่งสาร

สื่อกลางเหล่านี้มีสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ (กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ, 2557, อ้างถึงใน Mequanint et al., 2011; Kumar et al., 2007; Van der Vilet, 2000; Jung et al., 2009)

2.6 ภาวะเครียดออกซิเดชันและการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

เซลล์แมคโครฟาจ (macrophages, neutrophils, eosinophils) เป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน แต่กำเนิดซึ่งมีเอนไซม์ oxidase nicotinamideadenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase ทำหน้าที่หลักในการกระตุ้นกระบวนการอักเสบเพื่อกำจัดจุลชีพ สารพิษ และสิ่งแปลกปลอม โดยการสร้างอนุมูลอิสระซึ่งเกิดจากการออกซิไดส์ออกซิเจนให้ได้ออกซิเจนที่มีประจุลบ (reactive oxygen species; ROS) และอนุพันธ์ไนโตรเจนที่ว่องไว (reactive nitrogen species; RNS) ในช่วงเริ่มต้นของการตอบสนองภูมิคุ้มกัน เซลล์เม็ดเลือดขาวจะเพิ่มความต้องการออกซิเจนมากขึ้น 10-20 เท่าผ่านขั้นตอน respiratory burst ซึ่งเป็นการเพิ่มอัตราเมแทบอลิซึม ออกซิเจนที่สร้างขึ้นโดยเอนไซม์นี้จะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอื่น ๆ เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป นอกจากนี้ยังมีการผลิตสารที่เร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอื่น ๆ เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2) hypochlorous acid (HOCl) peroxynitrite ($ONOO^-$) hydroxyl (OH^\bullet) และ ozone (O_3) สารเหล่านี้นอกจากจะทำลายเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดอย่างไม่เฉพาะเจาะจงแล้ว ยังสามารถทำลายเนื้อเยื่อของโฮสต์ได้อีกด้วย (Tan et al., 2016)

นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มขึ้นของไนตริกออกไซด์ (NO) เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสประเภทต่าง ๆ มีผลให้เกิดการอักเสบและความเครียดออกซิเดชัน ระดับความเครียดที่เพิ่มขึ้นจะไปกระตุ้นแกน hypothalamic-pituitary-adrenal และปลดปล่อยฮอร์โมน anti-stressendogenous cortisol มีผลทำให้ความเครียดลดลง (Tan et al., 2016)

สารพฤกษเคมีที่พบในพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ช่วยลดความเครียดจากการเกิดออกซิเดชันในเนื้อเยื่อเป้าหมาย และด้านแบคทีเรียก่อโรคได้ (Dhama et al., 2014)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชในวงศ์โสน (ตารางที่ 2-5, 2-6 และ 2-7)

1. ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

Laladhas et al. (2010) ได้ศึกษาความสามารถของโปรตีน SF2 (Sesbania fraction 2) จากสมุนไพร และดอกแค (*S. grandiflora*) ที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ผลการศึกษาพบว่า SF2 สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (apoptosis) โดยพบว่าสาย DNA ในเซลล์มะเร็งชนิด Daltons lymphoma ascites (DLA) และ

เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW-480) มีการแตกหัก ความว่องไวของ SF2 มีความสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์ caspases 3, 8 and 9, poly (ADP-ribose) polymerase cleavage และ cytochrome C โปรตีน SF2 ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด NF- κ B ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยในกระบวนการ transcription ควบคุมการแสดงออกของยีน และทำให้ phorbolmyristateacetate (PMA) ซึ่งมีความเป็นพิษมีปริมาณลดลง นอกจากนี้ SF2 ยังควบคุมปัจจัยที่ถูกกระตุ้นมาจากเนื้องอก เช่น Bcl-2, p-Akt และ cyclooxygenase-2 ซึ่งมีผลไปขัดขวางการตายของเซลล์ (anti-apoptosis) การทดสอบทางเภสัชวิทยา ด้านความเป็นพิษต่อร่างกาย พบว่า SF2 มีความปลอดภัย และอาจถูกนำไปใช้ทดสอบกับผู้ที่มีความเสี่ยงต่อโรคมะเร็ง

Sreelatha, Padma, and Umasankari (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งจากใบและดอก แคน (*S. grandiflora*) ซึ่งใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ในหนูทดลองที่ชักนำให้เกิดมะเร็งตับชนิด Ehrlich Ascites Carcinoma ผลการทดลองพบว่า ใบและดอกแคนมีฤทธิ์ในการลดระดับ Lipid peroxidation ($p < 0.05$) และกระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ GSH, SOD และ CAT ($p < 0.05$)

2. ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

Kumar, Bajwa, Singh, Kuldeep, and Kalia (2013) ได้รวบรวมข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบจากต้นสมิ (*S. sesban* Linn.) ซึ่งเป็นพืชวงศ์โสน พบว่า สารสกัดจากต้นสมิ อุดมไปด้วยเทอร์ปีนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน และฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ และลดอาการบวมที่ทำได้

Patil, Nanjwade, and Manvi (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านข้ออักเสบจากสารสกัดจากเปลือกแคน โดยใช้การฉีดยาเข้าข้อทำให้เกิดอาการบวมที่ขาและข้อของหนูทดลอง ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากเปลือกแคนอุดมไปด้วยเทอร์ปีนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ลดการอักเสบในหนูทดลองได้

3. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

Ramesh, Mahesh, Sureka, and Begum (2008); Ramesh, Sureka, Bhuvana, and Begum (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ปกป้องความเสียหายต่อหัวใจในหนูทดลองที่ชักนำให้เกิด oxidative damage จากวันบุรีเป็นระยะเวลา 90 วัน จากนั้นป้อนสารสกัดจากต้นแคนต่อเนื่องกันเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า การสูบบุหรี่เรื้อรังก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน มีผลต่อหัวใจ สารสกัดจากต้นแคนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งส่งผลให้สามารถปกป้องความเสียหายต่อหัวใจได้

Ouattara et al. (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและสารต้านอนุมูลอิสระจากใบอ่อน ลำต้น เมล็ด ฟัก และรากของต้นแคน โดยใช้ น้ำ เมทานอล และอะซิโตน เป็นตัวทำละลาย

ทดสอบปริมาณฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน โดยวิธี DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity และ FRAP assay ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากแคมีสารประกอบฟีนอลิก ด้านแบคทีเรีย และต้านอนุมูลอิสระที่ดี

China et al. (2012) ได้ศึกษาปริมาณ โพลีฟีนอลจากดอกแค เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และฤทธิ์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ทำการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่า โพลีฟีนอลมีผลยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *Shigella flexneri* 2a, *Salmonella typhi*, *E. coli* และ *Vibrio cholerae* และสารสกัดจากดอกแคเหนี่ยวนำให้เกิดมวลชีวภาพของ *L. acidophilus* เพิ่มมากขึ้น

Wagh, Wagh, Toshniwal, and Sonawane (2012) ได้ศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม และฟลาโวนอยด์ในดอกแค ที่ใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย พบปริมาณฟีนอลิกรวม 49.1 ± 0.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และฟลาโวนอยด์ 12.86 ± 0.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สารสกัดยังมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ดี โดยยับยั้งเชื้อ *P.aeruginosa* (25.00 ± 0.60 มิลลิเมตร) เชื้อ *S. aureus* (21.00 ± 0.50 มิลลิเมตร) และเชื้อ *E. coli* (19.00 ± 0.60) ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในตา เช่น เยื่อตาอักเสบ

Lee et al. (2014) ศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านอนุมูลอิสระ ฟีนอล และฟลาโวนอยด์ในพืชที่ใช้เป็นอาหารของไทย 7 ชนิด ได้แก่ ผลและใบของมะนาว ใบแค ใบชะพลู รากขมิ้น ใบขมิ้น และเปลือกมะพร้าว พบว่า สารสกัดจากผลและใบของมะนาว มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียดีที่สุด ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดจากมะนาวและใบชะพลู มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด สารสกัดจากใบแค และสารสกัดจากรากขมิ้น มีปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์สูงสุด 47.7 และ 47.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

4. ฤทธิ์ต้านสารก่อการกลายพันธุ์

Tangvarasittichai et al. (2005) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านสารก่อการกลายพันธุ์จากดอกโสน โดยวิธี Ames test ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากดอกโสน มีฤทธิ์ต้านสารก่อการกลายพันธุ์ (aflatoxin B1 (AFB1), benzo(a)pyrene [B(a)P]) และพบสารสำคัญในดอกโสน คือ ฟลาโวนอล-กลัยโคไซด์ และเคอร์เซติน-แรมโนซิล-รูตินโนไซด์

5. การรักษาเนื้องอก

Doddola, Pasupulati, Koganti, and Koganti (2008) ได้ศึกษาสารสกัดจากใบแค ในการรักษาน้ำในไต ทำการทดลองโดยเลี้ยงหนูด้วยยา gentamicin และแอมโมเนียมออกซาลेटเพื่อชักนำให้เกิดเนื้องอก ทดสอบการสะสมแคลเซียมและออกซาลेटในไต รวมทั้งน้ำหนักรวมไต พบว่า สารสกัดจากใบมีฤทธิ์ในการลดการสะสมแคลเซียมออกซาลेट ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดเนื้องอกในไตได้

6. ฤทธิ์ทางเภสัชกรรม

Kasture and Deshmukh (2002) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านภาวะเครียดและโรคลมชักจากสารสกัดจากใบแคในหนูทดลองที่ถูกชักนำด้วยยา Pentylenetetrazol และยา Strychnine ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจากใบแคมีฤทธิ์ต้านภาวะเครียดที่สูง ทั้งยังส่งเสริมให้มีการสร้างกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก และเซโรโทนิน ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่ช่วยรักษาสมดุลภายในสมอง และช่วยให้เกิดความผ่อนคลาย

Kumar and Naheed (2012) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดจากสารสกัดจากใบแคในหนูทดลองด้วยวิธี Acetic acid induced writhing test และ tail flick test และฤทธิ์ต้านภาวะเครียดด้วยวิธี Open-field test ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากใบแคมีฤทธิ์ระงับปวดและลดอาการเครียดได้ ทั้งยังอุดมไปด้วยสารพฤกษเคมี เช่น อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ไตรเทอร์พีน แกมมา ซิเลจ และแอนทราควิโนนไกลโคไซด์

7. การรักษาบาดแผล

Karthikeyan, Suresh, and Suresh (2011) ได้ศึกษาสารสกัดจากเปลือกแคในการรักษาบาดแผลในหนูทดลอง ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากเปลือกแคที่ความเข้มข้น 10% w/w สามารถรักษาบาดแผลได้ มีฤทธิ์ป้องกันการบาดเจ็บเฉียบพลันในกระเพาะอาหาร แผลในกระเพาะอาหารที่เกิดจากความเครียด และการอักเสบจากการใช้ยา ซึ่งสารสกัดไม่มีผลต่อ pH และปริมาณกรดไฮโดรคลอริกในกระเพาะอาหาร ไม่ทำให้หนูทดลองมีอาการซึมเศร้า หรือมีอาการนอนไม่หลับ

8. ฤทธิ์ฆ่าพยาธิ

Sunil, Kallanagoda, and Channabasappa (2006) ทำการศึกษาฤทธิ์ฆ่าพยาธิในไส้เดือนดิน (*Pheretima posthuma*) โดยใช้น้ำมันสกัดจากเมล็ดแคความเข้มข้น 10, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ศึกษาช่วงเวลาที่ทำให้ไส้เดือนดินเป็นอัมพาตและตาย ผลการศึกษาพบว่า น้ำมันสกัดจากเมล็ดแคทำให้ไส้เดือนดินเป็นอัมพาตและตายได้

ตารางที่ 2-5 ฤทธิ์ทางชีวภาพของโสน และพืชวงศ์โสน

ชนิดพืช	สารสำคัญ	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	อ้างอิง
ดอกโสน	ฟลาโวนอล-กลัยโคไซด์ และเคอร์เซติน-แรมโนซิล-รูตินโนไซด์	ต้านสารก่อกลายพันธุ์(aflatoxin B1 (AFB1),benzo (a) pyrene [B(a)P])	(Tangvarasittichai et al., 2005)
ใบและดอกโสน	กรดไฮดรอกซีชินนamic พรุเนติน และจินสติน	ต้านอนุมูลอิสระ	(อุทัยวรรณ เลิศศักดิ์ศรีสกุล, 2550)
ต้นสมิ	เทอร์พีนอยด์ สเตียรอยด์ ซาโปนิน แทนนินและฟลาโวนอยด์	ต้านการอักเสบ และลดอาการบวมที่เท้า	(Kumar et al., 2013)
ใบอ่อน, ลำต้น, เมล็ด, ฝัก และรากของต้นแค	แทนนิน ฟลาโวนอยด์ คูมาริน และสเตียรอยด์	ต้านอนุมูลอิสระ แบคทีเรียก่อโรค และปกป้องความเสียหายต่อหัวใจ	(Ouattara et al., 2011; Lee et al., 2014; Ramesh et al., 2008; Ramesh et al., 2010)
ใบแค	โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ แอลคาลอยด์ กัม แทนนิน ไตรเทอร์พีน มิวซิเลจ และแอนทราควิโนนไกลโคไซด์	ต้านภาวะเครียดส่งเสริมการสร้างกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก และเซโรโทนิน ลดการสะสมแคลเซียมออกซาเลตในไต ต้านอนุมูลอิสระระงับปวดและลดอาการเครียด	(Kasture & Deshmukh, 2002; Doddola et al., 2008; Kumar & Naheed, 2012)

ตารางที่ 2-5 (ต่อ)

ชนิดพืช	สารสำคัญ	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	อ้างอิง
ดอกแค	โพลีฟีนอล และฟลาโวนอยด์ โปรตีน SF2 (Sesbania fraction 2)	ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>L. acidophilus</i> เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (apoptosis) เหนี่ยวนำให้เกิดโปรตีนที่ช่วยในกระบวนการ transcription (NF-kB) ควบคุมการแสดงออกของยีน และทำให้ phorbolmyristateacetate (PMA) ซึ่งมีความเป็นพิษมีปริมาณลดลง	(China et al., 2012; Wagh et al., 2012) (Laladhas et al., 2010)
เปลือกแค	เทอร์ปีนอยด์	ลดการอักเสบรักษาบาดแผล	(Patil et al., 2011; Karthikeyan et al., 2011)

ตารางที่ 2-6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชวงศ์โสน

ชนิดพืช	สารสำคัญ	วิธีการทดสอบ	IC ₅₀ (µg/mL)		อ้างอิง
			สารทดสอบ	สารมาตรฐาน	
ราก ลำต้น ใบ ดอก	แทนนิน ฟลาโวนอยด์ คูมาริน	• DPPH assay	24	3.6 (Quercetin)	(Ouattara et al., 2011)
ฝัก เมล็ดแค	สเตียรอยด์ และไตรเทอร์พีน	• Frap assay	0.75	3.6 Quercetin)	
ใบแค	โพลีฟีนอล และฟลาโวนอยด์	• nitric oxide assay	13.24	3.14 (Ascorbic acid)	(Doddola et al., 2008)
		• DPPH assay	2.71	5.9 (Ascorbic acid)	

ตารางที่ 2-7 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของพืชวงศ์โสน

ชนิดพืช	สารสำคัญ	ผลต่อแบคทีเรีย	MIC	อ้างอิง
ราก ลำต้น ใบ ดอก ฝัก เมล็ดแค	แทนนิน ฟลาโวนอยด์ คูมาริน สเตียรอยด์ และ ไตรเทอร์พีน	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>V. cholera</i> , <i>P. mirabilis</i>	12.5 mg/mL	(Ouattara et al., 2011)
ดอกแค	โพลีฟีนอล และฟลาโวนอยด์	<i>S. typhi</i> <i>S. flexneri</i> <i>V. cholera</i> <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> <i>E.coli</i>	0.065 µg/mL 0.028 µg/mL 0.250 µg/mL 0.65 µg/mL 1.5 µg/mL	(China et al., 2012; Wagh et al., 2012)
ใบแค	โพลีฟีนอล และฟลาโวนอยด์	<i>Burkholderia</i> sp.	135 mg/mL	(Lee et al., 2014)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือ

1. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (EHRET รุ่น BK4266) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
2. Lamina flow (Astec รุ่น HLF 1200E, England)
3. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) (Tommy, USA)
4. ออโตปิเปต (Automatic pipettes) (Gilson, France)
5. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
6. กระจาดกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Pall Corporation, USA)
7. กระจาดกรอง Whatman เบอร์ 1 และ เบอร์ 4 (Whatman, USA)
8. กระจกตวง (Duran, Germany)
9. ขวดแก้วที่มีฝาปิดมิดชิด (สำหรับ run TLC)
10. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, Thailand)
11. แผ่นเพลท TLC (Merck, Germany)
12. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator) (EYELA, Japan)
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท (VERSAMAX, Canada)
14. ไมโครเพลท (Sterilin Limited, USA)
15. เครื่องผสมสาร (Vortex) (IKA work, Malaysia)
16. เครื่องวัด pH (pH meter) (Denver Instrument, USA)
17. ปีกเกอร์ขนาด 50, 100, 150, 250, 500, 1000 มิลลิลิตร (Duran, Germany)
18. ตู้อบ (Binder, Germany)
19. เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
20. เครื่องให้ความร้อน (hot plate) (JENWAY, USA)
21. ช้อนตักสาร (spatula)

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Mueller-Hilton Agar (MHA) (Becton Dickinson and Company, USA)
2. Mueller-Hilton Broth (MHB) (Becton Dickinson and Company, USA)

3. Nutrient Agar (NA) (Merck, Germany)

4. Nutrient Broth(NB) (Merck, Germany)

3.1.3 สารเคมี

1. Standard McFarland No. 0.5

2. Sodium chloride (NaCl)

3. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Fisher Chemicals, England)

4. ยาปฏิชีวนะ

4.1 Ampicillin (T.P. Drug Laboratory, Thailand)

4.2 Tetracyclin (Sigma-Aldrich, Germany)

5. Methanol (Merck, Germany)

6. Ethanol (Merck, Germany)

7. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Germany)

8. 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (Sigma, Germany)

9. Acetic acid (Merck, Germany)

10. Acetone (Burdick & Jackson, Switzerland)

11. Aluminium chloride (Merck, Germany)

12. Butylated hydroxytoluene (BHT) (Sigma, Germany)

13. Chloroform (Carlo erba, Germany)

14. Ferrous sulphate (Loba chemie, India)

15. Folin-ciocalteu's reagent (Carlo erba, Germany)

16. Gallic acid (Fluka, Switzerland)

17. Hydrochloric acid (Carlo erba, Germany)

18. Iron (III) chloride hexahydrate (Merck, Germany)

19. Quercetin (Sigma, Germany)

20. Sodium acetate (Merck, Germany)

21. Sodium carbonate (Carlo erba, Germany)

22. Sodium nitrite (Univar, Australia)

3.1.4 เชื้อตัวอย่าง

เชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษา มีจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. subtilis* ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเก็บตัวอย่างโสน

เก็บส่วนลำต้น ใบและดอกโสน รหัสพรรณไม้อ้างอิง คือ ScBuu-Ny601 (ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้, 2557) และได้รับการยืนยันสายพันธุ์โดย ดร. เบญจวรรณ ชีวปรีชา (นักพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี) ในช่วงเดือนมิถุนายน – ตุลาคม 2558 จากบริเวณตำบลพระอาจารย์ อำเภองครักษ์ จังหวัดนครนายก จำนวน 2 กิโลกรัม โดยมีหลักในการคัดเลือกส่วนของโสน 2 วิธีได้แก่ 1) Random sampling คือหาง่ายและมีปริมาณมาก 2) Chemotaxonomic approach คือเลือกส่วนที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นำมาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เมื่อแห้งแล้วบดเป็นผงละเอียด เก็บไว้ในโถแก้วให้สัมพันธ์อากาศและแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2 การสกัดสาร

นำผงตัวอย่างลำต้น ใบ และดอกโสนมาสกัดด้วยตัวทำละลาย เมทานอล 80% ในอัตราส่วน 1: 5 สกัดโดยการแช่ในขวดโหล กวนหรือคนให้เข้ากัน แล้วปิดภาชนะทิ้งไว้ 6-7 วันที่อุณหภูมิห้อง ทำการสกัดสาร 3 ครั้ง เมื่อครบกำหนดนำสารทั้งหมดไปกรองแยกสารสกัดหยาบด้วยผ้าขาวบางแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 นำสารที่สกัดได้มาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ แล้วนำมาทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง จะได้สารสกัดหยาบซึ่งน้ำหนักของสารที่สกัดได้คำนวณร้อยละผลผลิต (% yield)

3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม

ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Misbah, Abdul, and Aminudin (2013) โดยนำสารสกัดความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร และสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติม 7% sodium carbonate ปริมาตร 1,250 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 1,000 ไมโครลิตร เพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลาเป็นเวลา 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกัน แสดงค่าในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัด (mg gallic acid equivalent (GAE)/g extract)

3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Srisawat et al. (2010) นำสารสกัดความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตรผสมกับ 5% Sodium Nitrite ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติม 10% aluminum chloride hexahydrate ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เติม Sodium hydroxide ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 240 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มีคเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกัน แสดงค่าในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์เซทินต่อกรัมของส่วนสกัด (mg quercetin equivalent (QE)/g extract)

3.2.5 การตรวจวัดเชิงคุณภาพของสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography, TLC) (คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา และสมาคมเพื่อการวิจัยอนุผลิตภัณฑ์ไทย, 2555)

การทำ TLC เริ่มด้วยการใช้แผ่น TLC Silica gel 60 F₂₅₄ เป็นวัสดุภาคนิ่ง จากนั้นนำส่วนสกัดจากโสมความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แด้ม (spotting) ลงบนแผ่น TLC ให้ห่างจากปลายด้านล่างขึ้นมาประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ไปจุ่มลงในขวดแก้วที่มีฝาปิดมิดชิด ซึ่งมีตัวทำละลายอยู่ ชนิดของส่วนผสมตัวทำละลายที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ แสดงดังตารางที่ 3-1 ตรวจสอบผลโดยการมองด้วยตาเปล่า และนำไปส่องด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร หากมองเห็นด้วยตาเปล่า และมองเห็นภายใต้แสง UV แสดงว่ามีสารโพลีฟีนอล ดังตารางที่ 3-1 เป็นองค์ประกอบอยู่

ตารางที่ 3-1 ชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้แยกสารโพลีฟีนอล

ชนิดของฟลาโวนอยด์	ชนิดของส่วนผสมตัวทำละลาย	อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้
ฟลาโวนอยด์	คลอโรฟอร์ม: เอธิลอะซิเตต	3: 2
ฟลาโวนที่มีหมู่เมทิลไดไฮดรอฟลาโวนอยด์	คลอโรฟอร์ม: เมทานอล	3: 1
ฟลาโวนอล ไอ-กลัยโคไซด์	คลอโรฟอร์ม: เอธิลอะซิเตต: อะซีโตน	5: 1: 4
ฟลาวาโนน ไอ-กลัยโคไซด์	คลอโรฟอร์ม: กรดแอซิติค	100: 4

3.2.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH

ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Mokbel and Hashinaga (2005) โดยปีเปตสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ใช้ Butylated hydroxytoluene (BHT) เป็นสารมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กำจัดอนุมูล ดังสมการที่ 1 พร้อมทั้งสร้างกราฟเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH เพื่อคำนวณเป็นค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้อนุมูล DPPH ลดลง 50% (IC_{50})

$$\text{เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH} = [A_a - (A_b - A_c) \times 100] / A_a \quad (\text{สมการที่ 1})$$

โดยที่ A_a คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ประกอบด้วยเมทานอลและสารละลาย DPPH ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม

A_b คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ประกอบด้วยตัวอย่างและสารละลาย DPPH เป็นชุดทดสอบ

A_c คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ประกอบด้วยตัวอย่างและน้ำกลั่น เป็นชุดทดสอบที่จะดูผลของตัวทำละลาย

3.2.7 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

วิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ ไชดานี บือราเฮง และชัชวิน เพชรเลิศ (2558) โดยผสมสารละลาย acetate buffer pH 3.6, TPTZ-HCl และ ferric chloride hexahydrate อัตราส่วน 10: 1: 1 จะได้เป็นสารละลายเอพอร์เอพี จากนั้นนำส่วนสกัดจากโสม ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายเอพอร์เอพี ปริมาตร 270 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 596 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกัน แสดงค่าในหน่วยมิลลิกรัมของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของส่วนสกัด ($mg \text{ FeSO}_4/g \text{ extract}$)

3.2.8 การเตรียมยาปฏิชีวนะ

3.2.8.1 เตรียมยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายยา Ampicillin และ Tetracyclin ปริมาณ 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 คืนเพื่อให้ยาละลายได้ดีขึ้น กรองยาแต่ละชนิดด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ปราศจากเชื้อ

3.2.8.2 เตรียมยาที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี 2-fold dilution นำยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากข้อ 8.1 มาเจือจางความเข้มข้นลงด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยเปิดยาปฏิชีวนะปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร จะได้ยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่งตามลำดับจนครบตามความเข้มข้นที่ต้องการ

3.2.9 การเตรียมสารสกัดจากโสม

3.2.9.1 เตรียมสารสกัดจากโสมที่ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายสารสกัดจากโสม ปริมาณ 0.8 กรัม ใน DMSO ปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้สารสกัดละลายได้ดีขึ้นกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ปราศจากเชื้อ

3.2.9.2 เตรียมสารสกัดจากโสมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี 2-fold dilution นำสารสกัดจากโสมที่ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากข้อ 9.1 มาเจือจางความเข้มข้นลงด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยเปิดสารสกัดจากโสมปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร จะได้สารสกัดจากโสมที่มีความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่งตามลำดับจนครบตามความเข้มข้นที่ต้องการ

3.2.10 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี agar well diffusion method และการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006)

3.2.10.1 เพาะเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.10.2 คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. subtilis* จำนวน 3-5 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Mueller-Hilton Broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง

3.2.10.3 นำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมาปรับค่าความขุ่นของแบคทีเรียให้มีค่าเท่ากับค่ามาตรฐาน Mc Farland 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) ด้วยสารละลาย 0.85% sodium chloride ปราศจากเชื้อ

3.2.10.4 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hilton Agar (MHA) ลงในหลอดทดลองหลอดละ 19 มิลลิลิตร นำไปอบด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

3.2.10.5 ปิเปตเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นแล้ว เชื้อละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร Mueller-Hilton Agar (MHA) ที่เตรียมไว้ เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ให้ อาหารแข็งและแบคทีเรียเจริญเติบโต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง

3.2.10.6 เจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 10.5 นำน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ DMSO methanol และ ethanol หยดลงในหลุมที่เจาะไว้ ปริมาณ 40 ไมโครลิตร นำยา ampicillin และ tetracyclin (ชุดเปรียบเทียบ) และสารสกัดจากโสม ที่ความเข้มข้น ต่างๆ หยดลงในหลุมที่เจาะไว้ ปริมาณ 40 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ อ่านผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ใน หน่วยเซนติเมตร บันทึกผลการทดลอง และนำไปหาค่า MIC

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของส่วนสกัดต่อ clear zone เชื้อแบคทีเรียก่อโรค และฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียโดยใช้ single factor analysis of variance วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ RBCD จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm sd) ความแตกต่างของข้อมูลถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Tukey โดยใช้โปรแกรม Minitab เวอร์ชัน 17.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การสกัดสาร

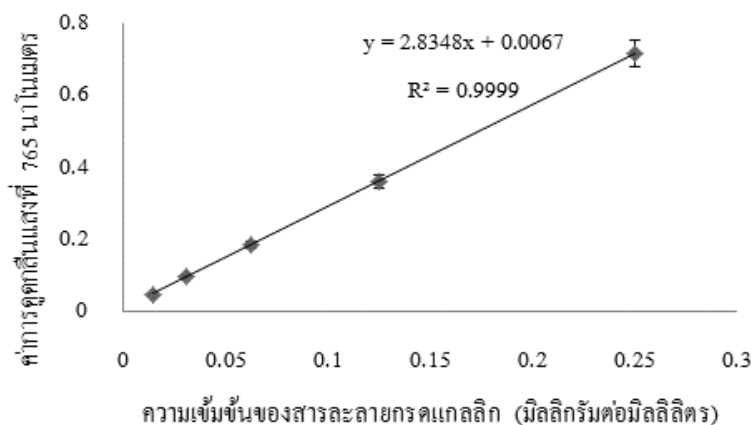
จากการนำผงตัวอย่างลำต้น ใบ และดอกโสนมาสกัดด้วยตัวทำละลาย เมทานอล 80% ในอัตราส่วน 1: 5 จะได้ร้อยละผลผลิต (% yield) ของลำต้น ใบ และดอกโสน คือ 1.78, 18.14 และ 10.28 ตามลำดับ ลักษณะทางกายภาพของลำต้น เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม ใบเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้มแกมเขียว และดอกเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้มแกมเหลือง (ตารางที่ 4-1)

ตารางที่ 4-1 ปริมาณส่วนสกัดและร้อยละผลผลิต (% yield) ส่วนของโสน

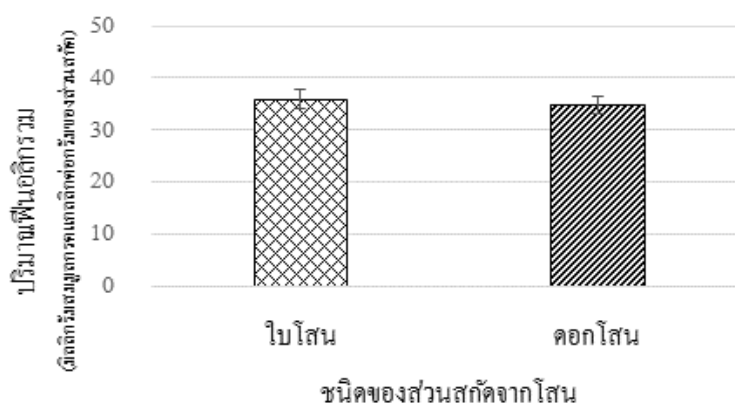
ส่วนของโสน	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	น้ำหนักส่วนสกัด (กรัม)	ร้อยละผลผลิต (% yield)	ลักษณะ ทางกายภาพ
ลำต้น	300	5.35	1.78	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลเข้ม
ใบ	500	90.71	18.14	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลเข้มแกมเขียว
ดอก	500	51.38	10.28	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลเข้มแกมเหลือง

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-2) พบว่า ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีปริมาณฟีนอลรวมเท่ากับ 35.93 ± 0.0004 และ 34.81 ± 0.0008 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัด ตามลำดับ การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก สมการเส้นตรงที่ได้คือ $y = 2.8348x + 0.0067$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9999 (ภาพที่ 4-1)



ภาพที่ 4-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกในการหาปริมาณฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน

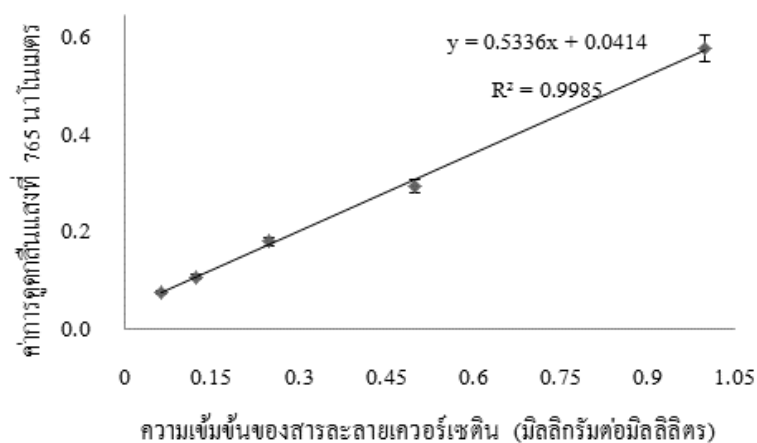


ภาพที่ 4-2 ปริมาณฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน

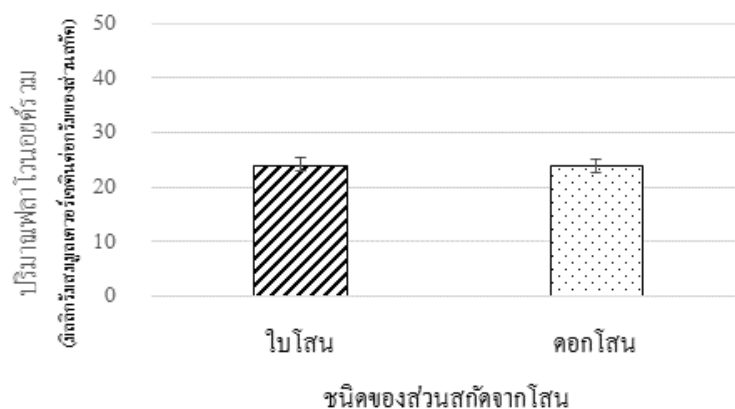
4.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-4) พบว่า ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีปริมาณ ฟลาโวนอยด์รวมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 24.11 ± 0.002 และ 23.90 ± 0.004 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์เชดินต่อกรัมของส่วนสกัด ตามลำดับ การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน

คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์เซติน สมการเส้นตรงที่ได้คือ $y = 0.5336x + 0.0414$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9985 (ภาพที่ 4-3)



ภาพที่ 4-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์เซตินในการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน



ภาพที่ 4-4 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน

4.4 ผลการตรวจวัดเชิงคุณภาพของสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

ผลการตรวจวัดเชิงคุณภาพของสาร โพลีฟีนอลชนิดต่างๆ ของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography, TLC) ด้วยการใช้แผ่น TLC Silica gel 60 F₂₅₄ เป็นวัฏภาคหนึ่ง ซึ่งมีตัวทำละลายอยู่ 4 ชนิด พบว่า สามารถมองเห็นด้วย

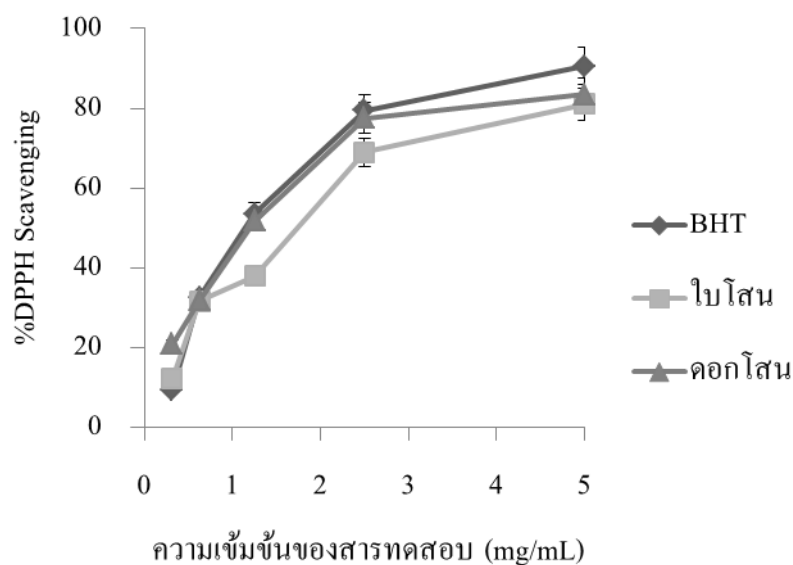
ตาเปล่า และมองเห็นภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร ในทุกระบบของตัวทำละลาย (ตารางที่ 3-1) ทำให้ทราบว่าส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ฟลาโวนที่มีหมู่เมทิลไดไฮดรอฟลาโวนอยด์ ฟลาโวนอล โอ-กลัยโคไซด์ และฟลาวาโนน โอ-กลัยโคไซด์ ดังผลที่แสดงไว้ในตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ผลการตรวจวัดเชิงคุณภาพของสาร โพลีฟีนอลชนิดต่างๆของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน

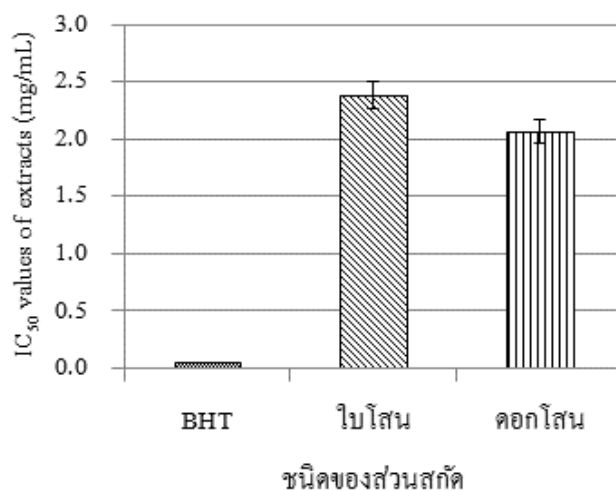
ชนิดของฟลาโวนอยด์	ส่วนสกัดจากใบ		ส่วนสกัดจากดอก	
	ตาเปล่า	UV	ตาเปล่า	UV
ฟลาโวนอยด์	+	+	+	+
ฟลาโวนที่มีหมู่เมทิล	+	+	+	+
ไดไฮดรอฟลาโวนอยด์				
ฟลาโวนอล โอ-กลัยโคไซด์	+	+	+	+
ฟลาวาโนน โอ-กลัยโคไซด์	+	+	+	+

4.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูล 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากดอกและใบโสนที่ความเข้มข้นในช่วง 0.312 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH[•] เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของส่วนสกัด โดยใบโสนมีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH[•] สูงสุด 74.37% ดอกโสน 80.83% และ BHT 90.78% (ที่ความเข้มข้นสูงสุดของ BHT = 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ค่า IC_{50} = 2.38, 2.07 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-5 และ 4-6)



ภาพที่ 4-5 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ของ BHT ส่วนสกัดจากใบและดอกโสม

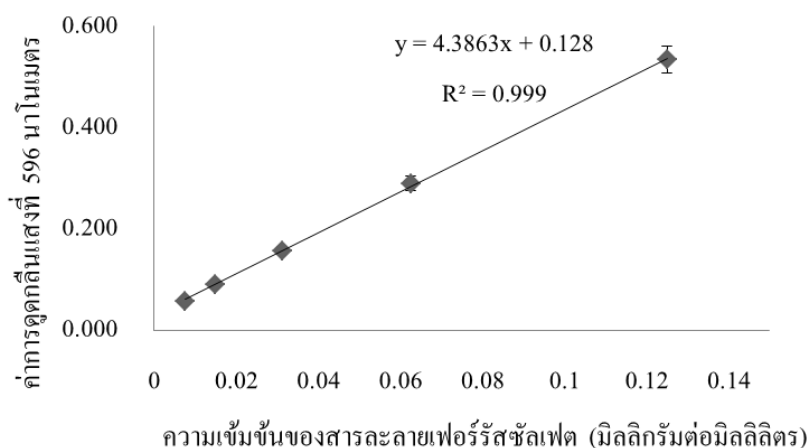


ภาพที่ 4-6 ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ของ BHT ส่วนสกัดจากใบและดอกโสม

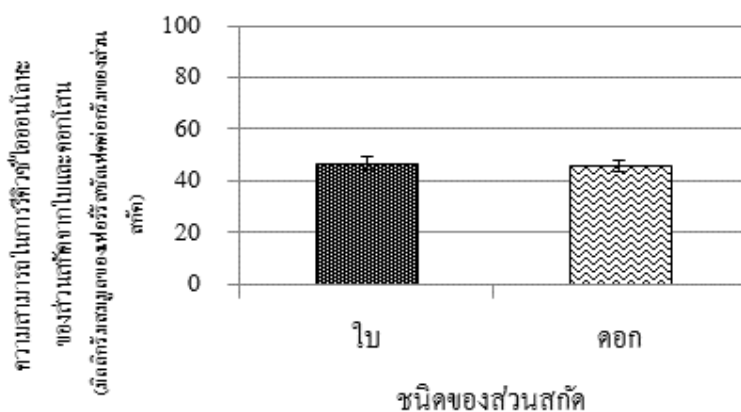
4.6 การวิเคราะห์ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของส่วนสกัดจากโสมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ส่วนสกัดจากใบและดอกโสมสามารถรีดิวซ์ไอออนเหล็ก (Fe^{3+}) ได้ไม่แตกต่างกัน โดยส่วนสกัดจากใบและดอกโสมมีค่า FRAP (FRAP value) เท่ากับ 46.89 ± 0.003 และ 45.90 ± 0.003 มิลลิกรัมสมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของส่วนสกัด ตามลำดับ

(ภาพที่ 4-8) การหาความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนโลหะของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน สามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต โดยสมการเส้นตรงที่ได้ คือ $y = 4.3863x + 0.128$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.999 (ภาพที่ 4-7)



ภาพที่ 4-7 กราฟมาตรฐานของสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟตในการหาความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนโลหะของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน



ภาพที่ 4-8 ความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนโลหะของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน

4.7 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar well diffusion method และการหาค่า Minimal Inhibition Concentration (MIC) ของส่วนสกัดจากโสน

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี agar well diffusion method และการหาค่า Minimal Inhibition Concentration (MIC) ของส่วนสกัดจากโสน โดยนำมาทดสอบฤทธิ์ต้าน

แบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก พบว่า ส่วนสกัดจากใบโสนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ได้ดีที่สุดใน (ค่า MIC เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาคือ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 (ค่า MIC เท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากัน) และยับยั้ง *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้น้อยที่สุด (ค่า MIC เท่ากับ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (ตารางที่ 4-3) ส่วนสกัดจากดอกโสนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ก็มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดใน (ค่า MIC เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาคือ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 (ค่า MIC เท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากัน) และยับยั้ง *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้น้อยที่สุด (ค่า MIC เท่ากับ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (ตารางที่ 4-4) ตัวควบคุมที่ใช้ในการทดสอบ คือ น้ำ เมทานอล เอทานอล และ DMSO พบว่า ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ โดยเมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่าส่วนสกัดจากใบและดอกโสน สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่แตกต่างกัน (ที่ระดับ 0.05)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของส่วนสกัดจากใบและดอกโสนกับยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดคือ เตตราซัยคลิน และแอมพิซิลิน (ตารางที่ 4-7) พบว่า ในภาพรวมเตตราซัยคลินให้ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าแอมพิซิลิน และดีกว่าส่วนสกัดจากใบและดอกโสน ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ เตตราซัยคลินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีกว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 (ค่า MIC เท่ากับ 0.01 และ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ส่วนในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก พบว่า เตตราซัยคลินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. subtilis* ไม่แตกต่างกัน แต่มีฤทธิ์ที่ดีกว่าใบและดอกโสน (ที่ระดับ 0.05) (ตารางที่ 4-5)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของส่วนสกัดจากใบและดอกโสนกับแอมพิซิลิน พบว่า ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ แอมพิซิลินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีกว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 (ค่า MIC เท่ากับ 0.01 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกพบว่า ยาแอมพิซิลิน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีกว่าเชื้อ *B. subtilis* (ค่า MIC เท่ากับ 0.001 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (ตารางที่ 4-6)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่แบคทีเรียถูกยับยั้งของแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่า ความเข้มข้นของส่วนสกัดสูงขึ้น ทำให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่แบคทีเรียถูกยับยั้งสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4-3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพส่วนสกัดจากใบโสนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก โดยวิธี Agar well diffusion method

เชื้อแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่แบคทีเรียถูกยับยั้งด้วยส่วนสกัดจากใบโสนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (เซนติเมตร) ± SD											ค่า MIC (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)
	80	40	20	10	5	2.5	1.25	สารควบคุม				
	มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	H ₂ O	MeOH	EtOH	DMSO	
แกรมลบ <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1.17±0.16	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	80
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	1.05±0.05	1.04±0.06	n	n	n	n	n	n	n	n	40
แกรมบวก <i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.10±0.05	0.95±0.05	n	n	n	n	n	n	n	n	n	40
	<i>B. subtilis</i>	1.24±0.08	1.00±0.04	0.92±0.03	n	n	n	n	n	n	n	20

หมายเหตุ n คือ ไม่เกิด clear zone

ตารางที่ 4-4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพส่วนสกัดจากดอกโสนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก
โดยวิธี Agar well diffusion method

เชื้อแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่แบคทีเรียถูกยับยั้งด้วยส่วนสกัดจากดอกโสนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (เซนติเมตร) ± SD												
	80	40	20	10	5	2.5	1.25	สารควบคุม				ค่า MIC	
	มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	H ₂ O	MeOH	EtOH	DMSO	(มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)
แกรมลบ	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1.10±0.10	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	80
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	1.13±0.10	0.93±0.03	n	n	n	n	n	n	n	n	n	40
แกรมบวก	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.32±0.03	1.05±0.09	n	n	n	n	n	n	n	n	n	40
	<i>B. subtilis</i>	1.06±0.05	0.86±0.04	0.80±0.00	n	n	n	n	n	n	n	n	20

หมายเหตุ n คือ ไม่เกิด clear zone

ตารางที่ 4-5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก โดยวิธี Agar well diffusion method

เชื้อแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่แบคทีเรียถูกยับยั้งด้วยยาเตตราซัยคลินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (เซนติเมตร) ± SD										สารควบคุม			
	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	H ₂ O	MeOH	EtOH	DMSO	
	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร					
แกรมลบ <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	4.55±0.05	4.43±0.08	3.90±0.09	3.50±0.23	3.42±0.14	3.10±0.10	2.88±0.03	2.45±0.05	1.85±0.00	n	n	n	n	
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	5.17±0.16	5.07±0.03	5.00±0.00	4.63±0.03	4.40±0.10	4.07±0.08	4.05±0.00	3.90±0.00	3.13±0.03	n	n	n	n
แกรมบวก <i>S. aureus</i> ATCC 25923	4.95±0.05	4.68±0.03	4.67±0.03	4.53±0.03	4.43±0.08	3.95±0.09	3.80±0.17	3.63±0.08	3.60±0.20	n	n	n	n	
	<i>B. subtilis</i>	3.88±0.03	3.83±0.03	3.75±0.10	3.43±0.03	3.30±0.00	3.00±0.00	2.83±0.08	2.82±0.13	2.58±0.03	n	n	n	n

หมายเหตุ n คือ ไม่เกิด clear zone

ตารางที่ 4-5 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่แบคทีเรียถูกยับยั้งด้วยยาเตตราไซคลิกลินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (เซนติเมตร) ± SD														
	0.16	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005	0.002	0.001	0.0006	สารควบคุม				ค่า MIC	
	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	H ₂ O	MeOH	EtOH	DMSO	(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
แกรมลบ <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1.85±0.00	1.40±0.00	0.88±0.01	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	0.040
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	2.55±0.00	2.20±0.00	1.95±0.05	1.57±0.06	0.87±0.06	n	n	n	n	n	n	n	n	0.010
แกรมบวก <i>S. aureus</i> ATCC 25923	3.27±0.28	2.90±0.00	2.72±0.08	2.48±0.08	2.15±0.00	1.73±0.06	1.25±0.05	0.94±0.03	n	n	n	n	n	n	0.001
	<i>B. subtilis</i>	2.45±0.05	2.18±0.03	2.10±0.00	1.92±0.03	1.47±0.06	1.23±0.03	1.07±0.03	0.93±0.08	n	n	n	n	n	0.001

หมายเหตุ n คือ ไม่เกิด clear zone

ตารางที่ 4-6 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาแอมพิซิลลินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก โดยวิธี Agar well diffusion method

เชื้อแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่แบคทีเรียถูกยับยั้งด้วยยาแอมพิซิลลินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (เซนติเมตร) ± SD												
	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	สารควบคุม			
	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	H ₂ O	MeOH	EtOH	DMSO
แกรมลบ <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2.25±0.10	2.00±0.05	1.73±0.13	1.70±0.10	1.65±0.00	0.98±0.03	0.88±0.03	n	n	n	n	n	n
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	5.18±0.06	4.80±0.09	4.53±0.25	4.30±0.05	4.28±0.24	4.20±0.30	3.98±0.03	3.63±0.32	3.20±0.00	n	n	n
แกรมบวก <i>S. aureus</i> ATCC 25923	7.08±0.03	6.88±0.03	6.73±0.03	6.53±0.03	6.38±0.08	4.13±0.55	3.98±0.28	3.17±0.33	2.97±0.06	n	n	n	n
	<i>B. subtilis</i>	2.10±0.19	2.13±0.03	2.00±0.00	1.95±0.05	1.90±0.00	1.60±0.00	1.47±0.06	1.33±0.06	1.22±0.03	n	n	n

หมายเหตุ n คือ ไม่เกิด clear zone

ตารางที่ 4-6 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่แบคทีเรียถูกยับยั้งด้วยยาแอมพิซิลลินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (เซนติเมตร) ± SD													
	0.16	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005	0.002	0.001	0.0006	สารควบคุม				ค่า MIC
	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	H ₂ O	MeOH	EtOH	DMSO	(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
แกรมลบ <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	1.25
	2.82±0.13	2.00±0.00	1.57±0.06	1.07±0.03	0.82±0.03	n	n	n	n	n	n	n	n	0.010
แกรมบวก <i>S. aureus</i> ATCC 25923	2.90±0.33	2.88±0.08	2.73±0.06	2.52±0.18	2.15±0.15	1.63±0.03	1.53±0.15	1.07±0.10	n	n	n	n	n	0.001
	1.20±0.00	1.10±0.10	1.02±0.10	0.70±0.00	n	n	n	n	n	n	n	n	n	0.020

หมายเหตุ n คือ ไม่เกิด clear zone

ตารางที่ 4-7 ประสิทธิภาพส่วนสกัดจากโสน และยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก โดยวิธี Agar Diffusion Susceptibility Method

เชื้อแบคทีเรีย	ค่า MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	ใบ	ดอก	เตตราไซคลิน	แอมพิซิลิน
แกรมลบ <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	80	80	0.040	1.25
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	40	40	0.010
แกรมบวก <i>S. aureus</i> ATCC 25923		40	40	0.001
	<i>B. subtilis</i>	20	20	0.001

บทที่ 5

อภิปราย และสรุปผล

อภิปรายผล

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน พบว่า ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมไม่แตกต่างกัน ซึ่งสารประกอบฟีนอลในพืชวงศ์นี้และพบในโสน อาจได้แก่ แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ และแทนนิน นอกเหนือจากสารประกอบฟีนอลแล้วยังพบสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ กัม ไตรเทอร์พีน และมิวซิเลจ (Kasture & Deshmukh, 2002; Doddola et al., 2008; Kumar & Naheed, 2012) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่ได้นำส่วนสกัดจากต้นโสนมาทดสอบ เนื่องจากมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการทดสอบ

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน พบว่า ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมไม่แตกต่างกัน และเมื่อนำส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมาตรวจวัดเชิงคุณภาพของสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) พบสารโพลีฟีนอลในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ฟลาโวนที่มีหมู่เมทิลไดไฮดรอฟลาโวนอยด์ ฟลาโวนอล ไอ-กลัยโคไซด์ และฟลาวาโนน ไอ-กลัยโคไซด์ ซึ่งใบและดอกโสน มีปริมาณสัดส่วนของสารโพลีฟีนอลที่ใกล้เคียงกัน และน่าจะประกอบด้วยสารกลุ่มฟลาโวนอล กลัยโคไซด์ เช่นเดียวกับรายงานของอุทัยวรรณ เลิศศักดิ์ศรีสกุล (2550) และ Tangvarasittichai et al. (2005) ที่ศึกษาสารบริสุทธิ์ในใบและดอกโสนด้วยการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (HPLC และ NMR spectroscopy ตามลำดับ) พบว่า ใบและดอกโสนประกอบด้วยสารบริสุทธิ์ ได้แก่ ฟลาโวนอล-กลัยโคไซด์ เควอร์เซติน-แรมโนซิล-รูติโนไซด์ เบต้า-ซิโตสเตอรอล กรดไฮดรอกซีซินนามิก จินีสทิน พรูเนติน และซิโตสเตอรอล-กลูโคไพราโนไซด์ ซึ่งพรูเนติน จินีสทิน และ กรดไฮดรอกซีซินนามิก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH TLC screening assay)

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจาก โสน โดยวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH[•] ซึ่งเป็นสารตั้งเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว มีสีม่วง พร้อมทั้งจะทำปฏิกิริยากับสารที่ให้อิเล็กตรอนหรือสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่ออนุมูล DPPH[•] รับอิเล็กตรอนมาแล้วสารละลายสีม่วงจะมีสีจางลงเป็นสีเหลือง (คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา และสมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย, 2555) จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน พบว่า ส่วนสกัดจากใบโสนและดอกโสนมีความสามารถในการให้

อิเล็กตรอนแก่อนุมูล DPPH[·] (IC₅₀ = 2.38 และ 2.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) แม้ว่าจะยังไม่ดีเท่ากับ BHT ที่ถูกใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (IC₅₀ = 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

การทดสอบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay) เป็นวิธีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยหลักการที่สารต้านอนุมูลอิสระสามารถให้อิเล็กตรอนกับสารประกอบเชิงซ้อน [Fe(III)(TPTZ)₂]³⁺ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น [Fe(II)(TPTZ)₂]²⁺ ปริมาณที่เกิดขึ้นของ [Fe(II)(TPTZ)₂]²⁺ สามารถใช้ในการประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556) ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากโสน พบว่าส่วนสกัดจากใบและดอกโสนสามารถให้อิเล็กตรอนได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการที่สารสกัดจากโสนสามารถให้อิเล็กตรอนได้นั้นอาจเป็นผลมาจากการมีสารกลุ่มแทนนิน คูมาริน ฟลาโวนอยด์ สเตียรอยด์ และไตรเทอร์พีน ที่มักพบในทุกส่วนของพืชวงศ์นี้ และจากการศึกษาของ Ouattara et al. (2011) และ Lee et al. (2014) พบว่า ส่วนสกัดเมทานอลจากใบแคซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกันมีค่า FRAP เท่ากับ 0.75 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมของส่วนสกัด ในขณะที่ส่วนสกัดจากใบโสนในการศึกษานี้มีค่า FRAP เท่ากับ 46.89±0.003 มิลลิกรัมสมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของส่วนสกัด อย่างไรก็ตาม ควรมีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการอื่นเพิ่มเติม เช่น วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS^{·+}), super peroxide anion radical และ hydrogen peroxide เพื่อศึกษากลไกอื่นในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar well diffusion method และการหาค่า Minimal Inhibition Concentration (MIC) ของส่วนสกัดจากโสน พบว่า ส่วนสกัดจากใบและดอกโสน มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ตามลำดับ (MIC = 20, 40, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของส่วนสกัดจากใบและดอกโสนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ พบว่า ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีกว่า *P. aeruginosa* ATCC 27853 อธิบายได้ว่า การที่เชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ATCC 27853 ตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะน้อยกว่า *E. coli* ATCC 25922 เพราะเชื้อมีความสามารถในการปรับตัวให้ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ดีกว่า *E. coli* ATCC 25922 ที่พบมากโดยเฉพาะในโรงพยาบาล โดยเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 มีความสามารถในการปรับตัวทางสรีรวิทยาสูงและเป็นเชื้อโรคฉวยโอกาสที่พบในมนุษย์ที่ระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ และยังพบว่าเชื้อ

P. aeruginosa มีอุปนิสัยการต่อต้านการคือยาปฏิชีวนะต่อไปนี้ penicillin G; aminopenicillin โดยสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ทำงานร่วมกับ cephalosporins ยากลุ่ม piperacillin; piperacillin และ tazobactam; cefepime; ceftazidime; aminoglycosides; quinolones และ carbapenems รวมทั้ง colistin และ fosfomycin ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการคือต่อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มขึ้นของ *P. aeruginosa* กับยาปฏิชีวนะจำนวนมากอันเป็นผลมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่มากเกินไป นำไปสู่การสะสมของความต้านทานยาปฏิชีวนะและเกิดความต้านทานระหว่างยาปฏิชีวนะและในรูปแบบ multidrug-resistance (MDR) (Yayan, Ghebremedhin, & Rasche, 2015) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก พบว่า ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ได้ดีกว่า *S. aureus* ATCC 25923 อธิบายได้ว่า เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 มักมีความสามารถในการปรับตัวให้คือต่อยาปฏิชีวนะได้ดีกว่า *B. subtilis* โดยมักพบว่าเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 สามารถต่อต้านยาปฏิชีวนะที่ใช้กันทั่วไปและมีประสิทธิภาพ ได้แก่ macrolides, lincosamides, streptogramin, tetracycline, gentamicin และ beta-lactams โดยเฉพาะ methicillin *S. aureus* ที่ทนต่อ Methicillin (MRSA) ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาในสถาบันการแพทย์ส่วนใหญ่ เพราะโรคที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* เป็นอันตรายที่คุกคามชีวิต นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ของเชื้อ MRSA ไปเป็นสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อ vancomycin *S. aureus* (VRSA) (Juayang, de los Reyes, de la, Rama & Gallega, 2014)

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ATCC 27853 กับ *S. aureus* ATCC 25923 พบว่า ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้น้อยกว่า *S. aureus* ATCC 25923 เนื่องจาก *P. aeruginosa* ATCC 27853 เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) และมีส่วนประกอบของไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ทางเดียวที่อาจจะผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ คือทางโปรตีนขนส่งพอริน (Porin) ที่ทำหน้าที่คัดเลือกเฉพาะสารที่เป็นประโยชน์ต่อเซลล์ และสารต้องมีขนาดเล็กพอที่จะผ่านพอรินเข้าไปได้ (Shan, Cai, Brooks, & Corke, 2007) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนเข้าไปทำลายแบคทีเรียแกรมลบได้ลำบากกว่า โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านแบคทีเรียที่อาจจะเป็นไปได้คือ 1) เข้าไปทำลายที่ผนังเซลล์ หรือการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ 2) รบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ในการขนส่งสารเข้าออกเซลล์ 3) ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน 4) ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ต่าง ๆ ที่จำเป็นในปฏิกิริยาเคมีของกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์ (นิชจิตร คลองดี, 2555)

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา พบว่า ฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค ซึ่ง Mohammed, El Souda, Taie, Moharam, and Shaker (2015) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของฟลาโวนอล กลัยโคไซด์ ที่สกัดจากใบกระถิน พบว่า มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *P.aeruginosa*, *S. aureus* และ *B. cereus* (%Inhibition = 72.08, 77.97, 34.05 และ 39.80 ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของโสมกับแค ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกัน จะเห็นได้ว่า โสมมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากกว่าแค แต่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่น้อยกว่าแค อธิบายได้ว่า แค มีสารสำคัญชนิดอื่นที่โสมไม่มี ซึ่งเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชวงศ์เดียวกัน

จะเห็นได้ว่า โสมเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการบริโภคอาหารที่มีประโยชน์แก่ร่างกาย ควรแก่การส่งเสริมให้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพิ่มขึ้นอีกทั้งยังสามารถนำไปพัฒนาต่อในด้านต่าง ๆ ได้ เช่น แยกสารบริสุทธิ์จากโสมมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ และนำสารบริสุทธิ์จากโสมมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ เพื่อเป็นการลดการใช้ยาปฏิชีวนะ ป้องกันการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรค ด้านอาหารช่วยชะลอความเสื่อมของดวงตา ด้านสุขภาพ โดยการนำมาทำชาเพื่อสุขภาพ สามารถทำเองได้ง่าย ไว้รับประทานได้ด้วยตัวเอง หรือจะพัฒนาส่งเสริมให้เป็นสินค้าประจำท้องถิ่นต่อไปได้

อย่างไรก็ตามควรนำส่วนสกัดจากโสมไปทดสอบความเป็นพิษก่อนใช้งานจริง เช่น การแยกสารบริสุทธิ์จากโสมและนำไปทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง หรือควรศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสารบริสุทธิ์ในโสมและนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่าง ๆ หรือฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น

สรุปผล

โสมอุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ในกลุ่มฟลาโวนที่มีหมู่เมทิล ไดไฮโดรฟลาโวนอยด์ ฟลาโวนอล โอ-กลัยโคไซด์ และฟลาโวนอน โอ-กลัยโคไซด์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ทั้งส่วนสกัดจากใบและดอกโสมมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีแม้จะยังไม่มากเท่ากับ BHT ก็ตาม นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แม้ว่าจะยังไม่ดีเท่ากับเตตราซัยคลินซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้กันในปัจจุบันก็ตาม

บรรณานุกรม

- กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวิณีย์ สีมานันท์, ปรียาภา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, เอกรัฐ ศรีสุข, กาญจนา หริ่มเพ็ง, เบญจวรรณ ชีวปรีชา และคำรณ เลียดประดม. (2557). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 19, 304–311.
- ไกรสิทธิ์ ตันติศิริพันธ์, ประภาศรี ภูวเสถียร และริญู เจริญศิริ. (2538). *โภชนาการและส่งเสริมสุขภาพ*. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา และสมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย. (2555). *คำร่าคู่มือการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง เทคนิคในการตรวจวัดอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และดัชนีภาวะเครียดออกซิเดชั่น*. เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์.
- ไชดานี ปือราเฮง และชัชวิน เพชรเลิศ. (2558). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากยี่หว่าดำและยี่หว่าขาว. ใน *รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 7"* (หน้า 1–6). พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- ธีรวุฒิ หวังอำนาจพร และรัชณี ไสยประจง. (2550). *ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและต้านสารอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรไทยบางชนิด*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พื้นฐาน, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย.
- นิชจิตร คลองดี. (2555). *กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของสารโมเลกุลเล็กที่ผลิตโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกจากอาหารหมัก*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นิติพงษ์ ศิริวงศ์ และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์. (2552). การดื้อยาปฏิชีวนะของ *Staphylococcus aureus* และแนวทางการควบคุม. *สงขลานครินทร์เวชสาร*, 27(4), 347–358.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 21(3), 275–286.
- เพ็ญภา ทรัพย์เจริญ. (2549). *พฤกษชาติสมุนไพร*. กรุงเทพฯ: สามเจริญพาณิชย์.
- ภัทรชัย กิรติสิน. (2552). *ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.
- วาริน แสงกิตติโกมล. (2546). การเปรียบเทียบปริมาณสารโพลีฟีนอลิกส์และปริมาณรวม การต้านสารอนุมูลอิสระในผักและสมุนไพร. *วารสารสหเวชศาสตร์*, 3, 91–99.

- สุธรรม อารีกุล. (2552). *องค์ความรู้เรื่องพืชป่าที่ใช้ประโยชน์ทางภาคเหนือของไทย เล่ม 3*.
เชียงใหม่: มูลนิธิโครงการหลวง.
- ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ กรมป่าไม้. (2557). *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์. ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2557*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.
- อรุณี รอดลอย, สุจินต์ หนูขวัญ และยุพเยาว์ สายจันทร์. (2555). *พรรณไม้น้ำในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย*. นนทบุรี: คุณาไทย.
- อิสยา จันทร์วิชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์. (2556). *แบคทีเรียทางการแพทย์ (พิมพ์ครั้งที่ 3)*.
กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อุทัยวรรณ เลิศศักดิ์ศรีสกุล. (2550). *การหาสูตรโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจากดอกและใบโสน*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีศึกษา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- อุไร จิรมงคลการ. (2547). *ผักพื้นบ้าน 2*. กรุงเทพฯ: อัมรินทร์พรินติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183–198.
- Arancibia, F., Bauer, T.T., Ewig, S., Mensa, J., Gonzalez, J., Niederman, M.S., & Torres, A. (2002). Community-acquired pneumonia due to gram-negative bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*: incidence, risk, and prognosis. *Archives of Internal Medicine*, 162, 1849–1858.
- China, R., Mukherjee, S., Sena, S., Bosea, S., Dattab, S., Koley, H., Ghosh, S., & Dhara, P. (2012). Antimicrobial activity of *Sesbania grandiflora* flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiological Research*, 167, 500–506.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2006). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. National Committee for Clinical Laboratory standards, Wayne, PA.
- Crossley, K.B., & Archer, G.L. (2009). *The Staphylococci in human disease*. USA: Blackwell.
- Dayananda, B., & Jaya, D. (2014). A review on pharmacological activity of *Sesbania grandiflora* Linn. *Columbia Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1, 40–43.

- Dhama, K., Tiwari, R., Chakraborty, S., Saminathan, M., Kumar, A., Karthik, K., Wani, M.Y., Amarpal, Singh, S.V., & Rahal, A. (2014). Evidence based antibacterial potentials of medicinal plants and herbs countering bacterial pathogens especially in the era of emerging resistance: an integrated update. *International Journal of Pharmacology*, *10*(1), 1-43.
- Doddola, S., Pasupulati, H., Koganti, B., & Koganti, V.S.R.G. (2008). Evaluation of *Sesbania grandiflora* for antiurolithiatic and antioxidant properties. *Journal of Natural Medicines*, *62*(3), 300–307.
- Gellatly, S.L., & Hancock, R.E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and hostdefenses. *Pathogens and Disease*, *67*, 159–173.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., & Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. MS, USA: Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Juayang, A.C., de los Reyes, G.B., de la Rama, A.J.G., & Gallega, C.T. (In press). Antibiotic resistance profiling of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical Specimens in a Tertiary hospital from 2010 to 2012. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*.
- Jung, H.W., Seo, U.K., Kim, J.H., Leem, K.H., & Park, Y.K. (2009). Flower extract of *Panax notoginseng* attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response via blocking of NF- κ B signaling pathway in murine macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, *122*, 313-319.
- Karthikeyan, P., Suresh, V., & Suresh, A. (2011). Wound healing activity of *Sesbania grandiflora* (L.) poir. bark. *International Journal of Pharmaceutics*, *3*(2), 87-93.
- Kasture, V.S., & Deshmukh, V.K. (2002). Anxiolytic and anticonvulsive activity of *Sesbania grandiflora* leaves in experimental animals. *Phytotherapy Research*, *16*(5), 455-460.
- Kumar, B.S., & Naheed, F.C. (2012). Analgesic and CNS depressant activity of the crude extract of *Sesbania grandiflora*. *International Current Pharmaceutical Journal*, *1*(3), 56-61.
- Kumar, S., Bajwa, B.S., Kuldeep, S., & Kalia, A.N. (2013). Anti-inflammatory activity of herbal plants: A review. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, *2*(2), 272–281.

- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., & Mitchell, R.N. (2007). *Robbins Basic Pathology* (8th ed.). United States of America: Elsevier Saunders.
- Laladhas, K.P., Cheriyan, V.T., Puliappadamba, V.T., Bava, S.V., Unnithan, R.G., Vijayammal, P.L., & Anto, R. J. (2010). A novel protein fraction from *Sesbania grandiflora* shows potential anticancer and chemopreventive efficacy, in vitro and in vivo. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 3(14), 636–646.
- Lander, H.M. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11, 118-124.
- Lee, J.H., Cho, S., Paik, H.D., Choi, C.W., Nam, K.T., Hwang, S.G., & Kim, S.K. (2014). Investigation on antibacterial and antioxidant activities, phenolic and flavonoid contents of some Thai edible plants as an alternative for antibiotics. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(10), 1461–1468.
- Lionis, C., Faresjo, A., Skoula, M., Kapsokefalou, M., & Faresjo, T. (1998). Antioxidant effects of herbs in Crete. *The Lancet*, 352, 1987-1988.
- Mequanint, W., Makonnen, E., & Urga, K. (2011). In vivo Anti-inflammatory activities of leaf extracts of *Ocimum lamiifolium* in mice model. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 32-36.
- Misbah, H., Abdul, A.A., & Aminudin, N. (2013). Antidiabetic and antioxidant properties of *Ficus deltoidea* fruit extracts and fractions. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(118), 1-12.
- Mohammed, R.S., El Souda, S.S., Taie, H.A.A., Moharam, M.E., & Shaker, K.H. (2015). Antioxidant, antimicrobial activities of flavonoids glycoside from *Leucaena leucocephala* leaves. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(6), 138-147.
- Mokbel, M.S., & Hashinaga, F. (2005). Antibacterial and antioxidant activities of banana (*Musa*, AAA cv. Cavandish) fruits peel. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 3, 125-131.
- Ouattara, M.B., Konaté, K., Kiendrébéogo, M., Ouattara, N., Compaore, M., Meda, R., Millogo-Rasolodimby, R., & Nacoulma, O.G. (2011). Antibacterial potential and antioxidant activity of polyphenols of *Sesbania grandiflora*. *Journal of Biological Sciences*, 3(4), 351–356.

- Pari, L., & Uma, A. (2003). Protective effect of *Sesbania grandiflora* against erythromycin estolate-induced hepatotoxicity. *Therapie*, 58(5), 439-443.
- Patil, R.B., Nanjwade, B.K., & Manvi, F.V. (2011). Antiinflammatory and anti-arthritic activity of *Sesbania grandiflora* and *Sesbania sesban* Bark in rats. *Advances in Pharmacology and Toxicology*, 12(1), 61-70.
- Ramesh, T., Mahesh, R., Sureka, C., & Begum, V.H. (2008). Cardioprotective effects of *Sesbania grandiflora* in cigarette smoke-exposed rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 52(4), 338-343.
- Ramesh, T., Sureka, C., Bhuvana, S., & Begum, V.H. (2010). *Sesbania grandiflora* diminishes oxidative stress and ameliorates antioxidant capacity in liver and kidney of rats exposed to cigarette smoke. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 61(4), 467-476.
- Rattanasena, P. (2012). Antioxidant and antibacterial activities of vegetables and fruits commonly consumed in Thailand. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(18), 77-82.
- Recio, M.C., Andújar, I., & Ríos, J.L. (2012). Anti-inflammatory agents from plants: Progress and potential. *Current Medicinal Chemistry*, 19, 2088–2103.
- Rimm, E.B., Ascherio, A., Giovannucci, E., Spiegelman, D., Stampfer, M. J., & Willett, W.C. (1996). Vegetable, fruit and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *The Journal of the American Medical Association*, 275, 447-451.
- Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2004). *Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases* (4th ed.). New York: McGraw Hill.
- Schroeder, C. M., Zhao, C., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D. D., McDermott, P. F., Walker, R. D., & Meng, J. (2002). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 576-581.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., & Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 10, 112-119.
- Sreelatha, S., Padma, P.R., & Umasankari, E. (2011). Evaluation of anticancer activity of ethanol extract of *Sesbania grandiflora* (Agati Sesban) against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(1), 984-987.

- Srisawat, U., Panunto, W., Kaendee, N., Tanuchit, S., Itharat, A., Lerdvuthisopon, N., & Hansakul, P. (2010). Determination of phenolic compounds, flavonoids, and antioxidant activities in water extracts of Thai red and white rice cultivars. *Journal of the Medical Association of Thailand*, *93*(7), S83-S91.
- Sroka, Z. (2005). Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Zeitschrift für Naturforschung*, *60*, 833-843.
- Steinmetz, K.A., & Pottor, J.D. (1996). Vegetable, fruit and cancer prevention: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, *96*, 1027-1039.
- Sunil, S.J., Kallanagoda, R.A., & Channabasappa, S.M. (2006). In vitro anthelmintic property of various seed oils. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *4*, 281-284.
- Tan, H.Y., Wang, N., Li, S., Hong, M., Wang, X., & Feng, Y. (2016). The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *4*, 1-16.
- Tangvarasittichai, S., Sriprang, N., Harnroongroj, T., & Changbumrung, S. (2005). Antimutagenic activity of *Sesbania javanica* Miq. flower DMSO extract and its major flavonoid glycoside. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, *36*(6), 1543-1551.
- Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., & Cross, C.E. (2000). Nitric oxide: a pro-inflammatory mediator in lung disease?. *Respiratory Research*, *1*, 67-72.
- Wagh, K.V., Wagh, V.D., Toshniwal, S.S., & Sonawane, B.R. (2012). Phytochemical, antimicrobial evaluation and determination of total phenolic and flavonoid contents of *Sesbania grandiflora* flower extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, *4*(4), 229-232.
- Yayan, J., Ghebremedhin, B., & Rasche, K. (In press). Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in pneumonia at a Single University hospital center in Germany over a 10-Year Period. *PLoS One*.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-1 การวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน

Test and CI for Two Variances: Phenolic vs Plant

95% CI for				
Plant	N	StDev	Variance	StDevs
1	3	0.000	0.000	(0.000, 0.003)
2	3	0.001	0.000	(0.000, 0.005)
Ratio of standard deviations = 0.539				
Ratio of variance = 0.291				
95% Confidence Intervals				
		CI for StDev		CI for Variance
Method		Ratio		Ratio
F		(0.086, 3.368)		(0.007, 11.342)
Tests				
			Test	
Method	DF1	DF2	Statistic	P-Value
F	2	2	0.29	0.451

สมมติฐานที่ทดสอบคือ

H_0 : ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีปริมาณฟีนอลิกรวมไม่แตกต่างกัน

H_a : ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีปริมาณฟีนอลิกรวมแตกต่างกัน

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณฟีนอลิกรวมได้ค่า p-value = 0.451 ซึ่งสูงกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงยอมรับสมมติฐานหลัก แสดงว่าส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีปริมาณฟีนอลิกรวมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-2 การวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณฟลาโวนอยด์ของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน

Test and CI for Two Variances: Flavonoids vs Plant

				95% CI for
Plant	N	StDev	Variance	StDevs
1	3	0.002	0.000	(0.001, 0.012)
2	3	0.004	0.000	(0.002, 0.027)
Ratio of standard deviations = 0.427				
Ratio of variance = 0.183				
95% Confidence Intervals				
		CI for StDev		CI for Variance
Method		Ratio		Ratio
F		(0.068, 2.668)		(0.005, 7.121)
Tests				
			Test	
Method	DF1	DF2	Statistic	P-Value
F	2	2	0.18	0.309

สมมติฐานที่ทดสอบคือ

H_0 : ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีปริมาณฟลาโวนอยด์ไม่แตกต่างกัน

H_a : ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีปริมาณฟลาโวนอยด์แตกต่างกัน

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณฟลาโวนอยด์ได้ค่า p-value = 0.309 ซึ่งสูงกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงยอมรับสมมติฐานหลัก แสดงว่าส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีปริมาณฟลาโวนอยด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน โดยวิธี
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Test and CI for Two Variances: EC50 vs Plant

Plant	N	StDev	Variance	95% CI for	
				StDevs	
1	3	0.090	0.008	(0.047, 0.563)	
2	3	0.026	0.001	(0.014, 0.166)	
Ratio of standard deviations = 3.388					
Ratio of variance = 11.476					
95% Confidence Intervals					
		CI for StDev		CI for Variance	
Method		Ratio		Ratio	
F		(0.542, 21.156)		(0.294, 447.571)	
Tests					
				Test	
Method	DF1	DF2	Statistic	P-Value	
F	2	2	11.48	0.160	

สมมติฐานที่ทดสอบคือ

H_0 : ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน

H_a : ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ค่า p-value = 0.160 ซึ่งสูงกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงยอมรับสมมติฐานหลัก แสดงว่าส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากใบและดอกโสนโดยวิธี
 Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

Test and CI for Two Variances: FRAP value vs Plant

Plant	N	StDev	Variance	95% CI for	
				StDevs	
1	3	0.003	0.000	(0.001, 0.018)	
2	3	0.003	0.000	(0.001, 0.016)	
Ratio of standard deviations = 1.114					
Ratio of variance = 1.241					
95% Confidence Intervals					
		CI for StDev		CI for Variance	
Method		Ratio		Ratio	
F		(0.178, 6.956)		(0.032, 48.388)	
Tests					
				Test	
Method	DF1	DF2	Statistic	P-Value	
F	2	2	1.24	0.893	

สมมติฐานที่ทดสอบคือ

H_0 : ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน

H_a : ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ค่า p-value = 0.893 ซึ่งสูงกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงยอมรับสมมติฐานหลัก แสดงว่าส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของส่วนสกัดจากใบโสน

General Linear Model: zone vs extract, bacteria

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	p-Value
extract	2	1.6666	0.8333	6.75	0.029
bacteria	3	0.6633	0.2211	1.79	0.249
Error	6	0.7412	0.1235		
Total	11	3.0711			

ทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับอิทธิพลของส่วนสกัดจากใบโสนที่ใช้ทดสอบ

สมมติฐานที่ทดสอบคือ

H_0 : ส่วนสกัดจากใบโสนทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อการทดลอง

H_a : มีส่วนสกัดจากใบโสนบางความเข้มข้นทำให้ผลการทดลองแตกต่างกัน

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน ได้ค่า p-value = 0.029 ซึ่งต่ำกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงปฏิเสธสมมติฐานหลัก แสดงว่าส่วนสกัดจากใบโสนบางความเข้มข้นมีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-6 ผลของส่วนสกัดจากใบโสน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Turkey's test

Test for Equal Variances: zone vs extract

Turkey Pairwise Comparisons: Response = zone, Term = extract

Grouping Information Using the Turkey Method and 95% Confidence

extract	N	Mean	Grouping
80	4	1.1400	A
40	4	0.7475	A
20	4	0.2300	B
			B

Means that do not share a letter are significantly different.

จากผลของ Turkey's test พบว่า ส่วนสกัดจากใบโสน ความเข้มข้น 80 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-7 ผลของส่วนสกัดจากใบโสน ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์
ด้วยวิธี Turkey's test

Test for Equal Variances: extract vs bacteria

Turkey Pairwise Comparisons: Response = zone, Term = bacteria

Grouping Information Using the Turkey Method and 95% Confidence

bacteria	N	Mean	Grouping
4	3	1.05333	A
1	3	0.69667	A
3	3	0.68333	A
3	3	0.39000	A

Means that do not share a letter are significantly different.

จากผลของ Turkey's test พบว่า ส่วนสกัดจากใบโสน มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของส่วนสกัดจากดอกโสน

General Linear Model: zone vs extract, bacteria

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	p-Value
extract	2	1.8175	0.9088	7.51	0.023
bacteria	3	0.4844	0.1615	1.33	0.348
Error	6	0.7260	0.1210		
Total	11	3.0280			

ทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับอิทธิพลของส่วนสกัดจากดอกโสนที่ใช้ทดสอบ

สมมติฐานที่ทดสอบคือ

H_0 : ส่วนสกัดจากดอกโสนทุกความเข้มข้น ไม่มีผลต่อการทดลอง

H_a : มีส่วนสกัดจากดอกโสนบางความเข้มข้นทำให้ผลการทดลองแตกต่างกัน

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน ได้ค่า p-value = 0.023 ซึ่งต่ำกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงปฏิเสธสมมติฐานหลัก แสดงว่าส่วนสกัดจากดอกโสนบางความเข้มข้นมีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-9 ผลของส่วนสกัดจากดอกโสน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Turkey's test

Test for Equal Variances: zone vs extract

Turkey Pairwise Comparisons: Response = zone, Term = extract

Grouping Information Using the Turkey Method and 95% Confidence

extract	N	Mean	Grouping
80	4	1.1525	A
40	4	0.7100	A
20	4	0.2000	B
			B

Means that do not share a letter are significantly different.

จากผลของ Turkey's test พบว่า ส่วนสกัดจากดอกโสน ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-10 ผลของส่วนสกัดจากดอกโสน ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ด้วยวิธี Turkey's test

Test for Equal Variances: extract vs bacteria

Turkey Pairwise Comparisons: Response = zone, Term = bacteria

Grouping Information Using the Turkey Method and 95% Confidence

bacteria	N	Mean	Grouping
4	3	0.906667	A
3	3	0.790000	A
1	3	0.686667	A
2	3	0.366667	A

Means that do not share a letter are significantly different.

จากผลของ Turkey's test พบว่า ส่วนสกัดจากดอกโสน มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน

General Linear Model: zone vs tet, bacteria

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	p-Value
tet	2	0.1960	0.098801	4.92	0.054
bacteria	3	2.7100	0.90332	45.32	0.000
Error	6	0.1196	0.01993		
Total	11	3.0256			

ทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับอิทธิพลของยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินที่ใช้ทดสอบ
สมมติฐานที่ทดสอบคือ

H_0 : ยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินทุกความเข้มข้น ไม่มีผลต่อการทดลอง

H_a : ยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินบางความเข้มข้นทำให้ผลการทดลองแตกต่างกัน

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน ได้ค่า p-value = 0.054 ซึ่งสูงกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05
จึงยอมรับสมมติฐานหลัก แสดงว่ายาปฏิชีวนะเตตราซัยคลินทุกความเข้มข้นมีผลในการยับยั้งเชื้อ
แบคทีเรียไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-12 ผลของยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ด้วยวิธี Turkey's test

Test for Equal Variances: zone vs bacteria

Turkey Pairwise Comparisons: Response = zone, Term = bacteria

Grouping Information Using the Turkey Method and 95% Confidence

bacteria	N	Mean	Grouping
1	3	5.08000	A
3	3	4.76667	A
2	3	4.29333	B
4	3	3.82667	C

Means that do not share a letter are significantly different.

จากผลของ Turkey's test พบว่า ยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุดในรองลงมาคือ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *B. subtilis* ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาพภาคผนวก ก-13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

General Linear Model: zone vs Am, bacteria

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	p-Value
Am	2	0.3701	0.1850	17.08	0.003
bacteria	3	50.2402	16.7467	1545.85	0.000
Error	6	0.0650	0.0108		
Total	11	50.6753			

ทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับอิทธิพลของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินที่ใช้ทดสอบ
สมมติฐานที่ทดสอบคือ

H_0 : ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินทุกความเข้มข้น ไม่มีผลต่อการทดลอง

H_a : ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินบางความเข้มข้นทำให้ผลการทดลองแตกต่างกัน

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน ได้ค่า p-value = 0.003 ซึ่งต่ำกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05
จึงปฏิเสธสมมติฐานหลัก แสดงว่ายาปฏิชีวนะแอมพิซิลินบางความเข้มข้นมีผลในการยับยั้งเชื้อ
แบคทีเรียได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ก-14 ผลของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ด้วยวิธี Turkey's test

Test for Equal Variances: zone vs bacteria

Turkey Pairwise Comparisons: Response = zone, Term = bacteria

Grouping Information Using the Turkey Method and 95% Confidence

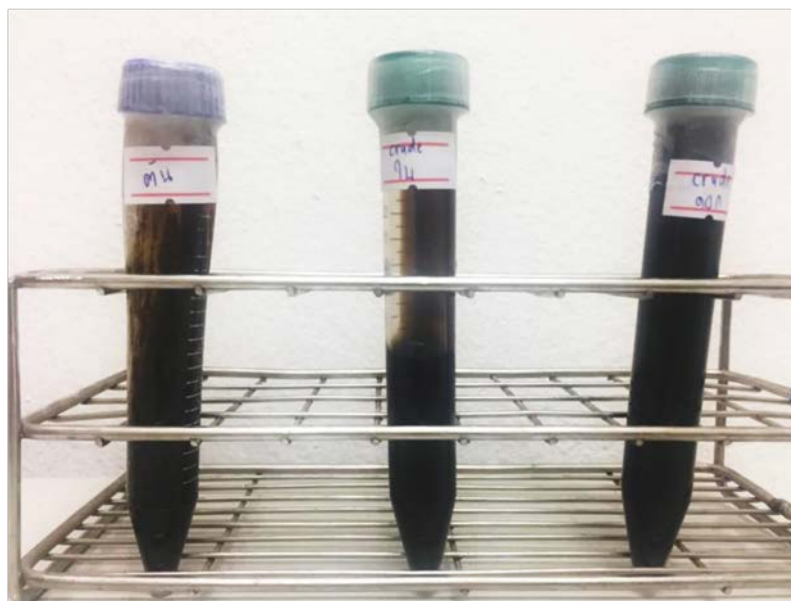
bacteria	N	Mean	Grouping
3	3	6.90333	A
1	3	4.83667	B
4	3	2.10333	C
2	3	1.99333	C

Means that do not share a letter are significantly different.

จากผลของ Turkey's test พบว่า ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *E. coli* ATCC 25922 ต่ำที่สุดคือ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *B. subtilis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาคผนวก ข

ลักษณะทางกายภาพของส่วนสกัดจากลำต้น ใบ และดอก โสน



ภาพภาคผนวก ข-1 ลักษณะทางกายภาพของส่วนสกัดจากลำต้น ใบ และดอก โสน

ภาคผนวก ค

ค่าการดูดกลืนแสงของส่วนสกัดที่ใช้ในการหาปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์
ความสามารถในการรีดิวซ์ไอออน โลหะ และเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH

ตารางภาคผนวก ค-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหา
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม						
ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (A_{765})			เฉลี่ย	SD
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
ไบโสน	1	0.107	0.108	0.110	0.108	0.002
ดอกโสน	1	0.106	0.106	0.102	0.104	0.002

ตารางภาคผนวก ค-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหา
ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม						
ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (A_{510})			เฉลี่ย	SD
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
ไบโสน	3	0.079	0.081	0.080	0.080	0.004
ดอกโสน	3	0.077	0.081	0.081	0.079	0.002

ตารางภาคผนวก ค-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 596 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหา
ความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนโลหะ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม
ต่อมิลลิลิตร

ความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนโลหะ						
ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (A_{596})			เฉลี่ย	SD
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
ไบโสน	1	0.326	0.328	0.348	0.334	0.012
ดอกโสน	1	0.322	0.344	0.342	0.336	0.012

ตารางภาคผนวก ก-4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH

สารทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสง (A_{517})										
	A_a	A_b					A_c				
		ความเข้มข้น (mg/mL)					ความเข้มข้น (mg/mL)				
		0.31	0.63	1.25	2.5	5	0.31	0.63	1.25	2.5	5
ไบโอสัน	0.477	0.129	0.134	0.257	0.375	0.448	0.013	0.002	-0.004	-0.007	-0.008
ดอกโสน	0.585	0.130	0.121	0.287	0.453	0.546	0.017	0.006	0.000	-0.002	-0.004
BHT	0.545	0.042	0.113	0.258	0.385	0.472	-0.008	-0.010	-0.009	-0.009	-0.006

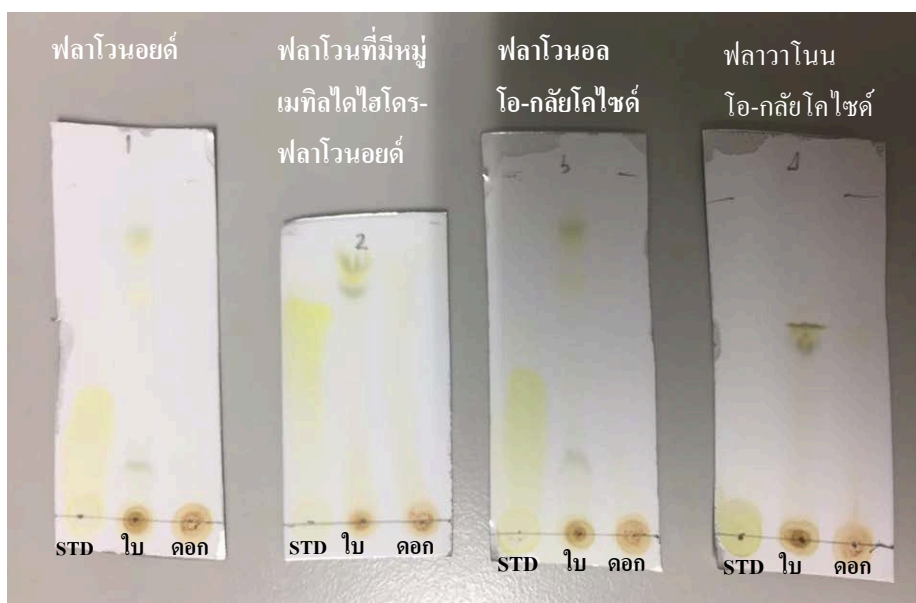
โดยที่ A_a คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ประกอบด้วยเมทานอลและสารละลาย DPPH ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม
 A_b คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ประกอบด้วยตัวอย่างและสารละลาย DPPH เป็นชุดทดสอบ
 A_c คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ประกอบด้วยตัวอย่างและน้ำกลั่นเป็นชุดทดสอบที่จะดูผลของตัวทำละลาย

ตารางภาคผนวก ค-5 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และ
ความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้อนุมูล DPPH ลดลง 50%

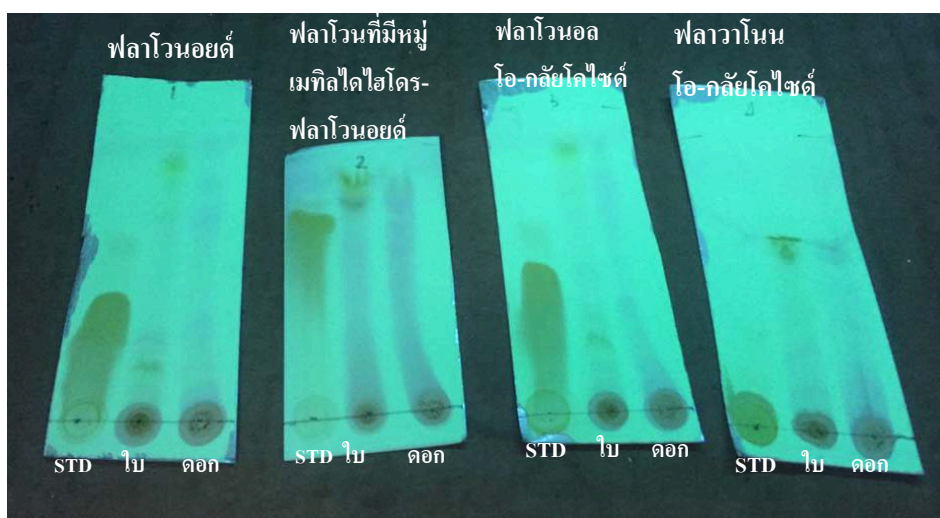
สารทดสอบ	%DPPH Scavenging					IC ₅₀ (mg/mL)
	ความเข้มข้นของสารทดสอบ (mg/mL)					
	0.31	0.63	1.25	2.5	5	
ไบโอสิน	4.40	20.77	47.23	72.42	74.37	2.38
ดอกโสน	5.96	22.23	51.23	80.35	80.83	2.07
BHT	12.02	27.52	50.89	77.58	90.78	0.05

ภาคผนวก ง

ผลการตรวจวัดเชิงคุณภาพของสาร โพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ
โดยวิธี โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

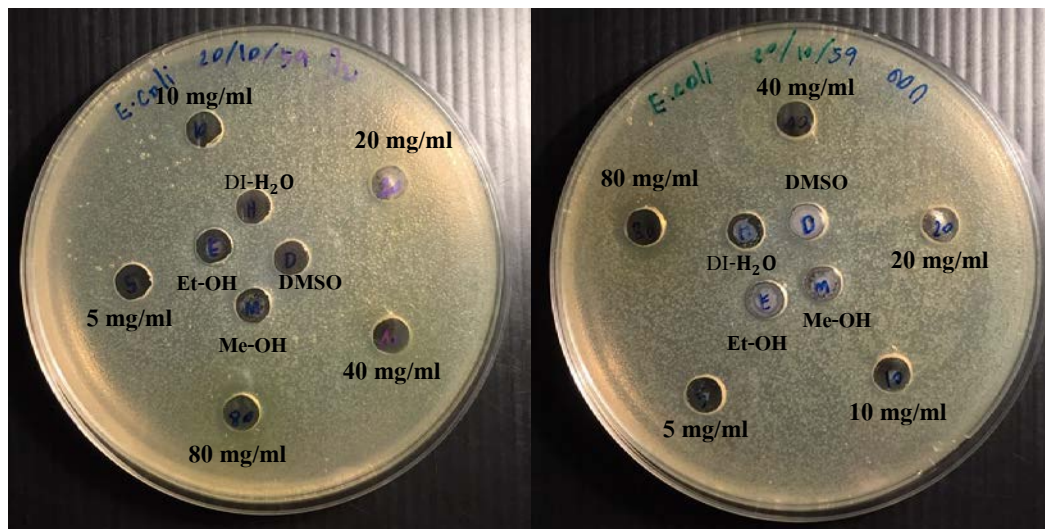


ภาพภาคผนวก ง-1 แผ่น TLC เมื่อตรวจสอบด้วยตาเปล่า



ภาพภาคผนวก ง-2 แผ่น TLC เมื่อนำไปส่องด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร

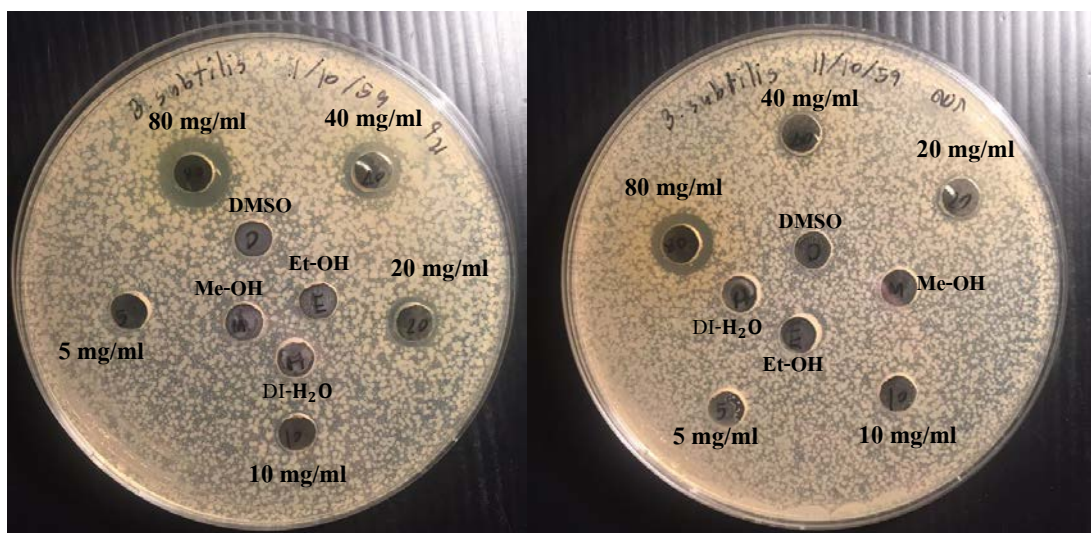
ภาคผนวก จ
ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย



ก.

ข.

ภาพภาคผนวก จ-1 Inhibition zone ประสิทธิภาพของส่วนสกัดจากโสนที่ความเข้มข้น 80, 40, 20, 10 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีต่อเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 (ก คือ ส่วนสกัดจากใบ, ข คือ ส่วนสกัดจากดอก)



ก.

ข.

ภาพภาคผนวก จ-2 Inhibition zone ประสิทธิภาพของส่วนสกัดจากโสนที่ความเข้มข้น 80, 40, 20, 10 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีต่อเชื้อ *B. subtilis* (ก คือ ส่วนสกัดจากใบ, ข คือ ส่วนสกัดจากดอก)

ภาคผนวก จ
สูตรอาหารและสารเคมี

1. Nutrient agar

Beef extract	3	กรัม
Gelatin peptone	5	กรัม
Agar (hardydiagnostics)	15	กรัม

นำส่วนผสมมาละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้ละลาย ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient broth

Beef extract	3	กรัม
Gelatin peptone	5	กรัม

นำส่วนผสมมาละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้ละลาย ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Mueller Hinton agar

Beef extract	2	กรัม
Casein acid hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar (hardydiagnostics)	17.0	กรัม

นำส่วนผสมมาละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้ละลาย ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Mueller Hinton broth

Beef extract	2	กรัม
Casein acid hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม

นำส่วนผสมมาละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้ละลาย ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. สูตรเตรียม McFarland Nephelometer Standards เบอร์ต่าง ๆ

สารเคมี	Tube number										
	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Barium Chloride (มิลลิลิตร)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Sulfuric acid (มิลลิลิตร)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Density (x 10 ⁸ CFU ต่อ มิลลิลิตร)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

6. สารละลายยาปฏิชีวนะ

1) ยาแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมยาโดยชั่งยา 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้เข้ากัน (อาจทิ้งไว้ 1 คืนเพื่อให้ยาละลายดีขึ้น) แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Pall corporation, USA)

2) ยาเตตราซัยคลิน ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมยาโดยชั่งยา 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้เข้ากัน (อาจทิ้งไว้ 1 คืนเพื่อให้ยาละลายดีขึ้น) แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Pall corporation, USA)

7. การเตรียม 0.85% NaCl

ชั่ง NaCl 0.85 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายแล้วนำมาเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที