ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย

นาย ทศพร ลีลา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF THAI HERBAL EXTRACTS

Mr. Tossaporn Leela

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย
โดย	นาย ทศพร ลีลา
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. บุญสม เลิศหิรัญวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนตรี วงศ์ศรี)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล)

…… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์)

…… กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรเทพ เขียวหอม)

…… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันเช็ง สิทธิกิจโยธิน)

ทศพร ลีลา : ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย. (ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF THAI HERBAL EXTRACTS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ. ดร. ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์, 97 หน้า

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทย คือ พลู กระชาย ข่า ตำลึง และเบญกานี ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*) และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli)* ด้วยวิธี Disc diffusion method โดยใช้ตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วที่แตกต่างกัน พบว่า สารสกัดจากเมทานอลสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบ สารสกัดหยาบของเบญกานีแสดงผลยับยั้งจุลินทรีย์ได้สูงสุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเฉลี่ยที่วัดได้จากสารสกัดเบญกานีมีค่าตั้งแต่ 10.3 ถึง 25.3 มิลลิเมตร ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อของสารสกัดมีค่าตั้งแต่ 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรถึง 1.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อมีค่า 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 1.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการผสมของสารสกัด 2 หรือ 3 ชนิด เพื่อทดสอบในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด การใช้สารสกัดประกอบกันจะเสริมฤทธิ์อย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับการใช้สารสกัดชนิดเดียว สารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดของเบญกานีระบุได้เป็นสารประกอบฟีนอลิก 14.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดคือที่เวลา 24 ชั่วโมง อุณหภูมิห้อง ขนาดอนุภาค 75 ไมโครเมตร อัตราส่วนตัวทำละลายต่อของแข็งเป็น 5:1 และใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดแสดงภาพของการสูญเสียโดยสมบูรณ์ของผิวเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ทดสอบทั้งหมดโดยสารสกัดของเบญกานี

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5270309021 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING
KEYWORDS : ANTIMICROBIAL ACTIVITY / EXTRACTION / SCANNIGN ELECTRON MICROSCOPE

TOSSAPORN LEELA: ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF THAI HERBAL EXTRACTS. ADVISOR: CHUTIMON SATIRAPIPATHKUL. CO-ADVISOR: MUENDUEN PHISALAPHONG, Ph.D., 97 pp.

This study evaluated the antimicrobial actiivities of crude extracts of traditional Thai herbs i.e. *Piper betle Linn, Boesenbergia pundurata, Alpinia galangal, Coccinia indica* and *Quercus infectoria* galls against both gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*) and gram-negative bacteria (*Escherichia coli*) by Disc diffusion method using solvents of different polarities. The results showed that the methanolic extracts can inhibit all the tested microbial strains. The crude extracts of *Q. infectoria* galls exhibited the highest antimicrobial activity. The average clear zone of the inhibition of *Q. infectoria* galls ranged from 10.3 to 25.3 mm. The minimum inhibition concentration values of the extracts ranged from 0.3125 mg/L to 1.250 mg/L whereas the minimum bactericidal concentration values ranged from 0.625 mg/L to 1.250 mg/L. The combinations of two or three herbal extracts were tested in three microbial strains. The combination of the exacts significantly enhanced their activity compared with a single extract. The antimicrobial compounds in the extracts of *Q. infectoria* galls were identified as phenolic compounds of 14.8 % by weight. The optimum conditions for the extraction were found at 24 h extraction time, room temperature, particle size of 75 μm, solvent to solid ratio of 5:1 and using methanol as solvent. Scanning electron microscopy illustrated a complete loss of cell surface and morphological changes of all the test microbial strains by the extracts of *Q. infectoria* galls.

Department : Chemical Engineering Student's Signature .....
Field of Study : Chemical Engineering Advisor's Signature .....
Academic Year : 2010 Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความอนุเคราะห์ ช่วยเหลือที่ดีจากบุคคลต่างๆ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อ.ดร.ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ รศ.ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางการวิจัย และให้ข้อคิดเห็นในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขและเพิ่มเติมวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตั้งแต่ต้นจนสำเร็จเป็นรูปเล่ม

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วย ผศ.ดร.มนตรี วงศ์ศรี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. สุรเทพ เขียวหอม และ ผศ.ดร.วันเซ็ง สิทธิกิจโยธิน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ทุนโครงการนำร่องมหาวิทยาลัยของรัฐ จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาสนับสนุนทุนวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาวิศวกรรมเคมี และเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ตลอดจนเพื่อน พี่และน้องๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ทุกคนในครอบครัว และท่านผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่ได้ให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าในการศึกษามาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

1.3 ขอบเขตการวิจัย..... 2

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ..... 2

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

2.1 องค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพร..... 3

2.2 การเตรียมสมุนไพรเพื่อการสกัด..... 4

2.3 กระบวนการสกัดส่วนสกัดหยาบ..... 5

2.3.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย..... 5

2.3.2 การสกัดสารจากของแข็ง..... 6

2.3.3 หลักการเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการแยก..... 6

2.3.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสมุนไพร..... 7

2.3.5 ประโยชน์ของการสกัดด้วยตัวทำละลาย..... 7

2.4 พลูกับการยับยั้งจุลินทรีย์..... 7

2.4.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดพลูที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์..... 8

2.5 กระชายกับการยับยั้งจุลินทรีย์..... 11

2.5.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดกระชายที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์... 12

2.6 ข่ากับการยับยั้งจุลินทรีย์..... 13

2.6.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดข่าที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์..... 14

2.7 ตำลึงกับการยับยั้งจุลินทรีย์..... 18

บทที่ หน้า

2.7.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดตำลึงที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์..... 18

2.8 เบญกานีกับการยับยั้งจุลินทรีย์..... 19

2.8.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดเบญกานีที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์.. 20

2.9 จุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหาร..... 23

2.9.1 แบคทีเรีย..... 23

2.9.2 ยีสต์..... 24

2.9.3 รา..... 25

2.10 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์..... 27

2.10.1 Dilution test..... 27

2.10.2 Diffusion test..... 28

3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 40

3.1 อุปกรณ์..... 40

3.2 เคมีภัณฑ์..... 41

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ..... 41

3.4 สมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ..... 41

3.5 วิธีเตรียมการสกัดสมุนไพร..... 42

3.6 วิธีการเพาะจุลินทรีย์จากหลอดเชื้อแห้งแข็ง..... 42

3.7 วิธีการเตรียมสารละลายเชื้อเข้มข้น..... 42

3.8 วิธีทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์..... 43

3.8.1 ทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion method..... 43

3.8.2 วิธีหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดจากสมุนไพร..... 43

3.8.3 วิธีหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ของสารสกัดจากสมุนไพร..... 44

3.8.4 วิธีศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เวลาต่างๆ..... 44

3.8.5 วิธีศึกษาประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจากสารสกัดผสม.. 44

บทที่ หน้า

3.9 วิธีศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากสมุนไพรแต่ละชนิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน..... 44

3.10 วิธีศึกษาอิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการสกัดอนุภาคสมุนไพรในแต่ละขนาดโดยวัดจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิก..... 45

3.11 วิธีศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์จุลินทรีย์..... 45

3.12 วิธีศึกษาผลของตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพืชสมุนไพร..... 45

4 ผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง..... 46

4.1 น้ำหนักสมุนไพรก่อนและหลังอบแห้ง..... 46

4.2 การสกัดสารจากสมุนไพร..... 48

4.3 ผลทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์..... 52

4.3.1 ผลทดสอบการหาบริเวณยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Disc diffusion method..... 52

4.3.2 ผลทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) ของสารสกัดจากสมุนไพร..... 61

4.3.3 ผลทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC) ของสารสกัดจากสมุนไพร..... 68

4.3.4 ผลของสารสกัดจากสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เวลาต่างๆ..... 69

4.3.5 ผลทดสอบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากสารสกัดผสม..... 71

4.4 ผลการศึกษาสารประกอบฟีนอลิกจากสมุนไพรไทย..... 73

4.5 ผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดอนุภาคของสมุนไพรในแต่ละขนาดโดยวัดจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิก..... 76

4.6 ผลของสารสกัดจากสุมนไพรต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์จุลินทรีย์..... 77

4.7 ผลของตัวทำละลายต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพืชสมุนไพร..... 80

บทที่ หน้า
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 85
5.1 สรุปผลการวิจัย..... 85
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 86
รายการอ้างอิง..... 87
ภาคผนวก..... 90
ภาคผนวก ก การคำนวณ..... 91
ภาคผนวก ข ข้อมูลทางการทดลองและกราฟมาตรฐาน..... 92
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 97

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติของตัวทำละลายบางชนิดที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร.....	5
2.2	สมุนไพรและสารสำคัญในสารสกัดสมุนไพรที่นำไปใช้ประโยชน์.....	22
2.3	จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร.....	27
2.4	ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดพลูที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์.....	29
2.5	ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดกระชายที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์.....	32
2.6	ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดข่าที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์.....	34
2.7	ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดตำลึงที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์.....	36
2.8	ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดเบญกานีที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์.....	38
4.1	น้ำหนักสมุนไพร 1 กิโลกรัม ภายหลังการอบแห้ง.....	48
4.2	ปริมาณของสารสกัดที่ได้จากการสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ.....	49
4.3	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ...	52
4.4	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดพลูที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์.....	63
4.5	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดกระชายที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์.....	64
4.6	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดข่าที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์.....	65
4.7	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดตำลึงที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์.....	66
4.8	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเบญกานีที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์.....	67
4.9	ความเข้มข้นต่ำสุดของสุมนไพรแต่ละชนิดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์.....	69
4.10	ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดเบญกานีที่เวลาต่างๆ.....	70
4.11	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดผสมจากสมุนไพรไทย.....	71
4.12	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากสมุนไพรด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ....	74
ข1.1	สารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดพลูด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ.....	92
ข1.2	สารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดกระชายด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ.....	92
ข1.3	สารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดข่าด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ.....	92
ข1.4	สารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดตำลึงด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ.....	93
ข1.5	สารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดเบญกานีด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ.....	93
ข1.6	สารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดสมุนไพรอนุภาคขนาดต่างๆ ตามเวลา.....	93
ข1.7	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพรด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ.....	95
ข1.8	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดผสมจากสมุนไพรไทย.....	96

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	พลู	7
2.2	โครงสร้างทางเคมีของ Eugenol	10
2.3	โครงสร้างทางเคมีของ Hydroxychavicol	10
2.4	กระชาย	11
2.5	โครงสร้างทางเคมีของ Geraniol	13
2.6	ข่า	13
2.7	โครงสร้างทางเคมีของ 1,8-cineole	15
2.8	โครงสร้างทางเคมีของ Methyl chavicol	16
2.9	โครงสร้างทางเคมีของ 1'-Acetoxychavicol acetate	16
2.10	ตำลึง	18
2.11	เบญกานี	19
2.12	โครงสร้างทางเคมีของแทนนิน	21
2.13	ลักษณะแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus*	24
2.14	ลักษณะแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas*	24
2.15	ลักษณะยีสต์ *Saccharomyces*	25
2.16	ลักษณะรากลุ่ม *Aspergillus*	26
2.17	ลักษณะรากลุ่ม *Penicillium*	26
4.1	พลูก่อนและหลังอบแห้ง	46
4.2	กระชายก่อนและหลังอบแห้ง	46
4.3	ข่าก่อนและหลังอบแห้ง	47
4.4	ตำลึงก่อนและหลังอบแห้ง	47
4.5	เบญกานีก่อนและหลังอบแห้ง	47
4.6	สารสกัดพลูที่ได้หลังจากระเหยตัวทำละลาย	50
4.7	สารสกัดกระชายที่ได้หลังจากระเหยตัวทำละลาย	51
4.8	สารสกัดข่าที่ได้หลังจากระเหยตัวทำละลาย	51
4.9	สารสกัดตำลึงที่ได้หลังจากระเหยตัวทำละลาย	51
4.10	สารสกัดเบญกานีที่ได้หลังจากระเหยตัวทำละลาย	52

ภาพที่ หน้า

4.11 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดพลูจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ..... 56
4.12 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดกระชายจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ..... 57
4.13 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดข่าจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ..... 58
4.14 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดตำลึงจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ..... 59
4.15 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดเบญกานีจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ..... 60
4.16 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* จากสารสกัดผสม..... 72
4.17 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* จากสารสกัดผสม..... 72
4.18 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. areus* จากสารสกัดผสม..... 73
4.19 ผลของขนาดของอนุภาคเบญกานีที่มีต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิก ที่เวลาต่างๆ..... 76
4.20 เชื้อ *E. coli* ก่อนและหลังได้รับสารสกัด..... 78
4.21 เชื้อ *B. subtilius* ก่อนและหลังได้รับสารกัด..... 78
4.22 เชื้อ *S. areus* ก่อนและหลังได้รับสารสกัด..... 79
4.23 เบญกานีก่อนการสกัด..... 80
4.24 เบญกานีหลังสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล..... 81
4.25 เบญกานีหลังสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล..... 82
4.26 เบญกานีหลังสกัดด้วยน้ำกลั่น..... 82
4.27 เบญกานีหลังสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน..... 83
4.28 เบญกานีหลังสกัดด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม..... 84

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น เนื้อสัตว์ ผัก และผลไม้ เพื่อการจำหน่ายโดยทั่วไปนั้น จะมีอายุการเก็บรักษาได้แตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประเภทของอาหารและวิธีการเก็บรักษาที่ใช้ เนื่องจากอาหารส่วนใหญ่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียได้เร็วขึ้นและมีอายุการเก็บรักษาได้ไม่นาน ดังนั้นจึงทำให้มีการเติมวัตถุกันเสียลงไปในอาหารเพื่อชะลอหรือยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเน่าเสีย ทำให้สามารถเก็บรักษาอาหารได้นานขึ้น วัตถุกันเสียที่นิยมใช้ในปัจจุบันมักเป็นกลุ่มกรดอ่อน เช่น กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอท เป็นต้น หากมีการใช้ในปริมาณที่มากจนเกินกำหนด อาจทำให้ผู้บริโภคได้รับสารเหล่านี้มากเกินความจำเป็น ก่อให้เกิดผลเสียต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคได้

จากการค้นคว้างานวิจัยต่างๆ พบว่า สารสกัดจากพืชสมุนไพรในธรรมชาติมีความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถใช้สารสกัดจากพืชธรรมชาติแทนการใช้สารเคมีที่เป็นวัตถุกันเสีย อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่พืชสมุนไพรชนิดนั้นๆได้อีกด้วย การนำสารสกัดเหล่านี้มาเป็นส่วนผสมในการผลิตแผ่นฟิล์มห่ออาหารเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เหมาะสมและสามารถไปใช้ประโยชน์ได้จริง เป็นจุดขายทางการตลาดเกี่ยวกับความปลอดภัยของผู้บริโภค เนื่องจากในปัจจุบันการใช้ส่วนประกอบจากธรรมชาติกำลังเป็นที่นิยมในระดับสากล

การศึกษาสารสกัดจากพืชสมุนไพรทดแทนการใช้สารเคมีที่เป็นวัตถุกันเสีย จึงมีความจำเป็นที่จะต้องได้ข้อมูลจากการทดลอง เพื่อหาวิธีและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด เพื่อให้ได้สารสกัดมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มตัวอย่างที่สนใจ รวมทั้งศึกษากลไกการออกฤทธิ์ อันเป็นข้อมูลที่สำคัญต่อการพัฒนาสารสกัดจากพืชสมุนไพรธรรมชาติซึ่งสามารถผลิตใช้ในอุตสาหกรรมอาหารทำให้ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1. สกัดสารจากสมุนไพรไทย พลู กระชาย ข่า ตำลึง และเบญกานี และตรวจหาสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบว่ามีการปนเปื้อนในอาหาร

2. ทดสอบความไวของเชื้อแต่ละชนิดต่อสารสกัดชนิดต่างๆ ด้วยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Inhibition Concentration, MIC) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) และ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เวลาต่างๆ

3. ศึกษาประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากสารสกัดผสม

4. ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

5. ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดสมุนไพรที่ขนาดอนุภาคต่างๆ ตามเวลา

6. ศึกษาผลของสารสกัดจากสุมนไพรต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์จุลินทรีย์ โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

7. ศึกษาผลของตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพืชสมุนไพร โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้วิธีการที่เหมาะสมในการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์จากสมุนไพรไทย และได้ข้อมูลสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในอาหารซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อประยุกต์ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การค้นคว้าวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้พืชสมุนไพรเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในประเทศไทยมักจะเน้นเฉพาะทางด้านการแพทย์เนื่องจากพบว่าสารสกัดจากสมุนไพรสามารถนำมาใช้เป็นยาหรือเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของยารักษาโรคที่เกิดขึ้นกับมนุษย์ได้ แต่ก็มีการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรมาประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางค์ จากการค้นคว้างานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีข้อมูลบางอย่างที่น่าสนใจที่แสดงให้เห็นว่า พืชสมุนไพรหลายชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้

2.1 องค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพร

องค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรในแต่ละชนิดมีสารสำคัญที่สามารถออกฤทธิ์ได้แตกต่างกัน ซึ่งสารเคมีที่ได้ล้วนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากการสังเคราะห์แสงของพืช พืชสมุนไพรบางชนิดนำมาใช้ปรุงแต่งอาหารเพื่อเพิ่มรสชาติได้อีกด้วย เช่น กระชาย ข่า และตำลึง เป็นต้น สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางยาของพืชสมุนไพรที่มีผลต่อร่างกาย สามารถแยกได้ดังนี้

2.1.1 ฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟลาโวนอยด์อาจเรียกได้ว่าเป็นสาร Nutraceutical ซึ่งหมายถึง อาหารหรือองค์ประกอบของอาหารที่สามารถนำมาใช้เป็นยา หรือมีประโยชน์ต่อสุขภาพ ทั้งในด้านการป้องกัน และการรักษาโรค โดยพบประโยชน์มากมาย ได้แก่

สารต้านอนุมูลอิสระ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถช่วยป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ และเนื้อเยื่อร่างกายจากอนุมูลอิสระและออกซิเจนอิสระ

สารต้านจุลินทรีย์ เช่น สารเควอเซติน มีคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรีย สารโนบิลิติน แทนเจอเรติน และเฮสเพอริดิน มีคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อรา

สารต้านเชื้อไวรัส เช่น สารเควอซิติน มอริน รูติน ไดไฮโดรเควอซิติน เอพิจีนิน คะเตชินและเฮสเพอริดิน ช่วยในการต้านทานไวรัสได้ 11 ชนิด

สารต้านการอักเสบ เช่น สารเคมเฟอรอล เควอซิติน ไมริเซติน และฟิเซอติน

ผลต่อระบบไหลเวียนโลหิตพบว่าการได้รับสารฟลาโวนอยด์จะช่วยป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง

2.1.2 อัลคาลอยด์ คือสารจากพืชที่มีคุณสมบัติในทางการแพทย์และมีธาตุไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ ตัวอย่างของอัลคาลอยด์ ได้แก่

อะโทรพีน สกัดได้จากพืช *Hyoscyamus Niger* คุณสมบัติใช้เป็นยาแก้อาการที่เกิดจากแก๊สพิษ ที่มีผลต่อระบบประสาท

โคเคอีน สกัดได้จากพืช *Erythroxylon coca* คุณสมบัติใช้เป็นยาสลบได้ มีผลในเชิงกระตุ้นระบบประสาทอย่างแรง

โคดีอีน สกัดได้จากพืช *Papaver somniferum* คุณสมบัติ มีผลในทางแก้ปวดและแก้ไอ

2.1.3 แทนนิน เป็นสารให้ความฝาดในพืช พบได้ในพืชหลายชนิด มีคุณสมบัติตกตะกอนโปรตีน ทำให้หนังสัตว์ไม่เน่าเปื่อยจึงมีการใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนังด้วย แทนนินมีฤทธิ์ฝาดสมานจึงใช้เป็นยารักษาโรคท้องเสียได้ และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ ตัวอย่างแทนนิน ได้แก่ ทีโอแกลลิน กรดแกลลิก และกรดเอลลาจิก เป็นต้น

2.1.4 น้ำมันหอมระเหย เป็นสารที่อยู่ในพืช โดยทั่วไปมีกลิ่นหอม เป็นส่วนผสมของสารเคมีหลายชนิดประเภทเทอร์พีน มีฤทธิ์ขับลม สารเหล่านี้หลายชนิดใช้ปรุงแต่งกลิ่นยา กลิ่นอาหาร ใช้เป็นน้ำหอม และบางชนิดมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

2.1.5 ไกลโคไซด์ เป็นสารประกอบซึ่งมี 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำตาล และส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล การมีน้ำตาลมาเกาะทำให้สารนั้นละลายน้ำได้ดีขึ้น ส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลเป็นพวกอินทรีย์เคมี ซึ่งมีสูตรโครงสร้างและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาแตกต่างกันออกไป เช่น ถ้าเป็นสารแอนทราควิโนนจะมีฤทธิ์เป็นยาถ่าย ถ้าเป็นสเตียรอยด์หรือไตรเทอร์พีน จะมีฤทธิ์ลดการอักเสบหรือขยายหลอดลม เป็นต้น

2.1.6 กัม เป็นสารเหนียวที่พบในพืชบางชนิด จะพบเมื่อเรากรีดหรือทำให้พืชเหล่านั้นเป็นแผลซึ่งบางชนิดใช้ในทางยา ปัจจุบันนิยมใช้กันแพร่หลายมากขึ้นด้วยวัตถุประสงค์ต่างๆกัน เช่น ช่วยให้อาหารมีความข้นหนืด ช่วยให้มีอีมัลชั่น สารแขวนลอยและฟองคงตัวและช่วยให้เกิดเจล

2.1.7 ลาเท็กซ์ เป็นยางสีขาวเหมือนน้ำนม ประกอบด้วย กัม เรซิน และสารอื่นๆ บางชนิดมีสารเคมี ซึ่งเมื่อรวมกับสารบางอย่างจะทำให้เกิดมะเร็ง

2.1.8 สเตียรอยด์ เป็นสารประกอบในพืชที่ละลายได้ดีในไขมันหรือตัวทำละลายที่ละลายไขมันได้ สารในกลุ่มนี้บางตัวใช้ในสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยาต้านการอักเสบ

2.1.9 ซาโปนิน เป็นสารประเภทไกลโคไซด์ อาจเป็นสเตียเรอยด์หรือไตรเทอร์พีน ซึ่งซาโปนินมีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เป็นพิษต่อสัตว์เลือดเย็น

2.1.10 ไซยาโนจินิกไกลโคไซด์ เป็นสารเคมีที่มีอยู่ในพืช เมื่อถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เกิดปฏิกิริยาทางเคมี จะให้ไซยาไนด์ซึ่งเป็นพิษต่อร่างกาย

2.2 การเตรียมสมุนไพรเพื่อการสกัด

พืชสมุนไพรที่นำมาสกัดส่วนใหญ่จะอยู่ในลักษณะของสมุนไพรแห้ง หลังจากนั้นทำให้เป็นผงละเอียด ซึ่งในผงละเอียดจะมีองค์ประกอบสำคัญอยู่ภายใน เมื่อทำการสกัด ผงสมุนไพรจะเข้าไปสัมผัสและทำปฏิกิริยากับตัวทำละลายที่เหมาะสม และองค์ประกอบเหล่านั้นจะถูก

ละลายออกมาให้ได้มากที่สุด เพราะฉะนั้นในการสกัดสมุนไพรจึงจำเป็นต้องบดพืชสมุนไพรแห้งให้เป็นผงละเอียดเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของพืชสมุนไพรที่จะสัมผัสกับตัวทำละลายนั้นๆ การลดขนาดของพืชสมุนไพรให้เป็นผงละเอียดควรคำนึงถึงโครงสร้างของพืชสมุนไพรเป็นหลัก ถ้ามุนไพรมีลักษณะเป็น ราก เนื้อไม้ ควรบดให้มีขนาดเล็ก แต่ถ้าสมุนไพรมีลักษณะเป็น ใบ ดอก ถ้าบดสมุนไพรให้มีขนาดเล็กจนเกินไปก็อาจจะทำให้เกิดปัญหาในการอุดตันเครื่องกรองในขบวนการสกัด และทำให้ได้องค์ประกอบที่ไม่ต้องการเกิดขึ้น ยกตัวอย่างเช่น ใบเบลลาดอนนา ถ้าบดละเอียดมากจนเกินไปจะได้สารสกัดที่มีทั้งองค์ประกอบสำคัญและสารอื่นปนอยู่ในปริมาณสูง แต่ถ้าหากใช้ผงที่หยาบปานกลางพบว่าจะให้สารสกัดที่มีปริมาณองค์ประกอบสำคัญสูงสุด

2.3 กระบวนการสกัดส่วนสกัดหยาบ

2.3.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การแยกสารบางชนิดออกจากสารผสมโดยใช้ตัวทำละลายสกัดออกมานั้น เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมากในเคมีอินทรีย์ สารผสมที่นำมาสกัดเป็นสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สารจากการสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ หรือสารจากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม การสกัดสารด้วยวิธีนี้อาศัยสมบัติของการทำละลายของสารที่ต่างกันในตัวทำละลายชนิดต่างๆ สารผสมที่นำมาสกัดอาจเป็นได้ทั้งของแข็งและของเหลว แต่ตัวทำละลายที่ใช้สกัดมักเป็นของเหลว ซึ่งคุณสมบัติของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารจากสมุนไพรสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของตัวทำละลายบางชนิดที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร

ตัวทำละลาย	คุณสมบัติ
แอลกอฮอล์	เมทานอลและเอทานอล เป็นที่นิยมใช้กันมาก เพราะมีความเป็นพิษต่ำ มีอำนาจในการละลายสารกว้างมาก ลดปฏิกิริยาการสลายตัวของน้ำ ขจัดออกได้ง่ายโดยไม่ต้องใช้ความร้อนสูง และยังใช้ทำละลายเอนไซม์ในพืชได้
น้ำกลั่น	เป็นตัวทำละลายที่สำคัญ ไม่ไวไฟ ไม่เป็นพิษ หาง่าย ราคาถูก และสกัดสารได้หลายชนิด แต่ไม่มีความคงตัว อาจทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย ก่อนนำมาใช้ต้องผ่านกระบวนการกำจัดเชื้อให้เรียบร้อย

ตัวทำละลาย	คุณสมบัติ
อะซิโตน	เป็นตัวทำละลายที่กำจัดไขมันได้ดีและสามารถละลายสารพื้นฐานในพืชได้บ้าง แต่มีข้อเสียคือ มีกลิ่นฉุน กำจัดออกได้ยาก
อีเทอร์	เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารได้จำกัดชนิด ไม่ละลายสารพื้นฐานชนิดอื่นๆที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อสมุนไพร
คลอโรฟอร์ม	เป็นตัวทำละลายที่สามารถละลายได้ในสารเกือบทุกชนิด แต่มีข้อเสียคือ หากได้รับประทานเข้าไปจะเป็นสารก่อมะเร็ง
เฮกเซน	เหมาะสำหรับสารไม่มีขั้ว และราคาถูก
เอสเทอร์	เป็นตัวทำละลายในการสกัดยาสมุนไพร ทำให้ตัวยาสำคัญเข้มข้นและทำให้บริสุทธิ์
เมทิลีนคลอไรด์	เกิดอิมัลชัน แต่ทำให้แห้งหรือระเหยได้ยาก

2.3.2 การสกัดสารจากของแข็ง

สารผสมที่เป็นของแข็งตามธรรมชาติมีทั้งพืชและสัตว์ ยกตัวอย่างเช่น ใบไม้ ดอกไม้ เปลือกไม้ รากไม้ ผลไม้ เมล็ด และอื่นๆ การสกัดโดยทั่วไปต้องทำให้ของแข็งแห้งเพื่อขจัดน้ำออกก่อนแล้วจึงบดให้ละเอียดเพื่อทำให้มีพื้นที่ผิวมากซึ่งจะสกัดสารออกมาได้มากที่สุด จากนั้นจึงนำไปแช่ในตัวทำละลายที่อุณหภูมิต่างๆ หรือต้มที่อุณหภูมิของจุดเดือดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน อีเทอร์ เมทิลีนคลอไรด์ คลอโรฟอร์ม อะซีโตน แอลกอฮอล์ หรือน้ำ เมื่อแช่หรือต้มในระยะหนึ่งจึงกรองเอาของแข็งออก และนำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกจะได้สารสกัดขั้นต้น (Crude extract) ส่วนของแข็งที่เหลืออาจนำไปสกัดต่อได้อีก ในกรณีที่สกัดขั้นแรกด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเมื่อจะสกัดต่อจะใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้น วิธีนี้จะทำให้ได้สารสกัดขั้นต้นที่มีสารผสมหลายชนิดเมื่อนำไปแยกต่อจะได้สารที่บริสุทธิ์ ซึ่งสามารถนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้างในขั้นต่อไป

2.3.3 หลักการเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการแยก

2.3.3.1 ตัวทำละลายสามารถละลายสารที่ต้องการสกัดได้

2.3.3.2 ตัวทำละลายต้องไม่ละลายสารอื่นๆ ที่เราไม่ต้องการสกัด

2.3.3.3 ตัวทำละลายต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด และสามารถแยกออกจากสารที่เราต้องการสกัดได้ง่าย มีจุดเดือดต่ำ ระเหยง่าย

2.3.3.4 ตัวทำละลายไม่เป็นพิษ และมีราคาถูก

2.3.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสมุนไพร

2.3.4.1 ตัวทำละลาย

2.3.4.2 สัดส่วนของสมุนไพรกับปริมาณสารทำละลายที่จะใช้

2.3.4.3 อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด

2.3.4.4 ขนาดอนุภาคของสมุนไพรที่จะนำมาสกัด

2.3.4.5 ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด

2.3.5 ประโยชน์ของการสกัดด้วยตัวทำละลาย

2.3.5.1 ใช้สกัดน้ำมันพืชจากเมล็ดพืช เช่น น้ำมันงา รำ ถั่ว ปาล์ม นุ่น บัว นิยมใช้เฮกเซน เป็นตัวทำละลาย

2.3.5.2 สกัดสารมีสีออกจากพืช

2.3.5.3 ใช้สกัดน้ำมันหอมระเหยออกจากพืช

2.3.5.4 ใช้สกัดยาออกจากสมุนไพร

2.4 **พลูกับการยับยั้งจุลินทรีย์**

รูปที่ 2.1 พลู

พลู ชื่อวิทยาศาสตร์ *Piper betle* Linn. ชื่อวงศ์ Piperaceae

ชื่อท้องถิ่น เปล้าอ้วน ซีเก๊าะ (มลายู - นราธิวาส) พลูจีน (ภาคกลาง)

ส่วนที่ใช้เป็นยา ใบสด

พลู เป็นพืชสมุนไพรที่มีความเกี่ยวพันกับชีวิตความเป็นอยู่ของคนไทยมาช้านานในลักษณะของการบริโภคกับหมาก มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย ต่อมาจึงแพร่กระจายไปยังประเทศต่าง ๆ ทั่วทวีปเอเชียและแอฟริกา พลูเป็นไม้เลื้อยเกาะหรือเกี่ยวพันกับไม้หรือหลักด้วยรากที่อยู่ตามข้อ ใบเป็นใบเดี่ยว รูปร่างรีถึงรูปไข่ ฐานใบป้านถึงมนกลมหรือเว้าเป็นรูปหัวใจ ปลายใบแหลม ก้านใบยาวติดกับลำต้น ใบมีสีเขียวเหลืองถึงเขียวเข้ม ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ขอบใบเรียบมีกลิ่นฉุนและมีรสเผ็ด ดอกมีสีขาวขนาดเล็กเป็นช่อบนแกนยาว พลูเป็นพืชผลเดี่ยวทรงกลมเล็กเนื้อนุ่ม เมื่อสุกมีสีแดง ขยายพันธุ์ได้ดีโดยการปักชำด้วยเถายาวขนาด 3-5 ข้อ ชอบดินอุดมสมบูรณ์ที่มีการระบายน้ำที่ดี ชอบอากาศร้อนชื้นแต่ไม่ร้อนจัด ปลูกได้ทุกภาคของประเทศ แหล่งปลูกพลูที่สำคัญคือ จังหวัดฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี นครนายก นครปฐม กรุงเทพมหานคร มหาสารคาม ขอนแก่น และนครราชสีมา ในใบพลูมีน้ำมันหอมระเหย มีสีน้ำตาลปนเหลืองและมีกลิ่นฉุน เรียกว่า น้ำมันพลู

2.4.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดพลูที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์

นันทการญจน์ และคณะ (1988) ฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากใบพลูมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด ได้แก่ *Bacillus megaterium, B. subtilis, Diplococus pneumoniae, Escherichia coli, Erwinia carotovora, Micrococcus pyogenes* และเชื้อราได้หลายชนิด ได้แก่ เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนัง คือ *Trichophyton rubrum, T. mentagrophytes* และเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus*

Yang และ Chou (1997) จากรายงานพบว่าสารสำคัญในใบพลูที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ Eugenol และ Hydroxychavicol

Wilson และคณะ (1997) ศึกษาน้ำมันกานพลูเพื่อการทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อ *Botrytis cinerea* สาเหตุโรคผลเน่าของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว พบว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ตั้งแต่ความเข้มข้นร้อยละ 0.78 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

Amadioha (1999) สกัดสารจากพูลด้วยแอลกอฮอร์และน้ำ เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum lindemuthianum* สารสกัดพลูด้วยแอลกอฮอร์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่า

Siriporn และคณะ (2000) ทดสอบยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารคือ *E. coli* และ *Yersinia enterocolitica* ด้วยสารสกัดจากพลู ศึกษาผลของพีเอช และอุณหภูมิของสารสกัดที่มีผลต่อการยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ พบว่าที่พีเอชต่ำประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารสกัดดีกว่าที่พีเอชสูงและที่อุณหภูมิต่ำ (4 และ 10 องศาเซลเซียส) ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารสกัดน้อยกว่าที่อุณหภูมิสูง (25, 35 และ 45 องศาเซลเซียส)

Vudhivanich (2003) สกัดพลูด้วยตัวทำละลาย เอทานอล 95 เปอร์เซ็น ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากพลูยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis pv.citri* ด้วยวิธี Disc diffusion method โดยการวัดค่า Inhibition zone ที่เกิดขึ้น

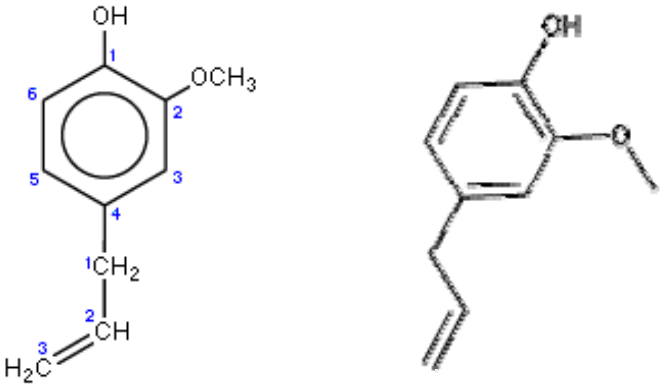
Lopez (2003) สกัดใบแห้งและใบสดของพลูด้วยตัวทำละลายเอทานอล ศึกษาฤทธิ์ของพลูในการยับยั้งเชื้อ *E. coli, Staphylococcus aureus, Salmonella derby, Pseudomonas aeruginosa, B. subtilis, Lactobacillus sp., Saccharomyces cerevisiae* และ *A. niger* ด้วยวิธี Disc diffusion method ซึ่งสารสกัดจากใบแห้งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด สารสกัดจากใบสดสามารถยับยั้งเชื้อได้ 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *Lactobacillus sp.*

คงเดช สวาสดิ์พันธ์ (2003) สกัดใบพลูแห้งด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์และเอทานอล ทดสอบยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion method พบว่าสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียสูงกว่าสารสกัดหยาบด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ซึ่งพบว่าสาร Hydroxychavicol ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* และยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *Staphylococcus sp.*

อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ (2004) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดพลูและน้ำมันพลู ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ในการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* เชื้อรา *T. mentagrophytes* และ *T. rubrum* โดยวัดค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อรา (MFC) ด้วยวิธี Broth dilution method พบว่าสารสกัดพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าน้ำมันพลู และในการทดสอบกับเชื้อราพบว่าเชื้อ *T. mentagrophytes* มีความไวต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัดทั้งสองมากกว่าเชื้อ *T. rubrum*

Arambewela (2005) ศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพลูด้วยตัวทำละลายเอทานอล ด้วยวิธี disc diffusion method และหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดโดยวิเคราะห์หาปริมาณและเอกลักษณ์โครงสร้างโมเลกุลแก๊สโครมาโตกราฟ/แมสสเปคโตรมิเตอร์ (Gas Chromatography – Mass Spectrometry, GC-MS) พบว่า สารสกัดจากพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli, S. aureus, S. epidermidis, P. aeruginosa* และ *S. pyogenes* ได้ และพบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่อยู่ในสารสกัดพลู คือ Safrole, Eugenol, Allylpyro catechol diacetate, Chavibitol acetate และ β-Phellandrene

Olonisakin และ Oladimeji (2007) ศึกษาองค์ประกอบสำคัญของกานพลูเพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบและโครงสร้าง พบว่าน้ำมันกานพลูมีองค์ประกอบเป็น Eugenol ซึ่งมีมากถึงร้อยละ 93.70 และมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อได้ดี

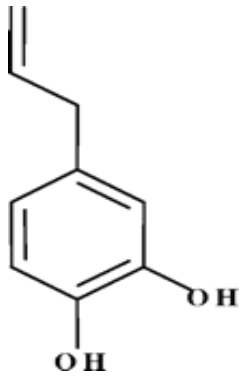


รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ Eugenol

Vaghasiya และคณะ (2007) ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากสายพันธุ์พลู 8 ชนิด เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล ในอัตราส่วน 1:10 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยหาค่า Inhibition zone พบว่าสารสกัดจากสายพันธุ์พลูทั้ง 8 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *K. pneumoniae* ได้ดีซึ่งค่า Inhibition zone อยู่ระหว่าง 0.5-1.2 เซนติเมตร

Nalina และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของสารสกัดพลูที่มีอิทธิพลต่อการทำลายเชื้อ *S. mutans* โดยดูโครงสร้างของเซลล์ที่ถูกทำลายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM) และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดพบว่ามี Hydroxychavicol กรดไขมัน (สเตียริกและปาล์มเมติก) และ Hydroxyl fatty acid esters (สเตียริก ปาล์มเมติก และไมริสติก) เป็นองค์ประกอบหลัก

Sandeep และคณะ (2009) สกัดใบพลูสดด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 กรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่ได้จากพลู คือ Hydroxychavicol มีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. mutans*



รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของ Hydroxychavicol

Caburian (2010) ศึกษาความสามารถของพลูในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบคือ *S. ureus, S. pyogenes, Candida albicans* และ *T. mentagrophytes* ค่า MIC ที่ได้มีค่าเท่ากับ 125, 15.60, 250 และ 195 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และหาองค์ประกอบที่สำคัญทางเคมีโดยวิเคราะห์หาปริมาณและเอกลักษณ์โครงสร้างโมเลกุลแก๊สโครมาโตกราฟ/แมสสเปคโตร-มิเตอร์ (Gas Chromatography – Mass Spectrometry, GC-MS) พบสารสำคัญคือ 5-(2-propenyl)-1, 3-benzodioxole, Eugenol isomer และ Caryophyllene

2.5 กระชายกับการยับยั้งจุลินทรีย์

รูปที่ 2.4 กระชาย

กระชาย ชื่อวิทยาศาสตร์ *Boesenbergia pundurata (R0xb.) Schitr.*

วงศ์ Zingiberaceae

ชื่อท้องถิ่น กะแอน ระแอน (ภาคเหนือ) ขิงทราย (มหาสารคาม) ว่านพระอาทิตย์ (กรุงเทพฯ)

ส่วนที่ใช้เป็นยา เหง้าและราก

กระชาย หรือ ขิงจีน เป็นพืชสมุนไพรที่ปลูกเลี้ยงกันในประเทศจีนและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุกไม่มีลำต้นบนดิน มีเหง้าใต้ดินซึ่งแตกรากออกไปเป็นกระจุกจำนวนมาก อวบน้ำ ตรงกลางพองกว้างกว่าส่วนหัวและท้าย ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ใบเดี่ยวเรียงสลับเป็นระนาบเดียวกัน รูปขอบขนานแกมรูปไข่ กว้าง 4.5-10 เซนติเมตร ยาว 13-15 เซนติเมตร ตรงกลาง

ด้านในของก้านใบมีร่องลึก ดอก ช่อ ออกแทรกอยู่ระหว่างกาบใบที่โคนต้น กลีบดอกสีขาวหรือชมพูอ่อน ใบประดับรูปใบหอกสีม่วงแดง ดอกย่อยบานครั้งละ 1 ดอก

สารสำคัญในรากและเหง้ากระชายมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ ช่วยขับลม แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ ช่วยเจริญอาหารและแก้โรคในช่องปาก และเป็นยาอายุวัฒนะ ตำรายาไทยใช้เหง้าแก้โรคในปากเช่น ปากเปื่อย ปากเป็นแผล ปากแห้ง ขับระดูขาว ขับปัสสาวะ รักษาโรคบิด แก้ปวดมวนท้อง จากการทดลองในสารสกัดแอลกอฮอล์และคลอโรฟอร์ม พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคผิวหนังและในปากได้ดีพอควร

2.5.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดกระชายที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์

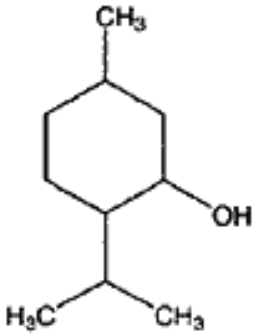
Penkhae และคณะ (2005) สารสกัดจากกระชายมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Aspergillus niger*, *A. oryzae* และ *Penicillium* sp. ซึ่งได้ศึกษาผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar well diffusion method พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *Penicillium* sp. ได้ดีกว่าเชื้อ *A. niger* และ *A. oryzae* และพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้น สามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้มากขึ้นด้วย

สุภัทรา จามกระโทก (2006) ทดสอบสารสกัดหยาบจากพืชวงศ์ขิง 17 ชนิด ด้วยเอทานอลในการต่อต้านการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum capsici, Dothiorella* sp, *C. gloeosporioide, Lasiodiplodia theobromae, Pestalotiopsis* sp. และ *Pythium aphanidermatum* พบว่า น้ำมันกระชายที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดี และเมื่อนำมาทดสอบผลต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides C. capsici* และ *Pestalotiopsis* sp. ได้ดี และได้นำสารสังเคราะห์ที่มีส่วนประกอบในพืชที่มีจำหน่ายทางการค้ามาทดสอบ ได้แก่ Camphene, Camphor, Eucalyptol, Eugenol และ Geraniol ซึ่งพบว่า Eugenol สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. capsici, C. gloeosporioides* และ *Pestalotiopsis* sp. ได้ดี

พิชัญญา ชาญชัย (2006) ศึกษาประสิทธิภาพการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ของไส้บรรจุไส้กรอกที่แช่น้ำมันหอมระเหย โดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) ด้วยวิธี Agar dilution method โดยพบว่าสารสกัดกระชายมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกดีที่สุด โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วงร้อยละ 0.1-0.4 ซึ่งได้นำไส้บรรจุไส้กรอก คือ ไส้สด ไส้คอลลาเจน และไส้เซลโลเฟน แช่ในน้ำมันหอมระเหยจากกระชาย ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไส้บรรจุที่แช่น้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี Disc diffusion method พบว่าไส้สดที่แช่น้ำมันหอมระเหยจากกระชายที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ระยะเวลาแช่สาร 1 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพดี

ที่สุดในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *Listeria monocytogenes*

Suwimol และคณะ (2010) ศึกษาสารสกัดกระชายด้วยตัวทำละลายเอทานอลในอัตราส่วน 1:5 กรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งเชื้อ *S. mutans, Lactobacillus sp., Aggregatibacter actinomycetemcomitans* และ *C. albicans.* ด้วยวิธี Disc diffusion method และ Broth microdilution method และศึกษาองค์ประกอบสำคัญทางเคมีของสารสกัดกระชายด้วยเครื่องวิเคราะห์หาปริมาณและเอกลักษณ์โครงสร้างโมเลกุลแก๊สโครมาโตกราฟ/แมสสเปคโตรมิเตอร์ (Gas Chromatography - Mass Spectrometry, GC-MS) พบว่าสารสำคัญหลักที่พบ คือ Geraniol, Olefinic terpene, Linalool และ α –terpineol



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ Geraniol

2.6 ข่ากับการยับยั้งจุลินทรีย์

รูปที่ 2.6 ข่า

ข่า ชื่อวิทยาศาสตร์ *Alpinia galanga (Linn.) Swartz.,* วงศ์ Zingiberaceae

ชื่อท้องถิ่น กฎุกกโรหิณี ข่าหยวก ข่าหลวง สะเอเชย เสะเออเคย

ส่วนที่ใช้เป็นยา เหง้า

ข่า เป็นพืชล้มลุกที่มีลำต้นเป็นกอ มีเหง้าอยู่ใต้ดิน เหง้ามีสีน้ำตาลอมแสดมีเส้นแบ่งข้อช่วงสั้นๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.6 เนื้อในเหง้ามีสีขาวรสขมเผ็ดร้อน แต่ไม่เผ็ดเหมือนกับขิง มักมีกลิ่นหอมฉุน ข่าเป็นพืชใบเดี่ยว ใบยาว ปลายใบมน ขอบใบเรียบ ก้านใบยาวเป็นกาบหุ้มซ้อนกัน ดอกเป็นช่อสีขาวนวล ผลกลมสีแดงส้มมีรสเผ็ดร้อน เหง้าข่าประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 0.04 ในน้ำมันประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่น Methyl- cinnamate ร้อยละ 48, Cineol ร้อยละ 20-30, Eugenol, Camphor และ Pinones เป็นต้น

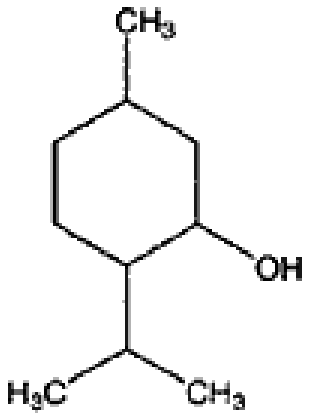
2.6.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดข่าที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์

จากผลงานวิจัย พบว่า ข่า มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย สารสกัดข่าด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ปิโตรเลียมอีเทอร์ และน้ำกลั่น สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ที่เป็นสาเหตุของอาการแน่นจุกเสียดท้องได้ โดยพบ Eugenol เป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย สารสกัดข่าด้วยแอลกอฮอล์ เมทานอล ไดคลอโรมีเทน เฮกเซน หรือน้ำกลั่น สามารถฆ่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคกลากเกลื้อนได้ โดยพบ 1- Acetoxychavicol acetate และ 1- Acetoxyeugenol acetate เป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา

Oonmetta-aree (2006) ศึกษาอิทธิพลของสารสกัดจากข่าด้วยตัวทำละลายเอทานอล ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ด้วยวิธี Disc diffusion method ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด จากนั้นทดสอบหาค่า MIC และ MBC ด้วยวิธี Broth dilution method ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.325 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับและศึกษาองค์ประกอบสำคัญทางเคมีของสารสกัด ด้วยเครื่องวิเคราะห์หาปริมาณและเอกลักษณ์โครงสร้างโมเลกุลแก๊สโครมาโตกราฟ/แมสสเปคโตรมิเตอร์ (Gas Chromatography – Mass Spectrometry, GC-MS) พบว่าสารประกอบหลักที่อยู่ในสารสกัดคือ 1- Acetoxychavicol acetate

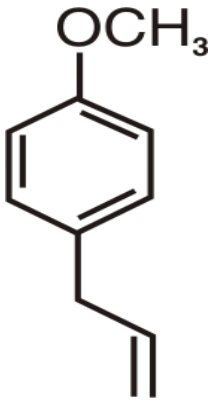
Krittika และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของสารสกัดข่าด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์และเอทานอล โดยวิเคราะห์หาองค์ประกอบสำคัญทางเคมีของสารสกัดด้วยเครื่องวิเคราะห์หาปริมาณและเอกลักษณ์โครงสร้างโมเลกุลแก๊สโครมาโตกราฟ/แมสสเปคโตรมิเตอร์ (Gas Chromatography - Mass Spectrometry, GC-MS) พบว่ามีสาร Zingiberene, Turmerone, Methyl chavicol และ γ-terpinene ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*, *S. aureus, B. cereus* และ *L. monocytogenes* โดยทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion method

Mayachiew (2007) ศึกษาสารสกัดข่ายับยั้งจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Disc diffusion method และ Agar dilution method และพบว่าเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่องวิเคราะห์หาปริมาณและเอกลักษณ์โครงสร้างโมเลกุลแก๊สโครมาโตกราฟ/แมสสเปคโตรมิเตอร์ (Gas Chromatography - Mass Spectrometry, GC–MS) ของสารสกัดข่ามีสารเป็นองค์ประกอบหลัก คือ 1, 8-cineole ร้อยละ 20.95, **β**-bisabolene ร้อยละ 13.16, **β**-caryophyllene ร้อยละ 17.95 และ **β**-selinene ร้อยละ 10.56



รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของ 1, 8-cineole

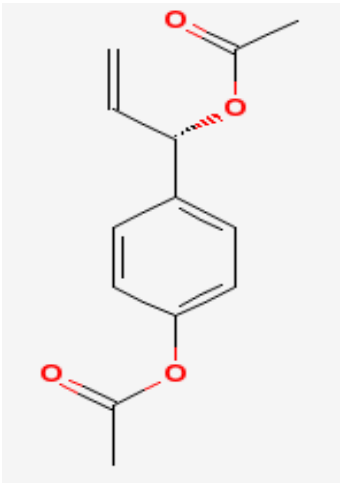
Natta L. (2008) ศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากพืชวงศ์ขิง 5 ชนิด ที่ได้จากการต้มกลั่น และสกัดด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ และเอทานอล ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Disc diffusion method พบว่าสารสกัดจากข่ามีความสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli, S. aureus, L.monocytogenes* และ *B. cereus* จากนั้นได้ทดสอบหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดโดยวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์หาปริมาณและเอกลักษณ์โครงสร้างโมเลกุลแก๊สโครมาโตกราฟ/แมสสเปคโตรมิเตอร์ (Gas Chromatography - Mass Spectrometry, GC-MS) พบว่าสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ คือ Methyl chavicol



รูปที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของ Methyl chavicol

ชัยณรงค์ และคณะ (2008) ใช้น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากข่าโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ ได้สาร Geraniol และสาร Linalool ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากพืช มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราในดิน *Sclerotium rofsii* โดยการผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *S. rolfsii* พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* ทำให้เส้นใยเชื้อราบางลง

Latha และคณะ (2009) ศึกษาสารสกัดข่าด้วยอะซิโตนยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion method พบว่า สารประกอบหลักที่อยู่ในสารสกัดข่า คือ 1'-Acetoxychavicol acetate สามารถยับยั้งเชื้อ *S. typhi, E. coli* และ *Enterococcus faecalis* ได้



รูปที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีของ 1'- Acetoxychavicol acetate

Kiranmayee และคณะ (2010) ศึกษาอิทธิพลของสารสกัดข่าด้วยตัวทำละลายเมทานอล อะซิโตน และไดเอทิลอีเทอร์ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis, Enterobacter aerogene, E. cloacae, E. coli, E. faecalis, K. pneumoniae, P. aeruginosa MTCC 6642, S. typhimurium, S. aureus* และ *S. epidermis* ด้วยวิธี Disc diffusion method และศึกษาหาค่า MIC และ MBC พบว่า สารสกัดข่าด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งเชื้อได้ดี ซึ่งมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.04-1.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.08-2.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดข่าด้วยเมทานอลด้วยเครื่องวิเคราะห์หาปริมาณและเอกลักษณ์โครงสร้างโมเลกุลแก๊สโครมาโตกราฟ/แมสสเปคโตรมิเตอร์(Gas chromatographic - Mass Spectrometric, GC-MS) สารที่พบคือ 5-Hydroxymethyl furfural ร้อยละ 59.9, Benzyl alcohol ร้อยละ 57.6, 1,8 cineole ร้อยละ 15.65, Methylcinnamate ร้อยละ 9.4, 3-phenyl-2-butanone ร้อยละ 8.5 และ 1,2 benzenedicarboxylic acid ร้อยละ 8.9

Weerakkody และคณะ (2010) ศึกษาอิทธิพลของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli, L. monocytogenes, S. typhimurium* และ *Clostridium perfringens* และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดข่าด้วยเครื่องวิเคราะห์หาปริมาณและเอกลักษณ์โครงสร้างโมเลกุลโครมาโตกราฟ/แมสสเปคโตรมิเตอร์ (Gas chromatographic - Mass Spectrometric, GC-MS) พบสารประกอบหลัก คือ 1'- Acetoxychavicol acetate (1'ACA) ร้อยละ 63.4 และ Neral ร้อยละ 15.6

ภัทราวดี และคณะ (2010) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดข่าร่วมกับกรดอะซิติก ต่อคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผักชี ซึ่งมีเชื้อ *E. coli* และ *S. typhimurium* ปนเปื้อนอยู่ พบว่าสารสกัดข่ามีประสิทธิภาพลดปริมาณจุลินทรีย์ได้ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากฤทธิ์ของ 1′-Acetoxychavicol acetate (ACA) ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่พบในสารสกัดข่าซึ่งสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้โดยผ่านเข้าผนังเซลล์ไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในและชั้นนอกของเซลล์ทำให้ ไซโทพลาซึม ภายในเซลล์ตกตะกอน นอกจากนั้นยังทำลายไซโทพลาสมิกเมมเบรนของเซลล์ทำให้สารต่างๆที่อยู่ภายในเซลล์ไหลออกนอกเซลล์

2.7 ตำลึงกับการยับยั้งจุลินทรีย์

รูปที่ 2.10 ตำลึง

ตำลึง ชื่อวิทยาศาสตร์ *Coccinia indica* วงศ์ Cucurbitaceae

ชื่อท้องถิ่น ผักแคบ (ภาคเหนือ) แคเด๊าะ (กระเหรี่ยงและแม่ฮองสอน) ตำลึง สี่บาท (ภาคกลาง) ผักตำนิน (ภาคอีสาน)

ส่วนที่ใช้เป็นยา ใบและลำต้น

ตำลึง เป็นไม้เลื้อยที่มีมือจับใช้สำหรับเลื้อยเกาะต้นไม้ใหญ่หรือไม้ปักหลัก มีสีเขียว จัดเป็นสมุนไพรไทย ลำต้นเป็นเถาไม้เลื้อยเนื้อแข็ง ใบเป็นใบเดี่ยว มีลักษณะเป็น 3 แฉก หรือ 5 แฉก กว้างและยาวประมาณ 4-8 เซ็นติเมตร โคนใบมีลักษณะเป็นรูปหัวใจ มีมือเกาะยื่นออกมาจากที่ข้อ ดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือดอกคู่ มีลักษณะเป็นรูประฆัง ดังแสดงในรูปที่ 2.10 กลีบดอกสีขาว แยกเพศอยู่คนละต้น ดอกออกตรงที่ซอกใบ ลักษณะของผลเป็นวงรีทรงยาวสีเขียวอ่อน เมื่อแก่จัดจะเป็นสีแดง เป็นที่ชื่นชอบของนกนานาชนิด

ประโยชน์ของตำลึงนอกจากจะปลูกเป็นผักสวนครัวแล้ว ตำลึงยังถือเป็น "ยาเย็น" ที่มีฤทธิ์ทางสมุนไพร ใช้เป็นยารักษาอาการแพ้โดยทั่วไป ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ในด้านการล้างพิษ ซึ่งครอบคลุมทั้งการล้างพิษภายในและการล้างพิษภายนอกร่างกาย ฯลฯ

2.7.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดตำลึงที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์

Farrukh (2003) พบว่า การสกัดตำลึงด้วยตัวทำละลาย เอทานอล สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *B. cereus* และ *S. aureus* ได้

Jadavpur University (2007) ได้รายงานการวิจัยพบว่า การสกัดตำลึงด้วยตัวทำละลายเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus, E. coli, B. subtilis* และ *P. aeruginosa* ได้

Dewanjee และคณะ (2007) พบว่าสารสกัดจากตำลึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus, E. coli, Shigella dysenteriae, S. soneii* และ *P. aeruginosa* ได้

Shaheen (2009) ศึกษาอิทธิพลของสารสกัดจากตำลึงที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ด้วยวิธี Disc diffusion method นอกจากนั้นยังได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดพบว่าในสารสกัดประกอบไปด้วย อัลคาลอยด์ แทนนิน ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ และฟีนอล

Prasanna (2010) ศึกษาอิทธิพลของสารสกัดตำลึงในการยับยั้งแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *E. coli, S. aureus* และ *Steptococcus pyrogens* และยับยั้งเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Candida albicans* และ *Trichophyton rubrum* พบว่าสารสกัดตำลึงมีความสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *S. pyrogens* ได้

2.8 เบญกานีกับการยับยั้งจุลินทรีย์

รูปที่ 2.11 เบญกานี

เบญกานี ชื่อวิทยาศาสตร์ *Quercus infectoria G. Olivier* วงศ์ Fagaceae
ชื่อท้องถิ่น เบญกานี
ส่วนที่ใช้เป็นยา ปูด

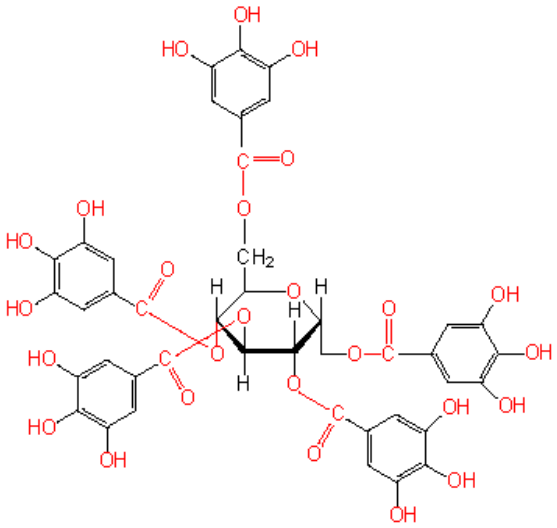
เบญกานี เป็นสมุนไพรที่พบได้ในประเทศแถบอินเดีย โดยเป็นพืชในวงศ์ Fagaceae ชื่อสามัญ ได้แก่ aleppo galls, downy oak, nutgall, gallnut, oak white gall เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ลำต้นโดยเฉพาะส่วนของกิ่งอ่อน มีก้อนแข็งๆ เรียกว่า ปูด (gall, gallnut, nutgall) เป็นเนื้อเยื่อที่เจริญผิดปกติ ซึ่งสร้างขึ้นมาห่อหุ้มแมลงที่มาอาศัย มีลักษณะค่อนข้างกลม แข็ง ภายในมีไข่ของแมลงชื่อ Cynips tinctoria ซึ่งเมื่อแมลงเข้าสู่ระยะ larva จะกระตุ้นเนื้อเยื่อให้มี cellular proliferation กลายเป็น gall ซึ่งมีแทนนินมาสะสมอยู่ ทั้งนี้ ตามตำราแพทย์แผนไทยใช้ปูดต้มแก้อาการท้องร่วง ท้องเสีย และบิด หรือฝนกับน้ำเพื่อฆ่าเชื้อบริเวณที่มีบาดแผล เพราะสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ และยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.8.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดเบญกานีที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์

Metin และคณะ (1998) ศึกษาความสามารถของสารสกัดเบญกานีในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus brevis, B. subtilis, B. cereus, E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, L. monocytogenes A, Micrococcus luteus, K. pneumoniae, Mycobacterium smegmatus, Proteus vulgaris, Alternaria alternata, Penicillium italicum, Fusarium equisetii* และ *Candida albicans* ด้วยวิธี Disc diffusion method พบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อได้ โดยค่า Inhibition zone อยู่ในช่วง 11-31 มิลลิเมตร และยังพบว่าใน gallnuts มีสารที่ประกอบไปด้วย แทนนิน ร้อยละ 50-75, กรดแกลลิก ร้อยละ 2-3, กรดเอลลาจิก ร้อยละ 2, กลูโคส, แป้ง และ etheric fats ร้อยละ 3

Voravuthikunchai (2004) ศึกษาอิทธิพลของสารสกัดเบญกานีด้วยสารสกัดเอทานอลที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี Disc diffusion method ซึ่งผลของ Inhibition zone มีค่าสูงสุดอยู่ที่ 14 มิลลิเมตร

Basri และคณะ (2004) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดเบญกานีด้วยตัวทำละลายอะซิโตน โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) แบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus, S. epidermidis* และ *B. subtilis)* และแกรมลบ (*E. coli, S. typhimurium* และ *P. aeruginosa*) พบว่าสารสกัดเบญกานีสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium* และ *P. aeruginos* ได้ดี ขณะที่ *E. coli* ไม่พบผลของการยับยั้ง และพบว่าในเบญกานีมีสาร แทนนิน ร้อยละ 50-70 กรดแกลลิก และกรดเอลลาจิกบางส่วน ซึ่งแทนนินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ดี



รูปที่ 2.12 โครงสร้างทางเคมีของแทนนิน

Vudhivanich (2004) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ในอัตราส่วน 1:2 กรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผัก ด้วยวิธี Disc diffusion method พบว่าสารสกัดจากเบญกานีสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวได้ดี โดยเฉลี่ยแล้วค่า Inhibition zone มีค่าเท่ากับ 3.51 เซนติเมตร

Sawangjaroen (2005) ศึกษาอิทธิพลของตัวทำละลาย เมทานอล n-เฮกเซน และไดคลอโรมีเทนในการสกัดเบญกานีพบว่า สารสกัดเบญกานีด้วยตัวทำละลายเมทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *Blastocystis hominis* ได้ค่อนข้างดี

Lara และคณะ (2008) ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากเบญกานีด้วยตัวทำละลายเมทานอลในการยับยั้งเชื้อ *Proteus mirabilis*, *Citrobacter braaki* และ *S. aureus*

Muskhazli และคณะ (2008) เปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดเบญกานีด้วยตัวทำละลายเมทานอลและน้ำเพื่อดูความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อ *Cellulosimicrobium cellulans* ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในช่วง 0.25 – 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดเบญกานีด้วยเมทานอลให้ผล Inhibition zone มากกว่าสารสกัดเบญกานีด้วยน้ำ

Chusri และคณะ (2008) สกัดเบญกานีด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็น ในอัตราส่วน 1:5 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน ศึกษาอิทธิพลของสารสกัดที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ด้วยการหาค่า MIC และผลของของสารสกัดที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์

Suwalak (2009) สกัดเบญกานีด้วยตัวทำละลายเอทานอล ร้อยละ 50 ศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *E. coli* โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ซึ่งอยู่ในช่วง 0.78 - 1.56 และ 1.56 - 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และได้ศึกษาอิทธิพลของสารสกัดที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

จากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด พลู กระชาย ข่า ตำลึง และเบญกานี สามารถสรุปสารสำคัญที่มีอยู่ในสมุนไพรและการนำสารสกัดไปใช้ประโยชน์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สมุนไพรและสารสำคัญในสารสกัดสมุนไพรที่นำไปใช้ประโยชน์

ชื่อสมุนไพร	ส่วนที่ใช้	ลักษณะของสารสกัด	สารสำคัญในสารสกัด	การนำไปใช้ประโยชน์
พลู	ใบ	ผง	Hydroxychavicol และ Eugenol	มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียอันเป็นสาเหตุของอาการจุกเสียด แน่นท้อง มีฤทธิ์ขับน้ำดี
กระชาย	เหง้าและราก	ผง	Geraniol, Linalool, Olefinic terpene และ α –terpineol	ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์
ข่า	เหง้า	ผง	1′-Acetoxychavicol acetate (ACA), Zingiberene, Turmerone และ Methyl chavicol	ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ฆ่าเชื้อราซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกลากเกลื้อน
ตำลึง	ใบและลำต้น	ผง	Alkaloids, Tannins, Saponins, Flavonoids, Glycosides และ Phenols	ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์
เบญกานี	ปูด	ผง	Tannin, Gallic acid และ Ellagic acid	ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

2.9 จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหาร

จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุสำคัญให้อาหารเน่าเสียมี 3 ประเภท ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา

2.9.1 แบคทีเรีย

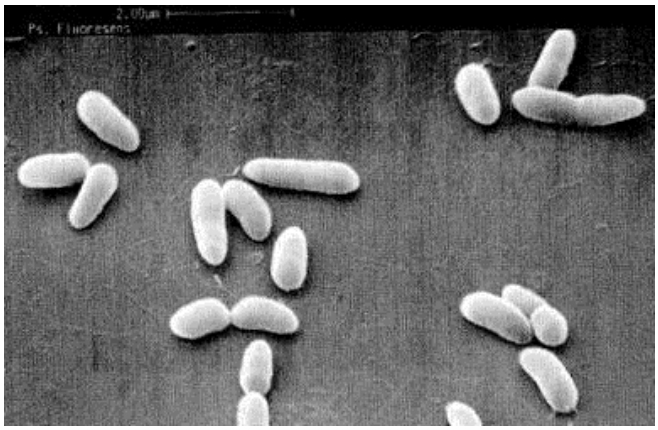
แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็ก มีรูปร่างต่างๆ กัน เช่น เกลียว กระบอกหรือท่อนกลม ซึ่งอาจเกาะเรียงตัวกันเป็นสายหรือกลุ่ม แบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มจำนวนโดยการแบ่งเซลล์โดยเฉลี่ยที่สภาวะเหมาะสมจะเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าทุก 20-30 นาที ดังนั้นหากในอาหารมีแบคทีเรียปนเปื้อนเพียง 1 เซลล์ ภายใน 10 ชั่วโมง จะมีจำนวนแบคทีเรียมากกว่า 1 ล้านเซลล์ อาหารที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ในระดับนี้ จะเกิดการเน่าเสียเกิดขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ตัวอย่างแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Pseudomonas Acinetobacter, Moraxella* และ *Flavobacterium* เป็นต้น แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียอาจแบ่งเป็นกลุ่มๆได้ โดยอาจพิจารณาจากความสามารถในการย่อยสลายประเภทอาหารและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นตัวอย่างเช่น

- แบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำตาล จะมีเอนไซม์ช่วยย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตจำพวกแป้ง หรือน้ำตาล

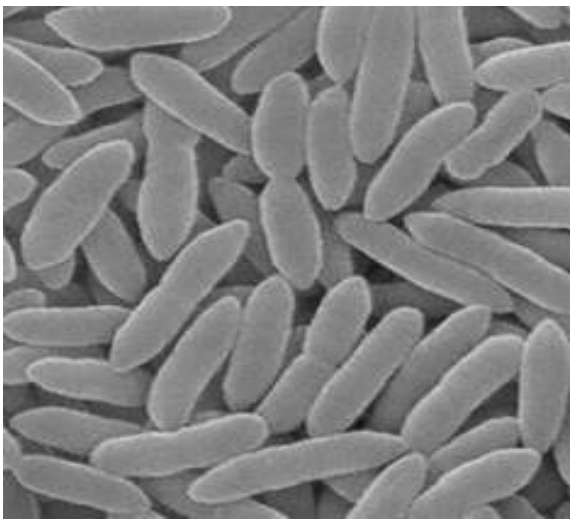
- แบคทีเรียที่ย่อยสลายโปรตีน เช่น *Clostridium*, *Pseudomonas* (ดังแสดงในรูปที่ 2.14) และ *Proteus* จะสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนทำให้เกิดการเน่าเสีย แบคทีเรียบางชนิดในกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายโปรตีนในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ทำให้เกิดสารที่มีกลิ่นเหม็น เช่น แก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์

- แบคทีเรียที่ย่อยสลายเพกทิน แบคทีเรียกลุ่มนี้มีน้อยชนิด เช่น *Bacillus* (ดังแสดงในรูปที่ 2.13), *Clostridium* และ *Erwinia* เป็นต้น แบคทีเรียนี้จะสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเพกทิน ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างซับซ้อนทำให้อาหารประเภทผักและผลไม้เกิดการเสียหายและเน่าเสียได้

- แบคทีเรียที่สร้างกรด เช่น กรดแอซิติก ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของอาหาร โดยเฉพาะเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ รสชาติจะเปลี่ยนไป เนื่องจากเกิดรสเปรี้ยวจากกรดแอซิติก ตัวอย่างแบคทีเรียที่สร้างกรดแอซิติก เช่น *Acetobacter* และ *Gluconobacter* เป็นต้น



รูปที่ 2.13 ลักษณะแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus*

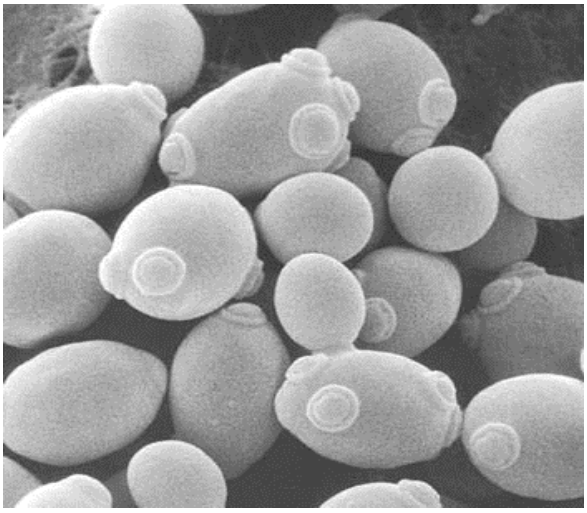


รูปที่ 2.14 ลักษณะแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas*

2.9.2 ยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย เซลล์มีรูปร่างหลายลักษณะ เช่น กลม รี เป็นต้น ส่วนใหญ่เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อ ยีสต์เจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลสูง เช่น น้ำผลไม้ แยม ผลไม้แช่อิ่มหรือแห้ง รวมทั้งอาหารที่มีปริมาณเกลือมาก เช่น ผักดอง แฮม เบคอน และเนื้อเค็ม สปอร์ของยีสต์ไม่ทนความร้อนเหมือนกับสปอร์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ ยีสต์ยังมีเอนไซม์ที่ย่อยสลายกรดอินทรีย์ต่างๆที่ใช้ในการถนอมอาหารได้ เช่น กรดแล็กติก กรดแอซิติก ทำให้กรดมีความเข้มข้นลดลง ทำให้อาหารมีสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียได้ อาหารที่เกิดการ

เน่าเสียจากยีสต์มักเกิดกลิ่นหมัก เมือก หรือฝ้าบริเวณผิวหน้า รวมทั้งเกิดความขุ่นและแก๊สได้ ตัวอย่างยีสต์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Saccharomyces* (ดังแสดงในรูปที่ 2.15), *Pichia* และ *Torulopsis* เป็นต้น

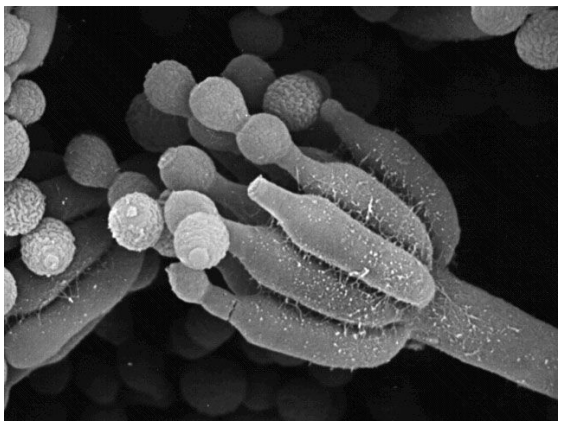


รูปที่ 2.15 ลักษณะยีสต์ *Saccharomyces*

2.9.3 รา

ราเป็นจุลินทรีย์ที่พบอยู่ทั่วไป มีรูปร่างลักษณะและสีต่างๆกัน ราเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผัก ผลไม้และอาหารแห้ง ผลิตภัณฑ์ขนมอบ เกิดการเน่าเสีย มีสี กลิ่น ที่ผิดปกติ และราบางชนิด เช่น *Aspergillus flavus* ยังสามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินขึ้นในอาหารได้ โดยทั่วไปราเจริญได้ช้ากว่าแบคทีเรียและยีสต์ แต่เมื่อราเจริญได้สักระยะหนึ่ง ก็จะเจริญได้อย่างรวดเร็ว ราสามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดี เช่น มีความชื้นน้อย ความเป็นกรด จึงเป็นปัญหาในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมาก ตัวอย่างราที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหาร เช่น *Aspergillus*, *Penicillium* (ดังแสดงในรูปที่ 2.16-2.17) และ *Rhizopus* เป็นต้น

รูปที่ 2.16 ลักษณะรากลุ่ม *Aspergillus*



รูปที่ 2.17 ลักษณะรากลุ่ม *Penicillium*

เนื่องจากอาหารแต่ละชนิดมีองค์ประกอบบางอย่างที่แตกต่างกัน จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของอาหารแต่ละชนิด จึงเกิดจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.3 ซึ่งแสดงตัวอย่างของชนิดจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารแต่ละประเภท

ตารางที่ 2.3 จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร

กลุ่มอาหาร	ตัวอย่างจุลินทรีย์
อาหารทะเล	*Achromobacter, Pseudomonas* และ *Vibrio*
เนื้อสัตว์ สัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์	*Achromobacter, Clostridium* และ *Pseudomonas*
ไข่และผลิตภัณฑ์	*Pseudomonas* และ *Proteus*
นมและผลิตภัณฑ์	*Pseudomonas, Micrococcus* และ *Streptococcus*
แยม ผลไม้แห้ง	*Saccharomyces* และ *Schizosaccharomyces*
อาหารกระป๋อง	*Bacillus stearothermophilus* และ *Clostridium thermosaccharolyticum*
ผักและผลไม้	*Botrytis, Erwinia* และ *Penicillium*
ธัญชาติ	mold
น้ำผลไม้	*Escherichia, Lactobacillus* และ *Leuconostoc Yeast*
เครื่องเทศ	*Bacillus* และ mold

2.10 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์

2.10.1 Dilution test

การทดสอบวิธีนี้แบ่งออกเป็น Broth dilution method และ Agar dilution method

2.10.1.1 Broth dilution method

เป็นการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ละเอียดวิธีหนึ่งการทดสอบนี้จะทำให้ทราบทั้งค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของยาปฏิชีวนะนั้น ๆ กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้ คือ เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมียาปฏิชีวนะในปริมาณต่างๆกันผสมอยู่ และสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารที่เลี้ยงเชื้อซึ่งมียาปฏิชีวนะในปริมาณต่างๆกัน การทดสอบหาความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี Broth dilution method นี้ สามารถทำได้ทั้ง Macro broth dilution method และ Micro broth dilution method ตรวจผลโดยดูการเจริญเติบโตของเชื้อ ค่าความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่เชื้อไม่

เจริญ ถือว่าเป็นค่า (MIC) การหาค่า MBC ทำได้โดยนำ Broth จากหลอดที่ดูแล้วว่าไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ตรวจผลโดยดูการเจริญเติบโตของเชื้อ ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยาปฏิชีวนะซึ่งสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ให้ลดลงไม่น้อยกว่าร้อยละ 99.9 ถือว่าเป็นค่า (MBC)

2.10.1.2. Agar dilution method

เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบความไวของเชื้อแบบปริมาณวิเคราะห์ โดยมีหลักการทดสอบคล้ายคลึงกับ Broth dilution method ต่างกันเพียงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น คือ การทดสอบโดยการเจือจางสารทดสอบในอาหารวุ้น และถ่ายเชื้อลงบนผิวของอาหารวุ้น เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการทดลองเชื้อในปริมาณมาก ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนอาหารจานเดียวกันได้ ซึ่งวิธีนี้สามารถหาค่า MIC ได้ แต่ไม่สามารถหาค่า MBC ได้ ตรวจผลโดยดูการเจริญเติบโตของเชื้อ ค่าความเข้มข้นของสารที่เชื้อไม่เจริญถือว่าเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC)

2.10.2 Diffusion test

วิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุดคือ Disc diffusion method เนื่องจากสะดวกประหยัดและใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ ไม่อาจทราบค่า MIC หรือ MBC ได้ ไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญช้าหลักการทั่วไปคือ การทำให้ยาปฏิชีวนะบนแผ่น paper disc ซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อในจำนวนที่เหมาะสมไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดของ zone of inhibition ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสรอบแผ่น paper disc ขนาดของ zone of inhibition นอกจากจะขึ้นอยู่กับความไวของเชื้อต่อสารแล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของยาปฏิชีวนะ ปริมาณอัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรดด่างและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อ

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดพลูที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์

ส่วนที่นำมาสกัด	ตัวทำละลาย	สภาวะที่ใช้ในการสกัด			จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
		อัตราส่วน (กรัมต่อมิลลิลิตร)	เวลา	อุณหภูมิ		
ใบสด	น้ำกลั่น แอลกอฮอร์ เฮกเซน	1:3	48 ชม.	อุณหภูมิห้อง	*E. coli.*	พิมลวรรณ ทัพยากรพิจารณ์ (1992)
ใบแห้ง	เอทานอล	1:5	48 ชม.	60 องศาเซลเซียส	*E. coli, S. aureus* และ *Salmonella derby*	Lopez (2003)
ใบแห้ง	เอทานอล	1:10	24 ชม.	อุณหภูมิห้อง	*A. niger, A. oryzae* และ *Penicillium* sp.	Wanchaitanawong (2005)
ใบแห้ง	เอทานอล	-	48 ชม.	อุณหภูมิห้อง	*E. coli* และ *Yersinia enterocolitica*	Siriporn และคณะ (2000)
ใบสด	เอทานอล	1:20	48 ชม.	อุณหภูมิห้อง	*E. coli, P. aeruginosa, S. epidermidis, S. aureus* และ *S .pyogens*	Arambewela (2005)

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดพลูที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ต่อ)

ส่วนที่นำมาสกัด	ตัวทำละลาย	สภาวะที่ใช้ในการสกัด			จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
		อัตราส่วน (กรัมต่อมิลลิลิตร)	เวลา	อุณหภูมิ		
ใบแห้ง	n-เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เมทานอล	1:3	7 วัน	อุณหภูมิห้อง	*Blastocystis hominis*	Sawangjaroen (2005)
ใบแห้ง	น้ำกลั่น เอทานอล เฮกเซน	1:10	24 ชม.	อุณหภูมิห้อง	*E. coli, S. Typhimurium, Listeria monocytogenes* และ *S. aureus*	Weerakkody (2010)
ใบสดและใบแห้ง	เอทานอล	1:5	48 ชม.	60 องศาเซลเซียส	*E. coli, S.aureus* และ *S.derby*	Lopez (2003)
ใบแห้ง	เอทานอล	1:10	24 ชม.	อุณหภูมิห้อง	*A. niger, A. oryzae* และ *Penicillium sp.*	Wanchaitanawong (2005)
ใบสด	เอทานอล	1:2	7 วัน	อุณหภูมิห้อง	*Xanthomonas axonopodis* pv. *Citric*	Vudhivanich (2003)

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดพลูที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ต่อ)

ส่วนที่นำมาสกัด	ตัวทำละลาย	สภาวะที่ใช้ในการสกัด			จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
		อัตราส่วน (กรัมต่อมิลลิลิตร)	เวลา	อุณหภูมิ		
ใบแห้ง	เมทานอล	1:10	24 ชม.	อุณหภูมิห้อง	*S.aureus, S.epidermidis, Micrococcus flavus, B. cereus, B.subtilis, Klebsiella aerogenes* และ *K. pneumonia*	Vaghasiya และคณะ (2007)

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดกระชายที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์

ส่วนที่นำมาสกัด	ตัวทำละลาย	สภาวะที่ใช้ในการสกัด			จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
		อัตราส่วน (กรัมต่อมิลลิลิตร)	เวลา	อุณหภูมิ		
ใบแห้ง	เอทานอล	1:5	7 วัน	อุณหภูมิห้อง	*S. mutans, Lactobacillus sp., Aggregatibacter actinomycetemcomitans* และ *C. albicans*	Suwimol และคณะ (2010)
ใบแห้ง	เอทานอล	1:3	24 ชม.	อุณหภูมิห้อง	*E. coli, S. aureus, B. cereus* และ *L.monocytogenes*	Norajit (2007)
ใบแห้ง	-	-	7 วัน	อุณหภูมิห้อง	*S. pyogenes*	Limsuwan (2008)
ใบแห้ง	เอทานอล	1:10	24 ชม.	อุณหภูมิห้อง	*A. niger, A. oryzae* และ *Penicillium sp*	Wanchaitanawong (2005)
ใบแห้ง	เฮกเซน คลอโรฟอร์ม	-	-	-	*S. aureus และ P. aeruginosa*	CHING (2008)

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดกระชายที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ต่อ)

ส่วนที่นำมาสกัด	ตัวทำละลาย	สภาวะที่ใช้ในการสกัด			จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
		อัตราส่วน (กรัมต่อมิลลิลิตร)	เวลา	อุณหภูมิ		
ใบแห้ง	คลอโรฟอร์ม เมทานอล น้ำกลั่น	-	-	-	*B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. Typhi* และ *Shigella sp.*	Voravuthikunchai (2006)

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดข่าที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์

ส่วนที่นำมาสกัด	ตัวทำละลาย	สภาวะที่ใช้ในการสกัด			จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
		อัตราส่วน (กรัมต่อมิลลิลิตร)	เวลา	อุณหภูมิ		
ใบแห้ง	เอทานอล	1:10	24 ชม.	อุณหภูมิห้อง	*S. aureus* และ *E. coli*	Oonmetta-aree (2006)
ใบแห้ง	คลอโรฟอร์ม เมทานอล น้ำกลั่น	1:5	7 วัน	อุณหภูมิห้อง	*B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. Typhi* และ *Shigella sp.*	Voravuthikunchai (2006)
ใบแห้ง	เอทานอล	-	-	-	*Bactrocera dorsalis*	sukhirun (2009)
ใบแห้ง	คลอโรฟอร์ม เมทานอล น้ำกลั่น ปิโตรเลียมอีเทอร์	-	-	-	*E.. coli*, *S. enteriditis*, *Clostridium perfringens*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida albicans*	Sunilson (2009)
ใบแห้ง	เมทานอล อะซิโตน	1:2	3 วัน	อุณหภูมิห้อง	*Colletotrichum leosporioides*	เนตรนภิส เขียวขำ (2010)

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดข่าที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ต่อ)

ส่วนที่นำมาสกัด	ตัวทำละลาย	สภาวะที่ใช้ในการสกัด			จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
		อัตราส่วน (กรัมต่อมิลลิลิตร)	เวลา	อุณหภูมิ		
ใบแห้ง	เมทานอล	1:10	-	80 องศาเซลเซียส	*B. cerus*, *B. megaterium*, *Micrococcus leuteus*, *S. aureus*, *Streptococcus lactis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* และ *S. typhimurium*	Gothandam (2010)
ใบแห้ง	เอทานอล	1:10	24 ชม.	อุณหภูมิห้อง	*S. aureus*	Mayachiew (2007)
ใบแห้ง	เอทานอล ปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม	1:6	72 ชม.	31 องศาเซลเซียส	*C. albicans* และ *E. aerogens*	Kochuthressia (2010)
ใบแห้ง	เอทานอล ปิโตรเลียมอีเทอร์	1:3	24 ชม	อุณหภูมิห้อง	*E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* และ *L. monocytogenes*	Natta (2008)

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดตำลึงที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์

ส่วนที่นำมาสกัด	ตัวทำละลาย	สภาวะที่ใช้ในการสกัด			จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
		อัตราส่วน (กรัมต่อมิลลิลิตร)	เวลา	อุณหภูมิ		
ใบแห้ง	น้ำกลั่น เอทานอล เฮกเซน	-	-	-	*B. cereus, Corynebacterium diptheriae, S. aureus, Streptococcus pyogenes, E.coli, K. pneumonia, Proteus mirabilis, P. aeruginosa, S. paratyphi* และ *Shigella boydii*	Farrukh (2008)
ใบแห้ง	ปิโตรเลียมอีเทอร์ ไดเอธิทอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม อะซิโตน เมทานอล	-	-	-	*S. aureus* และ *S. paratyphi*	Shaheen (2009)

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดตำลึงที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ต่อ)

ส่วนที่นำมาสกัด	ตัวทำละลาย	สภาวะที่ใช้ในการสกัด			จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
		อัตราส่วน (กรัมต่อมิลลิลิตร)	เวลา	อุณหภูมิ		
ใบแห้ง	เมทานอล เอทานอล เฮกเซน	-	24-48 ชม.	-	*S. pyogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *P.* aeruginosa และ *S. pneumoniae*	Bagyalakshmi (2009)
ใบแห้ง	เมทานอล	1:5	48 ชม.	อุณหภูมิห้อง	*S. aureus*, *E. coli*, *P.* aeruginosa, *Shigella dysenteriae* และ *Shigella soneii*	Dewanjee (2007)

ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดเบญกานีที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์

ส่วนที่นำมาสกัด	ตัวทำละลาย	สภาวะที่ใช้ในการสกัด			จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
		อัตราส่วน (กรัมต่อมิลลิลิตร)	เวลา	อุณหภูมิ		
ใบแห้ง	อะซิโตน	1:5	24 ชม	อุณหภูมิห้อง	*S. epidermidis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhimurium* และ *P. aeruginosa*	Basri และ Fan (2004)
ใบแห้ง	เอทานอล	1:5	7 วัน	อุณหภูมิห้อง	*E. coli*	Voravuthikunchai (2004)
ใบแห้ง	n-เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เมทานอล	1:3	7 วัน	อุณหภูมิห้อง	*Blastocystis hominis*	Sawangjaroen (2005)
ใบแห้ง	เอทานอล	1:5	7 วัน	อุณหภูมิห้อง	*S. aureus*	Chusri (2008)
ใบแห้ง	เอทานอล	1:5	7 วัน	อุณหภูมิห้อง	*Helicobacter pylori*	Voravuthikunchai (2008)
ใบแห้ง	เอทานอล	-	7 วัน	อุณหภูมิห้อง	*E. coli*	Suwalak (2009)
ใบแห้ง	เอทานอล	1:2	7 วัน	อุณหภูมิห้อง	*Erwinia carotovora subsp. Carotovora*	Vudhivanich (2004)

ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวข้องกับสารสกัดเบญกานีที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ต่อ)

ส่วนที่นำมาสกัด	ตัวทำละลาย	สภาวะที่ใช้ในการสกัด			จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
		อัตราส่วน	เวลา	อุณหภูมิ		
ใบแห้ง	เมทานอล	-	72 ชม	อุณหภูมิห้อง	*Proteus mirabilis*, *Citrobacter braaki* และ *S. aureus*	Lara และคณะ (2008)

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) SS-325, TOMY, Japan

3.1.2 Vertical Laminar flow VS-124, ISSCO, U.S.A.

3.1.3 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator)

3.1.4 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer LMS รุ่น VTX-3000L)

3.1.5 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) UV-2450, Shimadzu, Japan

3.1.6 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH Meter) MP220, Mettler Toledo, Switzerland

3.1.7 เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum pump)

3.1.8 กระดาษกรองเบอร์ 4 เส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร (whatman)

3.1.9 ตู้อบ (Hot Air Oven) ULM 500, Memmert, Germany

3.1.10 กระดาษกรองเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร (Toyo)

3.1.11 จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ขนาด 90×15 มิลลิเมตร

3.1.12 กล่องใส่จานเพาะเชื้อ (Petri dish box)

3.1.13 พาราฟิล์ม (Parafilm)

3.1.14 Duran bottle

3.1.15 บีกเกอร์ (Beaker)

3.1.16 สำลีพันก้าน

3.1.17 กระบอกตวง

3.1.18 ปิเปต

3.1.19 ไมโครปิเปต

3.1.20 ปากคีบ

3.1.21 ลูปเขี่ยเชื้อ

3.1.22 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

3.1.23 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JSM-5400)

3.2 เคมีภัณฑ์

3.2.1 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.2 อะซิโตน (Acetone) (May & Baker, British)

3.2.3 เอทานอล (Ethanol) (May & Baker, British)

3.2.4 เมทานอล (Methanol) (May & Baker, British)

3.2.5 เฮกเซน (Hexane) (May & Baker, British)

3.2.6 คลอโรฟอร์ม (Chloroform) (May & Baker, British)

3.2.7 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

3.2.8 อาหารวุ้นแข็ง Nutrient agar (Hi-media)

3.2.9 อาหารเหลว Nutrient broth

3.2.10 โมโนเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (monobasic sodium phosphate)

3.2.11 ไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (dibasic sodium phosphate)

3.2.12 Triptic soy broth (TSB)

3.2.13 Folin-ciocalteu

3.2.14 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO)

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

3.3.1 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จากคลังเก็บรักษาสายพันธุ์ ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ (ฝวช.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.3.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จากคลังเก็บรักษาสายพันธุ์ ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ (ฝวช.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.3.3 *Escherichia coli* ATCC 25922 จากคลังเก็บรักษาสายพันธุ์ ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ (ฝวช.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.4 สมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ

3.4.1 พลู

3.4.2 กระชาย

3.4.3 ข่า

3.4.4 ตำลึง

3.4.5 เบญกานี

3.5 วิธีเตรียมการสกัดสมุนไพร

นำสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด คือ พลู กระชาย ข่า ตำลึง และเบญกานี ล้างทำความสะอาด แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นบดให้ละเอียดเป็นผง แล้วทำการสกัดหยาบ ในอัตราส่วน 1:5 ของสมุนไพรต่อตัวทำละลายชนิดต่างๆ จากนั้นกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum pump) โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารสกัดที่ได้ระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Vacuum evaporator) เติมสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 20 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปใช้งาน

3.6 วิธีการเพาะจุลินทรีย์จากหลอดเชื้อแห้งแข็ง

ใช้กระดาษทิชชูชุบแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 พอหมาดเช็ดบริเวณรอบๆ หลอดจุลินทรีย์ (ampoule) จากนั้นใช้ตะไบเหล็กเลื่อยลงบนหลอดบริเวณกึ่งกลางสำลีให้เป็นรอยลึกลงไปในเนื้อแก้ว จากนั้นใช้ผ้าที่มีความหนาและสะอาดรองและมีกระดาษทิชชูชุบแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 หุ้มหลอดจุลินทรีย์ไว้ แล้วทำการหักหลอดจุลินทรีย์ โดยใช้นิ้วหัวแม่มือทั้งสองกดเบาๆบริเวณด้านที่ตรงข้ามกับรอยเลื่อยนั้น ดึงปลายหลอดจุลินทรีย์และสำลีทิ้งในหลอดน้ำยาฆ่าเชื้อ ใช้ไมโครปิเปตดูดอาหารเหลวที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละชนิด ประมาณ 0.3-0.4 มิลลิลิตร จากปริมาตร 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอดจุลินทรีย์ เพื่อละลายสารผสมเซลล์จุลินทรีย์ในหลอด ต้องทำในสภาพที่ปลอดเชื้อ ดูดสารละลายผสมเซลล์จุลินทรีย์จากหลอดจุลินทรีย์ให้หมด พร้อมกับเขี่ยกระดาษรหัสเชื้อใส่ลงในหลอดอาหารเหลวเดิม จากนั้นหยดสารละลายเซลล์จุลินทรีย์ลงบนจานอาหารแข็ง (agar plate) จำนวน 1 หยด สารละลายเซลล์จุลินทรีย์ที่เหลือทั้งหมดถ่ายใส่ลงในอาหารเหลว สำหรับจุลินทรีย์ที่หยดลงบนจานอาหารแข็ง ใช้ห่วงเหล็ก (loop) ฆ่าเชื้อเขี่ยกระจายเชื้อ (streak plate) ให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ สำหรับจุลินทรีย์ที่ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว (ทั้งในจานอาหารแข็งและในหลอดอาหารเหลว) นำไปบ่มที่อุณภูมิและเวลาที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิด เพื่อดูการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

3.7 วิธีการเตรียมสารละลายเชื้อเข้มข้น

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการเพาะในอาหารเหลวถ่ายลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นเอียง (Slant) 1 ลูป บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยสารละลายน้ำเกลือผสม(สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ น้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ 800 มิลลิลิตร) 3 มิลลิลิตร เหวี่ยงผสมให้เข้ากันแล้วดูดด้วยไมโครปิเปตปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่

ในขวดที่เตรียมน้ำเกลือไว้อยู่แล้ว 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ค่าที่ได้อยู่ระหว่าง 0.004 – 0.006 จะได้สารละลายเชื้อเข้มข้น 10^6 เซลล์

ส่วนการเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทำการชั่งโมโนโซเดียมฟอสเฟต 27.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร และชั่งไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต 53.65 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายทั้งสองผสมกันในอัตราส่วน โมโนโซเดียมฟอสเฟต 39 มิลลิลิตร ต่อ ไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต 61 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งได้สารละลายปริมาตร 200 มิลลิลิตร

3.8 วิธีทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

3.8.1 ทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion method

ใช้สำลีพันปลายไม้จุ่มเชื้อพอเปียกแล้ว swab เชื้อลงบนผิวอาหารวุ้นแข็ง 3 ระนาบ จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดสมุนไพรปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำมาวางบนจานเพาะเชื้อโดยทำการทดลองเช่นนี้ 3 ซ้ำ แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตผลการทดลองโดยดูลักษณะ clear zone และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสที่เกิดขึ้น

3.8.2 วิธีหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดสมุนไพร

นำเชื้อที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และ 48 ชั่วโมง สำหรับยีสต์ มาปรับความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ปราศจากเชื้อ จนมีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน 0.5 Mc farland และ เตรียม 2-fold serial dilution โดยนำหลอดทดลองขนาดเล็กมา 10 หลอด ใช้ปิเปตดูดอาหาร TSB ใส่ในหลอดที่ 2 จนถึงหลอดที่ 10 ปริมาณหลอดละ 1 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งดันไอ (Autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารสกัดจากสมุนไพรที่เตรียมไว้สำหรับทดสอบ (ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ใส่ในหลอดที่ 1 และหลอดที่ 2 ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าหลอดที่ 2 ให้สารสกัดจากสมุนไพรรวมตัวกับอาหาร TSB จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารในหลอดที่ 2 ไปใส่ในหลอดที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าหลอด และทำเจือจางต่อไปจนถึงหลอดที่ 9 จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารจากหลอดที่ 9 เขย่าแล้วทิ้งไป 1 มิลลิลิตร หลอดที่ 10 เป็นหลอดที่มีเฉพาะอาหาร TSB ใช้เป็นหลอดควบคุม ใช้ปิเปตดูดเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดทดลอง หลอดที่ 1 ถึง 10 หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มเพาะในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลจากความขุ่นของการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ใน

หลอดทดลอง ความเข้มข้นของหลอดทดลองสุดท้ายที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้ คือ ค่า MIC หรือ Minimal Inhibitory Concentration

3.8.3 วิธีหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ของสารสกัดสมุนไพร

นำอาหารเหลว (Broth) จากหลอดที่ดูแล้วว่าไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ตรวจผลดูการเจริญเติบโตของเชื้อ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรซึ่งสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ให้ลดลงไม่น้อยกว่าร้อยละ 99.9 ถือว่าเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC)

3.8.4 วิธีศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบต่อที่เวลาต่างๆ

ทำการเจือจางสารสกัดจากสมุนไพรที่ต้องการทดสอบในหลอดทดลองให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC ของสารที่ต้องการทดสอบ เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบในอาหาร TSB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของจุลินทรีย์ทดสอบ ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับสารละลาย McFarland No.0.5 จากนั้นผสมจุลินทรีย์ทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรที่เตรียมไว้ในหลอดทดลองด้วยอัตราส่วน 1:1 สำหรับชุดควบคุม (control) ให้ใช้อาหาร TSB แทนสารทดสอบ บ่มหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 และ 48 spread plate บน อาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.8.5 วิธีศึกษาประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจากสารสกัดผสม

นำสารสกัดที่ได้แต่ละชนิดที่ทราบผลแล้วว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม และทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดผสมด้วยวิธี Disc diffusion method

3.9 วิธีศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสมุนไพรแต่ละชนิดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

หาค่าสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดสมุนไพร พลู กระชาย ข่า ตำลึง และเบญกานี ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยในแต่ละหลอดทดลอง เตรียมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร สารสกัดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสาร folin ciocalteu ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นทิ้งไว้ 3 นาที เติมโซเดียมคาบอร์เนตปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 795 นาโนเมตร

3.10 วิธีศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดสมุนไพรอนุภาคขนาดต่าง ๆ

ทำการสกัดอนุภาคสมุนไพรขนาด 75, 180, 300 และ 600 นาโนเมตร โดยใช้อัตราส่วนสมุนไพรผงต่อตัวทำละลาย เป็น 1: 5 (กรัมน้ำหนักแห้ง: มิลลิลิตรของตัวทำละลาย) ที่อุณหภูมิห้อง โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้วัดค่าสารประกอบฟีนอลิก

3.11 วิธีศึกษาผลของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์จุลินทรีย์

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมเชื้อจุลินทรีย์ 10^6 เซลล์ 1 มิลลิลิตร และสารสกัดจากสมุนไพร 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองเชื้อและนำไปศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จุลินทรีย์โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

3.12 วิธีศึกษาผลของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพืชสมุนไพร

นำสมุนไพรแห้งที่ได้รับการคัดเลือกว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดไปศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสมุนไพรก่อนและหลังการสกัดเมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

บทที่ 4

ผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 น้ำหนักสมุนไพรก่อนและหลังอบ

สมุนไพรสด พลู กระชาย ข่า ตำลึง และเบญกานี อย่างละ 1 กิโลกรัม ภายหลังจากอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (ดังแสดงในรูปที่ 4.1-4.5) แล้วบดให้ละเอียดเป็นผง พบว่าร้อยละของน้ำหนักสมุนไพรแต่ละชนิดมีค่าเท่ากับ 12.53, 8.32, 11.98, 6.72 และ 97.00 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

รูปที่ 4.1 พลูก่อนและหลังอบแห้ง

รูปที่ 4.2 กระชายก่อนและหลังอบแห้ง

รูปที่ 4.3 ข่าก่อนและหลังอบแห้ง

รูปที่ 4.4 ตำลึงก่อนและหลังอบแห้ง

รูปที่ 4.5 เบญกานีก่อนและหลังอบแห้ง

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักสมุนไพร 1 กิโลกรัม ภายหลังการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

สมุนไพร	น้ำหนักแห้ง (ร้อยละ)
พลู	12.53
กระชาย	8.32
ข่า	11.98
ตำลึง	6.72
เบญกานี	97.00

4.2 การสกัดสารจากสมุนไพร

สกัดสารจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด คือ พลู กระชาย ข่า ตำลึง และเบญกานี ด้วยตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล น้ำกลั่น เฮกเซน และคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1:5 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากระเหยตัวทำละลาย (ดังแสดงในรูปที่ 4.6-4.10) จะได้สารสกัดหยาบ ซึ่งปริมาณของสารสกัดหยาบที่ได้มีค่าตั้งแต่ 2 - 52 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 4.2

สารสกัดพลูที่สกัดด้วย น้ำกลั่น เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และคลอโรฟอร์ม สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นสีเขียวเข้มค่อนข้างเหนียว และพบว่าสารสกัดหยาบของพลูที่ได้มีค่าเท่ากับ 10, 12, 10, 4 และ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุด รองลงมาคือน้ำกลั่นและเอทานอล ส่วนเฮกเซนและคลอโรฟอร์ม มีการละลายสารได้เท่ากันและได้สารสกัดน้อยที่สุด หรือเพียง 1/3 เท่าของการสกัดด้วยเมทานอล

สารสกัดกระชายที่สกัดด้วย น้ำกลั่น เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และคลอโรฟอร์ม สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นน้ำมันผสมอยู่กับของเหลวสีเหลือง และพบว่าสารสกัดหยาบของกระชายที่ได้มีค่าเท่ากับ 10, 24, 32, 4 และ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยเอทานอลสามารถสกัดสารได้สูงถึง 1/3 ของน้ำหนักสมุนไพรเริ่มต้น และสกัดสารได้ดีกว่าการใช้เฮกเซนหรือคลอโรฟอร์มที่สกัดกระชายได้ต่ำสุดถึง 8 เท่า

สารสกัดข่าที่สกัดด้วย น้ำกลั่น เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และคลอโรฟอร์ม สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น และพบว่าสารสกัดหยาบของข่าที่ได้มีค่าเท่ากับ 10, 16, 10, 4 และ 3.2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุด และสามารถสกัดได้ดีกว่าการใช้เฮกเซนหรือคลอโรฟอร์มถึง 4 เท่า รองลงมาคือ น้ำกลั่นและเอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพเท่ากัน ส่วนการสกัดด้วยเฮกเซนและคลอโรฟอร์มมีค่าน้อยสุด

สารสกัดตำลึงที่สกัดด้วย น้ำกลั่น เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และคลอโรฟอร์ม สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นสีเขียว และพบว่าสารสกัดหยาบของตำลึงที่ได้มีค่าเท่ากับ 4, 6, 6, 2 และ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ตามลำดับ การสกัดตำลึงด้วยตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด มีค่าน้อยเมื่อเทียบกับสมุนไพรอื่นๆ คือ เพียงร้อยละ 2-6 เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตาม การสกัดด้วยเมทานอลและเอทานอลให้สารสกัดมากที่สุดเท่ากัน คือ ร้อยละ 6 รองลงมา คือ น้ำกลั่น ส่วนเฮกเซนและคลอโรฟอร์ม สารสกัดได้น้อยเพียงร้อยะละ 2 เท่านั้น

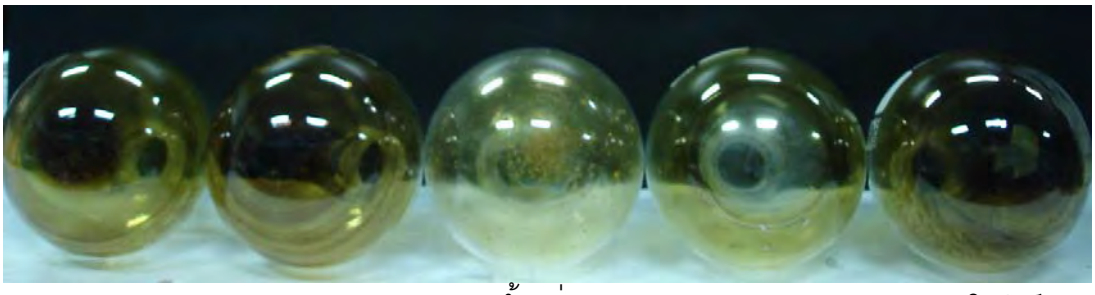
สารสกัดเบญกานีที่สกัดด้วย น้ำกลั่น เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และคลอโรฟอร์ม สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นผลึกสีน้ำตาล ขาว และพบว่าสารสกัดหยาบของเบญกานีที่ได้มีค่าเท่ากับ 30, 52, 42, 2 และ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ให้สารสกัดสูงมากที่สุดเมื่อเทียบกับพืช 4 ชนิด ก่อนหน้านี้ โดยเมทานอลสามารถสกัดได้ถึงครึ่งหนึ่งของน้ำหนักสมุนไพรเริ่มต้น หรือเป็น 16 เท่าของสารสกัดด้วยเฮกเซนและคลอโรฟอร์ม การสกัดด้วยเอทานอลให้สารสกัดมากแป็นอันดับสอง และอันดับสามคือ น้ำกลั่น

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า เมทานอลและเอทานอล เป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด รองลงมาคือน้ำกลั่น ส่วนเฮกเซนและคลอโรฟอร์มซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยหรือไม่มีขั้วนั้น มีประสิทธิภาพการสกัดได้ต่ำ เพียงร้อยละ 2-4 ในสมุนไพรทั้งหมด

ตารางที่ 4.2 ปริมาณของสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

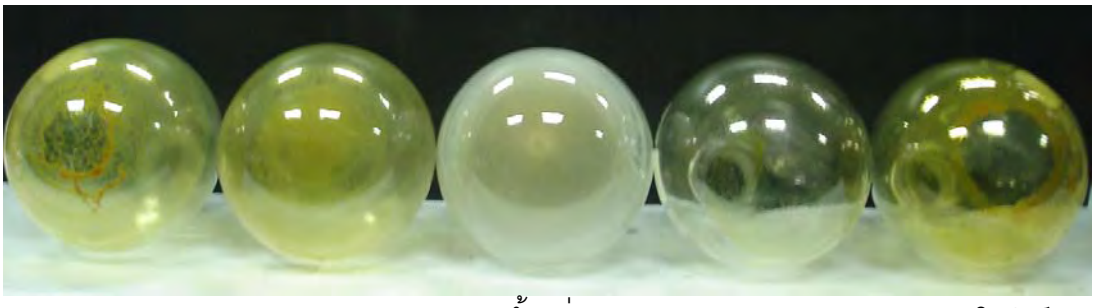
สมุนไพร	ตัวทำละลาย	สารสกัดหยาบที่ได้ (กรัม/100 กรัม นน.แห้ง)
พลู	น้ำกลั่น	10
	เมทานอล	12
	เอทานอล	10
	คลอโรฟอร์ม	4
	เฮกเซน	4
กระชาย	น้ำกลั่น	10
	เมทานอล	24
	เอทานอล	32
	คลอโรฟอร์ม	4
	เฮกเซน	4

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	สารสกัดหยาบที่ได้ (กรัม/100 กรัม นน.แห้ง)
ข่า	น้ำกลั่น	10
	เมทานอล	16
	เอทานอล	10
	คลอโรฟอร์ม	3.2
	เฮกเซน	4
ตำลึง	น้ำกลั่น	4
	เมทานอล	6
	เอทานอล	6
	คลอโรฟอร์ม	2
	เฮกเซน	2
เบญกานี	น้ำกลั่น	30
	เมทานอล	52
	เอทานอล	42
	คลอโรฟอร์ม	2
	เฮกเซน	2



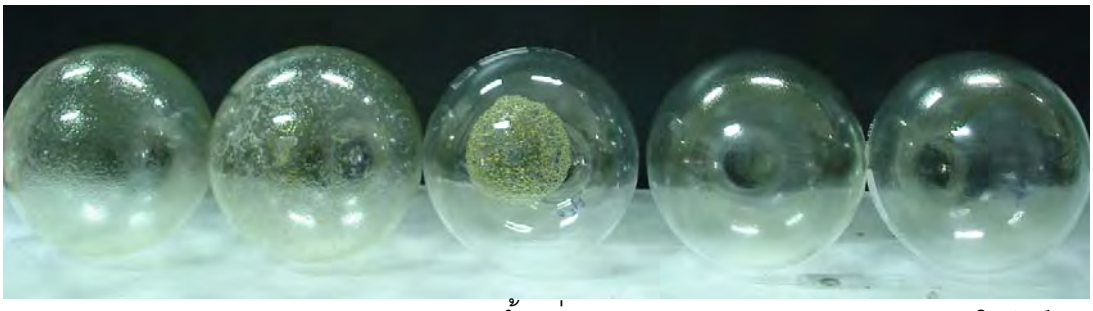
เมทานอล เอทานอล น้ำกลั่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม

รูปที่ 4.6 สารสกัดพลูที่ได้หลังจากระเหยตัวทำละลาย



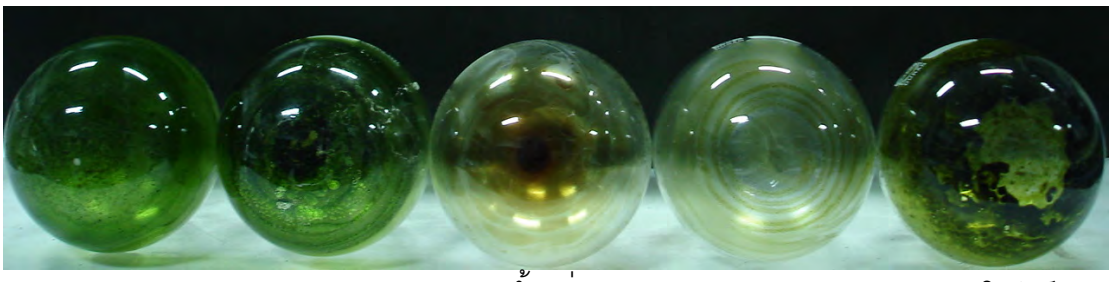
เมทานอล เอทานอล น้ำกลั่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม

รูปที่ 4.7 สารสกัดกระชายที่ได้หลังจากระเหยตัวทำละลาย



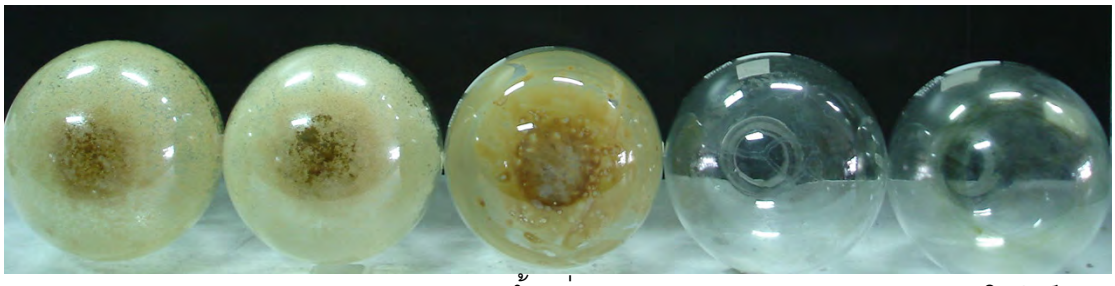
เมทานอล เอทานอล น้ำกลั่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม

รูปที่ 4.8 สารสกัดข่าที่ได้หลังจากระเหยตัวทำละลาย



เมทานอล เอทานอล น้ำกลั่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม

รูปที่ 4.9 สารสกัดตำลึงที่ได้หลังจากระเหยตัวทำละลาย



เมทานอล เอทานอล น้ำกลั่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม

รูปที่ 4.10 สารสกัดเบญกานีที่ได้หลังจากระเหยตัวทำละลาย

4.3 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย

4.3.1 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion method

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพรคือ พลู กระชาย ข่า ตำลึง และเบญกานี ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *E. coli*, *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ผลทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเฉลี่ย (มิลลิเมตร) ± S.D.[a]		
		E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*
พลู	น้ำกลั่น	8.3 ± 0.6	9.3 ± 0.6	8.7 ± 1.2
	เมทานอล	17.0 ± 2.6	18.7 ± 1.5	20.3 ± 1.2
	เอทานอล	18.0 ± 1.7	20.7 ± 1.2	20.7 ± 0.6
	คลอโรฟอร์ม	14.7 ± 2.1	16.7 ± 2.1	18.0 ± 1.0
	เฮกเซน	9.3 ± 1.2	12.3 ± 0.6	13.0 ± 1.0
กระชาย	น้ำกลั่น	-	-	-
	เมทานอล	11.3 ± 0.6	11.7 ± 0.6	13.3 ± 1.5
	เอทานอล	13.3 ± 1.2	12.3 ± 0.6	17.0 ± 3.0
	คลอโรฟอร์ม	13.0 ± 0	14.0 ± 1.0	14.7 ± 1.5
	เฮกเซน	12.3 ± 0.6	12.3 ± 0.6	14.3 ± 1.2

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเฉลี่ย (มิลลิเมตร) ± S.D.[a]		
		E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*
ข่า	น้ำกลั่น	-	-	-
	เมทานอล	-	-	-
	เอทานอล	-	-	-
	คลอโรฟอร์ม	-	12 ± 0	12.3 ± 0.6
	เฮกเซน	-	13 ± 1.0	13.6 ± 0.6
ตำลึง	น้ำกลั่น	-	-	10.7 ± 1.2
	เมทานอล	-	9.6 ± 1.5	12 ± 1.0
	เอทานอล	-	10.7 ± 1.5	13.3 ± 0.6
	คลอโรฟอร์ม	-	9.7 ± 0.6	14.0 ± 1.0
	เฮกเซน	-	11.3 ± 0.6	16.0 ± 1.7
เบญกานี	น้ำกลั่น	15.7 ± 0.6	21.3 ± 1.0	18.0 ± 1.0
	เมทานอล	20.3 ± 1.2	25.3 ± 0.6	22.0 ± 1.0
	เอทานอล	19.0 ± 1.0	24.0 ± 1.0	20.0 ± 1.0
	คลอโรฟอร์ม	10.3 ± 1.5	13.0 ± 1.0	12.7 ± 0.6
	เฮกเซน	10.3 ± 1.0	12.0 ± 0	11.3 ± 1.2

[a] หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส

ผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของพลู ดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลและเมทานอล มีผลยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเฮกเซน ตามลำดับ ส่วนสารสกัดด้วยน้ำกลั่นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยที่สุด เมื่อเทียบกันระหว่างชนิดของสายพันธ์แบคทีเรีย สารสกัดจากพลูสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*B. subtilis* และ *S. aureus*) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) ซึ่งเชื้อ *S. aureus* ถูกยับยั้งได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับ *B. subtilis* โดยพบว่าในสารสกัดพลูมีสาร Eugenol ซึ่งมีมากถึงร้อยละ 93.7 (Olonisakin และ Oladimej, 2007) และมีสาร Hydroxychavicol (Sandeep และคณะ, 2009) ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อได้ดี

ส่วนผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของกระชาย ดังแสดงในรูปที่ 4.12 สารสกัดจากตัวทำละลาย 4 ชนิด ยกเว้นน้ำกลั่น สามารถยับยั้งแบคทีเรีย 3 ชนิดได้ดี โดยให้แถบวงใสที่กว้างและใกล้เคียงกัน ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวก (*B. subtilis*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) ส่วนเชื้อ *S. aureus* ถูกยับยั้งได้มากที่สุด ส่วนสารสกัดด้วยน้ำกลั่นไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้เลย โดยพบว่าสารในกระชายที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อคือ Geraniol ซึ่งเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยหลายชนิด ซึ่งยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก ชนิดกลม และชนิดท่อนได้ดี (Pattnaik et al., 1997) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยครั้งนี้ที่สารสกัดจากกระชายสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ดีกว่าเชื้อ *E. coli*

ส่วนสารสกัดข่าที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด พบว่าไม่มีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้เลยในทุกกรณี ส่วนประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกนั้น พบว่า สารสกัดด้วยเฮกเซนยับยั้งได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจากคลอโรฟอร์ม ส่วนสารสกัดจากเมทานอล เอทานอล และน้ำกลั่น ไม่พบประสิทธิภาพในการยับยั้ง ดังแสดงในรูปที่ 4.13 โดยพบว่าในสารสกัดข่ามีสาร 1′- Acetoxychavicol acetate (ACA) ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ (ภัทราวดี และคณะ, 2010) โดยผ่านเข้าผนังเซลล์ไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในและชั้นนอกของเซลล์ทำให้ Cytoplasm ภายในเซลล์ตกตะกอน และทำให้ผนังเซลล์ทั้งสองสูญเสียความสามารถในการควบคุมการแพร่หรือขนส่งสารเข้าออกจากเซลล์ จึงส่งผลให้สารต่างๆที่อยู่ภายในเซลล์ไหลออกนอกเซลล์

ส่วนในสารสกัดตำลึงด้วยตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ ส่วนความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก พบว่า สารสกัดด้วยเฮกเซนยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด เมื่อสกัดด้วยน้ำกลั่นจะทำให้มีประสิทธิภาพน้อยทำให้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้เลย ถือว่าเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพน้อยที่สุดในการสกัดสารยับยั้งในตำลึง ดังแสดงในรูปที่ 4.14

สารสกัดเบญกานีมีประสิทธิมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสูงมาก ดังแสดงในรูปที่ 4.15 จากการทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเฉลี่ยของสารสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด อยู่ในช่วง 10 – 25 มิลลิเมตร เมื่อสกัดด้วยเมทานอล เอทานอล น้ำกลั่น คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน โดยพบว่า เมื่อสกัดด้วยเมทานอลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Muskhazli และคณะ (1998) ที่พบว่าสารสกัดเบญกานีด้วยเมทานอลให้ผลยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดด้วยเฮกเซนและคลอโรฟอร์มมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้น้อยและมีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนงานวิจัยของ Metin และคณะ (1998) ได้รายงานว่าสารสกัดเบญกานีด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งเชื้อได้หลายชนิดเช่นกัน และงานวิจัยของ ราชิดา หมั่นยามีน (1997) ได้รายงานว่าสารสกัดจากเบญกานีมีฤทธิ์ต้านเชื้อดีที่สุดโดยมีขนาดเส้นผ่าน

ศูนย์กลางวงใสเฉลี่ยประมาณ 20 – 21 มิลลิเมตร โดยสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ คือ สารกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งมีมากถึงร้อยละ 50-70

จากการทดลองจะพบว่าการสกัดสารจากสมุนไพรบางชนิดโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย จากคุณสมบัติของน้ำจะสกัดเอาสารเฉื่อยที่เป็นอาหารของจุลินทรีย์ออกมาด้วยทำให้เกิดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้สารสกัดเสื่อมคุณภาพ เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อจึงพบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

สารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธ์ของเชื้อแบคทีเรีย โดยส่วนใหญ่พบว่าสารสกัดจากพืชทั้ง 5 ชนิดมีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ คือ 1′- Acetoxychavicol acetate, Eugenol, Geraniol และแทนนิน ซึ่งสารเหล่านี้จะเข้าไปควบคุมการสร้างโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย ขัดขวางการละลายของชั้นไขมันใน cytoplasmic membrane รวมทั้งยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำให้โปรตีนภายในเซลล์รวมตัวกัน

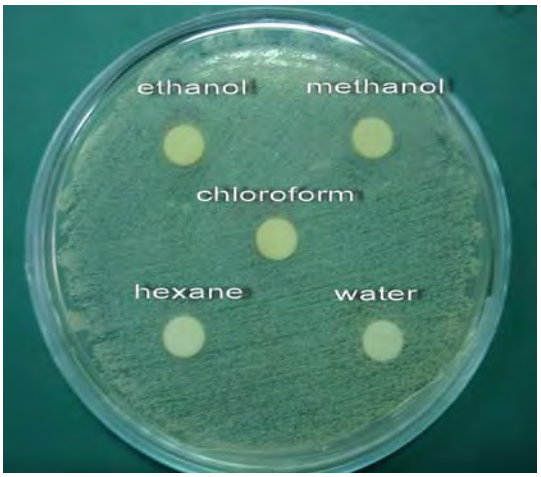
จากผลการทดลองส่วนนี้จะพบว่า ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีและมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับผลการทดลองของงานวิจัยคนอื่นๆ

(ก)

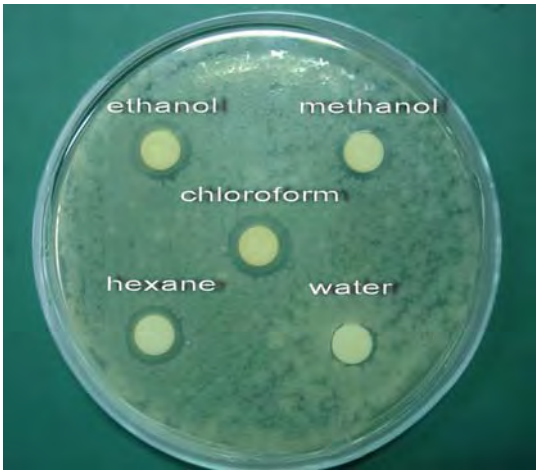
(ข)

(ค)

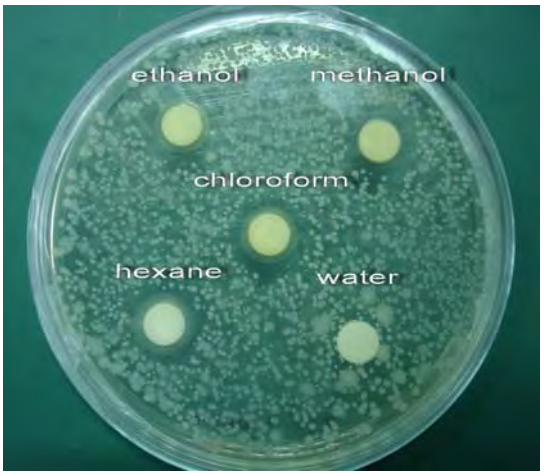
รูปที่ 4.11 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดพลูจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร DMSO บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) *E. coli*, (ข) *B. subtilis* และ (ค) *S. aureus*



(ก)

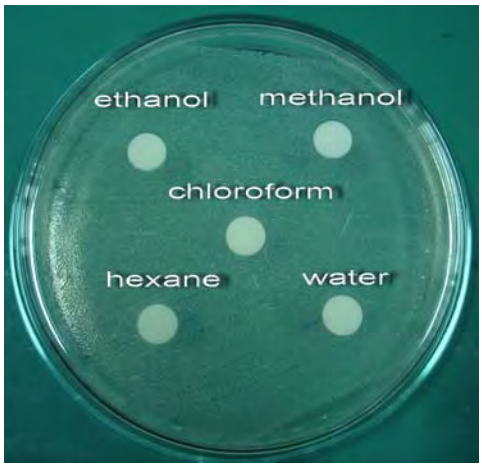


(ข)



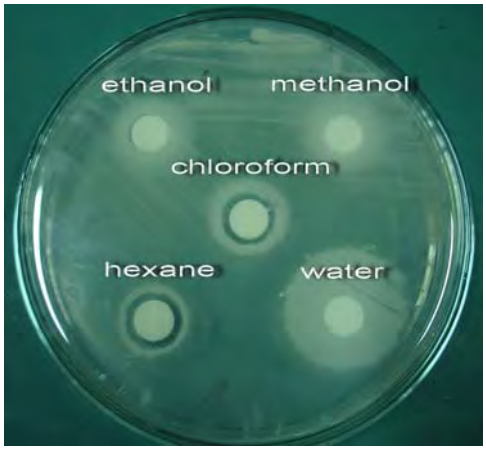
(ค)

รูปที่ 4.12 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดกระชายจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร DMSO บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) *E. coli*, (ข) *B. subtilis* และ (ค) *S. aureus*



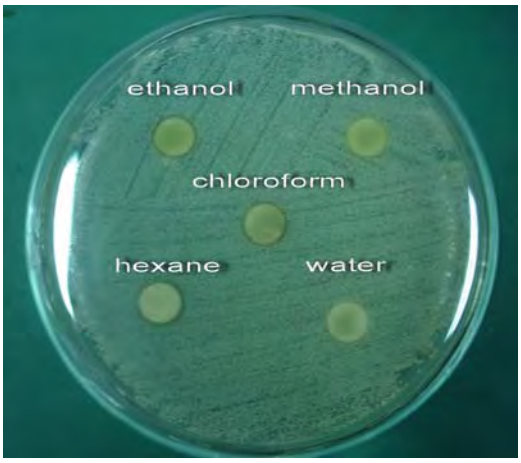
(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 4.13 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดข่าจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร DMSO บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) *E. coli*, (ข) *B. subtilis* และ (ค) *S. aureus*

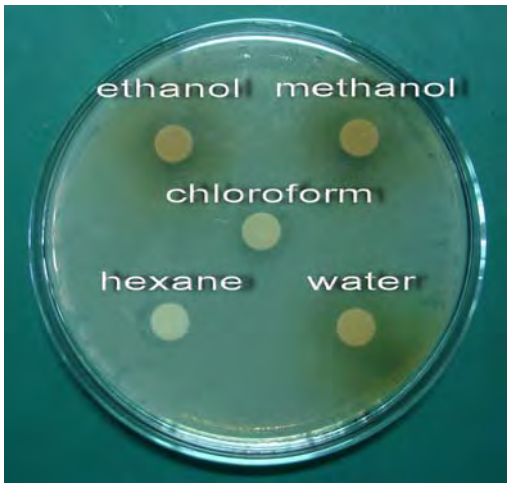


(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.14 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดตำลึงจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร DMSO บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) *E. coli*, (ข) *B. subtilis* และ (ค) *S. aureus*



(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.15 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดเบญกานีจากตัวทำละลายชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร DMSO บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) *E. coli,* (ข) *B. subtilis* และ (ค) *S. aureus*

4.3.2 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ด้วยวิธี Disc diffusion method พบว่า สารสกัดจากสมุนไพรด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อได้แตกต่างกัน โดยสารสกัดพลูและกระชายด้วยเอทานอล สารสกัดข่าและตำลึงด้วยเฮกเซน และสารสกัดเบญกานีด้วยเมทานอล มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด จากนั้นนำสารสกัดต่างๆ มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย คือ พลู กระชาย ข่า ตำลึง และเบญกานี ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* ในหลอดทดลอง โดยวิธี broth dilution method ตั้งแต่ความเข้มข้น 2.5 – 0.0049 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มีความสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังแสดงในตารางที่ 4.4-4.8

สารสกัดพลูมีความสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อมีค่าเท่ากับ 1.25, 0.625 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารสกัดพลูยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*B. subtilis* และ *S. aureus*) ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของนนทกรณ์ และคณะ (2543) ที่รายงานว่า ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดพลูด้วยเอทานอลที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 3 ชนิด อยู่ในช่วง 1.5625 – 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดกระชายมีความสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อมีค่าเท่ากับ 1.25, 0.625 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารสกัดกระชายสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์อีก 2 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Suwimon และคณะ (2010) ที่รายงานว่า สารสกัดจากระชายมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดกระชายอยู่ในช่วง 0.5 – 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดข่ามีความสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อมีค่าเท่ากับ 2.5, 1.25 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilsi* และ *S. aureus* มีค่าเท่ากันและยับยั้งได้ดีที่สุดเช่นเดียวกันกับสารสกัดจากพลู ส่วน *E. coli* ยับยั้งได้น้อยสุดโดยต้องใช้ความเข้มข้นมากถึง 2 เท่า จึงจะยับยั้งเชื้อได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Kiranmayee และคณะ (2010) ที่รายงานว่า สารสกัดจากข่ามีความสามารถใน

การยับยั้งเชื้อ *B. subtilis, E. coli* และ *S. aureus* ได้ โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยังเชื้ออยู่ในช่วง 0.04 - 1.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดตำลึงมีความสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อมีค่าเท่ากับ 2.5, 0.625 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดตำลึงออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S.aureus* ได้ดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Hussain (2010) โดยหาค่า MIC ของสารสกัดตำลึงต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดตำลึง 2.5 – 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สารสกัดเบญกานีมีความสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อมีค่าเท่ากับ 1.25, 0.3125 และ 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดจากเบญกานีสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบในความเข้มข้นที่เจือจางกว่าสารสกัดจากสมุนไพรอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Basri และ Fan (2005) ที่รายงานว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus, B. subtilis, S. epidermidis* และ *P. aeruginosa*) หรือค่า MIC ที่วัดได้อยู่ในช่วง 0.0781 - 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Archa Vermani (2009) ที่รายงานว่า สารสกัดเบญกานีด้วยเมทานอล และน้ำกลั่น ค่า MIC ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้มีค่าเท่ากับ 0.1563 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า สารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกเป็นโมเลกุลของลิโปโพลีแซคคาไรด์ (Helander, 1998) เมื่อสารสกัดสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบจะต้องแพร่ผ่านชั้นของลิโปโพลีแซคคาไรด์ก่อนถึงจะสามารถเข้าไปทำลายเซลล์ได้ ทำให้การยับยั้งหรือฆ่าเชื้อทำได้ยากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

ตารางที่ 4.4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดพลูด้วยเอทานอลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เข้มข้น 10^6 เซลล์ ใน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัด 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เชื้อจุลินทรีย์		
	E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*
2.5000	-	-	-
1.2500	-	-	-
0.6250	+	-	-
0.3125	+	+	+
0.1563	+	+	+
0.0781	+	+	+
0.0391	+	+	+
0.0195	+	+	+
0.0098	+	+	+
0.0049	+	+	+

หมายเหตุ - คือ ไม่พบเชื้อเจริญเติบโต , + คือ พบเชื้อเจริญเติบโต

ตารางที่ 4.5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดกระชายด้วยเอทานอลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เข้มข้น 10^6 เซลล์ ใน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัด 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เชื้อจุลินทรีย์		
	E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*
2.5000	-	-	-
1.2500	-	-	-
0.6250	+	-	+
0.3125	+	+	+
0.1563	+	+	+
0.0781	+	+	+
0.0391	+	+	+
0.0195	+	+	+
0.0098	+	+	+
0.0049	+	+	+

หมายเหตุ - คือ ไม่พบเชื้อเจริญเติบโต , + คือ พบเชื้อเจริญเติบโต

ตารางที่ 4.6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดข่าด้วยเฮกเซนยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เข้มข้น 10^6 เซลล์ ใน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัด 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เชื้อจุลินทรีย์		
	E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*
2.5000	-	-	-
1.2500	+	-	-
0.6250	+	+	+
0.3125	+	+	+
0.1563	+	+	+
0.0781	+	+	+
0.0391	+	+	+
0.0195	+	+	+
0.0098	+	+	+
0.0049	+	+	+

หมายเหตุ - คือ ไม่พบเชื้อเจริญเติบโต , + คือ พบเชื้อเจริญเติบโต

ตารางที่ 4.7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดตำลึงด้วยเฮกเซนยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เข้มข้น 10^6 เซลล์ ใน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัด 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เชื้อจุลินทรีย์		
	E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*
2.5000	-	-	-
1.2500	+	-	-
0.6250	+	-	-
0.3125	+	+	+
0.1563	+	+	+
0.0781	+	+	+
0.0391	+	+	+
0.0195	+	+	+
0.0098	+	+	+
0.0049	+	+	+

หมายเหตุ - คือ ไม่พบเชื้อเจริญเติบโต , + คือ พบเชื้อเจริญเติบโต

ตารางที่ 4.8 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเบญกานีด้วยเมทานอลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เข้มข้น 10^6 เซลล์ ใน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัด 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เชื้อจุลินทรีย์		
	E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*
2.5000	-	-	-
1.2500	-	-	-
0.6250	+	-	-
0.3125	+	-	-
0.1563	+	+	+
0.0781	+	+	+
0.0391	+	+	+
0.0195	+	+	+
0.0098	+	+	+
0.0049	+	+	+

หมายเหตุ - คือ ไม่พบเชื้อเจริญเติบโต , + คือ พบเชื้อเจริญเติบโต

4.3.3 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ของสารสกัดจากสมุนไพร

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทย คือ พลู กระชาย ข่า ตำลึง และเบญกานี ที่มีความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* จากผลการทดลอง สมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มีความสามารถในการฆ่าเชื้อได้ โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อมีค่าตั้งแต่ 0.625 – 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.9

พลูและตำลึงมีความสามารถในการฆ่าเชื้อ *E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อมีค่าเท่ากันคือ 2.5, 1.25 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กระชายและข่ามีความสามารถในการฆ่าเชื้อ *E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อมีค่าเท่ากันคือ 2.5, 2.5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Kiranmayee และคณะ (2010) ที่รายงานว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดข่าที่สามารถฆ่าเชื้อ *B. subtilis, E. coli* และ *S. aureus* ได้ อยู่ในช่วง 0.08 – 2.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากรายงานการวิจัยของ ภาณุวัฒน์ แย้มสกุล (2009) ซึ่งได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากข่าในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในสุกรคือ *E. coli* พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้มีค่าเท่ากับ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าของงานวิจัยครั้งนี้

ส่วนเบญกานีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* มีค่าเท่ากับ 1.25, 0.625 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยที่ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *B. subtilis* ของสารสกัดเบญกานีมีค่าสูงเมื่อเทียบกับสารสกัดอื่นๆ เพราะสามารถใช้ความเข้มข้นที่เจือจางกว่า คือ เพียง 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Basri และ Fan (2005) ที่รายงานว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus, B. subtilis, S. epidermidis* และ *P. aeruginosa*) หรือค่า MBC ที่วัดได้อยู่ในช่วง 0.3125 – 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดลองเมื่อทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจากสารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด พบว่า สารสกัดจากสมุนไพรสามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้อย่างดี โดยออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และสารสกัดจากเบญกานีสามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด เนื่องจากใช้ในความเข้มข้นที่เจือจางกว่าสารสกัดจากสมุนไพรชนิดอื่นๆ

ตารางที่ 4.9 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เข้มข้น 10^6 เซลล์ ใน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัด 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สมุนไพร	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*
พลู	2.5	1.25	2.5
กระชาย	2.5	2.5	2.5
ข่า	2.5	2.5	2.5
ตำลึง	2.5	1.25	2.5
เบญกานี	1.25	0.625	0.625

4.3.4 การศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบต่อหน่วยเวลา

การวิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดจากสมุนไพรไทยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบต่อหน่วยเวลา โดยการใช้สารสกัดจากเบญกานี ในอัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลายเมทานอล เป็น 1:5 (กรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7 วัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดเบญกานีที่เวลาต่างๆ โดยใช้สารสกัด 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของเชื้อเข้มข้น 10^6 เซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อจุลินทรีย์		
	E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*
0	+	+	+
2	+	+	+
4	+	+	+
6	-	-	-
8	-	-	-
16	-	-	-
24	-	-	-

หมายเหตุ - คือ ไม่พบเชื้อเจริญเติบโต , + คือ พบเชื้อเจริญเติบโต

จำนวนเชื้อ *E. coli* หลังจากสัมผัสกับสารสกัดเบญกานี พบว่า ที่เวลา 0 – 4 ชั่วโมง ยังพบว่า มีเชื้อเจริญเติบโตแต่ปริมาณเชื้อลดน้อยลงตามเวลาที่เพิ่มมากขึ้น หลังจากเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง จะไม่ปรากฏมีเชื้อ *E. coli* เหลืออยู่

จำนวนเชื้อ *B. subtilis* หลังจากสัมผัสกับสารสกัดเบญกานี พบว่า ที่เวลา 0 - 6 ชั่วโมง เชื้อมีจำนวนลดลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง ปรากฏว่า จำนวนเชื้อลดลงเหลืออยู่เพียงร้อยละ 20 และที่เวลา 6 ชั่วโมง จะไม่ปรากฏเชื้อ *B. subtilis* เหลืออยู่

ส่วนจำนวนเชื้อ *S. aureus* หลังจากสัมผัสกับสารสกัดเบญกานี พบว่า ที่เวลา 0 – 4 ชั่วโมง จำนวนเชื้อจะลดลงเหลือเพียง ร้อยละ 60 จนเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง จะไม่ปรากฏเชื้อ *S. aureus* เหลืออยู่เช่นเดียวกัน

จากการทดลองพบว่า ระยะเวลาที่สารสกัดเบญกานีสัมผัสกับเชื้อทั้ง 3 ชนิดจะมีอิทธิพลต่อการฆ่าเชื้อ โดยเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นยิ่งทำให้จำนวนเชื้อลดน้อยลง และเวลาในการที่เชื้อสัมผัสกับสารสกัดนานถึง 6 ชั่วโมง จะเป็นเวลาน้อยที่สุดที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Won และคณะ (1997) ที่รายงานว่า สารสกัดจากสมุนไพรสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้ จะต้องใช้เวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง จึงจะสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด

4.3.5 การศึกษาประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของสารสกัดผสม

จากการทดลองข้างต้นพบว่า สมุนไพรที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีคือ พลู กระชาย และเบญกานี สามารถนำมาศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้โดยการผสมสารสกัดต่างๆ ในความเข้มข้นที่กำหนด ดังนี้

สูตรที่ 1 สารสกัดพลูและเบญกานี (อัตราส่วน 1:1)

สูตรที่ 2 สารสกัดกระชายและเบญกานี (อัตราส่วน 1:1)

สูตรที่ 3 สารสกัดพลูและกระชาย (อัตราส่วน 1:1)

สูตรที่ 4 สารสกัดพลู กระชาย และเบญกานี (อัตรส่วน 1:1:1)

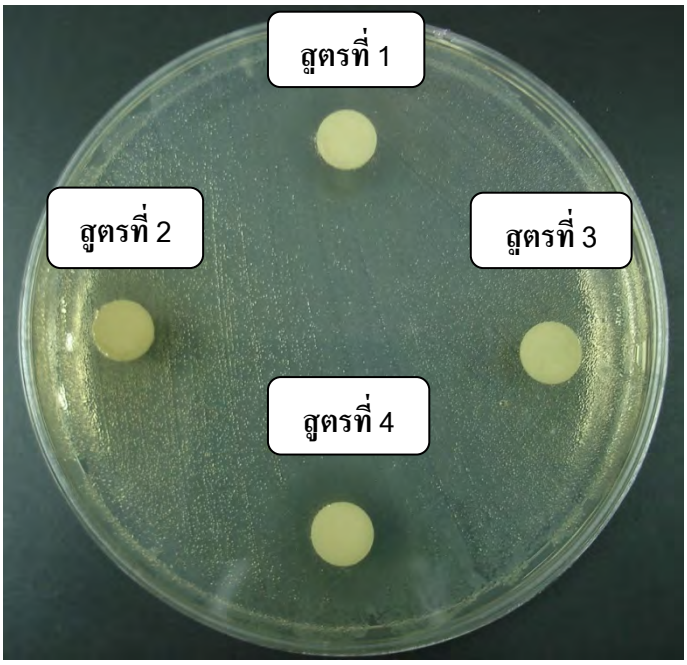
จากสูตรที่ 1 – 4 มีความเข้มข้นรวมของสารสกัดผสม คือ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด สารสกัดผสมทั้ง 4 สูตรมีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดผสมจากสมุนไพรไทย

สารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเฉลี่ย (มิลลิเมตร) ± S.D.[a]		
	E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*
สูตรที่ 1	12.3 ± 0.6	19.3 ± 0.6	20.8 ± 0.8
สูตรที่ 2	14.7 ± 0.8	19.8 ± 0.8	21.5 ± 0.5
สูตรที่ 3	10.7 ± 0.6	11.7 ± 1.2	12.7 ± 0.6
สูตรที่ 4	15.5 ± 1.3	19.8 ± 0.3	20.7 ± 0.3

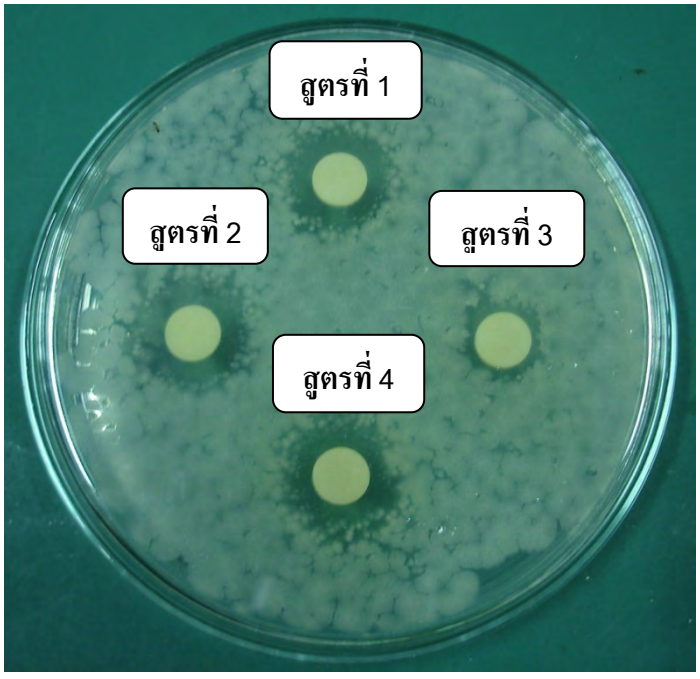
[a] หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส

จากการทดลองพบว่า การเสริมประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อเชื้อ ทั้ง 3 ชนิด ในสูตรที่ 1, 2 และ 4 มีประสิทธิภาพดีกว่าสูตรที่ 3 โดยขนาดผ่านศูนย์กลางวงใสเฉลี่ยของสูตรที่ 1, 2 และ 4 ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* มีค่าเท่ากับ 12.3, 14.7 และ15.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.16



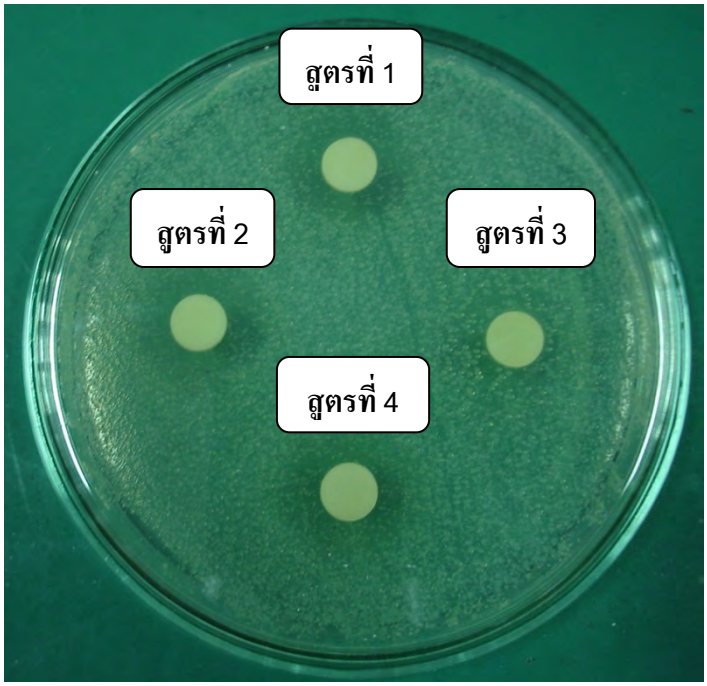
รูปที่ 4.16 ประสิทธิภาพของสารสกัดผสมในการยับยั้งเชื้อ *E. coli*

สำหรับการยับยั้งเชื้อ *B. subtils* พบว่าสารสกัดในสูตรที่ 2 คือ พลู และเบญานี มีผลยับยั้งเชื้อได้ดีสุดโดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเฉลี่ยกว้างถึง 19.8 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 ประสิทธิภาพของสารสกัดผสมในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*

ส่วนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ให้ผลเช่นเดียวกันคือ สารสกัดในสูตรที่ 2 ให้ผลยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเฉลี่ย 21.5 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.18



รูปที่ 4.18 ประสิทธิภาพของสารสกัดผสมในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*

จากการทดลองเมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรพบว่า สารสกัดผสมจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับการทดลองที่ 4.3.1 ถือว่าประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของสารสกัดผสมดีกว่าการใช้สารสกัดเพียงชนิดเดียว เนื่องจากสารสกัดผสมที่ความเข้มข้นเพียง 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลการยับยั้ง (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเฉลี่ย) ใกล้เคียงกับสารสกัดจากสมุนไพรเพียงชนิดเดียวที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.4 ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกจากสมุนไพรไทย

จากการทดลองหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากการสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล น้ำกลั่น เฮกเซน และคลอโรฟอร์ม ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.0025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้มีค่าตั้งแต่ 0.07 – 14.8 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของสมุนไพรแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากสมุนไพรจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ อัตราส่วนที่ใช้ในการสกัด 1:5 กรัมต่อมิลลิลิตรของตัวทำละลาย ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

สมุนไพร	สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้ (กรัม/100 กรัม นน.แห้ง)				
	น้ำกลั่น	เมทานอล	เอทานอล	คลอโรฟอร์ม	เฮกเซน
พลู	2.4	11.2	12.4	13.6	13.7
กระชาย	0.2	0.9	0.7	3.4	1
ข่า	0.1	0.4	0.5	0.6	0.4
ตำลึง	0.7	0.5	0.5	0.3	0.07
เบญกานี	9.2	14.8	12	0.7	0.2

สารสกัดพลูที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เมื่อศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก พบว่า สารสกัดด้วยน้ำกลั่น เมทานอล เอทานอล คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 2.4, 11.2, 12.4, 13.6 และ 13.7 เปอร์เซ็น โดยน้ำหนักของสมุนไพรแห้ง ตามลำดับ โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดด้วยเฮกเซน และคลอโรฟอร์มมีค่ามาก โดยเมื่อใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย จะสามารถสกัดได้ปริมาณมากที่สุด รองลงมาเป็นเอทานอลและเมทานอล ส่วนน้ำกลั่นสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ปริมาณน้อยสุด ซึ่งน้อยกว่าเฮกเซนถึง 5 เท่า เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกในใบพลูเป็นสารที่มีขั้วต่ำ ดังนั้นเฮกเซนซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยที่สุดจึงสามารถละลายลายสารประกอบฟีนอลิกออกมาได้มาก ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Maisuthisakul ที่รายงานว่า ตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยสามารถสกัดสารฟีนอลิกออกมาได้ดีที่สุด โดยสารประกอบฟีนอลิกในพลูเป็นสารกลุ่มที่มีขั้วต่ำเนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งระหว่างน้ำมัน – น้ำมีค่าสูง

ส่วนสารสกัดกระชายที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เมื่อศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก พบว่า สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยน้ำกลั่น เมทานอล เอทานอล คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 0.2, 0.9, 0.7, 3.4 และ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของสมุนไพรแห้ง ตามลำดับ โดยสารสกัดกระชายด้วยคลอโรฟอร์มมีปริมาณสารประกอบฟินอลิกมากที่สุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่นๆ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ได้ศึกษาหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในกระชาย ได้รายงานว่า สารประกอบฟีนอลิกที่พบส่วนใหญ่เป็นสารประเภทฟลาโวนอยด์ (Mongkolsuk และDean, 1964 ; Trakoontivakorn et al.,2001 ,ธนศักดิ์ และคณะ ,2008)

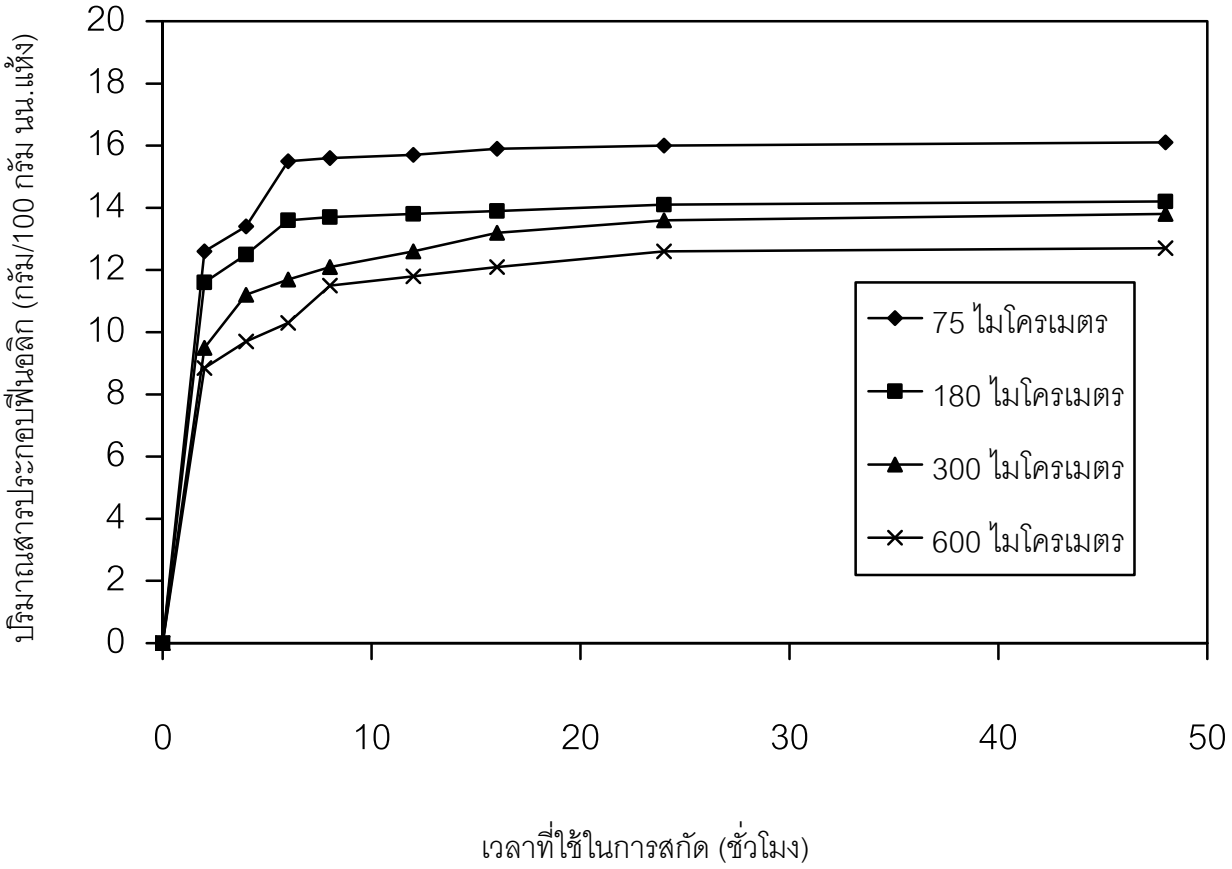
สารสกัดข่าที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เมื่อศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก พบว่า สารสกัดข่าด้วยน้ำกลั่น เมทานอล เอทานอล คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 0.1, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของสมุนไพรแห้ง ตามลำดับ โดยสารสกัดจากคลอโรฟอร์มสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ปริมาณมากที่สุด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Nopparat และ Siree (2009)

สารสกัดตำลึงที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เมื่อศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก พบว่า สารสกัดตำลึงที่สกัดด้วยน้ำกลั่น เมทานอล เอทานอล คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 0.7, 0.5, 0.5, 0.3 และ 0.07 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของสมุนไพรแห้ง ตามลำดับ โดยสารสกัดจากน้ำกลั่นสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ปริมาณมากที่สุด และจากผลงานวิจัยของ Arshad Hussain (2010) ที่ได้ทำการศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในตำลึงที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography และ High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) พบว่า สารสกัดจากตำลึงด้วยน้ำกลั่นและเอทานอล มีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ

สารสกัดเบญกานีที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เมื่อศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก พบว่า สารสกัดเบญกานีที่สกัดด้วยน้ำกลั่น เมทานอล เอทานอล คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 9.2, 14.8, 12, 0.7 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของสมุนไพรแห้ง ตามลำดับ โดยสารสกัดจากเฮกเซนสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ปริมาณน้อยที่สุด ส่วนเมทานอลสกัดได้ปริมาณมากที่สุด จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกพบว่า สารสกัดจากเบญกานีมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด คือ 14.8 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของสมุนไพรแห้ง ค่าที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์ของ Kaur และคณะ (2008) ที่ได้รายงานว่า มีมากถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ค่าที่แตกต่างอาจเกิดจากแหล่งของเบญกานีที่ใช้ทดลอง

4.5 ผลของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดอนุภาคสมุนไพรขนาดต่าง ๆ ตามเวลา

จากการศึกษาอิทธิพลของขนาดอนุภาคที่มีต่อการสกัดเบญกานี โดยใช้อัตราส่วนเบญกานีผง ต่อ เมทานอล เป็น 1: 5 (กรัมน้ำหนักแห้ง: มิลลิลิตรของเมทานอล) ที่อุณหภูมิห้อง โดยการแปรผันขนาดเป็น 75, 180, 600 และ850 ไมโครเมตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์จากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดที่วัดได้ที่เวลาต่างๆ ได้ผลทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 ผลของขนาดของอนุภาคเบญกานีที่มีต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่เวลาต่างๆ

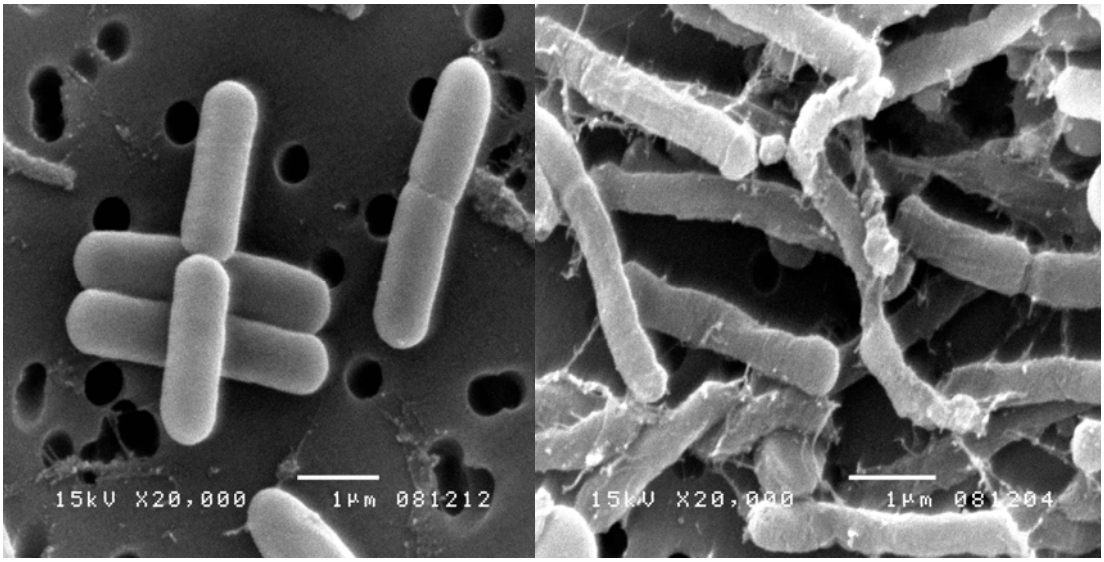
จากการศึกษาเวลาที่ใช้ในการสกัดสารสกัดจากเบญกานีช่วงระยะเวลา 2 - 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณสารประกอบฟินอลิกมีค่าเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ช่วงเวลา 2 – 6 ชั่วโมง ที่ขนาดอนุภาค 75 และ180 ไมโครเมตร สารประกอบฟินอลิกที่สกัดได้มีค่าเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน หลังจากชั่วโมงที่ 8 – 24 สารสกัดที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนเมื่อเวลาที่ 48 ชั่วโมง ปริมาณสารที่สกัดได้เริ่มเข้าสู่สภาวะสมดุล ส่วนที่ขนาด

อนุกาค 300 และ 600 ไมโครเมตร สารประกอบฟินอลิกที่ได้ค่อยๆเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ แต่จะไม่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเหมือนอนุภาคขนาดเล็ก จนถึงชั่วโมงที่ 24 และ 48 สารสกัดที่ได้เริ่มเข้าสู่สภาวะสมดุล เมื่อพิจารณาตามขนาดอนุภาค พบว่า อนุภาคขนาดใหญ่ (600 ไมโครเมตร) และอนุภาคขนาดกลาง (180 และ 300 ไมโครเมตร) สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้เพียง 1/2 เท่าของอนุภาคเล็กสุด โดยสารประกอบที่สกัดได้เป็นสารประกอบที่อยู่ผิวนอก ส่วนสารประกอบที่อยู่ภายในต้องอาศัยการสกัดโดยการแพร่ของตัวทำละลายเข้าไปในอนุภาคสมุนไพร

ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Herodez (2003) ได้ศึกษาผลของขนาดอนุภาคต่อการสกัดสาร antioxidant จาก Balm leaves พบว่า การลดขนาดอนุภาคทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดเพิ่มมากขึ้น และสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ ผกามาศ และคณะ (2007) ที่ศึกษาผลของขนาดเมล็ดขนุนที่ส่งผลต่อการสกัดสารพรีไบโอติกส์ พบว่า ขนาดของเมล็ดขนุนที่มีขนาดเล็กจะให้ปริมาณของสารสกัดที่สูงกว่า ทั้งนี้เนื่องจากพื้นที่สัมผัสระหว่างเมล็ดขนุนกับตัวทำละลายมีมากขึ้น และในขั้นตอนของการลดขนาดจะช่วยทำลายผนังเซลล์ที่หุ้มสารที่ต้องการสกัด ทำให้สารที่ต้องการสกัดเกิดการแพร่สู่ตัวทำละลายได้ง่ายขึ้น ทำให้อัตราการสกัดที่ได้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ พิชญ์อร ไหมสุทธิสกุล (2002) ได้รายงานว่า เวลามีผลต่อปริมาณสารสกัดที่ได้ โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการสกัด หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่

4.6 การศึกษาผลของสารสกัดจากสุมนไพรไทยต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์

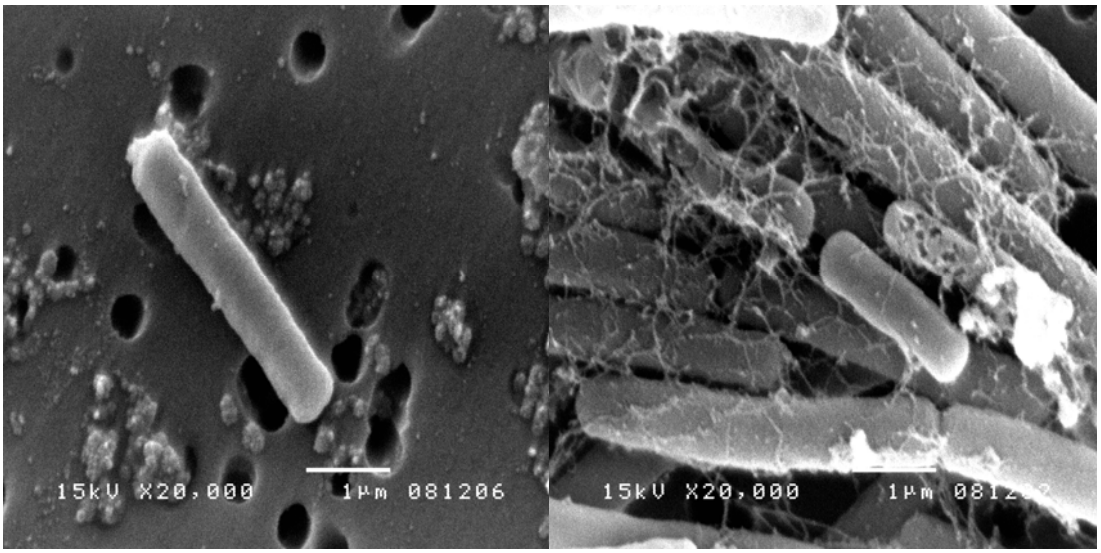
ผลของสารสกัดเบญกานีด้วยเมทานอลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพพื้นผิวของเชื้อ *E. coli* เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า เซลล์ปรกติมีรูปร่างลักษณะเป็นแท่งและผิวของผนังมีลักษณะเรียบ เมื่อทำการเติมสารสกัดลงไป พบว่า สารสกัดจะออกฤทธิ์ทำลายผนังเซลล์เป็นส่วนใหญ่ ดังแสดงในรูปที่ 4.20



(ก) (ข)

รูปที่ 4.20 เชื้อ *E. coli* (ก) ก่อนได้รับสารสกัด (ข) หลังได้รับสารสกัด

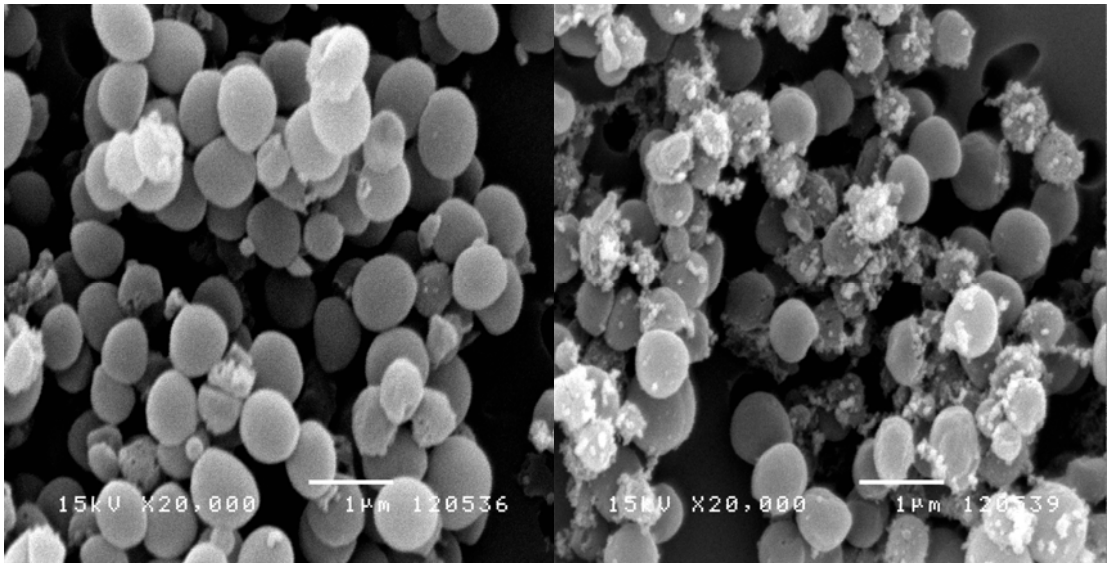
ส่วนผลของสารสกัดเบญกานีด้วยเมทานอลต่อเชื้อ *B. subtilis* พบว่า ก่อนทำการเติมสารสกัดนั้น เซลล์ปรกติมีความแข็งแรง มีลักษณะผิวเซลล์ที่ราบเรียบเช่นเดียวกับผิวเซลล์ของเชื้อ *E. coli* เมื่อมีการเติมสารสกัดลงไป จะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด คือ เซลล์ของ *B. subtilis* มีลักษณะยืดยาวขึ้น และรูปร่างของผนังเซลล์มีการเปลี่ยนรูปไป โดยเกิดการยุบหรือสลายตัว ทำให้รูปร่างเซลล์ผิดปกติไปจากเดิม ดังแสดงในรูปที่ 4.21



(ก) (ข)

รูปที่ 4.21 เชื้อ *B. subtilis* (ก) ก่อนได้รับสารสกัด (ข) หลังได้รับสารสกัด

สำหรับผลของสารสกัดเบญกานีด้วยเมทานอลต่อการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *S. aureus* พบว่า ลักษณะรูปร่างของเชื้อปรกติเป็นรูปทรงกลมผิวเรียบอยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน ซึ่งเมื่อทำการเติมสารสกัดพบว่า ผนังเซลล์ของเชื้อถูกทำลายจากผิวเรียบกลายเป็นผิวขรุขระ และผนังเซลล์บางส่วนมีการฉีกขาดและหลุดออกมาเกาะรวมกันที่พื้นผิวภายนอก ดังแสดงในรูปที่ 4.22



(ก) (ข)

รูปที่ 4.22 เชื้อ *S. aureus* (ก) ก่อนได้รับสารสกัด (ข) หลังได้รับสารสกัด

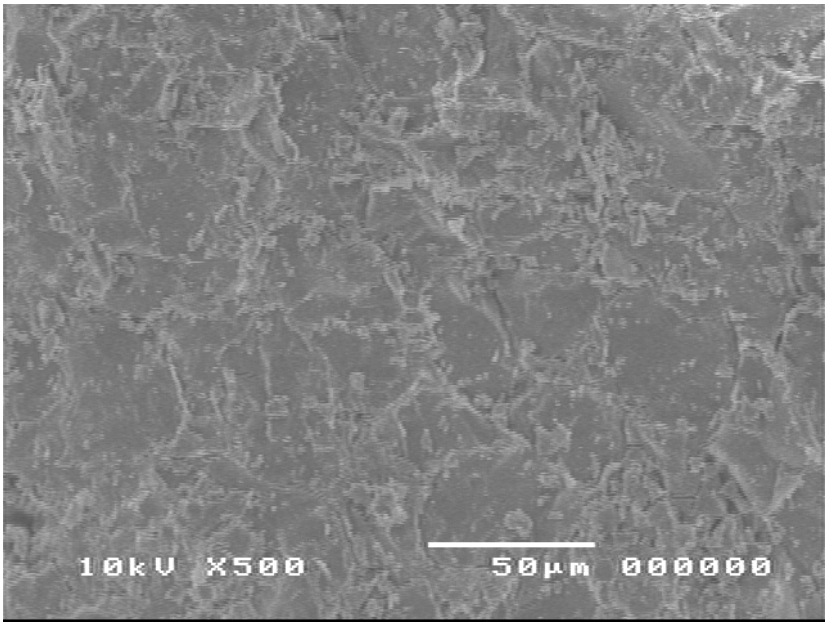
จากผลการถ่ายภาพของจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดเบญกานีนั้น ได้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Chusri *และ* Voravuthikunchai (2009) ที่ศึกษาการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ด้วยสารสกัดสมนุไพรจากเอทานอล โดยพบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการควบคุมสารเข้า-ออก ของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อทำการตรวจสอบการรั่วไหลของสารประกอบที่ดูดกลืนแสง UV ซึ่งอาจรั่วไหลจากเยื่อภายในที่ช่วงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร แต่ทำให้เกิด pseudomulticellular aggregates ทำให้มีการเกาะตัวของกลุ่มเซลล์ที่มีผนังเซลล์หนา มีสาเหตุหลักจากสารกลุ่มแทนนิน ซึ่งลักษณะการเปลี่ยนแปลงเช่นนี้มีปรากฏในการทดลองของ Hamilton-Miller และ Shah (1999) เกี่ยวกับการยับยั้งเซลล์ของ *S. aureus* ด้วยสารสกัดจากชาเขียว ที่ประกอบด้วยสารชีวภาพออกฤทธิ์ในกลุ่มแทนนิน และกรดแกลลิก

นอกจากนี้ Sakol และ Supayang (2009) พบว่า เซลล์ของ *E. coli* ซึ่งปกติมีรูปร่างเป็น rod shape และมีผนังเซลล์ชั้นนอกประกอบด้วยเยื่อติดแน่นกับ cytoplasmic membrane เมื่อมีการใช้สารสกัดของเบญกานีชนิดที่ความเข้มข้น MIC ที่ค่า 0.78 –1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีผลทำให้เกิดการเสียผิวหน้าเซลล์ของ *E. coli* และ cytoplasmic membrane เกิดการถูกทำลาย เซลล์บางเซลล์หยุดการแบ่งตัว และผนังเซลล์ชั้นนอกเกิดการแยกตัวออกจาก cytoplasmic membrane รวมทั้งมีการรั่วหรือฉีกขาดของผนังเซลล์ชั้นนอกและ cytoplasmic membrane

4.7 การศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพืชสมุนไพร

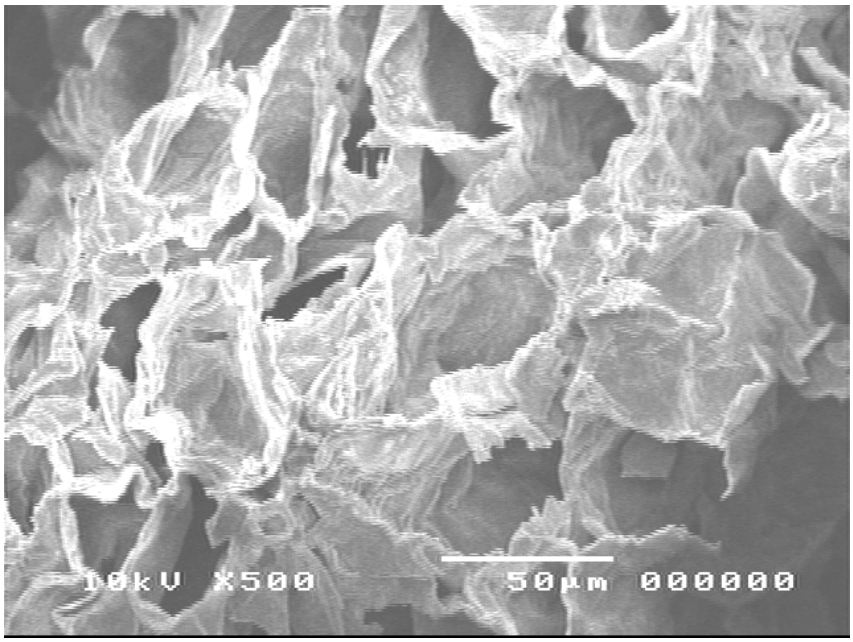
สุมนไพรที่ใช้ในการศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา คือ เบญกานี อนุภาคเบญกานีที่ใช้ขนาด 300 ไมโครเมตร ใช้เวลาในการสกัด 24 ชั่วโมง ซึ่งลักษณะของเบญกานีก่อนและหลังการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscops, SEM) ดังแสดงในรูปที่ 4.23 – 4.28

สภาพพื้นผิวของเบญกานีก่อนการสกัดพบว่า มีลักษณะขรุขระ ผิวหน้าเสมอกัน ไม่มีรูพรุน ดังแสดงในรูปที่ 4.23



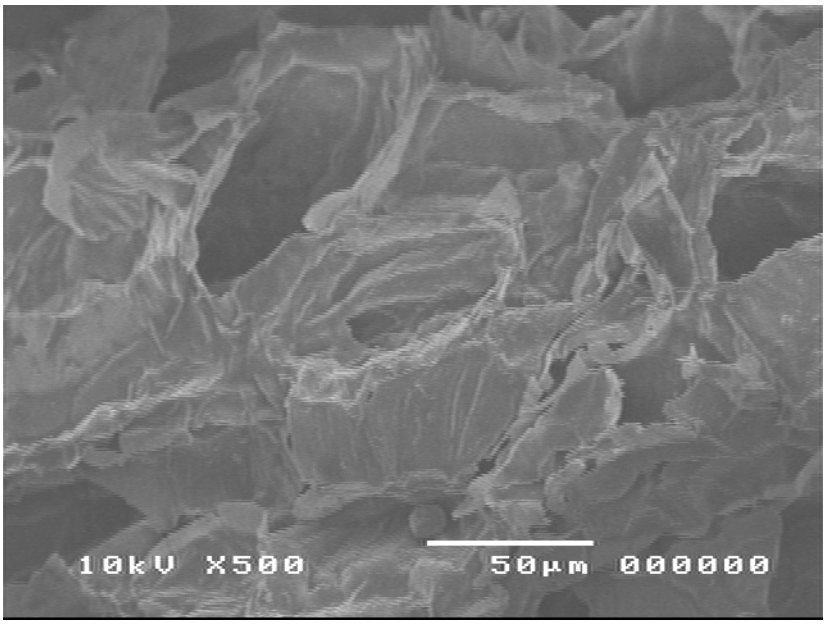
รูปที่ 4.23 เบญกานีก่อนสกัด

สภาพพื้นผิวของเบญกานีที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลพบว่า มีลักษณะเป็นรูพรุนกว้าง ลึก และฉีกขาดค่อนข้างมาก (ดังแสดงในรูปที่ 4.24) มากกว่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายเมทามอลมีฤทธิ์ในการสกัดเบญกานีได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับร้อยละของสารสกัดที่ได้ของเบญกานีที่มีค่ามากที่สุด



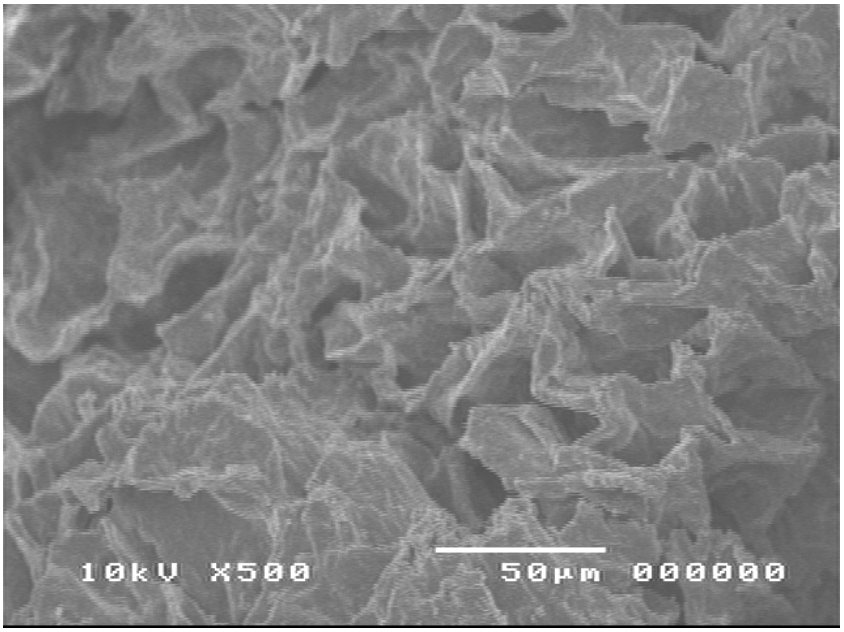
รูปที่ 4.24 เบญกานีหลังสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล

สภาพพื้นผิวของเบญกานีที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลพบว่า มีลักษณะเป็นรูพรุนกว้าง และฉีกขาด มากกว่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นๆ แต่น้อยกว่าตัวทำละลายเมทานอล (ดังแสดงในรูปที่ 4.25) แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ในการสกัดเบญกานีได้ดีรองจากตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งสอดคล้องกับร้อยละของสารสกัดที่ได้ของเบญกานีที่มีค่ามากเป็นอันดับ 2



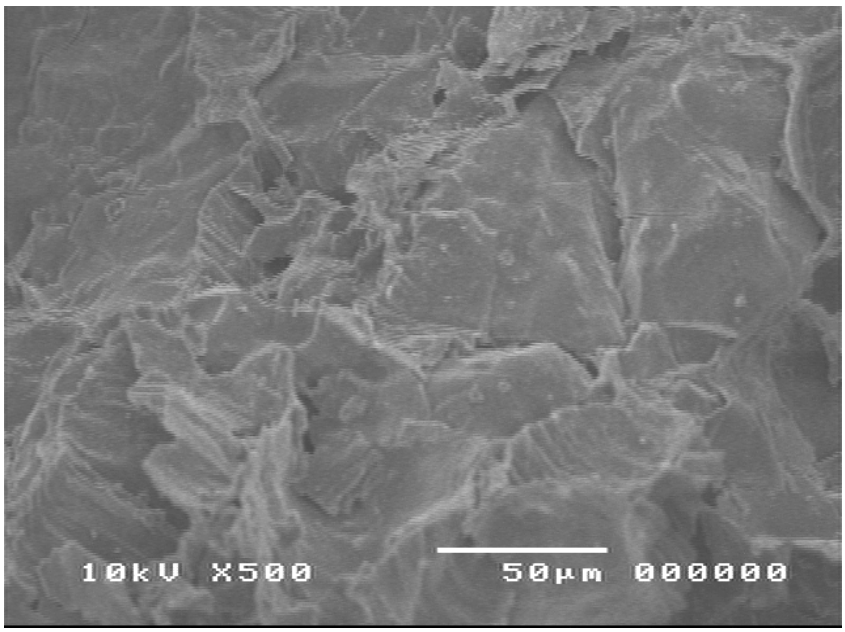
รูปที่ 4.25 เบญกานีหลังสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล

สภาพพื้นผิวของเบญกานีที่สกัดด้วยน้ำกลั่นพบว่า มีลักษณะเป็นรูพรุนลึกเช่นเดียวกับที่สกัดด้วยเมทานอล และเอทานอล แต่ไม่ถึงกับฉีกขาด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองหาร้อยละของสารสกัดที่ได้ของเบญกานีที่สกัดด้วยน้ำกลั่นพบว่ามีค่ามากเป็นอันดับที่สาม ดังแสดงในรูปที่ 4.26



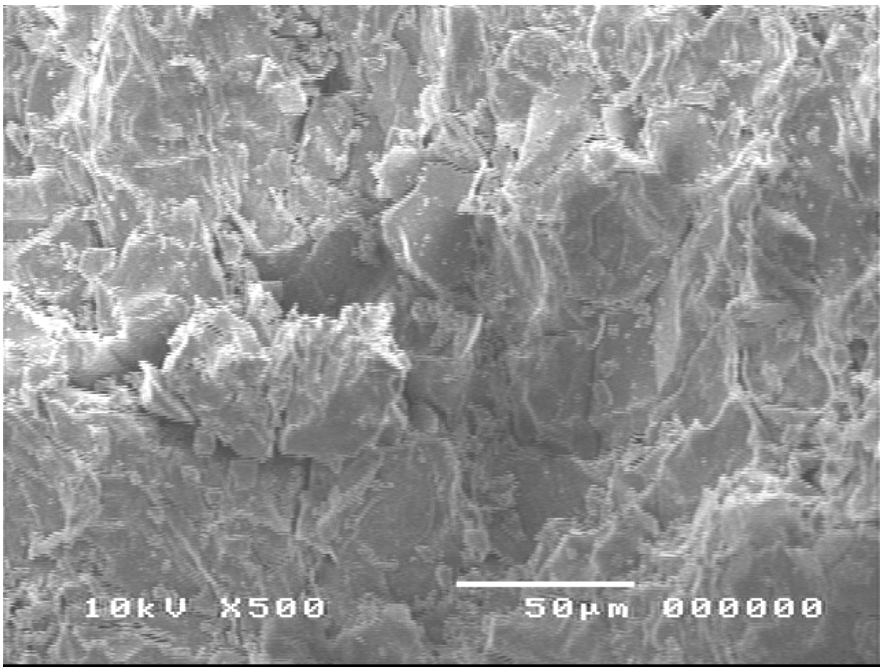
รูปที่ 4.26 เบญกานีหลังสกัดด้วยน้ำกลั่น

สภาพพื้นผิวของเบญกานีที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนพบว่า ลักษณะของพื้นผิวไม่มีรูพรุนลึกเหมือนตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล และน้ำกลั่น แต่ถูกกัดเซาะลงไปเล็กน้อย (ดังแสดงในรูปที่ 4.27) แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายเฮกเซนมีฤทธิ์ในการสกัดค่อนข้างน้อย



รูปที่ 4.27 เบญกานีหลังสกัดด้วยเฮกเซน

ส่วนสภาพพื้นผิวของเบญกานีที่สกัดด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มพบว่า ลักษณะของพื้นผิวไม่มีรูพรุนลึก แต่ถูกกัดเซาะลงไปเล็กน้อย เหมือนกับตัวทำละลายเฮกเซน (ดังแสดงในรูปที่ 4.28) แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ในการสกัดค่อนข้างน้อย ซึ่งสอดคล้องกับร้อยละของสารสกัดที่ได้ของเบญกานีที่มีค่าค่อนข้างน้อย ซึ่งมีค่าเท่ากับตัวทำละลายเฮกเซน



รูปที่ 4.28 เบญกานีหลังสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ใช้สกัดเบญกานีมีความสามารถในการสกัดได้แตกต่างกัน จึงส่งผลให้ลักษณะของพื้นผิวสมุนไพรที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ แตกต่างกันไปด้วยเมื่อทำการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งพบว่าตัวทำละลายที่มีขั้วสูงสามารถสกัดได้ดีโดยลักษณะของพื้นผิวเบญกานีส่วนใหญ่จะมีรูพรุน และฉีกขาด ส่วนตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยมีความสามารถในการสกัดได้น้อยจึงส่งผลให้พื้นผิวถูกกัดเซาะได้น้อยตามไปด้วย

ทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 ปริมาณสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ที่สกัดด้วยน้ำกลั่น เมทานอล เอทานอล คลอโรฟอร์ม และ เฮกเซน พบว่า พลู ข่า และเบญกานีที่สกัดด้วยเมทานอล กระชายที่สกัดด้วยเอทานอล และตำลึงที่สกัดด้วยเอทานอลและเมทานอล ให้ปริมาณของสารสกัดหยาบมากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด สารสกัดจากเบญกานีมีปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่าสมุนไพรชนิดอื่นๆ

5.1.2 การทดสอบการหาบริเวณยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Disc diffusion method เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด พบว่า

สารสกัดจากพลูด้วยด้วยเอทานอลมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ดี เมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่นๆ โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ดีกว่าเชื้อ *E. coli*

สารสกัดจากกระชายด้วยเอทานอลมีความความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดด้วยคอลโรฟอร์มสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด

สารสกัดจากข่าด้วยคลอโรฟอร์มและเฮกเซนมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *B.subtilis* ได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดจากข่าด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆไม่พบว่ามีการยับยั้งเชื้อ *E. coli* เกิดขึ้น

สารสกัดจากตำลึงด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ไม่พบว่ามีการยับยั้งเชื้อ *E. coli* เกิดขึ้น ส่วนสารสกัดจากตำลึงด้วยเฮกเซนมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด

สารสกัดจากเบญกานีด้วยเมทานอลมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้ดีกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นๆโดยยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด พบว่า สารสกัดจากเบญกานีมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด

5.1.3 เมื่อเปรียบเทียบสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ของสารสกัดจากเบญกานี ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด

5.1.4 การเสริมประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพร พบว่า เมื่อผสมสารสกัดพลู กระชาย และเบญกานีเข้าด้วยกัน สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

5.1.5 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์จุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด (*E. coli*, *B. subtilis* และ *S. aureus*) โดยส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าลักษณะผนังเซลล์ของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ถูกทำลายและเกิดการบิดตัวผิดไปจากรูปร่างเดิม

5.1.6 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเบญกานีหลังการสกัดด้วยเมทานอล โดยส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า มีลักษณะเป็นรูพรุนและฉีกขาดมากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายเมทานอลมีความสามารถในการสกัดสารสกัดออกมาได้มาก ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของสารสกัดที่ได้ ที่มีค่าสูงกว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นๆ

5.1.7 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ โดยสารสกัดจากเบญกานีด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด เมื่อเทียบกับการสกัดสมุนไพรอื่นๆ

5.1.8 ขนาดอนุภาคของสมุนไพรมีอิทธิพลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิก โดยอนุภาคของสมุนไพรขนาด 75 ไมโครเมตร จะทำให้สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ในปริมาณสูง ในสภาวะที่ทดลอง และปริมาณของสารสกัดที่ได้จะเข้าสู่สภาวะสมดุล หลังจากชั่วโมงที่ 8

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้สมุนไพรสดและสมุนไพรแห้งแต่ละชนิด

2. ควรมีการวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อระบุชนิดสารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบใน สารสกัดหยาบที่ได้ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ HPLC

3. หากมีการนำสารสกัดสมุนไพรไปใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ควรมีการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดนั้นด้วย

รายการอ้างอิง

คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2539. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 73-84.

จิดาภา อริยะแจ่มเลิศ และคนอื่นๆ, 2540. การหาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย. ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

นิจศิริ เรืองรังษี, 2534. เครื่องเทศ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, หน้า 22-29.

ผักสวนครัวไทย.ป้าสงวน.โรงพิมพ์ตั้งตงฮวด, [ออนไลน์], 2545. แหล่งที่มา: http://www.tungsong.com/samunpai/drug/22_Tumlung/Index_Tumlung.html.

เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ และ กัญจนา ดีวิเศษ, 2542. สมุนไพรกับวัฒนธรรมไทย ตอนที่ 2 ไม้ริมรั้ว, โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, หน้า 42-43.

สุวิมล กีรติพิบูล, 2546.จุลินทรีย์กับการควบคุมสุขลักษณะการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร, ส. เอเชียเพรส จำกัด, หน้า 34-142.

หน่วยข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, สมุนไพรไม่ใช่ยาหม้อ, พิมพ์ครั้งที่1, กรุงเทพฯ, [ออนไลน์], 2532. แหล่งที่มา: http://www.samunpai.com/samunpai/show.php?cat=1&id=35

Adams, MR., and Moss, MO., 1995. “Chapter 5. Microbiology of Primary Food Commodities” In: Food Microbiology.Cambridge: The Royal society of Chemistry. 103 - 105.

Ahmad, I., and Beg, A.Z., 2001. “ Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multidrug resistant human pathogens”. J Ethnopharmacol. 74: 113 - 123.

A.O.A.C., 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed., Association of Official Analysis Chemists, Arlington, Virginia.

Benkeblia, N., 2004. “Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Alliumcepa*) and garlic (*Allium sativum*)”. Lebensmittel Wissenschaft and Technologie. 37: 263 - 268.

Cho, S.H., Lee, S.Y., Kim, J.W., KO, G.H., and Seo, I.W., 1995. "Development and application of natural antimicrobial agent isolated from grapefruit seed extract-antimicrobial activity of grapefruit seed extract". Journal Food Hygiene and Safety. 10: 33 - 39.

Chusri, S., and Voravuthikunchai, S.P., 2009. "Detailed studies on *Quercus infectoria* Olivier (nutgalls) as an alternative treatment for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections". J. Appl Microbiol. 106: 89–96.

Dhingra, O.D., and Sinclair, J.B., 1995. Basic Plant Pathology Method. 2nd ed. CRC Press.Inc., Florida.

Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M., and El-Baroty, G.S.A., 1989. "Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils", Journal of Food Protection. 85: 289 - 293.

Ficker, C.E., et al., 2003. "Inhibition of human pathogenic fungi by members of Zingiberaceae used by the Kenyah (Indonesian Borneo)". Journal of Ethnopharmacology. 85: 289 - 293.

Jaipetch, H., et al., 1982. "Constituents of *Bosenbergia pandurata* (syn. *Kaempferia pandurata*): isolation crystal structure and synthesis of (±)-boesenbergin A". Australian Journal of Chemistry. 35: 351 - 361.

Jirovetz, L., Buchbauer, G., Pottachola, M., and Kalathil, N., 2003. "Analysis of the essential oils of the leaves, stems, rhizomes and roots of the medicinal plant *Alpinia galanga* from southern India". Acta Pharmaceutica. 53: 73 - 81.

Kaur, G., Athar, M., and Alam, M.S., 2008. "Quercus infectoria galls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages". Chem Biol Interact. 171: 272–282.

Nguefack, J., Leth, V., Amvam, P.H., and Mathur, S.B., 2004. "Evaluation of five essential oil from aromatic plant of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi". International Journal of Food Microbiology. 94: 329 - 334.

Nikelson, N., 1999. "Taking the hysteria out of *Listeria*: The mechanics of *Listeria* and strategis to find it". Food Quality. 6: 28 – 34

Pithayanukul, P., et al., 2005. “Inhibition of Naja kaouthia venom activities by plant polyphenols”. J. thnopharmacol. 97: 527–533.

Smid, E.J., and Gorris, L.G.M., 1999. “Natural antimicrobials for food preservation”, In: Rahman, M.S. (ED.). Handbook of Food Preservation, Marcel Dakker, New York. 285 – 308

Tiwawech, D., et al., 2000. “Enhancing effects of Thai edible plants on 2-amino-3, 8-dimethylimidazo (4,5-*f*) quinoxalinehepatocarcinogenesis in a rat medium–term bioassay”. Cancer Letters. 158: 195 - 201.

Trakoontivakorn, G., et al., 2001. “Structural analysis of a novel antimutagenic compound, 4-hydroxypanduratin A, and the antimutagenic activity of flavonoids in a Thai spice, fingerroot (*Bosenbergia pandurata* Schult.) against mutagenic heterocyclic amines”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 3046 - 3050.

Tuchinda, T., et al., 2002. “Anti-inflammation cyclohexenyl chalcone derivatives in *Bosenbergia pandurata*”. Phytochemistry. 59: 169 - 173.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การคำนวณ

การวิเคราะห์ข้อมูล

1.วิเคราะห์ปริมาณผลผลิตของสารสกัดจากสมุนไพรนำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกเพื่อหาปริมาณผลผลิตที่ได้ด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศ คำนวณโดยใช้สูตร ดังนี้

$$\%\text{Yield (dry weight basis)} = (W_1 \times 100) / W_2$$

W_1= น้ำหนัก (กรัม) สารสกัดหลังจากระเหยตัวทำละลายออก

W_2= น้ำหนักแห้ง (กรัม) ของตัวอย่าง

ภาคผนวก ข

ข้อมูลทางการทดลองและกราฟมาตรฐาน

ข.1 ข้อมูลทางการทดลอง

ตารางที่ ข1.1 สารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดพลูด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	ค่าดูดกลืนแสง	ความเข้มข้น (ไมโครโมล)
พลู	เมทานอล	0.996	1.644
	เอทานอล	1.187	1.972
	น้ำกลั่น	0.244	0.349
	เฮกเซน	1.207	2.007
	คลอโรฟอร์ม	1.200	1.995

ตารางที่ ข1.2 สารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดกระชายด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	ค่าดูดกลืนแสง	ความเข้มข้น (ไมโครโมล)
กระชาย	เมทานอล	0.414	0.128
	เอทานอล	0.350	0.106
	น้ำกลั่น	0.141	0.035
	เฮกเซน	0.478	0.150
	คลอโรฟอร์ม	1.504	0.504

ตารางที่ ข1.3 สารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดข่าด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	ค่าดูดกลืนแสง	ความเข้มข้น (ไมโครโมล)
ข่า	เมทานอล	0.211	0.059
	เอทานอล	0.241	0.069
	น้ำกลั่น	0.105	0.022
	เฮกเซน	0.219	0.061
	คลอโรฟอร์ม	0.303	0.090

ตารางที่ ข1.4 สารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดตำลึงด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	ค่าดูดกลืนแสง	ความเข้มข้น (ไมโครโมล)
ตำลึง	เมทานอล	0.269	0.079
	เอทานอล	0.243	0.070
	น้ำกลั่น	0.360	0.110
	เฮกเซน	0.073	0.011
	คลอโรฟอร์ม	0.184	0.049

ตารางที่ ข1.5 สารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดเบญกานีด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	ค่าดูดกลืนแสง	ความเข้มข้น (ไมโครโมล)
เบญกานี	เมทานอล	1.227	2.182
	เอทานอล	1.063	1.759
	น้ำกลั่น	0.851	1.349
	เฮกเซน	0.058	0.030
	คลอโรฟอร์ม	0.098	0.099

ตารางที่ ข1.6 สารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดสมุนไพรอนุภาคขนาดต่างๆ ตามเวลา

เวลา (ชั่วโมง)	ขนาดอนุภาค (ไมโครเมตร)	ค่าดูดกลืนแสง	ความเข้มข้น(ไมโครโมล)
2	75	0.578	1.85
	180	0.536	1.70
	300	0.421	1.40
	600	0.392	1.30
4	75	0.614	1.97
	180	0.571	1.83
	300	0.491	1.64
	600	0.430	1.43
6	75	0.704	2.28
	180	0.623	2.00
	300	0.514	1.72
	600	0.456	1.52

เวลา (ชั่วโมง)	ขนาดอนุภาค (ไมโครเมตร)	ค่าดูดกลืนแสง	ความเข้มข้น (ไมโครโมล)
8	75	0.710	2.30
	180	0.627	2.02
	300	0.531	1.78
	600	0.532	1.69
12	75	0.712	2.31
	180	0.632	2.03
	300	0.552	1.85
	600	0.544	1.73
16	75	0.721	2.34
	180	0.637	2.05
	300	0.578	1.94
	600	0.560	1.79
24	75	0.724	2.35
	180	0.641	2.07
	300	0.623	2.00
	600	0.577	1.85
48	75	0.730	2.37
	180	0.644	2.08
	300	0.630	2.03
	600	0.581	1.86
72	75	0.730	2.37
	180	0.644	2.08
	300	0.631	2.03
	600	0.582	1.86
96	75	0.730	2.37
	180	0.644	2.08
	300	0.631	2.03
	600	0.582	1.86

ตารางที่ ข1.7 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร)											
		E. coli				*B. subtilis*				*S. aureus*			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
พลู	เมทานอล	18	14	19	17	20	19	17	18.7	21	19	21	20.3
	เอทานอล	19	16	19	18	20	20	22	20.7	20	21	21	20.7
	คลอโรฟอร์ม	16	12	15	14.7	19	16	15	16.7	17	18	19	18
	น้ำกลั่น	9	8	8	8.3	10	9	9	9.3	8	8	10	8.7
	เฮกเซน	10	8	10	9.3	12	13	12	12.3	13	14	12	13
กระชาย	เมทานอล	11	11	12	11.3	12	12	11	11.7	15	13	12	13.3
	เอทานอล	12	14	14	13.3	13	12	12	12.3	17	20	14	17
	คลอโรฟอร์ม	13	13	13	13	14	15	13	14	16	15	13	14.7
	น้ำกลั่น	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	เฮกเซน	13	12	12	12.3	12	12	13	12.3	15	13	15	14.3
ข่า	เมทานอล	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	เอทานอล	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	คลอโรฟอร์ม	-	-	-	-	12	12	12	12	12	13	12	12.3
	น้ำกลั่น	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	เฮกเซน	-	-	-	-	13	12	14	13	13	14	14	13.6
ตำลึง	เมทานอล	-	-	-	-	8	10	11	9.6	12	13	11	12
	เอทานอล	-	-	-	-	9	12	11	10.7	14	13	13	13.3
	คลอโรฟอร์ม	-	-	-	-	10	10	9	9.7	13	15	14	14
	น้ำกลั่น	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	12	10.7
	เฮกเซน	-	-	-	-	12	11	11	11.3	18	15	15	16
เบญกานี	เมทานอล	21	19	21	20.3	26	25	25	25.3	22	23	21	22
	เอทานอล	20	18	19	19	24	23	25	24	19	21	20	20
	คลอโรฟอร์ม	9	10	12	10.3	13	12	14	13	12	13	13	12.7
	น้ำกลั่น	15	16	16	15.7	20	21	22	21	19	17	18	18
	เฮกเซน	11	9	10	10	12	12	12	12	10	12	12	11.3

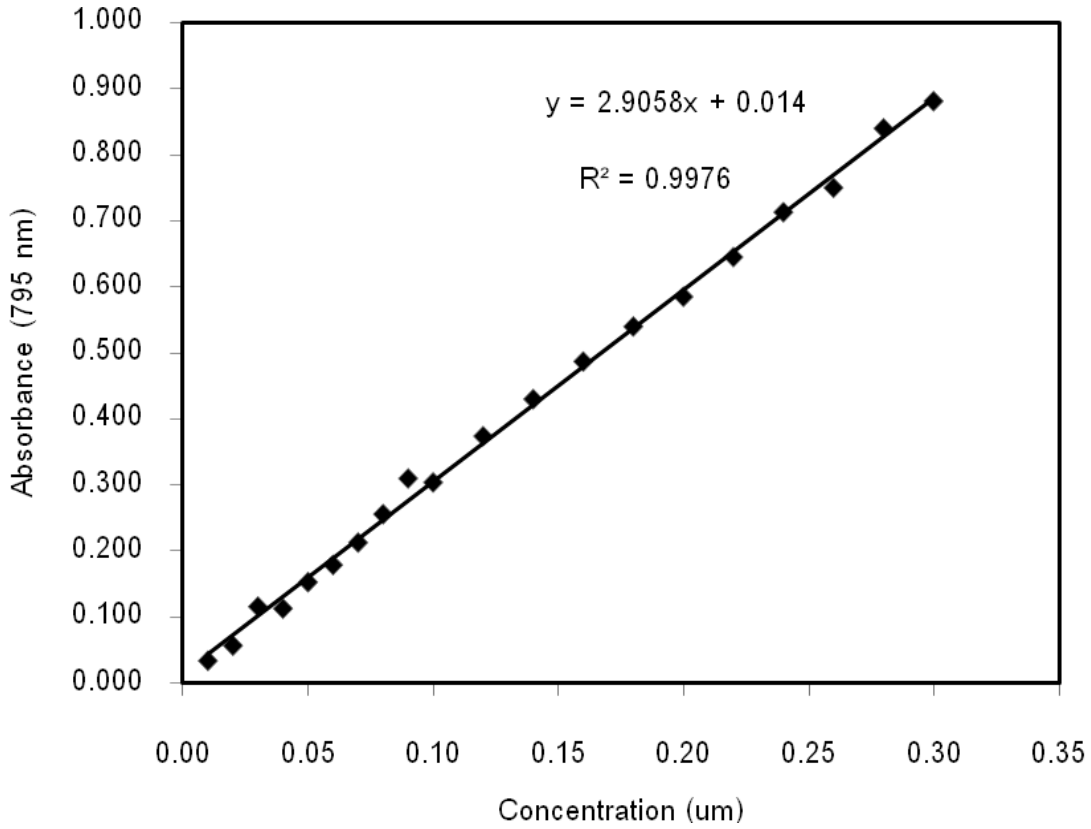
1,2 และ 3 คือ จำนวนครั้งที่วัด , 4 คือ ค่าเฉลี่ย

ตารางที่ ข1.8 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดผสมจากสมุนไพรไทย

สารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเฉลี่ย (มิลลิเมตร)											
	E. coli				*B. subtilis*				*S. aureus*			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
สูตรที่ 1	12.0	13.0	12.0	12.3	19.0	20.0	19.0	19.3	20.0	21.5	21.0	20.8
สูตรที่ 2	14.0	15.5	14.5	14.7	20.5	19.0	20.0	19.8	22.0	21.0	21.5	21.5
สูตรที่ 3	10.0	11.0	11.0	10.7	12.0	10.0	12.0	11.7	13.0	13.0	12.0	12.7
สูตรที่ 4	14.0	16.0	16.5	15.5	19.5	20.0	20.0	19.8	20.5	21.0	20.5	20.7

1,2 และ 3 คือ จำนวนครั้งที่วัด , 4 คือ ค่าเฉลี่ย

ข.2 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นกรดแกลลิก

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย ทศพร ลีลา เกิดเมื่อวันที่ 4 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2528 ในจังหวัดอุบลราชธานี สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนเบญจะมะมหาราช จังหวัดอุบลราชธานี เมื่อปี พ.ศ.2545 หลังจากนั้นได้รับปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เมื่อปี พ.ศ. 2550 และได้ศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2552

Tossaporn Leela and Chutimon Satirapipathkul, “Studies on the Antibacterial Actitvity of Quercus Infectoria Galls”, 2011 International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (ICBBB 2011) 26-28, February, 2011 Singapore