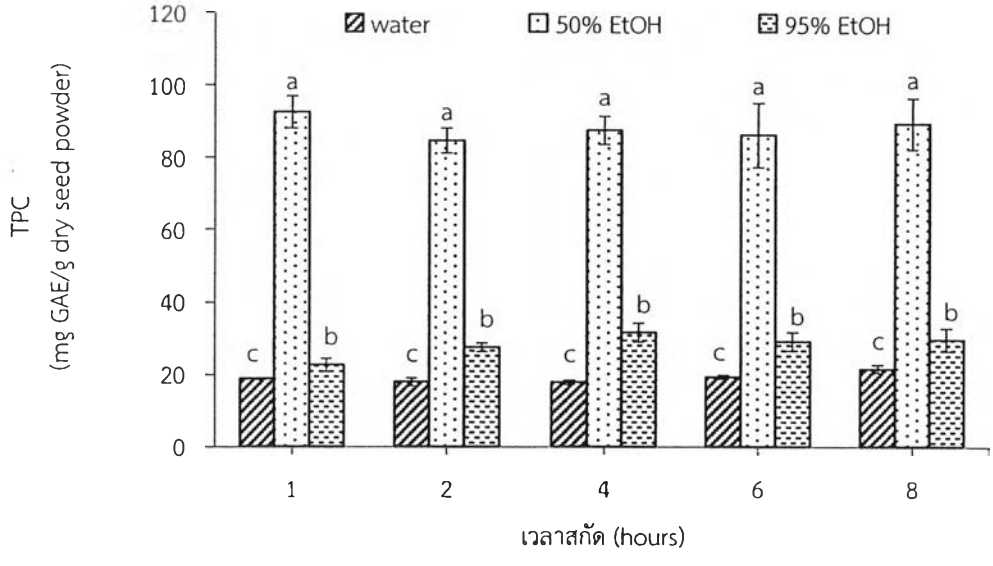
บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

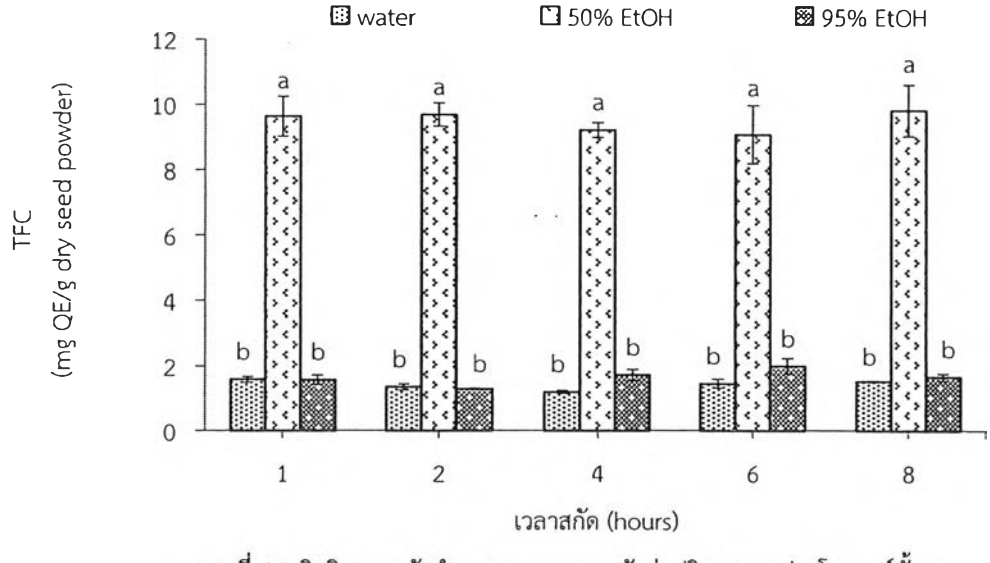
4.1 การสกัดเมล็ดหว้า

4.1.1 การสกัดเมล็ดหว้าด้วยตัวทำละลายและเวลาต่าง ๆ

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลายเนื่องจากมีความเป็นพิษน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอินทรีย์อื่น ๆ Chew *et al.* (2011)



ภาพที่ 4.1 อิทธิพลของตัวทำละลายและเวลาสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด



ภาพที่ 4.2 อิทธิพลของตัวทำละลายและเวลาสกัดต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

4138052479

จากภาพที่ 4.1 และ 4.2 พบว่าการสกัดเมล็ดหว้าด้วยตัวทำละลายต่างกันให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยการใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นตัวทำละลายให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 92.55 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักผงเมล็ดหว้า 1 กรัมและ 9.82 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซทินต่อน้ำหนักผงเมล็ดหว้า 1 กรัม ตามลำดับ

เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำกว่าน้ำ ทำให้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 มีขั้วเป็นกลางระหว่างเอทานอลและน้ำ ดังนั้น การที่เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถสกัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดได้สูงสุดจึงกล่าวได้ว่าสารประกอบฟีนอลิกในเมล็ดหว้าส่วนใหญ่มีขั้วเป็นกลางระหว่างเอทานอลและน้ำ การเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลถึงร้อยละ 95 แล้วทำให้สกัดสารออกมาได้ปริมาณลดลง เนื่องจากในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์รวมทั้งโมเลกุลของน้ำตาลที่มาเกาะมีหมู่ฟังก์ชันคือหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่มีความเป็นไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) จึงสามารถละลายได้ในตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำและเอทานอลมากกว่าเอทานอลอย่างเดียว (Radojković *et al.*, 2012)

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bucić-Kojić *et al.* (2009) ที่พบว่าเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ปริมาณสูงสุด ตามด้วยการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70, 96 และน้ำ ตามลำดับ ส่วน Chew *et al.* (2011) รายงานว่าเมื่อแปรความเข้มข้นของเอทานอลจากร้อยละ 0 ถึง 100 ในการสกัดพบว่าเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 60 สามารถสกัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดได้สูงสุดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) นอกจากนี้ Liu *et al.* (2010) รายงานว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลถึงร้อยละ 45 และลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลไปจนถึงร้อยละ 90

การสกัดที่เวลาต่างๆ (1 - 8 ชั่วโมง) จากทุกตัวทำละลายไม่ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ดังภาพที่ 4.1 และ 4.2 เนื่องจากเกิดความสมดุลความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ระหว่างตัวทำละลายและ solid matrix (Chew *et al.*, 2011)

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Al-Farsi and Lee (2008) และ Chew *et al.* (2011) ที่พบว่าการสกัดเวลา 1 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสมต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ ดังนั้น เลือกการสกัดที่เวลา 1 ชั่วโมงสำหรับการทดลองต่อไปเพื่อเป็นการประหยัดเวลาและพลังงาน

4138052479

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารสกัดแห้งเมื่อใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ เวลาสกัด 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ปริมาณสารสกัดแห้ง (% โดยน้ำหนักสารสกัดแห้งต่อผงเมล็ดหว้า)
น้ำกลั่น	$9.25^{b} \pm 1.36$
เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50	$16.73^{a} \pm 0.31$
เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95	$5.03^{c} \pm 0.42$

หมายเหตุ a - c หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์เมื่อใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ เวลาสกัด 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g dry extract)	ความเข้มข้นสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g dry extract)
น้ำกลั่น	$206.85^{c} \pm 31.72$	$17.36^{c} \pm 2.70$
เอทานอลความเข้มข้น 50%	$553.47^{a} \pm 28.41$	$57.55^{a} \pm 2.64$
เอทานอลความเข้มข้น 95%	$453.36^{b} \pm 44.32$	$31.51^{b} \pm 3.42$

หมายเหตุ a - c หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

การสกัดเวลา 1 ชั่วโมงด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ นำมาคำนวณปริมาณสารสกัดแห้งที่ได้ต่อผงเมล็ดหว้า (yields) ดังตารางที่ 4.1 และคำนวณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม ดังตารางที่ 4.2 พบว่าการสกัดเมล็ดหว้าด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ให้ปริมาณสารสกัดแห้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยสารสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ให้ปริมาณสารสกัดแห้งสูงสุดเท่ากับร้อยละ 16.73 ซึ่งนอกจากจะได้ปริมาณสารสกัดแห้งสูงกว่าการใช้ตัวทำละลายอีก 2 ชนิดแล้ว ยังให้ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์สูงกว่าด้วย โดยตัวทำละลายที่แตกต่างกันจะทำให้ปริมาณสารสกัดและองค์ประกอบของสารที่สกัดได้แตกต่างกัน (Wang and Weller, 2006)

4138052479

ตารางที่ 4.3 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดหว้า (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เวลาสกัด 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยวิธี DDM

แบคทีเรีย	ขนาดโซนใส (mm)				
	ตัวทำละลาย			แอมพิซิลิน (100 ug/ml)	น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
	น้ำกลั่น	50% เอทานอล	95% เอทานอล		
E. coli	8.92^{b} ± 0.29	12.67^{a} ± 1.15	11.92^{a} ± 0.14	11.75^{a} ± 0.25	-
S. Typhimurium	8.37^{c} ± 0.13	11.00^{b} ± 0.90	11.42^{b} ± 0.76	15.75^{a} ± 0.75	-
S. aureus	13.50^{c} ± 1.32	16.92^{b} ± 0.88	16.42^{b} ± 1.28	24.00^{a} ± 1.00	-

หมายเหตุ a - c หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวนอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
- หมายถึง ไม่เกิดโซนใส

จากตารางที่ 4.3 เมื่อนำสารสกัดเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มาทดสอบฤทธิ์ต้าน *E. coli* พบว่าสารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 ให้ขนาดโซนใส (clear zone) ไม่แตกต่างกับแอมพิซิลินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 มีฤทธิ์การต้าน *E. coli* ได้เทียบเท่ากับแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มีขนาดโซนใสแตกต่างกับสารสกัดจากน้ำกลั่น (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยสารสกัดจากน้ำกลั่นให้ขนาดโซนใสเล็กสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และเมื่อนำสารสกัดเมล็ดหว้ามาทดสอบฤทธิ์ต้าน *S.* Typhimurium และ *S. aureus* พบว่าสารสกัดจากน้ำกลั่น เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 ให้ขนาดโซนใสเล็กกว่าแอมพิซิลิน โดยสารสกัดจากน้ำกลั่นให้ขนาดโซนใสเล็กสุดอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองกล่าวได้ว่าสารสกัดเมล็ดหว้าจากเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดจากน้ำกลั่น อย่างไรก็ตาม แบคทีเรีย *S. aureus* ซึ่งเป็นแกรมบวกให้โซนใสขนาดใหญ่สุดในทุกตัวทำละลายที่ใช้สกัดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *E. coli* และ *S.* Typhimurium ซึ่งเป็นแกรมลบ แสดงให้เห็นว่า *S. aureus* ถูกยับยั้งได้ง่ายกว่าแบคทีเรียอีก 2 ชนิด

4138052479

ตารางที่ 4.4 ค่า MIC ของสารสกัดเมล็ดหว้าจากตัวทำละลายต่าง ๆ เวลาสกัด 1 ชั่วโมง อุณหภูมิห้อง

แบคทีเรีย	MIC (mg/ml)		
	น้ำกลั่น	50% เอทานอล	95% เอทานอล
E. coli	12.50	3.13 - 6.25	3.13
S. Typhimurium	6.25	3.13	3.13
S. aureus	0.78	0.39	0.39

ตารางที่ 4.5 ค่า MBC ของสารสกัดเมล็ดหว้าจากตัวทำละลายต่าง ๆ เวลาสกัด 1 ชั่วโมง อุณหภูมิห้อง

แบคทีเรีย	MBC (mg/ml)		
	น้ำกลั่น	50% เอทานอล	95% เอทานอล
E. coli	12.50	6.25	3.13 - 6.25
S. Typhimurium	12.50	3.13 - 6.25	3.13 - 6.25
S. aureus	1.56 - 3.13	0.78	0.78 - 1.56

จากตารางที่ 4.4 นำสารสกัดเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือค่า MIC พบว่าสารสกัดจากเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 ให้ค่า MIC ต่ำกว่าสารสกัดจากน้ำกลั่น โดยเมื่อทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *S.* Typhimurium สารสกัดจากเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 มีค่า MIC อยู่ในช่วง 3.13 - 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากน้ำกลั่นมีค่า MIC อยู่ในช่วง 6.25 - 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกคือ *S. aureus* พบว่าสารสกัดจากเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 มีค่า MIC เท่ากับ 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าสารสกัดจากน้ำกลั่นที่มีค่า MIC เท่ากับ 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4138052479

ส่วนการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ฆ่าแบคทีเรียหรือค่า MBC ดังตารางที่ 4.5 พบว่าให้ผลการทดลองมีแนวโน้มเดียวกันกับค่า MIC โดยเมื่อทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *S.* Typhimurium สารสกัดจากเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 มีค่า MBC อยู่ในช่วง 3.13 - 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าสารสกัดจากน้ำกลั่นที่มีค่า MBC เท่ากับ 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกคือ *S. aureus* พบว่าสารสกัดจากเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 ให้ค่า MBC อยู่ในช่วง 0.78 - 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า MBC ของสารสกัดจากน้ำกลั่นมีค่าอยู่ในช่วง 1.56 - 3.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

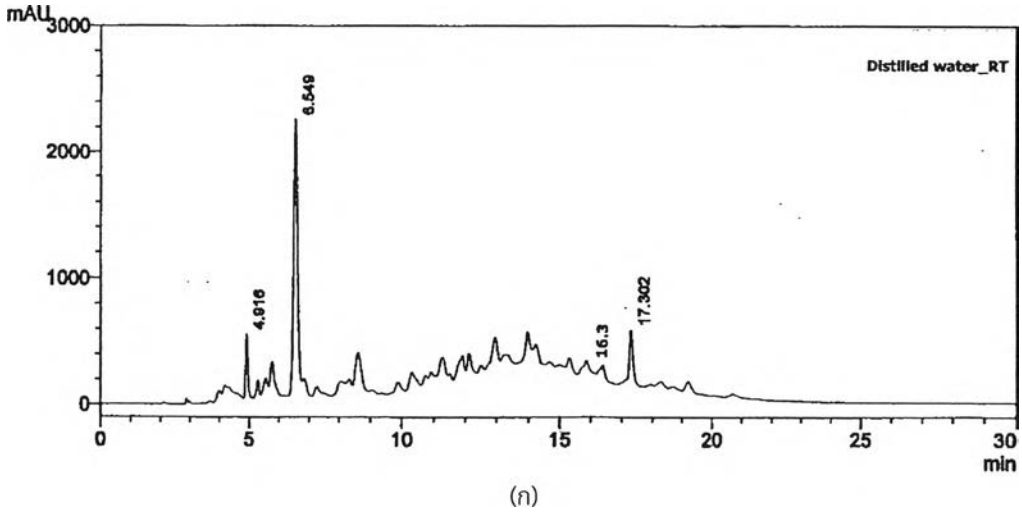
จากผลการวิเคราะห์ค่า MIC และ MBC กล่าวสรุปได้ว่าสารสกัดจากเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและการฆ่าแบคทีเรีย *E. coli*, *S.* Typhimurium และ *S. aureus* ได้ดีกว่าการใช้สารสกัดจากน้ำกลั่น เนื่องจากสามารถนำสารสกัดเมล็ดหว้าจากเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 มาใช้ได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าการใช้สารสกัดจากน้ำกลั่นในการยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย

ผลการทดลองการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสอดคล้องกับ Chandrasekaran and Venkatesalu (2004) และ Sharifa *et al.* (2008) ที่พบว่าสารสกัดจากแอลกอฮอล์สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดจากน้ำ โดย Chandrasekaran and Venkatesalu (2004) รายงานว่าค่า MIC และ MBC ของสารสกัดเมล็ดหว้า (*Syzygium jambolanum* DC (Holland) จากรัฐทมิฬนาฑู ประเทศอินเดีย เตรียมในปี 2002) จากน้ำและแอลกอฮอล์ เมื่อทดสอบกับแบคทีเรีย *E. coli*, *S.* Typhimurium และ *S. aureus* พบว่ามีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 125 - 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับ *E. coli* และ *S.* Typhimurium และ 250 - 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับ *S. aureus* ส่วน Narendhirakannan and Banerjee (2011) รายงานว่าค่า MIC ของสารสกัดเมล็ดหว้า (*Syzygium cumini* จากตำบลโคอิมบาโตร์ ประเทศอินเดีย เตรียมในปี 2010) จากเอทานอลที่ใช้ยับยั้ง *E. coli* มีค่าเท่ากับ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าความแตกต่างของสายพันธุ์และแหล่งที่ปลูกของหว้าทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดหว้าแตกต่างกันไปด้วย

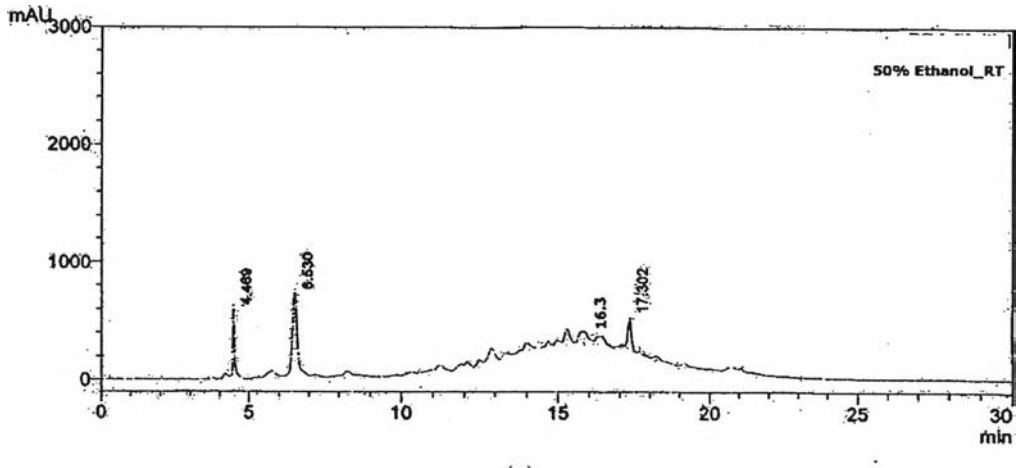
จากผลการทดลองยังเห็นได้ว่าสารสกัดเมล็ดหว้าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ซึ่งเป็นแกรมบวกได้ดีกว่าการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *S.* Typhimurium ซึ่งเป็นแกรมลบ โดยผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Chandrasekaran and Venkatesalu (2004) ที่พบว่าสารสกัดเมล็ดหว้าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้ดีกว่า *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa* และ *S.* Typhimurium ซึ่งเป็นแกรมลบ

การที่สารสกัดจากตัวทำละลายต่าง ๆ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้แตกต่างต่างกัน เนื่องจากตัวทำละลายต่างกันจะสกัดเอาองค์ประกอบที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียออกมาได้แตกต่างกัน (Chandrasekaran and Venkatesalu, 2004) อย่างไรก็ตาม สารสกัดเมล็ดหว้าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เนื่องจากการมีสารประกอบฟีนอลิก (Mohamed *et al.*, 2010)

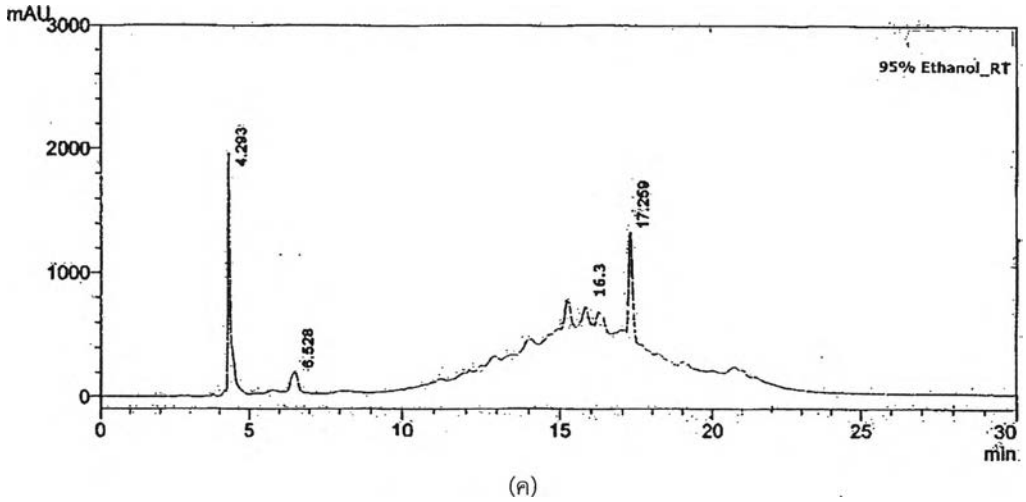
4138052479



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 4.3 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของตัวอย่างสารสกัดเมล็ดหว้าที่สกัดด้วย (ก) น้ำกลั่น (ข) เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ (ค) เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เวลาสกัด 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

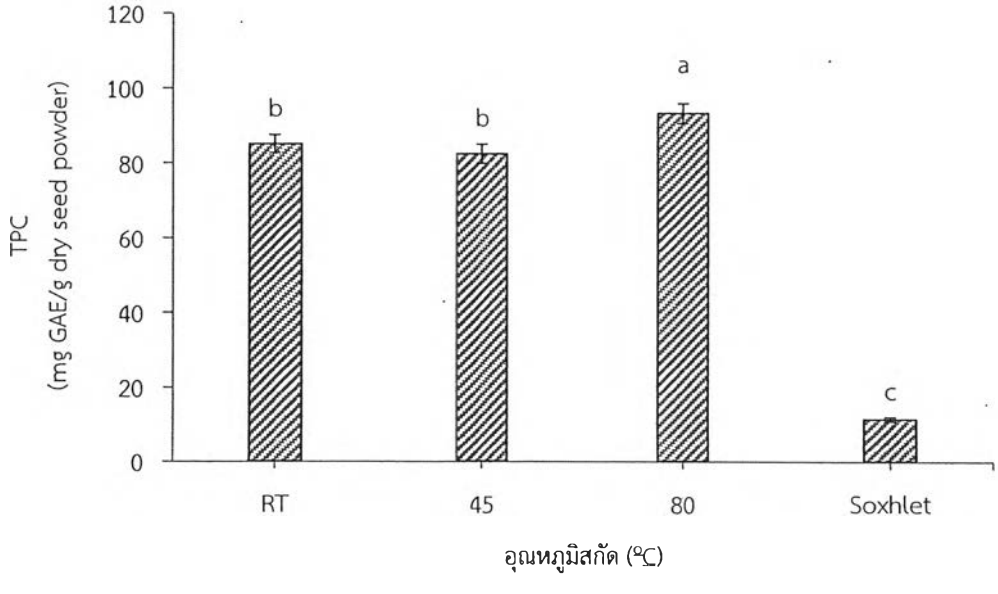
ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของตัวอย่างสารสกัดเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าในสารสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดตรวจพบกรดฟีนอลิก คือกรดแกลลิก (gallic acid) และรูทิน (rutin) ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (ตารางที่ ก.1) ซึ่งมีสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (Cowan, 1999) และการใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายสามารถสกัดกรดแกลลิกได้ดีที่สุด เนื่องจากกรดแกลลิกมีโครงสร้างอย่างง่าย ประกอบไปด้วยวงอะโรมาติก หมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ และหมู่คาร์บอกซิลอีก 1 หมู่ จึงทำให้สามารถละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วอย่างเช่นน้ำได้ดี (Galanakis *et al.*, 2013)

และจากภาพที่ 4.3 ข และ ค เห็นได้ว่าสารสกัดจากเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 มีกลุ่มของสารที่พบมากเป็นกลุ่มเดียวกันซึ่งมีรูทินเป็นส่วนประกอบ ทำให้สารสกัดเมล็ดหว้าจากตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดยับยั้งแบคทีเรียได้ไม่แตกต่างกันแต่ต่างจากสารสกัดด้วยน้ำกลั่นซึ่งมีกลุ่มของสารที่พบมากอยู่อีกช่วง ดังภาพที่ 4.3 ก ดังนั้น จากงานวิจัยนี้กล่าวได้ว่าสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียไม่สัมพันธ์กับปริมาณและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้แต่สัมพันธ์กับชนิดหรือกลุ่มของสารที่สกัดได้ และเนื่องจากสารสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น เพื่อเป็นการประหยัดตัวทำละลาย จึงเลือกเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป

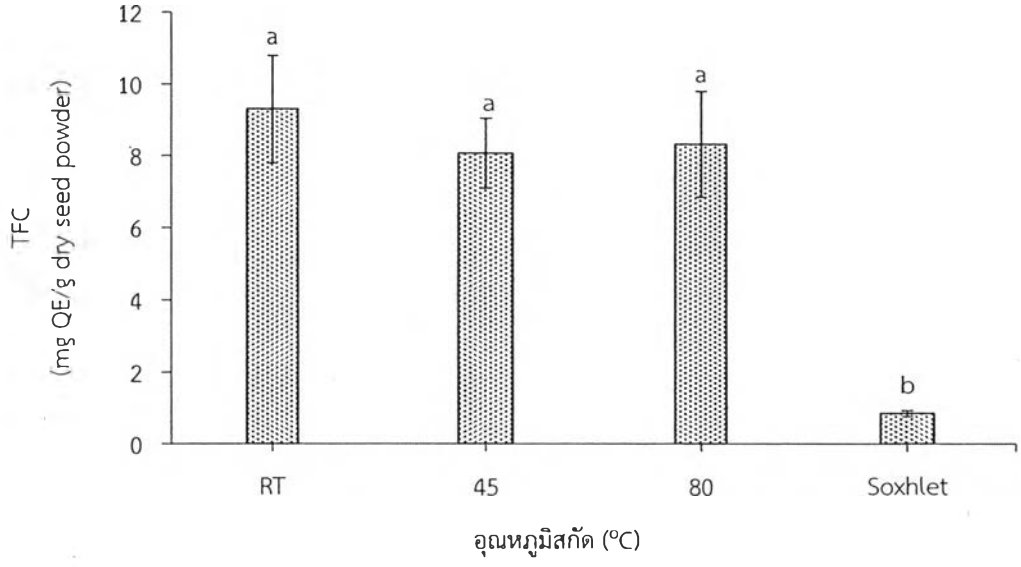
4138052479

4.1.2 การสกัดเมล็ดหว้าที่อุณหภูมิต่าง ๆ

จากการเลือกภาวะในข้อ 4.1.1 นำผงเมล็ดหว้ามาสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทดลองแปรอุณหภูมิสกัดต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (RT) อุณหภูมิ 45 และ 80 องศาเซลเซียส และสกัดด้วยชุดสกัดซอกห์เล็ต (Soxhlet) ที่ภาวะเดียวกัน



ภาพที่ 4.4 อิทธิพลของอุณหภูมิสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด



ภาพที่ 4.5 อิทธิพลของอุณหภูมิสกัดต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ตารางที่ 4.6 ปริมาณสารสกัดแห้งจากการสกัดเมล็ดหว้าด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิสกัด	ปริมาณสารสกัดแห้ง (% โดยน้ำหนักสารสกัดแห้งต่อผงเมล็ดหว้า)
อุณหภูมิห้อง	$15.74^{a} \pm 0.48$
45 °C	$15.71^{a} \pm 0.71$
80 °C	$15.60^{a} \pm 0.45$
ชุดสกัดซอกห์เล็ต	$1.49^{b} \pm 0.04$

หมายเหตุ a - b หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

จากภาพที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าการสกัดเมล็ดหว้าด้วยชุดสกัดซอกห์เล็ต ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดต่อผงเมล็ดหว้าต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และยังให้ปริมาณสารสกัดแห้งต่อผงเมล็ดหว้าต่ำสุดอีกด้วย ดังตารางที่ 4.6

ข้อเสียหลักของการสกัดด้วยชุดสกัดซอกห์เล็ตคือจำเป็นต้องใช้เวลาสกัดนาน ส่วนใหญ่มากกว่า 12 ชั่วโมงขึ้นไป นอกจากนี้ยังมีข้อเสียอื่นคือต้องใช้ตัวทำละลายปริมาณมาก และไม่มีขั้นตอนการกวนที่ช่วยเร่งการสกัด (Stalikas, 2007; Wang and Weller, 2006) ดังนั้น การทดลองสกัดเมล็ดหว้าด้วยชุดสกัดซอกห์เล็ต เพียงเวลา 1 ชั่วโมง จึงอาจไม่นานเพียงพอต่อการสกัด ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และปริมาณสารสกัดแห้งที่ได้ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดที่อุณหภูมิอื่น ๆ ด้วยวิธีเขย่าเมื่อใช้เวลาสกัดเท่ากัน

ตารางที่ 4.7 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเมื่อสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิสกัด	ความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g dry extract)	ความเข้มข้นสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g dry extract)
อุณหภูมิห้อง	$541.49^{bc} \pm 30.04$	$55.96^{b} \pm 7.94$
45 °C	$525.89^{c} \pm 39.96$	$52.58^{b} \pm 1.62$
80 °C	$598.37^{b} \pm 34.01$	$53.38^{b} \pm 9.99$
ชุดสกัดซอกห์เล็ต	$777.25^{a} \pm 33.13$	$68.75^{a} \pm 2.52$

หมายเหตุ a - c หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

การสกัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ สามารถคำนวณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัมได้ดังตารางที่ 4.7 พบว่าการสกัดด้วยชุดสกัดซอกห์เล็ตให้ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ถึงแม้ว่าจะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดรวมถึงปริมาณสารสกัดแห้งต่ำสุด ดังผลการทดลองข้างต้นก็ตาม อาจเกิดจากการสกัดด้วยชุดสกัดซอกห์เล็ตนั้น ตัวทำละลายที่ใช้สกัดตัวอย่างจะมีความบริสุทธิ์อยู่เสมอจากการถูกทำให้ระเหยแล้วควบแน่นกลับมาสกัดผงหว้าใหม่ (Wang and Weller, 2006)

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kothari *et al.* (2012) ซึ่งรายงานว่าการสกัดเมล็ด *Manilkara zapota* L. ด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 และเมทานอล และการสกัดเมล็ด *Tamarindus indica* L. ด้วยเมทานอลด้วยชุดสกัดซอกห์เล็ตต่างทำให้ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นจากการสกัดที่อุณหภูมิห้อง และการสกัดเมล็ด *Manilkara zapota* L. และ *Phoenix sylvestris* Roxb. ด้วยเมทานอลด้วยชุดสกัดซอกห์เล็ตยังทำให้ความเข้มข้นของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นจากการสกัดที่อุณหภูมิห้องเช่นเดียวกัน

4138052479

ตารางที่ 4.8 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดหว้า (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เวลาสกัด 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ด้วยวิธี DDM

แบคทีเรีย	ขนาดโซนใส (mm)					
	อุณหภูมิสกัด				แอมพิซิลิน (100 ug/ml)	น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
	อุณหภูมิห้อง	45 °C	80 °C	ชุดสกัดซอกห์เล็ต		
E. coli	11.92^{a} ± 0.14	11.08^{b} ± 0.38	11.42^{ab} ± 0.52	11.75^{ab} ± 0.43	11.67^{ab} ± 0.29	-
S. Typhimurium	11.08^{b} ± 1.04	11.50^{b} ± 0.50	11.67^{b} ± 0.29	11.58^{b} ± 0.63	15.67^{a} ± 0.76	-
S. aureus	15.92^{b} ± 0.63	14.83^{b} ± 0.29	15.42^{b} ± 0.80	14.75^{b} ± 0.66	24.17^{a} ± 0.76	-

หมายเหตุ a - c หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวนอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
- หมายถึง ไม่เกิดโซนใส

จากตารางที่ 4.8 เมื่อนำสารสกัดเมล็ดหว้าความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากทุกอุณหภูมิสกัดมาทดสอบกับ *E. coli* พบว่าสารสกัดจากอุณหภูมิต่าง ๆ ให้ขนาดโซนใสไม่แตกต่างกับแอมพิซิลิน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากทุกอุณหภูมิมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *E. coli* ได้ไม่ต่างกับแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เมื่อทดสอบกับ *S.* Typhimurium และ *S. aureus* พบว่าสารสกัดจากทุกอุณหภูมิให้ขนาดโซนใสเล็กกว่าแอมพิซิลินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และสารสกัดจากทุกอุณหภูมิยังให้ขนาดโซนใสไม่แตกต่างกันเองในการทดสอบกับแบคทีเรียแต่ละชนิด จากผลการทดลองกล่าวได้ว่าสารสกัดเมล็ดหว้าจากทุกอุณหภูมิสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม สำหรับแบคทีเรีย *S. aureus* ซึ่งเป็นแกรมบวกจะให้โซนใสขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *E. coli* และ *S.* Typhimurium ซึ่งเป็นแกรมลบ แสดงให้เห็นว่า *S. aureus* ถูกยับยั้งได้ง่ายกว่าแบคทีเรียอีก 2 ชนิด

4136052479

ตารางที่ 4.9 ค่า MIC ของสารสกัดเมล็ดหว้าจากเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เวลาสกัด 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

แบคทีเรีย	MIC (mg/ml)			
	อุณหภูมิห้อง	45 °C	80 °C	ชุดสกัดซอกห์เล็ต
E. coli	3.13 - 6.25	3.13	3.13	3.13
S. Typhimurium	3.13	3.13	3.13	3.13
S. aureus	0.39	0.39	0.39 - 0.78	0.39 - 0.78

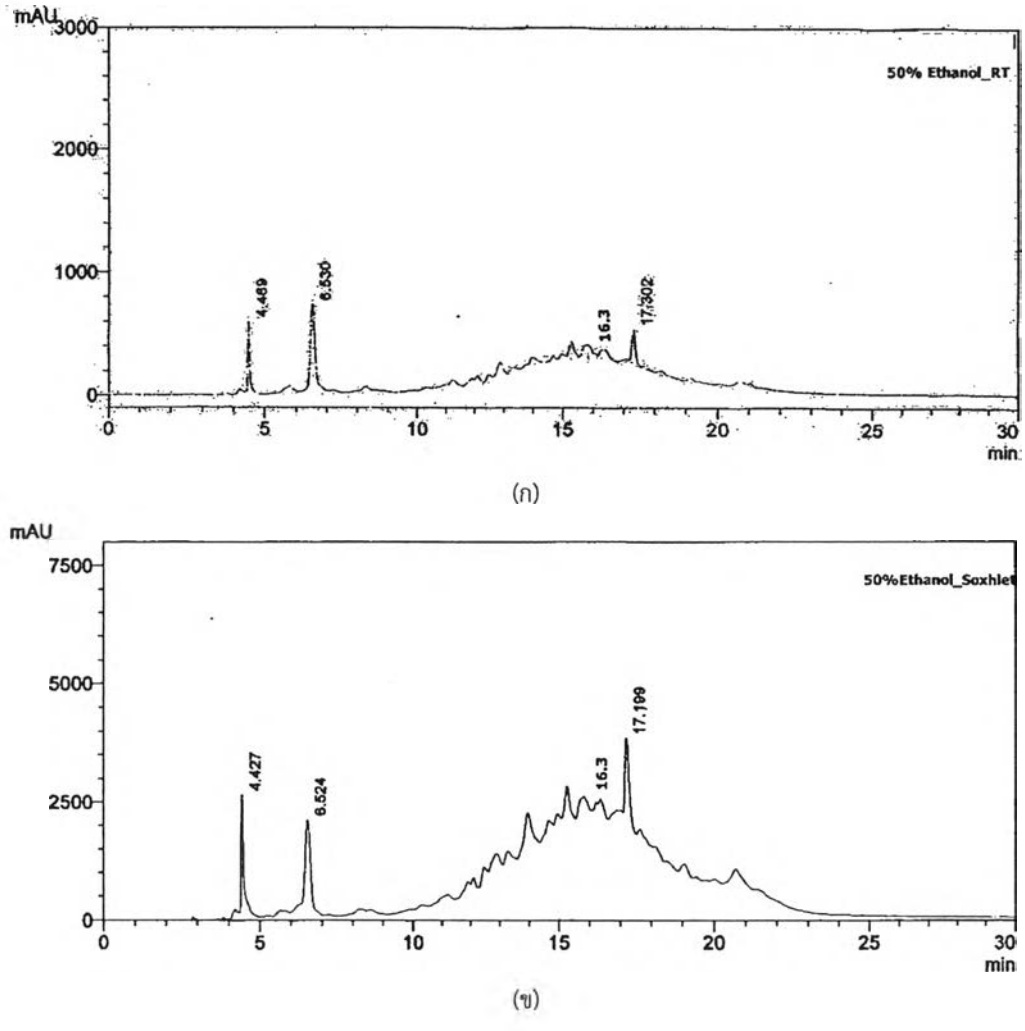
ตารางที่ 4.10 ค่า MBC ของสารสกัดเมล็ดหว้าจากเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เวลาสกัด 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

แบคทีเรีย	MBC (mg/ml)			
	อุณหภูมิห้อง	45 °C	80 °C	ชุดสกัดซอกห์เล็ต
E. coli	6.25	6.25	3.13 - 6.25	3.13 - 6.25
S. Typhimurium	3.13 - 6.25	3.13 - 6.25	3.13	3.13 - 6.25
S. aureus	0.78	0.78	0.39 - 0.78	0.39 - 0.78

จากตารางที่ 4.9 และ 4.10 เมื่อนำสารสกัดเมล็ดหว้ามาทดสอบกับ *E. coli* และ *S.* Typhimurium พบว่าสารสกัดจากทุกอุณหภูมิมีค่า MIC และ MBC ไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าอยู่ในช่วง 3.13 - 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เมื่อทดสอบกับ *S. aureus* สารสกัดจากทุกอุณหภูมิให้ค่า MIC และ MBC ไม่แตกต่างกันเช่นเดียวกัน โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.39 - 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองกล่าวได้ว่าสารสกัดจากทุกอุณหภูมิสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและการฆ่าแบคทีเรียได้ไม่แตกต่างกัน

4138052479

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ ทิวาพร พรหมรัตน์ และ วลัยรัตน์ จันทรปานนท์ (2549) ซึ่งรายงานว่าสารสกัดขมิ้นชันจากเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ได้ไม่แตกต่างกับสารสกัดด้วยชุดสกัดซอกห์เล็ต อย่างไรก็ตาม ค่า MIC และ MBC ของแบคทีเรีย *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีค่าต่ำกว่าแบคทีเรีย *E. coli* และ *S.* Typhimurium ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *S. aureus* ถูกยับยั้งและฆ่าได้ง่ายกว่าแบคทีเรีย *E. coli* และ *S.* Typhimurium ซึ่งเป็นแกรมลบ



ภาพที่ 4.6 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของตัวอย่างสารสกัดเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เวลาสกัด 1 ชั่วโมงที่ (ก) อุณหภูมิห้อง และ (ข) ชุดสกัดซอกห์เล็ต

เนื่องจากการสกัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ไม่แตกต่างกัน จึงเลือกตัวอย่างสารสกัดเมล็ดหว้าที่อุณหภูมิห้องและที่สกัดด้วยชุดสกัดซอกห์เล็ตมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดังภาพที่ 4.6 ก และ ข ซึ่งสารสกัดทั้ง 2 ตัวอย่างต่างพบกรดฟีนอลิกคือกรดแกลลิกและรูทินซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์อยู่ด้วย (ตารางที่ ก.1) โดยเห็นได้ว่ากลุ่มของสารที่พบมากต่างเป็นกลุ่มเดียวกันโดยมีรูทินเป็นส่วนประกอบ จึงอาจทำให้สารสกัดที่อุณหภูมิห้องและสารสกัด

จากชุดสกัดซอกห์เล็ตยับยั้งแบคทีเรียได้ไม่แตกต่างกัน และจากงานวิจัยนี้อาจกล่าวได้ว่าสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียไม่สัมพันธ์ปริมาณและความเข้มข้นของสารประกอบฟีอลิก แต่สัมพันธ์กับชนิดหรือกลุ่มของสารที่สกัดได้

ถึงแม้สารสกัดเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยชุดสกัดซอกห์เล็ตจะให้ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด แต่ให้ปริมาณสารสกัดแห้ง (yields) และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดต่อผงเมล็ดหว้าต่ำสุด และยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ไม่แตกต่างกับสารสกัดจากอุณหภูมิอื่น ดังนั้น จึงเลือกการสกัดเมล็ดหว้าที่อุณหภูมิห้องเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อเป็นการประหยัดพลังงาน และในการทดลองต่อไปซึ่งเป็นการนำสารสกัดเมล็ดหว้ามาประยุกต์ใช้ล้างโหระพาสดเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ การสกัดที่อุณหภูมิห้องด้วยการแช่จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมกว่าเนื่องจากสามารถสกัดตัวอย่างได้คราวละปริมาณมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยชุดสกัดซอกห์เล็ต (Adams and McChesney, 1983)

จากผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในข้อ 4.1.1 และ 4.1.2 สารสกัดเมล็ดหว้าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เนื่องจากการมีสารประกอบฟีนอลิก (Mohamed *et al.*, 2010) โดยขณะที่สารประกอบฟีนอลิกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียจะทำให้เกิดการรั่วซึมและเกาะกลุ่มกันเป็นผลให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียหน้าที่ในการควบคุมการผ่านเข้า - ออกของสาร โดยการเปลี่ยนแปลงนี้เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เซลล์แบคทีเรียถูกทำลาย (Cowan, 1999; Karaca, 2011) นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นกลุ่มหนึ่งของสารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ทั่วไปในพืชยังสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ซึ่งเป็นสารสำคัญต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) ของแบคทีเรียทำให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ (Cushnie and Lamb, 2005) ด้วยกลไกต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้เซลล์แบคทีเรียถูกทำลายในที่สุด

นอกจากนี้ ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากข้อ 4.1.1 และ 4.1.2 ยังพบว่าสารสกัดเมล็ดหว้าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกั้นสารต่าง ๆ ที่จะซึมผ่านเข้าเซลล์ ดังนั้น ในแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่มีโครงสร้างของเยื่อชั้นนอกนี้ ทำให้สารต่าง ๆ รวมทั้งสารต้านการเจริญของแบคทีเรีย (antibiotic) สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ง่าย เป็นผลให้ถูกทำลายได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Ikigai *et al.*, 1993; Shan *et al.*, 2007)

4.2 การประยุกต์ใช้สารสกัดเมล็ดหว้ากับโหระพา

โหระพา (*Ocimum basilicum* Linn.) เป็นผักที่นิยมนำมารับประทานสดและหากมีการรับประทานโหระพาที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคก็อาจส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ เนื่องจากไม่ผ่านการให้ความร้อนซึ่งเป็นขั้นตอนของการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้มีการส่งออกโหระพาสดไปยังสหภาพยุโรปและประสบปัญหาถูกตรวจพบแบคทีเรีย *E. coli* เกินมาตรฐานเมื่อส่งไปถึงประเทศปลายทาง (กรมการค้าต่างประเทศ, 2550; กรมวิชาการเกษตร, 2548)

การล้างเป็นขั้นตอนหนึ่งที่ช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์บนผิวหน้า ซึ่งในระดับอุตสาหกรรมมักใช้สารเคมีเพื่อให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม สารเคมีบางชนิดมีฤทธิ์

4138052479

กัดกร่อนจึงอาจเป็นอันตรายต่อผู้เตรียมและหากใช้ความเข้มข้นสูงหรือเวลานานก็อาจส่งผลต่อคุณภาพของผักได้ ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจึงได้ถูกนำมาใช้เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับขั้นตอนการล้าง

เบื้องต้นได้ทำการตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *E. coli* ที่พบตามธรรมชาติของโหระพา แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 จำนวนแบคทีเรียตามธรรมชาติของโหระพา

แบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรียที่พบ (log cfu/g ± sd)
แบคทีเรียทั้งหมด	6.72 ± 0.62
E. coli	3.22 ± 0.35

จากตารางที่ 4.11 แสดงจำนวนแบคทีเรียตามธรรมชาติของโหระพา โดยพบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 6.72 ± 0.62 ล็อกซีเอฟยูต่อกรัม และจำนวน *E. coli* เท่ากับ 3.22 ± 0.35 ล็อกซีเอฟยูต่อกรัม ซึ่งมีจำนวนเกินข้อกำหนดทางกฎหมายที่ได้ระบุไว้ว่า *E. coli* ในผักสดต้องมีไม่เกิน 2 ล็อกซีเอฟยูต่อกรัม (มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2548) ดังนั้น จึงใช้แบคทีเรียที่มีอยู่ตามธรรมชาติสำหรับการทดลองขั้นตอนต่อไป

4.2.1 การหาเวลาที่เหมาะสมของการแช่โหระพาด้วยสารสกัดเมล็ดหว้า

นำโหระพาสดมาแช่สารสกัดเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยภาวะเหมาะสมจากข้อ 4.1 คือการใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นตัวทำละลาย สกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 2 MBC (12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แช่โหระพาด้วยสารสกัดเป็นเวลาต่าง ๆ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 การลดลงของจำนวนแบคทีเรียเมื่อแช่โหระพาด้วยสารสกัดเมล็ดหว้าความเข้มข้น 2 MBC เป็นเวลาต่าง ๆ

เวลาแช่ (min)	log cfu/g ± sd	
	แบคทีเรียทั้งหมด	*E. coli*
0 (ไม่แช่)	6.43^{a} ± 0.78	3.40^{a} ± 0.44
10	6.07^{b} ± 0.88	2.81^{ab} ± 0.43
20	5.81^{bc} ± 1.03	2.27^{bc} ± 0.27
30	5.69^{c} ± 1.04	1.80^{c} ± 0.39
40	5.24^{d} ± 0.80	1.67^{c} ± 0.41

หมายเหตุ a - d หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

4138052479

จากตารางที่ 4.12 พบว่าการแช่โหระพาด้วยสารสกัดเมล็ดหว้าความเข้มข้นเท่ากับ 2 MBC เป็นเวลา 10 นาที ทำให้จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จากการไม่แช่สารสกัด ส่วนจำนวน *E. coli* ลดลงจากการไม่แช่สารสกัดเช่นกัน แต่จะลดจำนวนลงจนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญและไม่เกินตามข้อกำหนดทางกฎหมายคือ 100 ซีเอฟยูต่อกรัม หรือ 2.00 ล็อกซีเอฟยูต่อกรัม (มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2548) ต่อเมื่อแช่สารสกัดนาน 30 - 40 นาที ดังนั้น การเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจึงอาจช่วยลดเวลาแช่ลงได้

4.2.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดเมล็ดหว้าที่ใช้แช่โหระพา

การหาความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดหว้าเพื่อใช้แช่โหระพา แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 การลดลงของจำนวนแบคทีเรียเมื่อแช่โหระพาด้วยสารสกัดเมล็ดหว้าความเข้มข้นต่าง ๆ เวลา 10 นาที

ทรีทเมนต์	log cfu/g ± sd	
	แบคทีเรียทั้งหมด	*E. coli*
ไม่แช่	$7.02^{a} \pm 0.30$	$3.04^{a} \pm 0.10$
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	$6.72^{ab} \pm 0.12$	$2.71^{b} \pm 0.17$
2 MBC (12.5 mg/ml)	$6.24^{bc} \pm 0.34$	$2.23^{c} \pm 0.25$
4 MBC (25.0 mg/ml)	$5.90^{cd} \pm 0.08$	ND - 1.00
6 MBC (37.5 mg/ml)	$5.41^{d} \pm 0.37$	ND - 1.00

หมายเหตุ a - d หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
ND หรือ not detected หมายถึง ตรวจไม่พบแบคทีเรียที่ระดับเจือจาง 1 ต่อ 10

จากตารางที่ 4.13 เมื่อแปรความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดหว้าที่ใช้แช่โหระพาเวลา 10 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและ *E. coli* ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด โดยเมื่อพิจารณาถึงการลดจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมด พบว่าการแช่โหระพาด้วยสารสกัดเมล็ดหว้าความเข้มข้น 2 MBC ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับตารางที่ 4.12 โดยจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จากการไม่แช่แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) กับการแช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดหว้าเป็น 4 MBC และ 6 MBC จึงจะทำให้จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดลดลงจนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อพิจารณาถึงการลดจำนวนของ *E. coli* พบว่าการแช่โหระพาด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและสารสกัดเมล็ดหว้าความเข้มข้น 2 MBC ต่างทำให้จำนวน *E. coli* ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการไม่แช่ แต่ยังคงเกินข้อกำหนดทางกฎหมายคือ 2.00 ล็อกซีเอฟยูต่อกรัม (มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2548) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดหว้าเป็น 4 MBC และ 6 MBC

ทำให้จำนวน *E. coli* ลดลงเหลือ 1.00 ล็อกซีเอฟยูต่อกรัมจนถึงไม่พบที่ระดับเจือจาง 1 ต่อ 10 ซึ่งมีจำนวนอยู่ในเกณฑ์ที่กฎหมายกำหนดไว้

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

(จ)

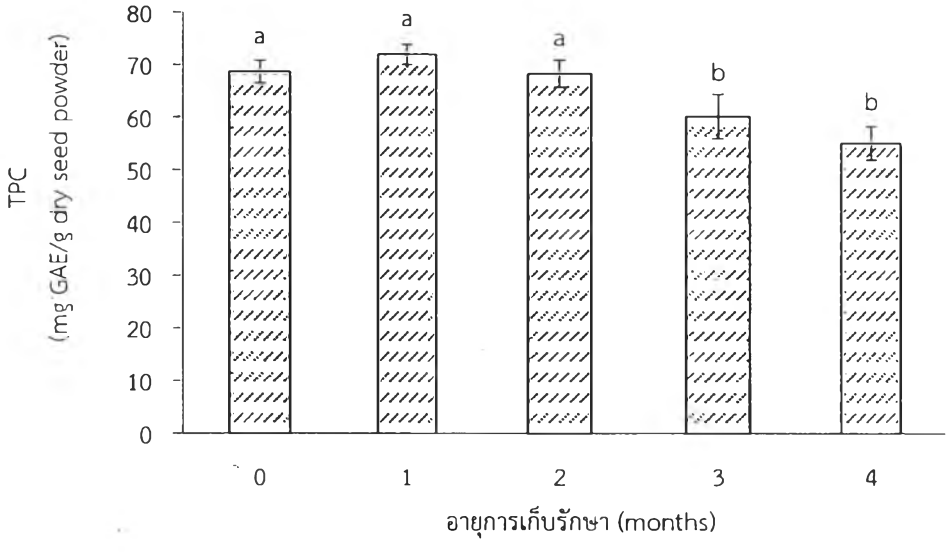
ภาพที่ 4.7 (ก) โหระพาเริ่มต้น (ไม่แช่); (ข) โหระพาแช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ; (ค) โหระพาแช่ด้วยสารสกัดเมล็ดหว้าความเข้มข้น 2 MBC; (ง) โหระพาแช่ด้วยสารสกัดเมล็ดหว้าความเข้มข้น 4 MBC; (จ) โหระพาแช่ด้วยสารสกัดเมล็ดหว้าความเข้มข้น 6 MBC

ผลลักษณะปรากฏของโหระพาหลังแช่ด้วยสารสกัดเมล็ดหว้าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 4.7 ค - จ พบว่าความสด สี และกลิ่นของโหระพายังคงเดิมไม่แตกต่างจากการไม่แช่ (ภาพที่ 4.7 ก) และการแช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (ภาพที่ 4.7 ข) ดังนั้น กล่าวได้ว่าสารสกัดเมล็ดหว้าไม่ส่งผลต่อลักษณะปรากฏของโหระพา

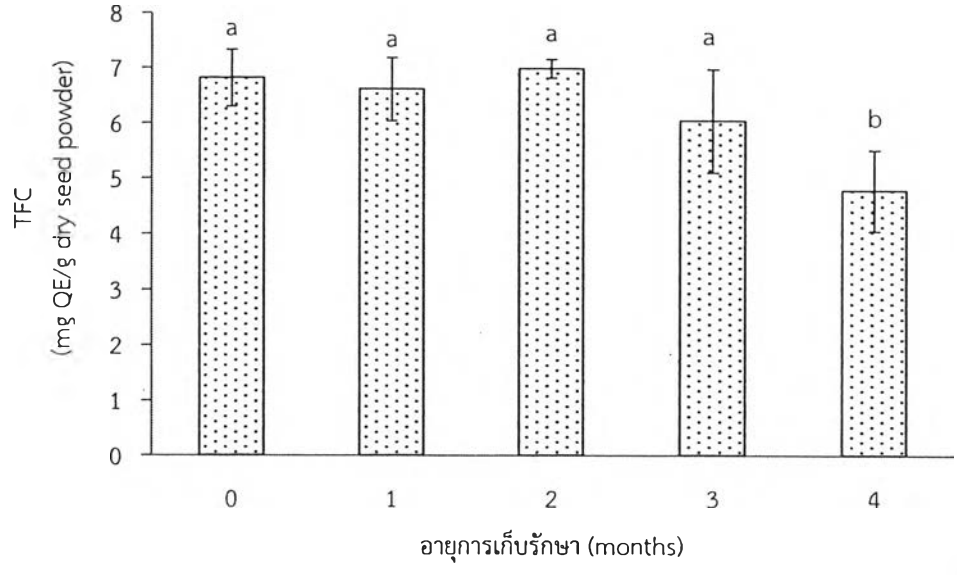
จากผลการประยุกต์ใช้สารสกัดเมล็ดหว้าเพื่อลดจำนวนแบคทีเรียของโหระพาพบว่าสารสกัดเมล็ดหว้าความเข้มข้น 4 MBC และ 6 MBC ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จึงเลือกใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 4 MBC เพื่อเป็นการประหยัดสารสกัด ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมคือการแช่โหระพาด้วยสารสกัดเมล็ดหว้าความเข้มข้นเท่ากับ 4 MBC (25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 10 นาที

4.3 อายุการเก็บรักษาของสารสกัดเมล็ดหว้า

โดยส่วนใหญ่แล้ว ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะตรวจวัดหลังจากการสกัดทันทีเพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียในระหว่างการเก็บรักษา (Materska, 2010) อย่างไรก็ตาม หากต้องการนำสารสกัดมาใช้ประโยชน์ การสูญเสียสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดเมื่อเวลาผ่านไปจึงไม่อาจละเลยได้ ด้วยเหตุนี้จึงได้ศึกษาความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกระหว่างการเก็บรักษา โดยนำสารละลายสารสกัดเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยภาวะเหมาะสมจากข้อ 4.1 คือการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง มาเก็บรักษาในขวดสีชาปิดสนิท ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน



ภาพที่ 4.8 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมล็ดหว้า เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 - 4 เดือน



ภาพที่ 4.9 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดเมล็ดหว้า เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0 - 4 เดือน

4138052479

จากภาพที่ 4.8 และ 4.9 พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดค่อย ๆ ลดลงเมื่อเก็บรักษานานขึ้น โดยสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือน และลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเก็บรักษาต่อถึง 4 เดือน ส่วนสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 4 เดือน โดยความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดก็ลดลงด้วยแนวโน้มเดียวกัน ดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเมื่อเก็บรักษาสารสกัดเมล็ดหว้าเป็นเวลา 4 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง

อายุการเก็บรักษา (months)	ความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g dry extract)	ความเข้มข้นสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g dry extract)
0 (เริ่มต้น)	$417.40^{a} \pm 21.60$	$41.37^{a} \pm 2.48$
1	$437.39^{a} \pm 19.04$	$40.13^{a} \pm 2.63$
2	$415.21^{a} \pm 20.88$	$42.43^{a} \pm 9.99$
3	$365.88^{b} \pm 33.56$	$36.76^{a} \pm 6.37$
4	$334.65^{b} \pm 17.32$	$29.10^{b} \pm 4.91$

หมายเหตุ a - b หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Materska (2010) ที่ศึกษาอายุการเก็บรักษาของสารสกัดสมุนไพรต่าง ๆ เป็นเวลา 6 เดือน และพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากสะระแหน่และสาเกลดลงจากเริ่มต้นเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือน หลังจากนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกยังคงลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.15 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดหว้า (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3 และ 4 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยวิธี DDM

แบคทีเรีย	โซนใส (mm)				
	สารสกัดเมล็ดหว้าจาก 50% เอทานอล			แอมพิซิลิน (100 µg/ml)	น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
	0 month (เริ่มต้น)	3 months	4 months		
E. coli	10.58^{ab} ± 0.52	10.33^{ab} ± 1.15	8.27^{b} ± 0.25	12.00^{a} ± 2.00	-
S. Typhimurium	12.75^{b} ± 0.25	12.67^{b} ± 0.58	11.50^{c} ± 0.50	16.50^{a} ± 0.50	-
S. aureus	15.58^{b} ± 0.38	15.33^{b} ± 1.53	12.50^{c} ± 0.50	22.50^{a} ± 0.50	-

หมายเหตุ a - b หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวนอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
- หมายถึง ไม่เกิดโซนใส

จากตารางที่ 4.15 เมื่อนำสารสกัดเมล็ดหว้า (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3 และ 4 เดือนที่อุณหภูมิห้องมาทดสอบกับแบคทีเรีย *E. coli* พบว่าขนาดโซนใสของการเก็บรักษาเวลา 0 และ 3 เดือน ไม่แตกต่างกับกับแอมพิซิลิน (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 4 เดือนพบว่าโซนใสมีขนาดเล็กลง และเมื่อนำสารสกัดเมล็ดหว้ามาทดสอบกับแบคทีเรีย *S.* Typhimurium และ *S. aureus* พบว่าขนาดโซนใสของการเก็บรักษาที่เวลา 0 - 4 เดือน มีขนาดเล็กกว่าแอมพิซิลิน และการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 เดือน ทำให้โซนใสมีขนาดเล็กลงจากเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

4138052479

ตารางที่ 4.16 ค่า MIC ของสารสกัดเมล็ดหว้าเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3 และ 4 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง

แบคทีเรีย	MIC (mg/ml)		
	0 month	3 months	4 months
E. coli	3.13	3.13 - 6.25	6.25
S. Typhimurium	3.13	3.13	6.25
S. aureus	0.39	0.39	1.56

ตารางที่ 4.17 ค่า MBC ของสารสกัดเมล็ดหว้าเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3 และ 4 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง

แบคทีเรีย	MBC (mg/ml)		
	0 month	3 months	4 months
E. coli	3.13 - 6.25	6.25	12.50
S. Typhimurium	3.13 - 6.25	3.13 - 6.25	6.25
S. aureus	0.78	0.78	1.56 - 3.13

จากตารางที่ 4.16 และ 4.17 เมื่อนำสารสกัดเมล็ดหว้าที่เก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3 และ 4 เดือนมาทดสอบกับแบคทีเรีย *E. coli* และ *S.* Typhimurium พบว่าสารสกัดเมล็ดหว้าที่เก็บรักษาเป็นเวลา 0 และ 3 เดือน ให้ค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วงเดียวกันคือ 3.13 - 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและมีค่า MIC และ MBC เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 6.25 - 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 4 เดือน ในขณะที่เมื่อทดสอบกับแบคทีเรีย *S. aureus* ให้ค่า MIC และ MBC ที่มีแนวโน้มเช่นเดียวกันคือสารสกัดเมล็ดหว้าที่เก็บรักษาเป็นเวลา 0 และ 3 เดือน ต่างให้ค่า MIC เท่ากับ 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากับ 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MIC และ MBC เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 1.56 - 3.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเก็บรักษานานถึง 4 เดือน แสดงให้เห็นว่าเมื่อเก็บรักษาสารสกัดเมล็ดหว้านานถึง 4 เดือน ฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดหว้าต่อการยับยั้งการเจริญของ

แบคทีเรียจะลดลง จึงต้องใช้สารสกัดเมล็ดหว้าที่ความเข้มข้นสูงขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองจากตารางที่ 4.15 - 4.17 พบว่าแบคทีเรีย *S. aureus* ซึ่งเป็นแกรมบวกถูกยับยั้งการเจริญได้ง่ายที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *E. coli* และ *S.* Typhimurium ซึ่งเป็นแกรมลบ เนื่องจากเหตุผลเดียวกันกับข้อ 4.1

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเก็บรักษาสารละลายสารสกัดเมล็ดหว้าในขวดสีชาปิดสนิทที่อุณหภูมิห้องประมาณ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน ทำให้ปริมาณและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดลดลง รวมถึงฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก็ลดลงด้วยเช่นกัน สันนิษฐานได้ว่าสารประกอบฟีนอลิกชนิดที่ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีอาจสลายตัวเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานาน ซึ่งการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกมาจากหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น ออกซิเจน อุณหภูมิ และแสง (Issa and Abd-Aljabar, 2013) ดังนั้นหากต้องการเก็บรักษาสารสกัดเมล็ดหว้าที่ภาวะอุณหภูมิห้องเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านจุลินทรีย์ไม่ควรเก็บรักษานานเกิน 3 เดือน

4138052479