



## โครงการ

# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การผลิตฟิล์มคอมโพสิตของพุลลูแลนและสารสกัดจากสมุนไพรเพื่อยับยั้ง  
การเติบโตของแบคทีเรีย  
Production of composite film of pullulan and herbal  
extracts to inhibit the growth of bacteria

**ชื่อนิสิต** นายณัฐพัชร รัตนะหัสติน **เลขประจำตัวนิสิต** 5932115023

**ภาควิชา** พฤษศาสตร์

**ปีการศึกษา** 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การผลิตฟิล์มคอมโพสิตของพอลิแลนและสารสกัดจากสมุนไพร  
เพื่อยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย

นายณัฐพัชร รัตนะหัสติน

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2562

Production of composite film of pullulan and herbal extracts  
to inhibit the growth of bacteria

Mr. Nattapat Rattanahadsadin

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements  
For the Degree of Bachelor of Science in Botany  
Department of Botany  
Faculty of Science, Chulalongkorn University  
Academic Year 2019

ชื่อเรื่อง การผลิตฟิล์มคอมโพสิตของพอลิแลนและสารสกัดจากสมุนไพรเพื่อยับยั้ง  
การเติบโตของแบคทีเรีย

ชื่อนิสิต ณัฐพัชร รัตนะหัสติน

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สีนานา ประสงค์สุข

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร. วิภาณี แบนศิริ

ภาควิชา พฤษศาสตร์

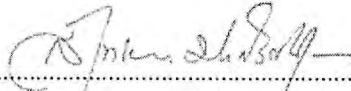
สาขาวิชา พฤษศาสตร์


ปีการศึกษา 2562

---

ภาควิชาพฤษศาสตร์ อนุมัติให้โครงการวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพฤษศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงการวิทยาศาสตร์

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สีนานา ประสงค์สุข)

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(อาจารย์ ดร. วิภาณี แบนศิริ)

  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศศิธร พ่วงปาน)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การผลิตฟิล์มคอมโพสิตของพุลูลูแลนและสารสกัดจากสมุนไพรรักษา เพื่อยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย
ชื่อนิติ	ณัฐพัชร รัตนหัตถิน
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการงาน	รองศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการงานร่วม	อาจารย์ ดร. วิภาณี แบนศิริ
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2562

### บทคัดย่อ

การนำสารสกัดสมุนไพรมารักษาประยุกต์ใช้ในรูปแบบฟิล์มเป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่ที่ทั่วโลกเริ่มให้ความสนใจ ซึ่งพุลูลูแลนเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่เหมาะสมสำหรับการขึ้นรูปฟิล์มและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากสมุนไพรรักษา 2 ชนิด ได้แก่ ใบสาบเสือ (*Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob.) และต้นตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) ด้วย 95% เอทานอล เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *S. epidermidis* ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคผิวหนัง พบว่าสารสกัดหยาบจากสมุนไพรรักษาทั้ง 2 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อทดสอบ เมื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อ (MIC) โดยค่าความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อที่ 50% ( $IC_{50}$ ) ของสารสกัดจากใบสาบเสือต่อเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* มีค่าเท่ากับ 11.19 และ 3.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากตะไคร้มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 11.94 และ 5.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้มีการศึกษาถึงผลกระทบของความเข้มข้นของพุลูลูแลนและกลีเซอรอลต่อคุณลักษณะของฟิล์มที่ผลิตได้โดยพบว่าฟิล์มที่ผลิตจากพุลูลูแลนความเข้มข้น 4% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับกลีเซอรอลความเข้มข้น 0.5% (โดยปริมาตรต่อปริมาตร) มีสมบัติความยืดหยุ่นที่ดีกว่าฟิล์มที่เตรียมจากความเข้มข้นอื่นในการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นของพุลูลูแลนและกลีเซอรอลนี้อาจจะสามารถนำมาใช้ในการเตรียมฟิล์มยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย ร่วมกับสารสกัดจากใบสาบเสือและต้นตะไคร้ในอนาคตได้

**คำสำคัญ:** *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, ฟิล์มพุลูลูแลน, สารสกัดจากสมุนไพรรักษา

<b>Title</b>	Production of composite film of pullulan and herbal extracts to inhibit the growth of bacteria
<b>Student name</b>	Nattapat Rattanahadsadin
<b>Senior project advisor</b>	Assoc. Prof. Dr. Sehanat Prasongsuk
<b>Senior project coadvisor</b>	Dr. Wichanee Bankeeree
<b>Program</b>	Botany
<b>Department</b>	Botany
<b>Academic year</b>	2019

---

### Abstract

Application of herbal extracts in film is a new type of products that is worldwide interesting. Pullulan is mentioned as a suitable and safe biopolymer for film forming that is safe for consumers. In this study, crude extracts of leaves of bitter bush (*Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob.) and stem of lemon grass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) by maceration with 95% ethanol. The extracts were tested for the growth-inhibitory activity of bacteria causing skin disease, *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*. The results showed that both herbal extracts could inhibit the growth of *S. aureus* and *S. epidermidis*. The half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of leaves extract of bitter bush on *S. aureus* and *S. epidermidis* were 11.39 and 3.03 mg/ml, respectively, while IC<sub>50</sub> of stem extract of lemon grass were 11.94 and 5.11 mg/ml, respectively. In addition, the effects of pullulan and glycerol concentration on film characteristic were investigated. At 4% (w/v) pullulan and 0.5% (v/v) glycerol, the casted film presented the higher flexibility than those of others in this study. It might be concluded that these concentrations of pullulan and glycerol could be applied for further preparation of antibacterial film with crude extracts of leaves of bitter bush and stem of lemon grass.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, pullulan film, herbal extracts

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิทยาศาสตร์และอาจารย์ ดร. วิภาณี แบนศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิทยาศาสตร์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอน ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำโครงการวิทยาศาสตร์ และกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศศิธร พ่วงปาน ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงการวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้อุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในโครงการวิทยาศาสตร์นี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจที่สำคัญ และให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้านอย่างเต็มที่

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญรูป.....	ฌ
สารบัญตาราง.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา.....	16
4. ผลการศึกษา.....	22
5. อภิปรายผลการศึกษา.....	33
6. สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	39
เอกสารอ้างอิง.....	40
ภาคผนวก.....	47
ภาคผนวก ก.....	48
ภาคผนวก ข.....	50
ภาคผนวก ค.....	52



## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสาบเสือ.....	4
2 โครงสร้างของพุลลูแลน.....	13
3 ตัวอย่างสาบเสือ ( <i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.) ในพิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กลิน สุวตะพันธ์ H.B. No. 016529 (BCU).....	22
4 สารสกัดหยาบจากสมุนไพรร.....	23
5 แผ่น TLC ของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือและต้นตะไคร้ที่ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ต่าง ๆ.....	24
6 บริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรรต่อเชื้อทดสอบ.....	26
7 ฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของ <i>Staphylococcus aureus</i> ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรร ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงสมการ polynomial ลำดับ 2 และค่าสหสัมพันธ์ ของการ ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง.....	28
8 ฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของ <i>Staphylococcus epidermidis</i> ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรร ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงสมการ polynomial ลำดับ 2 และค่าสหสัมพันธ์ ของการ ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง.....	28
9 การบ่มเชื้อ <i>Aureobasidium pullulans</i> PBUAP 34 บนอาหารสูตร Yeast Malt Agar (YMA) เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน.....	29
10 ลักษณะเชื้อ <i>Aureobasidium pullulans</i> PBUAP 34 ในอาหารสูตร Production Medium (PM).....	30
11 พุลลูแลน.....	30
12 ลักษณะของฟิล์มพุลลูแลนที่ความเข้มข้น 3 4 และ 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร).....	32

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ค่า Retardation factor ( $R_f$ ) ของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน.....	25
2 ค่า Retardation factor ( $R_f$ ) ของสารสกัดหยาบจากต้นตะไคร้เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ต่างกัน.....	26
3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรโดยวิธี Agar well diffusion.....	27
4 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรเทียบกับยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล.....	28
5 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเติบโต (MIC) ของเชื้อ	30
6 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักพุลลูแลนและน้ำหนักเซลล์ของ <i>Aureobasidium pullulans</i> PBUAP 34 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร PM pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน.....	32

## บทที่ 1

### บทนำ

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาหลายประเทศทั่วโลกเริ่มให้ความสำคัญกับการนำพืชสมุนไพรมาใช้แทนยาปฏิชีวนะมากขึ้น เนื่องจากการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Weaver et al., 2014) นอกจากนี้สมุนไพรยังช่วยเสริมสร้างสุขภาพร่างกายให้แข็งแรง เพิ่มภูมิคุ้มกันโรค ก่อให้เกิดอาการแพ้และมีผลข้างเคียงน้อยกว่าสารสังเคราะห์ และไม่ทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะ (ประสาทร บิริสุทธิเพ็ชร, พิทย กัญบุตร และสาร พรตระกุลพิพัฒน์, 2551; Brull and Coote, 1999) งานวิจัยเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้สมุนไพรแทนสารปฏิชีวนะทั้งเสริมเข้าไปโดยตรงในอาหาร (Gutierrez, Barry-Ryan, and Bourke, 2008) และสารสกัดจากธรรมชาติ จึงได้รับความสนใจและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (ประสาทร บิริสุทธิเพ็ชร และคณะ, 2551) มีรายงานว่าสารสกัดจากตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) และสาบเสือ (*Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob.) มีฤทธิ์สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* ได้ (จิราภรณ์ บุราคร, จารวี สุขประเสริฐ และธีรดา สุขธรรม, 2554; Chomnawang et al., 2005; ชาลิสา ชาญเขตรธรรม และ อานุกาพ สกิจขวา, 2557) *P. acnes* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปตามผิวหนัง ผม ขน ช่องปาก ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคสิวอักเสบ (Lertsatitthanakorn et al., 2006) *S. aureus* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในร่างกายมนุษย์ตามผิวหนังและรูขุม เป็นสาเหตุสำคัญของโรคปอดบวม การติดเชื้อบนผิวหนัง ติดเชื้อในกระแสเลือด และอาหารเป็นพิษ (วัชรินทร์ รังสีภานุรัตน์, พัชรี กัมมารเจษฎากุล และอิสยา จันทรวิทยานุชิต, 2559; Noskin et al., 2005) และ *S. epidermidis* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ตามผิวหนังทั่วไปและเยื่อเมือกบางแห่ง เช่น จมูก หู ปาก และหลอดปัสสาวะส่วนปลาย โดยปกติไม่ก่อโรค แต่ในสภาวะที่ภูมิคุ้มกันอ่อนแอจะก่อให้เกิดโรคสิวอักเสบเป็นหนอง (จิราภรณ์ บุราคร และคณะ, 2554) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียของสารสกัดจากสาบเสือนี้น่าต่ำกว่าสารสกัดจากสมุนไพรไทยอีกหลายชนิด (Chomnawang et al., 2005)

การนำสารสกัดสมุนไพรมาใช้อยู่ในผลิตภัณฑ์ในปัจจุบันมีหลายรูปแบบทั้งรูปแบบครีมบำรุงผิว สบู่ก้อน สบู่เหลว เป็นต้น (ฐิติมา ศรีสุวรรณ และคณะ, 2550) ซึ่งหลายผลิตภัณฑ์มีส่วนประกอบ

สำคัญเป็นสารเคมีอยู่ด้วย จึงอาจส่งผลข้างเคียงต่อผู้บริโภคได้ फिल्मเป็นผลิตภัณฑ์อีกรูปแบบหนึ่งที่นักเภสัชกรรมทั่วโลกเริ่มให้ความสนใจ เนื่องจากฟิล์มสามารถควบคุมอัตราการปลดปล่อยสารภายในฟิล์มได้จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของสารและช่วยลดความถี่ในการบริโภคสารด้วย (Karki et al., 2016) นอกจากนี้ฟิล์มยังเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้งานง่าย และพกพาได้สะดวก ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาแผ่นฟิล์มสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ โดยการผลิตฟิล์มจากพอลิเมอร์ธรรมชาติเพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

พุลูลแลนเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ผลิตได้จาก *Aureobasidium pullulans* มีสมบัติที่สามารถละลายน้ำได้ เหมาะสำหรับการสร้างฟิล์ม (Drosou, Krokida, and Biliaderis, 2017) และมีรายงานว่าฟิล์มพุลูลแลน มีความยืดหยุ่น ไม่มีกลิ่น ไม่ยอมให้น้ำมันผ่าน สามารถต้านทานต่อการเข้าออกของออกซิเจนได้ดี (Stefano et al., 2014) มีสมบัติป้องกันการเกิดออกซิเดชัน สามารถรับประทานได้ ไม่มีความเป็นพิษ ไม่มีสีและรส และสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (Yuen, 1974; สีหนาท ประสงค์สุข, 2552)

งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียของฟิล์มคอมโพสิตพุลูลแลนที่มีสารสกัดสมุนไพร โดยศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบจากสมุนไพรสาบเสือ (*Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob.) และตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) โดยศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* เพื่อนำความเข้มข้นที่ได้มาใช้ในการผลิตฟิล์มคอมโพสิตพุลูลแลนที่มีสารสกัดสมุนไพร เพื่อพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์สมุนไพรและเพิ่มมูลค่าให้กับสาบเสือและตะไคร้

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาการผลิตฟิล์มคอมโพสิตของพุลูลแลนที่มีสารสกัดจากสมุนไพรเพื่อยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ฟิล์มคอมโพสิตของพุลูลแลนที่มีสารสกัดจากสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านเภสัชวิทยาได้

## บทที่ 2

### การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 สมุนไพรที่ใช้ศึกษา

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจำนวนมาก เนื่องจากสารสกัดสมุนไพรเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาเชื้อดื้อยาได้ พืชสมุนไพรที่ใช้ศึกษา ได้แก่

##### 2.1.1 สาบเสือ (*Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob.)

##### 2.1.1.1 การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน (taxonomic classification)

Division: Spermatophyta

Class: Dicotyledonae

Order: Asterales

Family: Asteraceae

Genus: *Chromolaena*

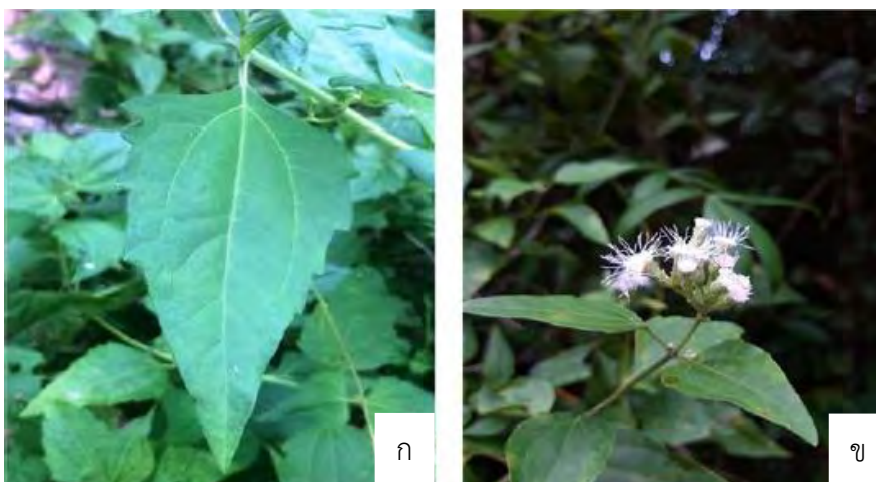
Species: *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob.

ชื่อสามัญ: Siam weed, Bitter bush ชื่อท้องถิ่น: ยี่สุนเถื่อน ช้างผัดคราด (สุราษฎร์ธานี), ผัดคราด บ้านร้าง (ราชบุรี), ฝรั่งเศส ฝรั่งเศสที่ (สุพรรณบุรี), ชีโพยกวย ไข่ปุ๊กกอก (สุพรรณบุรี), บ่อไล่ เพาะจีแค หญ้าค่าพัง (แม่ฮ่องสอน), หญ้าลิมเมือง (หนองคาย), หญ้าเลาฮ้าง (ขอนแก่น), หญ้าเมืองฮ้าง หญ้าเมืองวาย (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ), หญ้าเหม็น (อีสาน), มนทน (เพชรบูรณ์), หมาหลง (ชลบุรี), มั่งกระต่าย (ลพบุรี อุตรดิตถ์ ราชบุรี), หญ้าตงร้าง หญ้าพระศิริไอยสวรรค์ (สระบุรี), ร้าเคย (ระนอง), สาบเสือ (สิงห์บุรี สระบุรี), เบญจมาศ (ภาคกลาง กรุงเทพฯ ตราด), หญ้าฝรั่งเศส (จันทบุรี ตราด), หญ้าดอกขาว (ภาคกลาง กรุงเทพฯ เชียงใหม่ อ่างทอง เลย) (Koyama et al., 2016)

##### 2.1.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้รอเลื้อยขนาดใหญ่ แตกกิ่งก้านสาขาจนเหมือนทรงพุ่มกิ่ง ก้าน ลำต้น มีขนสั้นนุ่ม ใบเป็นใบเดี่ยว ลักษณะการเรียงของใบแบบคู่ตรงข้าม ลักษณะใบขอบขนานทรงรูปสามเหลี่ยม กว้าง 7.5-10 เซนติเมตร ยาว 2.5-5.0 เซนติเมตร ปลายใบแหลม โคนใบคล้ายรูปลิ้ม ใบเรียวยาวขอบเข้าหากัน ขอบใบหยัก เห็นเส้นใบชัดเจน 3-5 เส้นตั้งรูปที่ 1 ก ผิวใบทั้งสองด้านมีขนสั้นนุ่ม ผิวใบด้านล่างมีต่อมและมีสีเขียวอ่อนกว่าผิวใบด้านบน ก้านใบยาว 0.5-2.0 เซนติเมตร ออกดอก

เป็นช่อ อยู่บริเวณปลายกิ่ง ก้านดอกยาว 1-2 เซนติเมตร มีดอกย่อย 20-35 ดอก ดอกสีฟ้าอมม่วง กลีบดอกเชื่อมกันมีลักษณะแคบยาวขึ้นไปเป็นหลอด ปลายแยกออกเป็น 5 กลีบ ดังรูปที่ 1 ข ผลเป็นสันมีรูปร่างคล้ายรูปห้าเหลี่ยม ยาว 0.4 มิลลิเมตร ขนาดเล็ก เรียวบางมีสีดำ ผิวเกลี้ยงยกเว้นบริเวณมุม มีหนามแข็งบนเส้นของผล ที่ปลายผลมีขนสีขาว (Koyama et al., 2016)



รูปที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสาบเสือ ใบสาบเสือ (ก) ดอกสาบเสือ (ข) (Zahara, 2019)

#### 2.1.1.3 สรรพคุณทางยา

ใบ ใช้กับแผลสดช่วยห้ามเลือดโดยทำให้เลือดกลายเป็นลิ่มเลือด สารสกัดจากใบ มีฤทธิ์ฆ่าพยาธิ ต้านเชื้อรา ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ระงับความเจ็บปวด รักษาโรคผิวหนัง แผลมีหนอง ใช้เป็นยากำจัดแมลง (Chakraborty, Rambhade, and Patil, 2011) ปกป้องตับจากสารพิษ ป้องกันท้องร่วง มีฤทธิ์สมานแผล ลดความดันโลหิต บำรุงหัวใจ ป้องกันโรคเบาหวาน ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ แก้ปวดเกร็ง ลดไข้ ช่วยขับปัสสาวะ (Zahara, 2019) สารสกัดจากดอกมีฤทธิ์ต้านวัณโรค (Chakraborty, Rambhade, and Patil, 2011)

#### 2.1.1.4 การศึกษาทางวิทยาศาสตร์

มีการศึกษาสารสกัดจากสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของ *S. aureus* โดยมีค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำเย็นไม่ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ (Mbajiuka et al., 2014) มีรายงานอีกว่าสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 1466 ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* TISTR 518 ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยังพบว่าสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากต้นและรากที่สกัดด้วยตัวทำละลายเดียวกันแสดงให้เห็น

ว่าฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ (Hanphakphoom et al., 2016)

2.1.1.5 ชนิดของสารที่สกัดได้จากใบสาบเสือ ได้แก่ น้ำมันหอมระเหย สารประกอบฟลาโวนอยด์ ได้แก่ acacetin, chalcones, eupatilin, luteolin, และ naringenin เป็นต้น สารกลุ่มฟีนอล, ซาโปนิน, แทนนิน, เทอร์พีนอยด์, เทอร์ปีน, สารประกอบ phytoprostane chromomeric acid (Kanase and Shaikh, 2018), อัลคาลอยด์, pyrrolizidine, สเตียรอยด์, กรดฟีนอลิก, กรดเฟอรูลิก (Zahara, 2019), คาร์ดิแอกไกลโคไซด์, โพรบาแทนนิน และ แอนทราควิโนน, (Oduyayo et al., 2017; Vijayaraghavan, Rajkumar, and Seyed, 2018)

## 2.1.2 ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf)

### 2.1.2.1 การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน (taxonomic classification)

Division: Magnoliophyta

Class: Liliopsida

Order: Poales

Family: Poaceae

Genus: *Cymbopogon*

Species: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

ชื่อสามัญ: Lemongrass ชื่อท้องถิ่น: จะไคร (ภาคเหนือ), ไคร (ภาคใต้), ตะไคร้ (ภาคกลาง), เชิดเกรย (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) (Oyen and Xuan, 1999)

### 2.1.2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุก อายุหลายปี แตกกิ่งก้านแตกเป็นกอกระจุกอัดแน่น มีเหง้าใต้ดิน มีกลิ่นเฉพาะ ชอบและปล้องสั้นมาก ต้นสูง 2-3 เมตร ลักษณะลำต้นเป็นรูปทรงกระบอก ด้านล่างแข็ง บริเวณใต้ข้อ มักมีไขปกคลุมอยู่ ผิวเรียบและเกลี้ยง ใบเดี่ยว กาบใบเหนียว สีนวลขาวหรือขาวปนม่วง ยาวและหนา หุ้มข้อและปล้องไว้แน่น ผิวใบเรียบและเกลี้ยง รูปขอบขนาน เส้นกลางใบเด่น ใบกว้าง 0.5-2 เซนติเมตร ยาว 50-100 เซนติเมตร ขอบใบจะมีขนขึ้นอยู่เล็กน้อย และค่อย ๆ เรียวเข้าหากัน ปลายใบเรียวแหลม ออกดอกยาก ดอกออกเป็นช่อกระจาย ช่อดอกย่อยมีก้านออกเป็นคู่ ในแต่ละคู่ จะมีใบประดับรองรับ (Oyen and Xuan, 1999)

### 2.1.2.3 สรรพคุณทางยา

น้ำมันหอมระเหยจากใบมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา รักษาโรคน้ำกัดเท้า กลาก ต้านการอักเสบ บรรเทาอาการปวด ต้านสารก่อมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันโรค ไซซ้อ

ลดความดันโลหิต รักษาโรคเบาหวานโดยการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด รักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ต้านมาลาเรียและโรคปอดบวม น้ำมันหอมระเหยในตะไคร้มีสารสำคัญมากมาย เช่น citral และ myrcene เป็นต้น (Oladeji et al., 2019) มีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ ควบคุมระดับไขมันในเลือด ต้านการเกิดเนื้องอก (Machraoui et al., 2018)

#### 2.1.2.4 การศึกษาทางวิทยาศาสตร์

มีการศึกษาสารสกัดจากตะไคร้ พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. epidermidis* ATCC 12228 ที่ความเข้มข้นต่ำสุดในช่วง 0.3-0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Mosquera et al., 2016) มีรายงานอีกว่าสารสกัดจากตะไคร้มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 14990 ที่ความเข้มข้นต่ำสุดมากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Chomnawang et al., 2005)

2.1.2.5 ชนิดของสารที่สกัดได้จากต้นตะไคร้ ได้แก่ น้ำมันหอมระเหย เช่น  $\beta$ -citral,  $\alpha$ -citral,  $\beta$ -myrcene, nerol, geraniol, citronellal, limonene, linalool, geranyl acetate และ neryl acetate เป็นต้น สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์, เทอร์ปีน, อัลคาลอยด์, แทนนิน, ซาโปนิน, ฟลาโวนอยด์, ไกลโคไซด์ และสารประกอบฟีนอลิก (Machraoui et al., 2018; Ekpenyong, Akpan and Nyoh, 2015)

## 2.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

### 2.2.1 *Staphylococcus aureus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน พบการสร้างแคปซูลในบางสายพันธุ์ทำให้เชื้อมีความทนทานต่อการต้านยาปฏิชีวนะและภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ มีสีขาวขุ่น และนูนเล็กน้อย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-4 มิลลิเมตร (ชาลิสา ชาญเขตรธรรม และอานุภาพ สกิจขวา, 2557) เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ตามผิวหนังและโพรงจมูกของมนุษย์ สามารถฉวยโอกาสก่อโรคได้หากร่างกายมีความผิดปกติเกิดขึ้น เชื้อนี้เป็นสาเหตุของอาการที่ไม่รุนแรงจนถึงภาวะช็อกได้ แบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ทำให้เป็นเชื้อที่สร้างปัญหาด้านสุขภาพที่สำคัญอย่างมาก (Gor et al., 2019) โรคที่เกิดขึ้นกับมนุษย์เกี่ยวข้องกับผิวหนังเช่น การเกิดสิว ฝี แผลพุพอง แต่หากแบคทีเรียสามารถเข้าสู่กระแสเลือดได้อาจนำไปสู่อาการเจ็บป่วยที่รุนแรงขึ้นตั้งแต่การติดเชื้อที่เนื้อเยื่ออ่อน ข้ออักเสบจากการติดเชื้อ



ปวดบวม กระจกอักเสบและติดเชื้อ เยื่อหูหัวใจอักเสบ และอาจทำให้เสียชีวิตจากภาวะหัวใจล้มเหลว และเยื่อหุ้มสมองอักเสบได้ แบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถแพร่จากสัตว์สู่คนได้และเป็นเชื้อที่พบได้ทั่วโลก อีกทั้งมีความหลากหลายของความรุนแรงและความสามารถในการพัฒนาความต้านทานยาปฏิชีวนะได้อย่างรวดเร็วจึงทำให้การป่วยและเสียชีวิตจากเชื้อชนิดนี้มีอัตราสูง (Wang et al., 2019)

### 2.2.2 *Staphylococcus epidermidis*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Namvar et al., 2014) เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ตามผิวหนังและเยื่อหูบางแห่งของมนุษย์ เช่น รูจมูก หู ปาก รักแร้ และหลอดปัสสาวะส่วนปลาย แบคทีเรียชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม coagulase-negative staphylococci ซึ่งแยกจาก coagulase-positive staphylococci เช่น *S. aureus* เนื่องจากไม่สามารถผลิตน้ำย่อยโคแอกกูเลส (coagulase) ได้ (Chessa, Ganau, and Mazzarello, 2015) *S. epidermidis* โดยปกติไม่ก่อโรคแต่จะก่อโรคหากร่างกายมีความผิดปกติเกิดขึ้น โรคที่เกิดขึ้นกับมนุษย์เช่น โรคผิวหนังอักเสบ การติดเชื้อในกระแสเลือด ข้ออักเสบจากการติดเชื้อ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นต้น (Namvar et al., 2014)

## 2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากพืช

วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชที่ใช้กันอย่างแพร่หลายสามารถแบ่งได้ 2 วิธีหลัก คือ Diffusion method และ Dilution method

### 2.3.1 Diffusion method (ประสาทรพ บัณฑิตพิเศษ และคณะ, 2551)

วิธีนี้เป็นการทดสอบเชิงคุณภาพเพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในเบื้องต้น การทดสอบด้วยวิธีนี้ใช้ศึกษาความไวของเชื้อต่อสารทดสอบซึ่งจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ขนาดโมเลกุลของสารสกัด ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความสามารถของสารสกัดในการแพร่ผ่านอาหาร ปริมาณของเชื้อที่ใช้ทดสอบ และการวัดขนาดบริเวณยับยั้ง สิ่งเหล่านี้ล้วนมีผลต่อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดทั้งสิ้น

#### 2.3.1.1 Disc diffusion method (Balouiri, Sadiki, and Ibensouda, 2016)

วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้มาก หลักการทั่วไปคือ เชื้อเชื้อและกระจายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เหมาะสม วางแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ซึ่งมีสารทดสอบที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสม สารทดสอบจะแพร่จาก paper disc สู่อาหารเลี้ยงเชื้อโดยรอบ และยับยั้งการเติบโตของเชื้อทดสอบเกิดเป็นบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) หรือบริเวณใส (clear zone) วัดขนาดบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม ข้อดีของวิธีนี้คือ สะดวก ประหยัด สามารถทดสอบสารทดสอบจำนวนมากได้ภายในการทดสอบหนึ่งครั้ง และการตีความผลทำได้ง่าย

### 2.3.1.2 Agar well diffusion method (Balouiri et al., 2016)

เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชและแบคทีเรีย หลักการทั่วไปคล้าย disc diffusion method โดยเริ่มจากเขี่ยเชื้อและกระจายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร จากนั้นใช้แท่งโลหะกลวง (cork borer) เจาะอาหารในจานเพาะเชื้อให้เป็นหลุม หยดสารทดสอบที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนปริมาตร 20-100 ไมโครลิตรลงในหลุม และหยดสารที่ใช้เป็นชุดควบคุมลงในหลุม นำจานเพาะเชื้อไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสม สารทดสอบจะแพร่จากหลุมสู่อาหารเลี้ยงเชื้อโดยรอบและยับยั้งการเติบโตของเชื้อทดสอบเกิดเป็นบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) หรือบริเวณใส (clear zone) วัดขนาดบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม

### 2.3.1.3 Antimicrobial gradient method (Etest) (Balouiri et al., 2016)

วิธีนี้ใช้หลักการของ diffusion method และ dilution method เพื่อใช้หาค่า MIC หลักการทั่วไปคือ วางแผ่นที่มีความเข้มข้นของสารทดสอบจากความเข้มข้นมากที่สุดที่ปลายด้านหนึ่งไปยังความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ปลายอีกด้านหนึ่ง ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เขี่ยเชื้อและกระจายเชื้อไว้แล้ว จากนั้นอ่านค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อได้เป็นค่า MIC

## 2.3.2 Dilution method

วิธีนี้เป็นสารทดสอบเชิงปริมาณ เนื่องจากสามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ใช้ เป็นวิธีที่นิยมใช้หาค่า MIC (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

### 2.3.2.1 Broth dilution method

วิธีนี้สามารถแบ่งเป็น macrodilution (tube test) คือการเจือจางทำในหลอดทดลอง และ microdilution (dilution test) คือการเจือจางทำใน 96-well microtiter plate (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551) หลักการที่ใช้คือ ใช้การเจือจางสารทดสอบด้วยอาหารเหลวโดยเจือจางลดลงทุกสองเท่า (two-fold dilution) โดยทำในหลอดหรือ 96-well microtiter plate และมีหลอดที่ไม่มีสารทดสอบเป็นหลอดควบคุม จากนั้นเขี่ยเชื้อที่ปรับปริมาณที่เหมาะสมลงในหลอด นำหลอดไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสม สังเกตความขุ่นของอาหารเหลว ทั้งนี้การทำ macrodilution จำเป็นต้องใช้ปริมาณสารสกัดมากกว่า microdilution และอาจเกิดความผิดพลาดในขณะเตรียมสารละลายได้ (Balouiri et al., 2016)

### 2.3.2.2 Agar dilution method (Balouri et al., 2016)

ใช้หลักการคล้าย Broth dilution method โดยการเจือจางสารทดสอบลงทุกสองเท่า (serial two-fold dilution) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเขี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและนำไปปฏิกิริยาที่สภาวะที่เหมาะสม อาหารที่มีความเข้มข้นของสารทดสอบที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ ความเข้มข้นนั้นคือค่า MIC นอกจากนี้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกันยังสามารถใช้ทดสอบเชื้อหลายชนิดได้

## 2.4 การสกัดสารจากพืช

### 2.4.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

การศึกษาพืชสมุนไพรนั้น ขั้นตอนแรกคือการเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อรักษาสารชีวโมเลกุลในพืชไว้ก่อนถึงขั้นตอนการสกัดเช่น การนำตัวอย่างไปอบแห้งหรือการบดตัวอย่าง เป็นต้น (Azwanida, 2015) สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเตรียมตัวอย่างพืชมีหลายประการได้แก่ การระบุชนิดพันธุ์พืชให้ถูกต้อง การคัดแยกตัวอย่างเพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนพืชอื่น ตัวอย่างพืชจะต้องสะอาดปลอดโรค นอกจากนี้แม้จะเป็นพืชชนิดเดียวกันแต่สารชีวโมเลกุลในพืชอาจแตกต่างกันได้ทั้งด้านปริมาณและชนิด หากตัวอย่างพืชเป็นสายพันธุ์ที่ต่างกันหรือถูกเก็บจากแหล่งที่ปลูกต่างกัน ดังนั้นขณะเก็บตัวอย่างจำเป็นต้องบันทึกสถานที่ และอายุของตัวอย่างด้วย (จันทร์เพ็ญ โคตรภูธร, 2559)

การสกัดสารจากพืชสามารถทำได้ทั้งจากตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง แต่การออกแบบการทดลองส่วนใหญ่มักทำจากตัวอย่างแห้งเนื่องจากตัวอย่างสดต้องรักษาความสดของตัวอย่างอีกทั้งยังมีแนวโน้มที่จะเสื่อมสภาพเร็วกว่าตัวอย่างแห้งด้วย (Azwanida, 2015) แต่การทำพืชสมุนไพรให้แห้งอาจทำให้สูญเสียฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชไปได้เช่นกัน (จันทร์เพ็ญ โคตรภูธร, 2559)

การทำพืชสมุนไพรให้แห้งนั้นสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้ (Azwanida, 2015)

2.4.1.1 การทำให้แห้งด้วยอากาศ (Air-drying) โดยการให้พืชสัมผัสกับอากาศที่อุณหภูมิโดยรอบ วิธีนี้สามารถช่วยรักษาสารชีวโมเลกุลที่ไม่คงตัวที่อุณหภูมิสูงได้ เนื่องจากตัวอย่างพืชไม่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูง แต่เนื่องจากอุณหภูมิโดยรอบไม่เสถียร จึงอาจใช้เวลานานหลายวันจนถึงหลายเดือน อีกทั้งยังขึ้นกับชนิดของตัวอย่างด้วย

2.4.1.2 การใช้ไมโครเวฟอบแห้งและการใช้เตาอบ เป็นวิธีที่ให้ความร้อนกับตัวอย่างพืช จึงสามารถช่วยลดระยะเวลาในการทำให้ตัวอย่างแห้งได้ แต่การใช้อุณหภูมิที่สูงทำให้มีโอกาสสูญเสียสารชีวโมเลกุลในตัวอย่างพืชได้เช่นกัน

2.4.1.3 การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilization) เป็นวิธีที่ใช้หลักการการระเหิดน้ำในตัวอย่างพืชจะถูกเปลี่ยนจากสถานะของแข็งเป็นสถานะก๊าซโดยไม่ผ่านสถานะของเหลว

ซึ่งตัวอย่างพืชที่จะนำมาทำวิธีนี้จะต้องนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ถึง -80 องศาเซลเซียสก่อนและต้องคลุมปากภาชนะก่อนนำมาทำแห้งเพื่อป้องกันการสูญเสียตัวอย่างในระหว่างการทำแห้ง อย่างไรก็ตามวิธีนี้เป็นวิธีที่ซับซ้อนและมีค่าใช้จ่ายสูงที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีทำสมุนไพรให้แห้งวิธีอื่น

นอกจากนี้การลดขนาดอนุภาคของตัวอย่างเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างตัวอย่างและตัวทำละลายโดยการบดหรือการทำให้เป็นผง ทำให้ประสิทธิภาพการสกัดสารจากตัวอย่างนั้นเพิ่มขึ้นด้วย (Azwanida, 2015; Handa et al., 2008)

## 2.4.2 วิธีการสกัด

### 2.4.2.1 มาเซอเรชัน (Maceration) (Handa et al., 2008)

เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับและใช้ในงานวิจัยพืชสมุนไพรอย่างแพร่หลาย เป็นขบวนการสกัดสารด้วยวิธีการแช่ตัวอย่างพืชด้วยตัวทำละลายในภาชนะปิดและเขย่าภาชนะตลอดเวลา เพื่อให้สารชีวโมเลกุลในเซลล์พืชละลายในตัวทำละลายโดยการทำให้ผนังเซลล์พืชนุ่มและถูกทำลาย เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงแยกสารสกัดที่ได้ออก และนำกากมาบีบสารสกัดให้ออกมามากที่สุด นำสารสกัดที่ได้ไปกรอง สารสกัดจากตัวอย่างพืชที่ได้จากวิธีนี้จะขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ในการแช่ตัวอย่างและตัวทำละลายที่ใช้ วิธีนี้มีข้อดีคือสารไม่ถูกความร้อนทำให้โอกาสการสูญเสียสารชีวโมเลกุลลดลง ข้อเสียคือใช้ตัวทำละลายปริมาณมาก (Azwanida, 2015) นอกจากนี้การสกัดด้วยวิธีนี้เพียงครั้งเดียวนั้น สารชีวโมเลกุลในตัวอย่างพืชอาจยังออกมาไม่หมด เนื่องจากการบีบสารสกัดออกจากกากในการสกัดครั้งแรก อาจยังมีสารหลงเหลืออยู่ ดังนั้นหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด อาจต้องทำการสกัดซ้ำ 2-3 ครั้ง

### 2.4.2.2 เพอร์โคเลชัน (Percolation) (จันทร์เพ็ญ โคตรภูธร, 2559)

เป็นขบวนการสกัดสารแบบต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่าเพอร์โคเลเตอร์ (Percolator) โดยการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายพอชื้นเพื่อให้พองตัวเต็มที่ จากนั้นบรรจุผงสมุนไพรลงใน Percolator ครั้งละน้อยเป็นชั้น เติมตัวทำละลายให้มีระดับสูงกว่าสมุนไพร แช่ไว้ 24 ชั่วโมงจึงไขเอาสารสกัดออก โดยจะต้องเติมตัวทำละลายอย่างสม่ำเสมอเพื่อไม่ให้สมุนไพรแห้ง การสกัดด้วยวิธีนี้อาจไม่สมบูรณ์เนื่องจากปัจจัยหลายประการ เช่น การบรรจุผงสมุนไพรที่ไม่สม่ำเสมออาจทำให้ตัวทำละลายแทรกซึมได้อย่างไม่ทั่วถึง เป็นต้น

### 2.4.2.3 ซอกซ์เลตเอกแทรกชัน (Soxhlet Extraction)

หรือการสกัดร้อนแบบต่อเนื่อง โดยตัวทำละลายที่อยู่ในภาชนะด้านล่างจะถูกให้ความร้อนทำให้ระเหยกลายเป็นไอขึ้นไป เกิดการควบแน่นในคอนเดนเซอร์ (Condenser) แล้วจึงหยดกลับลงมาสู่ทิมเบอร์ (Thimble) ซึ่งมีตัวอย่างพืชอยู่ เมื่อปริมาณสารสกัดสูงถึงระดับหนึ่ง

สารจะไหลลงสู่ภาชนะด้านล่างอีกครั้ง จนกระทั่งการสกัดสารเสร็จสิ้น วิธีนี้ใช้ปริมาณตัวทำละลายน้อยกว่าวิธีมาเซอเรชัน อย่างไรก็ตามตัวทำละลายที่ใช้ในวิธีนี้จำเป็นต้องมีความบริสุทธิ์สูง และตัวอย่างที่จะนำมาสกัดด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องแห้งและเป็นผงละเอียด แต่การสกัดด้วยวิธีนี้อาจสูญเสียสารชีวโมเลกุลบางชนิดไปเนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้ความร้อน วิธีนี้จึงเหมาะสำหรับการสกัดสารชีวโมเลกุลที่ทนความร้อน (Azwanida, 2015)

#### 2.4.3 การทำสารสกัดให้เข้มข้น (จันทร์เพ็ญ โคตรภูธร, 2559)

2.4.3.1 การระเหย (Free Evaporation) เป็นวิธีการระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดโดยให้ความร้อนจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิหรือเตาให้ความร้อน การทำสารสกัดให้เข้มข้นด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะทำให้สารชีวโมเลกุลสลายตัวด้วย หากให้อุณหภูมิที่สูงเกินไปสารชีวโมเลกุลในตัวอย่างอาจสลายตัวได้

2.4.3.2 การกลั่นภายใต้สภาวะลดความดัน (Distillation in vacuum) เป็นวิธีการระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดโดยทำภายใต้อุณหภูมิต่ำและมีการลดความดันจนเป็นสภาวะสุญญากาศด้วยการใช้ปั๊มสุญญากาศ เครื่องมือนี้เรียกว่า เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) มีส่วนประกอบ 3 ส่วนได้แก่ ขวดใส่สารตัวอย่าง (Distillation flask) คอนเดนเซอร์ (Condenser) และขวดรองรับสารตัวอย่างกันกลม (Receiving flask) โดยตลอดการกลั่น ขวดใส่สารตัวอย่างจะหมุนอยู่ตลอดเวลาและถูกแช่อยู่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเพื่อให้ความร้อนกระจายอย่างสม่ำเสมอ ตัวทำละลายที่ระเหยออกจากขวดใส่สารตัวอย่างจะถูกควบแน่นที่บริเวณคอนเดนเซอร์และหยดลงในขวดรองรับสารตัวอย่างกันกลม จนกระทั่งในขวดใส่สารตัวอย่างเหลือเพียงสารสกัดจากพืช

2.4.3.3 การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilization หรือ freeze dehydration) เป็นวิธีการทำแห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง โดยใช้ความเย็นทำให้น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็ง และลดความดันลงเพื่อให้ของแข็งเปลี่ยนสถานะเป็นไอ วิธีนี้เหมาะกับสารที่สลายตัวง่ายเมื่อถูกด้วยความร้อน

#### 2.5 फिल्मและสมบัติของฟิล์ม (Karki et al., 2016)

ฟิล์มเป็นรูปแบบหนึ่งของการให้ยา เนื่องจากสะดวกในการใช้งานและมีความสามารถในการละลายได้อย่างรวดเร็วจึงทำให้ฟิล์มเหมาะสำหรับใช้นำส่งยาโดยอาจผ่านการรับประทานทางปาก ผ่านเยื่อ مخاطแก้ม หรือผ่านผิวหนัง เป็นต้น ลักษณะฟิล์มที่ดีคือสามารถบรรจุยาได้ในปริมาณที่เหมาะสม มีอัตราการละลายเร็วและทำให้ยาอยู่ในบริเวณที่ต้องการได้นาน ไม่มีพิษต่อร่างกาย มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย และมีความยืดหยุ่นปานกลาง

ข้อดีของฟิล์มเมื่อเทียบกับยาในรูปแบบดั้งเดิมคือยาเม็ดและยาน้ำ ฟิล์มจะโดดเด่นในด้านการเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) คืออัตราและปริมาณการดูดซึมยาเข้าสู่ระบบหมุนเวียน

เลือด ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของยาและช่วยลดความถี่ในการบริโภคยา สามารถละลายได้เร็ว มีโอกาสเกิดการแตกหักได้น้อย พกพาสะดวกกว่ายาเม็ดซึ่งต้องการบรรจุภัณฑ์แบบพิเศษ ใช้งานสะดวกไม่ต้องวัดปริมาตรและเขย่าขวดทุกครั้งก่อนรับประทานเหมือนยาน้ำ การใช้ฟิล์มแปะผิวหนังไม่ทำให้เกิดการระคายเคืองเนื่องจากการพัฒนาความสามารถในการซึมผ่านของไอน้ำและยังทำให้ผิวหนังบริเวณที่แปะไม่เหนียว แต่ข้อจำกัดที่สำคัญของฟิล์มคือความสามารถในการบรรจุยาที่น้อยทำให้ไม่เหมาะกับยาชนิดที่ต้องใช้ในปริมาณมากและฟิล์มมักจะดูความชื้น

การผลิตฟิล์มสามารถใช้พอลิเมอร์ชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกันเพื่อให้ได้สมบัติของฟิล์มตามที่ต้องการได้ โดยสมบัติของพอลิเมอร์ที่สามารถนำมาผลิตฟิล์มต้องไม่มีความเป็นพิษ ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง เป็นพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้และมีสมบัติเชิงกลที่ดี

## 2.5.1 สมบัติของฟิล์ม (Karki et al., 2016)

### 2.5.1.1 ความหนาของฟิล์ม

ความหนาของฟิล์มเป็นสิ่งที่สำคัญเนื่องจากมีความสัมพันธ์กับปริมาณยาในฟิล์ม ซึ่งการใส่พลาสติกไซเซอร์มีส่วนช่วยเพิ่มความหนาของฟิล์มเล็กน้อย โดยทั่วไปการวัดความหนาของฟิล์มมักใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์และไมโครมิเตอร์แบบดิจิตอล ความสม่ำเสมอของน้ำหนักแผ่นฟิล์มบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการผลิตฟิล์ม หากพบว่าฟิล์มที่ผลิตได้มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงแสดงว่าวิธีผลิตอาจไม่มีประสิทธิภาพและมีโอกาสสูงที่ยาในฟิล์มจะไม่สม่ำเสมอ

### 2.5.1.2 สมบัติเชิงกล (mechanical properties)

ศึกษาเกี่ยวกับ Young's modulus เพอร์เซ็นต์การยืดตัวและการยืดตัว ณ จุดขาด (elongation at break) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของวัตถุภายใต้ความเครียด ซึ่งสามารถวัดได้ด้วยเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (texture analyzer) และความต้านทานต่อการฉีกขาด (Tear resistance)

### 2.5.1.3 ปริมาณความชื้น (Moisture content)

ปริมาณความชื้นในฟิล์มส่งผลกระทบต่อความแข็งแรงเชิงกล สมบัติในการยึดติด และความพรุนของฟิล์ม

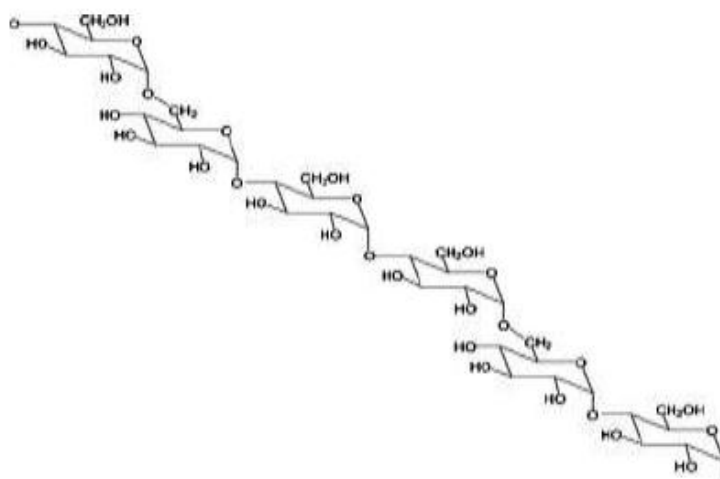
2.5.1.4 สมบัติอื่น ๆ ของฟิล์มเช่น การบวม (Swelling) เพื่อศึกษาการปลดปล่อยยา การศึกษาสัญญาณวิทยาของพื้นผิวฟิล์มเพื่อประเมินการกระจายตัวของยาโดยศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

### 2.5.2 พอลิเมอร์ที่ใช้ผลิตฟิล์ม (Karki et al., 2016)

พอลิเมอร์ที่ใช้ผลิตฟิล์มมีความหลากหลายเช่น ไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส (Hydroxypropyl methylcellulose; HPMC), ไฮดรอกซีโพรพิลเซลลูโลส (Hydroxypropyl cellulose; HPC), พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Poly vinyl alcohol; PVA), โพลีเอทิลีนออกไซด์ (Poly ethylene oxide; PEO), พูลูลูแลน, เพกทิน, ไคโตซาน, โซเดียมอัลจิเนต, คาร์ราจีแนน และเจลาติน เป็นต้น โดยพูลูลูแลนมักถูกใช้ในการผลิตฟิล์ม เนื่องจากมีความสามารถในการละลายน้ำสูง สมบัติเชิงกลมีความแข็งแรงสูง และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มที่มีการเพิ่มพูลูลูแลนเข้าไปเป็นส่วนผสมมีค่าความทนต่อแรงดึงเพิ่มขึ้น

### 2.6 พูลูลูแลน

พูลูลูแลนเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพประเภทคาร์โบไฮเดรตที่สามารถผลิตได้จาก *Aureobasidium pullulans* โดยกระบวนการสังเคราะห์พูลูลูแลนจะเกิดขึ้นภายในเซลล์และหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ พูลูลูแลนมีโครงสร้างเป็นเส้นตรงประกอบด้วยน้ำตาลหลายโมเลกุล หน่วยย่อยของพูลูลูแลนคือ น้ำตาลมอลโตไตรโอสหรือมอลโตเตตระโอส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคซิดิก ( $\alpha$ -1,6-glycosidic linkage) (สีหนาท ประสงค์สุข, 2552) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 โครงสร้างของพูลูลูแลน (เสาวลักษณ์ พลอยงาม, 2552)

การผลิตพูลูลูแลน อาหารเลี้ยงเชื้อจะประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส เปปโตน ฟอสเฟตและเกลือชนิดต่าง ๆ โดยปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 6.5 ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อค่าความเป็นกรดต่าง

จะลดลงถึงประมาณ 3.5 ภายใน 24 ชั่วโมง การเจริญสูงสุดของยีสต์จะอยู่ที่ 75 ชั่วโมงและปริมาณผลผลิตพุลลูแลนสูงสุดอยู่ที่ 100 ชั่วโมง (สีหนาท ประสงค์สุข, 2552)

สมบัติของพุลลูแลน พุลลูแลนมีลักษณะเป็นผงสีขาว สามารถละลายน้ำได้อย่างรวดเร็ว ทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น ไม่มีความเป็นพิษ สามารถรับประทานได้ ไม่ดูดความชื้น ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและรส สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ แผ่นฟิล์มพุลลูแลนสามารถเตรียมได้โดยการนำสารละลายพุลลูแลนความเข้มข้นประมาณ 5-10% มาทำให้แห้งจะได้แผ่นฟิล์มที่บางใสและมีสมบัติป้องกันการเกิดออกซิเดชัน สามารถต้านทานต่อการผ่านเข้าออกของออกซิเจนได้ดี พุลลูแลนถูกใช้อย่างแพร่หลายเช่น อุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากสมบัติของพุลลูแลนที่ไม่สามารถย่อยสลายได้โดยเอนไซม์อะไมเลสในร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจึงเป็นพอลิเมอร์ที่ให้พลังงานต่ำมากเหมาะสำหรับนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารบางประเภท ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางเนื่องจากเมื่อนำพุลลูแลนมาละลายน้ำ จะได้สารละลายที่มีความหนืดจึงใช้เป็นสารเติมแต่งในโลชั่นและแชมพู ในอุตสาหกรรมยามีการใช้ฟิล์มของพุลลูแลนเนื่องจากมีสมบัติละลายน้ำได้อย่างรวดเร็ว นำไปเคลือบสารสำหรับใช้ในการฆ่าเชื้อโรคในปากได้ ในปัจจุบันมีการวางขายสินค้าชนิดนี้ด้วย ชื่อว่า Cool Mint Listerine Pocketpaks (Yuen, 1974; สีหนาท ประสงค์สุข, 2552)

## 2.7 เชื้อรา *Aureobasidium pullulans*

*A. pullulans* เป็นเชื้อราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) ที่จัดอยู่ในกลุ่มแอสโคไมซีตัสยีสต์ (Ascomycetous yeast) มีชื่อสามัญว่า ยีสต์ดำ (black yeast) เนื่องจากสามารถผลิตเม็ดเมลานินออกมาได้ ทำให้โคโลนีมีลักษณะสีดำ ซึ่งเมลานินนี้เป็นปัญหาต่อการผลิตพุลลูแลนโดยปนเปื้อนในระหว่างการผลิตทำให้ต้องกำจัดออกซึ่งในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจะใช้ผงถ่านกัมมันต์กำจัดเมลานินออก (สีหนาท ประสงค์สุข, 2552)

ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* มีลักษณะโคโลนีเรียบและเป็นเมือก มีสีครีมหรือชมพูในระยะแรกทีเล็งจากนั้นอาจเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นหรือเปลี่ยนเป็นสีอื่น มีเส้นใยสั้น ๆ ขึ้นรอบโคโลนี ลักษณะเส้นใยเรียบ โปร่งใส เห็นผนังกันชัดเจน ความกว้างเส้นใยประมาณ 3-12 ไมโครเมตร ผนังเซลล์จะหนาขึ้นเมื่อเลี้ยงนานขึ้น เรียกว่าคลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) มีการสร้างโคนีเดียจากภายใน ด้านข้างหรือปลายของเส้นใย (เสาวลักษณ์ พลอยงาม, 2552)



## 2.8 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียของฟิล์มคอมโพสิตพอลูลูแลนและสารสกัดจากสมุนไพรหลายการศึกษาพบว่า ฟิล์มคอมโพสิตสามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียได้ อาทิ การศึกษาของ Gniewosz และ Synowiec (2011) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียของฟิล์มคอมโพสิตพอลูลูแลนและสารสกัดไทมอล พบว่าฟิล์มพอลูลูแลนที่ประกอบด้วยไทมอลปริมาณ 26.5-52.9 มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตร สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Samonella enteritidis* และ *Escherichia coli* ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นอื่น เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการประยุกต์ใช้ฟิล์มคอมโพสิตของพอลูลูแลนและสารสกัดจากสมุนไพร โดยนำฟิล์มมาเคลือบผิวผักผลไม้เพื่อยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย ได้แก่ การศึกษาของ Gniewosz และคณะ (2013) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียของฟิล์มคอมโพสิตของพอลูลูแลนและน้ำมันหอมระเหยของเทียนตากบสำหรับใช้เคลือบแครอท พบว่าฟิล์มพอลูลูแลนที่ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยของเทียนตากบ 8-10% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ทั้งหมด และพบว่าจำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่พบบนผิวแครอทนั้นลดลงประมาณ 3 log CFU ต่อกรัม และการศึกษาของ Gniewosz และคณะ (2014) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียของฟิล์มคอมโพสิตของพอลูลูแลนและสารสกัดดอกมีเดิร์สวีทและศึกษาประสิทธิภาพของฟิล์มในการเคลือบผิวแอปเปิลเพื่อยืดอายุ พบว่าสารสกัดดอกมีเดิร์สวีทที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลมีปริมาณกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงกว่าสารสกัดดอกมีเดิร์สวีทที่สกัดด้วยเอทานอลเพียงอย่างเดียว ซึ่งส่งผลให้การยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นด้วย โดยสามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. enteritidis*, และ *E. coli* ส่วนผลการเคลือบพอลูลูแลนบนผิวแอปเปิล พบว่า ช่วยป้องกันคุณภาพของแอปเปิลขณะเก็บรักษาได้โดยลดการเปลี่ยนแปลงสีและลดการสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษา นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Zhang และคณะ (2018) ศึกษาสมบัติของฟิล์มคอมโพสิตของพอลูลูแลนและโซเดียมอัลจิเนตที่เติมสารแคปไซซินความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าสมบัติต่าง ๆ ของฟิล์มมีการเปลี่ยนแปลง โดยเมื่อเพิ่มปริมาณแคปไซซินในฟิล์ม ค่าการส่องผ่าน การยึดตัว หนา จุดขาดและความจุความชื้นมีค่าลดลง ในทางกลับกัน ค่าความทนต่อแรงดึง อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ และค่ามุมสัมผัสมีค่าเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ฟิล์มคอมโพสิตยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ได้ เมื่อนำฟิล์มไปเคลือบผลแอปเปิลพบว่าสามารถรักษาความสดของแอปเปิลได้ โดยฟิล์มคอมโพสิตของพอลูลูแลนที่ประกอบด้วยแคปไซซิน 8% มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและรักษาความสดของแอปเปิลได้ดีที่สุด

### บทที่ 3

#### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

##### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์	บริษัท / ประเทศ
ตู้อบไอร้อน (Hot air oven)	Memmert/ Germany
ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-123	ISSOC/ Thailand
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BL610	Sartorius/ Germany
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-205	Denver Instrument Company/ USA
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น PP-50	Sartorius/ Germany
เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator)	Tokyo Rikakikai Co., Ltd/ Japan
เครื่องเขย่าสาร (Shaker) รุ่น SPL 15	Labcon/ The Republic of South Africa
เครื่องดูดสุญญากาศ (Vacuum pump) รุ่น A-35	Tokyo Rikakikai Co., Ltd/ Japan
เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอ (Autoclave)	REXMED Industries Co., Ltd/ Taiwan
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Rotofix32	Hettich/ Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Micro-centrifuge) รุ่น 16M	Labnet International, Inc./ USA
เครื่องกวนสารละลายพร้อมเตาให้ความร้อน (Hot plate and Magnetic Stirrer) รุ่น C-MAG HS10	IKA/ Germany
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	Olympus optical Co., Ltd/ Japan
อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer)	BOECO/ Germany
เวอร์เนียวคาลิปเปอร์แบบดิจิตอล	S2 instrument Co., Ltd/ Thailand
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/ VIS Spectrophotometer) รุ่น HP 8453	Agilent/ USA
ตู้ปลอดเชื้อ (Biological safety cabinet) Class II รุ่น Classic212	Faster S.r.l./ Italy

### 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	บริษัท / ประเทศ
กลูโคส (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	Ajax Finechem/ Australia
เปปโตน (Peptone)	HiMedia Laboratories Pvt. Ltd/ India
ไดโปแตสเซียมฟอสเฟต (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Ajax Finechem/ Australia
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Ajax Finechem/ Australia
บีฟ เอ็กซ์แทรกซ์ (Beef extract)	HiMedia Laboratories Pvt. Ltd/ India
ยีสต์ เอ็กซ์แทรกซ์ (Yeast extract)	HiMedia Laboratories Pvt. Ltd/ India
มอลท์ เอ็กซ์แทรกซ์ (Malt extract)	HiMedia Laboratories Pvt. Ltd/ India
แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Ajax Finechem/ Australia
เกลือ (NaCl)	Ajax Finechem/ Australia
เอทานอล 95% (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Fisher/ USA
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich/ USA
Chloramphenicol	Sang Thai Medical Co., Ltd/ Thailand
น้ำมันมะกอก (Olive oil)	Lam Soon Co., Ltd/ Thailand
อะซิโตน (Acetone)	Merck/ Germany
ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)	Merck/ Germany
เฮกเซน (Hexane)	Ajax Finechem/ Australia
กรดซัลฟิวริก (Sulphuric acid)	Ajax Finechem/ Australia
P-anisaldehyde	Sigma-Aldrich/ USA
เอทิลอะซิเตท (Ethyl Acetate)	Merck/ Germany
เอทิลอีเธอร์ (Ethyl Ether)	Merck/ Germany

### จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

*A. pullulans* PBUAP 34 ได้รับความอนุเคราะห์จากคลังเชื้อของหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*S. aureus* TISTR 746 และ *S. epidermidis* TISTR 2172 ได้รับจากคลังเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ วว. (TISTR Culture Collection) ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ (ศคช.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

### 3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.3.1 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

สมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ ใบสาบเสือ (*Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob.) อายุ 2 ปี เก็บจากพื้นที่แขวงบางมด เขตจอมทอง จังหวัดกรุงเทพฯ และต้นตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) อายุ 2 ปี เก็บจากพื้นที่ตำบลหนองนกไข่ อำเภอกระทุ่มแบน จังหวัดสมุทรสาคร ระบุชนิดพันธุ์สาบเสือโดยใช้ฐาน Flora of Thailand (Koyama et al, 2016) และทำตัวอย่างสาบเสือเข้าพิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิณ สุวตะพันธุ์ นำสมุนไพรมาล้างน้ำให้สะอาด อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ บดให้ละเอียด และนำไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 เมช (ดัดแปลงจากวิธีของ ธิดา ไชยวงศ์, 2555)

#### 3.3.2 การสกัดสารจากสมุนไพร

นำผงสมุนไพรมาสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration) ด้วยเอทานอล 95% (โดยปริมาตร) ในอัตราส่วนสมุนไพร 1 ส่วนต่อสารสกัด 5 ส่วน (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปิดฝาขวดให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิห้อง ( $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส) ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มารองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง เก็บสารสกัดที่ได้และสกัดซ้ำด้วยเอทานอลอีก 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ทั้ง 3 ครั้งมารวมกันและนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) (ดัดแปลงจากวิธีของ จารวี สุขประเสริฐ และสุบงกช ทรัพย์แดง, 2555) และแช่แข็งในเครื่องทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็ง ชั่งน้ำหนักสารสกัดสมุนไพรที่ได้นำมาคำนวณหาร้อยละของผลผลิต (%yield) (Hanphakphoom et al., 2016) ดังสมการที่ 1 และเก็บสารในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เมื่อจะนำมาทดสอบจึงนำสารสกัดมาละลายด้วย Dimethylsulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านเมมเบรน (Millipore filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร (ดัดแปลงจากวิธีของวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์ และคณะ, 2559)

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักสมุนไพรแห้ง (กรัม)}} \times 100 \quad (1)$$

#### 3.3.3 การตรวจสอบสารที่สกัดได้จากสมุนไพรด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography; TLC)

ละลายสารสกัดที่ได้ด้วยเฮกเซนและเอทานอล จุดสารสกัดที่ละลายแล้วลงบนแผ่น TLC ขนาด 2.5x7 เซนติเมตร ด้วยหลอดแคปิลลารี (capillary tube) โดยจุดให้ห่างจากขอบล่างของแผ่นประมาณ 1.5 เซนติเมตร ให้เส้นผ่านศูนย์กลางของจุดไม่เกิน 2 มิลลิเมตร โดยสารสกัดที่ละลายด้วย

เฮกเซน ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ได้แก่ เฮกเซนต่ออะซิโตน (9:1) เฮกเซนต่อไดเอทิลอีเทอร์ (7:3) (Pereira et al., 2009) และเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท (6:3) (Gupta et al., 2019) สารสกัดที่ละลายด้วย เอทานอล ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ได้แก่ ไดคลอโรมีเทนต่อเอทานอล (9:1) และเอทิลอะซิเตทต่อเอทานอล ต่อหน้า (77:15:8) (Pereira et al., 2009) โดยเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวด แก้ว ปิดฝาให้สนิท เขย่าขวดและทิ้งให้อากาศภายในขวดอึมด้วยไอของสารละลาย วางแผ่น TLC ลงในขวด ปิดฝาและรอให้สารละลายเคลื่อนที่ไปตามแผ่น TLC จนห่างจากขอบบนประมาณ 1 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ออกจากขวด ทำให้แห้ง ก่อนนำไปจุ่มสารละลาย Anisaldehyde sulphuric acid ที่มีอัตราส่วนของเมทานอลต่อกรดแอซิดิกต่อกรดซัลฟิวริกเข้มข้นต่ออะนิซาลดีไฮด์ เท่ากับ 85:10:5:0.5 ทิ้งให้แผ่น TLC แห้งเล็กน้อย นำไปให้ความร้อนบนเตาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนปรากฏสีชัดเจน และวัดระยะการเคลื่อนที่ของสารเพื่อหาค่า Retardation factor ( $R_f$ ) ดังสมการที่ 2 (ดัดแปลงจากวิธีของ Pereira และคณะ, 2009)

$$R_f = \frac{\text{ระยะที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}} \quad (2)$$

### 3.3.4 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Agar well diffusion

เพาะเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 746 และ *S. epidermidis* TISTR 2172 ในอาหาร เหลว Nutrient Broth (NB) (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน ปรับปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น  $1 \times 10^8$  CFU ต่อ มิลลิลิตร โดยอาศัยกราฟ มาตรฐานค่า Log ของจำนวนแบคทีเรียที่สร้างขึ้น ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงเดียวกัน (รูป ภาคผนวกที่ ค1 และ ค2) (จิราภรณ์ บุราคร และคณะ, 2554) ปิเปิดสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก ก) โดยการ streak plate จากนั้นใช้แท่งโลหะกลวง (cork borer) เบอร์ 5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร เจาะอาหารในจานเพาะเชื้อให้เป็นหลุม จำนวน 4 หลุม หยดสารสกัดจากสมุนไพร ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายด้วย 50% DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลุม (ดัดแปลงจากวิธีของธิดา ไชยวงศ์ศรี, 2555) ใช้ยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอลความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นชุดการทดลองควบคุมผลบวก และ 50% DMSO เป็นชุดการทดลอง ควบคุมผลลบ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (ดัดแปลงจากวิธีของวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์ และคณะ, 2559)

### 3.3.5 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโต (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ของเชื้อโดยวิธี broth dilution

นำสารสกัดสมุนไพรมาละลายด้วย 10% DMSO และเจือจางด้วย NB ให้ได้ความเข้มข้น 2.5 5.0 7.5 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ดัดแปลงจากวิธี Chomnawang และคณะ, 2005) ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร เติมเชื้อแบคทีเรียที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น  $1 \times 10^7$  CFU ต่อมิลลิลิตร โดยอาศัยกราฟมาตรฐานค่า Log ของจำนวนแบคทีเรียที่สร้างขึ้น (รูปภาคผนวกที่ ค1 และ ค2) (ดัดแปลงจากวิธีของ จารวี สุขประเสริฐ และ สุขภักข ทรัพย์แดง, 2555) ลงในแต่ละหลอดปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธี Dilution plate count บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่มีการเติม 10% DMSO (ดัดแปลงจากวิธีของวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์ และคณะ, 2559)

### 3.3.6 การผลิตพุลลูแลน

เพาะเลี้ยง *A. pullulans* PBUAP 34 บนอาหารสูตร Yeast Malt Agar (YMA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน เชื้อโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว Yeast Malt Broth (YMB) (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน ปรับปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น  $1 \times 10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Direct microscopic count โดยใช้ Haemocytometer (ภาคผนวก ข) เติมเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในอาหารสูตร Production Medium (PM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์และนำส่วนใสไปตกตะกอนพุลลูแลนด้วยเอทานอล 95% (โดยปริมาตร) ในอัตราส่วนของ 95% เอทานอล 2 ส่วนต่อส่วนใส 1 ส่วน แยกตะกอนพุลลูแลนออกจากสารละลายโดยกรองด้วยกระดาษกรอง นำพุลลูแลนและตะกอนเซลล์ที่แยกได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ บันทึกค่าน้ำหนักพุลลูแลนและน้ำหนักเซลล์แห้ง บดพุลลูแลนให้ละเอียดและเก็บในตู้ดูดความชื้น (ดัดแปลงจากวิธีของ Prasongsuk และคณะ, 2007)

### 3.3.7 การเตรียมฟิล์มคอมโพสิตของพุลลูแลนและสารสกัดหยาบจากสมุนไพรมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโต

ขึ้นรูปฟิล์มพุลลูแลนที่ความเข้มข้น 3 4 และ 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ดัดแปลงจากวิธีของ Kumar และคณะ, 2019) ร่วมกับกลีเซอรอล ด้วยวิธีหล่อฟิล์ม (cast film) ทำการเตรียมสารละลายพุลลูแลนโดยชั่งผงพุลลูแลนหนัก 6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนเป็นเนื้อเดียวกัน

นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนออก นำตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ เพื่อนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของพอลูลูแลนในสารละลาย จากนั้นปรับความเข้มข้นของสารละลายพอลูลูแลนให้เท่ากับความเข้มข้นดังกล่าว และขึ้นรูปฟิล์มพอลูลูแลนที่ความเข้มข้น 3 และ 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับการเติมและไม่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้นสุดท้าย 0.5% โดยปริมาตร ส่วนสารละลายพอลูลูแลนที่ความเข้มข้น 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ขึ้นรูปฟิล์มร่วมกับการเติมและไม่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 0.5 และ 1.0% โดยปริมาตร (ดัดแปลงจากวิธีของ Kumar และคณะ, 2019) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันและกำจัดฟองอากาศออกโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายลงในแม่พิมพ์ (film-mold) ขนาด 15x15 เซนติเมตร นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลอกฟิล์มออกและเก็บรักษาที่ระดับความชื้นต่ำกว่า 40% เพื่อคงสภาพฟิล์ม (ดัดแปลงจากวิธีของ Zhang, Wei, and Hun, 2018)

นำฟิล์มพอลูลูแลนที่ผลิตได้มาศึกษาสมบัติต่าง ๆ เพื่อคัดเลือกฟิล์มที่เหมาะสมสำหรับการผลิตฟิล์มคอมโพสิตของพอลูลูแลนและสารสกัดจากสมุนไพรมะขาม โดยการเติมสารสกัดหยาบจากสมุนไพรมะขามที่มีความเข้มข้นในช่วงค่า MIC ขึ้นรูปฟิล์ม นำฟิล์มคอมโพสิตที่ผลิตได้ไปศึกษาสมบัติต่าง ๆ และเก็บรักษาที่ระดับความชื้นต่ำกว่า 40% เพื่อคงสภาพฟิล์ม

### 3.3.8 การศึกษาสมบัติของฟิล์ม

นำฟิล์มที่ผลิตได้มาศึกษาสมบัติความยืดหยุ่นของฟิล์มเพื่อคัดเลือกฟิล์มที่เหมาะสมสำหรับการผลิตฟิล์มคอมโพสิตของพอลูลูแลนและสารสกัดจากสมุนไพรมะขาม โดยฟิล์มที่เหมาะสมต้องสามารถลอกออกจากแม่พิมพ์ได้และเมื่อพับหรืองอแผ่นฟิล์ม ฟิล์มต้องไม่แตกหัก

### 3.3.9 การวิเคราะห์ผลในเชิงสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) การทดลองทุกครั้งจะทำซ้ำ 3 ชุด และนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี one-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics (IBM Corp., United States)

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 4.1 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

นำสาบเสือส่วนหนึ่งมาระบุชนิดพันธุ์และเก็บตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิณ สุวตะพันธุ์ H.B. No. 016529 (BCU) ดังรูปที่ 3 จากนั้นนำสมุนไพรมาล้างน้ำให้สะอาดและอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ พบว่าน้ำหนักน้ำในใบสาบเสือมีค่า  $77.71 \pm 5.77\%$  ของน้ำหนักสด ส่วนน้ำหนักน้ำในต้นตะไคร้มีค่าร้อยละ  $80.71 \pm 0.84$  ของน้ำหนักสด (ตารางภาคผนวกที่ ค1)



รูปที่ 3 ตัวอย่างสาบเสือ (*Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob.) ในพิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิณ สุวตะพันธุ์ H.B. No. 016529 (BCU)

#### 4.2 การสกัดสารจากสมุนไพร

นำใบสาบเสือน้ำหนักแห้งเริ่มต้น 10 กรัม ขนาด 60 เมช แช่ในเอทานอล 95% (โดยปริมาตร) ในอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวเท่ากับ 1:5 ในสภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปประเหยแห้งภายใต้ความดัน จะมีน้ำหนักของสารที่สกัดได้จากสาบเสือเท่ากับ  $1.63 \pm 0.04$  กรัม (ตารางภาคผนวกที่ ค2) คิดเป็นผลผลิตเท่ากับ  $16.27 \pm 0.42\%$  โดยน้ำหนัก



ส่วนสารสกัดจากตะไคร้มีน้ำหนักเท่ากับ  $1.05 \pm 0.07$  กรัม (ตารางภาคผนวกที่ ค2) คิดเป็นผลผลิตเท่ากับ  $10.47 \pm 0.65\%$  โดยน้ำหนัก โดยลักษณะของสารสกัดที่ได้คล้ายกันคือมีลักษณะหนืด แต่สีของสารสกัดที่ได้แตกต่างกันคือสารสกัดจากใบสาบเสือมีสีเขียวเข้ม ในขณะที่สารสกัดจากต้นตะไคร้มีสีเขียวอมเหลือง ดังรูปที่ 4

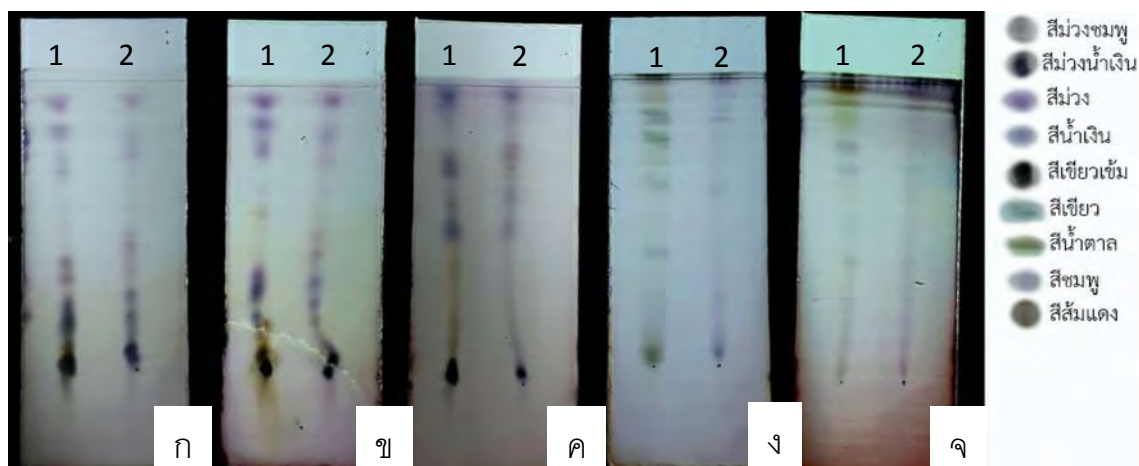


รูปที่ 4 สารสกัดหยาบจากสมุนไพร ใบสาบเสือ (ก) ต้นตะไคร้ (ข)

#### 4.3 การตรวจสอบสารที่สกัดได้จากสมุนไพร

การวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดจากใบสาบเสือ ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ต่าง ๆ และตรวจสอบด้วยสารละลาย Anisaldehyde sulphuric acid พบค่า  $R_f$  แสดงดังตารางที่ 1 โดยเมื่อใช้เอทิลอะซิเตทต่อเอทานอลต่อน้ำ (77:15:8) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่ามีจุดของสารปรากฏ 8 จุด เมื่อใช้ไดคลอโรมีเทนต่อเอทานอล (9:1) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่ามีจุดของสารปรากฏ 9 จุด เมื่อใช้เฮกเซนต่อไดเอทิลอีเทอร์ (7:3) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่ามีจุดของสารปรากฏ 10 จุด และเมื่อใช้เฮกเซนต่ออะซิโตน (9:1) และเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท (6:3) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่พบว่ามีจุดของสารปรากฏ 11 จุด ดังรูปที่ 5

การวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดจากต้นตะไคร้ พบค่า  $R_f$  แสดงดังตารางที่ 2 โดยเมื่อใช้ ไดคลอโรมีเทนต่อเอทานอล (9:1) และเอทิลอะซิเตทต่อเอทานอลต่อน้ำ (77:15:8) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่ามีจุดของสารปรากฏ 5 จุด เมื่อใช้เฮกเซนต่ออะซิโตน (9:1) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่ามีจุดของสารปรากฏ 8 จุด เมื่อใช้เฮกเซนต่อไดเอทิลอีเทอร์ (7:3) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่ามีจุดของสารปรากฏ 9 จุด และเมื่อใช้ เฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท (6:3) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่ามีจุดของสารปรากฏ 10 จุด ดังรูปที่ 5 ซึ่งจุดของสารที่ปรากฏนี้แสดงถึงองค์ประกอบของจำนวนสารที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้งสองชนิด



รูปที่ 5 แผ่น TLC ของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือ (1) และต้นตะไคร้ (2) ที่ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ต่าง ๆ ได้แก่ เฮกเซนต่ออะซิโตน (9:1) (ก) เฮกเซนต่อไดเอทิลอีเทอร์ (7:3) (ข) เฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท (6:3) (ค) ไคคลอโรมีเทนต่อเอทานอล (9:1) (ง) และเอทิลอะซิเตทต่อเอทานอลต่อน้ำ (77:15:8) (จ)

ตารางที่ 1 ค่า Retardation factor ( $R_f$ ) ของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน

องค์ประกอบ ที่	ค่า $R_f$ ของสารเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน				
	เฮกเซนต่อ อะซิโตน (9:1)	เฮกเซนต่อ ไดเอทิลอีเทอร์ (7:3)	เฮกเซนต่อ เอทิลอะซิเตท (6:3)	ไคคลอโรมีเทน ต่อเอทานอล (9:1)	เอทิลอะซิเตทต่อ เอทานอลต่อน้ำ (77:15:8)
1	เขียวเข้ม 0.04	เขียวเข้ม 0.07	เขียว 0.03	เขียว 0.04	เขียว 0.06
2	เขียว 0.09	เขียว 0.13	น้ำตาลเข้ม 0.07	เขียว 0.11	ม่วง 0.13
3	น้ำเงิน 0.17	น้ำตาล 0.20	น้ำตาล 0.16	ม่วง 0.41	ม่วง 0.29
4	ม่วง 0.22	น้ำเงิน 0.30	น้ำตาลอ่อน 0.28	เขียว 0.64	ม่วง 0.41
5	ม่วงชมพู 0.32	ม่วงชมพู 0.36	ส้มแดง 0.40	เขียว 0.73	เขียว 0.71
6	ม่วงชมพู 0.38	เขียว 0.56	น้ำเงิน 0.51	เขียว 0.80	ม่วง 0.79
7	ชมพู 0.49	น้ำตาล 0.64	ม่วง 0.60	ม่วง 0.87	เขียว 0.87
8	ม่วง 0.69	น้ำเงิน 0.80	ม่วง 0.71	น้ำตาล 0.96	น้ำตาล 1.00
9	ม่วง 0.73	น้ำเงิน 0.88	ม่วง 0.76	เขียว 1.00	-
10	ม่วง 0.82	ม่วง 0.96	ม่วง 0.93	-	-
11	ม่วง 0.92	-	น้ำเงิน 0.97	-	-

ตารางที่ 2 ค่า Retardation factor ( $R_f$ ) ของสารสกัดหยาบจากต้นตะไคร้เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน

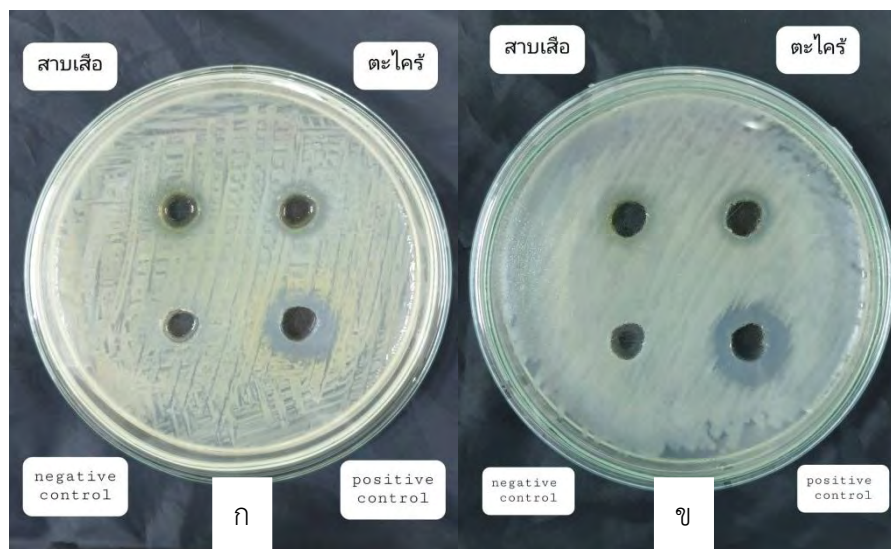
องค์ประกอบ ที่	ค่า $R_f$ ของสารเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน					
	เฮกเซนต่อ อะซีโตน (9:1)	เฮกเซนต่อ ไดเอทิลอีเทอร์ (7:3)	เฮกเซนต่อ เอทิลอะซิเตท (6:3)	ไดคลอโรมีเทน ต่อเอทานอล (9:1)	เอทิลอะซิเตทต่อ เอทานอลต่อน้ำ (77:15:8)	
1	ม่วงน้ำเงิน 0.04	ม่วง 0.07	ม่วงน้ำเงิน 0.04	ม่วง 0.04	ม่วง 0.06	
2	ม่วงน้ำเงิน 0.08	ม่วง 0.11	ม่วง 0.09	ม่วง 0.20	ชมพู 0.14	
3	ม่วง 0.18	ม่วง 0.20	ม่วง 0.22	ม่วง 0.89	ม่วง 0.20	
4	ม่วง 0.27	ม่วง 0.26	ม่วง 0.51	ชมพู 0.96	ม่วง 0.73	
5	ชมพู 0.42	ม่วง 0.32	ม่วง 0.62	ม่วง 1.00	ม่วง 1.00	
6	ชมพู 0.73	ชมพู 0.42	ม่วง 0.73	-	-	
7	ชมพู 0.82	ชมพู 0.49	น้ำตาล 0.78	-	-	
8	ชมพู 0.93	ม่วง 0.73	ม่วง 0.91	-	-	
9	-	ม่วง 0.84	ม่วง 0.97	-	-	
10	-	ม่วง 0.96	-	-	-	

#### 4.4 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Agar well diffusion

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและปรับปริมาณเซลล์เริ่มต้นโดยอาศัยกราฟมาตรฐานค่า Log ของจำนวนแบคทีเรียที่สร้างขึ้น (รูปภาคผนวกที่ ค1 และ ค2) และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 50% โดยปริมาตร DMSO เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองชนิด (รูปภาคผนวกที่ ค3) พบว่าสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือและต้นตะไคร้มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 และ *S. epidermidis* TISTR 2172 ได้ ดังรูปที่ 6

จากผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (ตารางภาคผนวกที่ ค3) พบว่าสารสกัดจากตะไคร้สามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียได้มากกว่าสารสกัดจากสาบเสือแสดงดังตารางที่ 3 โดยสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 และ *S. epidermidis*

TISTR 2172 ได้มากกว่า 1.05 และ 1.12 เท่า ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนของบริเวณยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรกับชุดการทดลองควบคุมผลบวกแสดงดังตารางที่ 4 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อที่ใกล้เคียงกัน



รูปที่ 6 บริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรต่อเชื้อทดสอบ *S. aureus* TISTR 746 (ก) และ *S. epidermidis* TISTR 2172 (ข)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรโดยวิธี Agar well diffusion

สารที่ใช้ทดสอบ	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)*	
	<i>S. aureus</i> TISTR 746	<i>S. epidermidis</i> TISTR 2172
สาบเสือ	11.78±0.30 <sup>c</sup>	11.14±0.08 <sup>c</sup>
ตะไคร้	12.52±0.08 <sup>b</sup>	12.41±0.16 <sup>b</sup>
คลอแรมฟินิคอล (ชุดควบคุมผลบวก)	15.59±0.38 <sup>a</sup>	16.80±0.22 <sup>a</sup>
50% DMSO (ชุดควบคุมผลลบ)	ND	ND

\* ผลจากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ND คือไม่สามารถตรวจพบบริเวณการยับยั้ง

ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

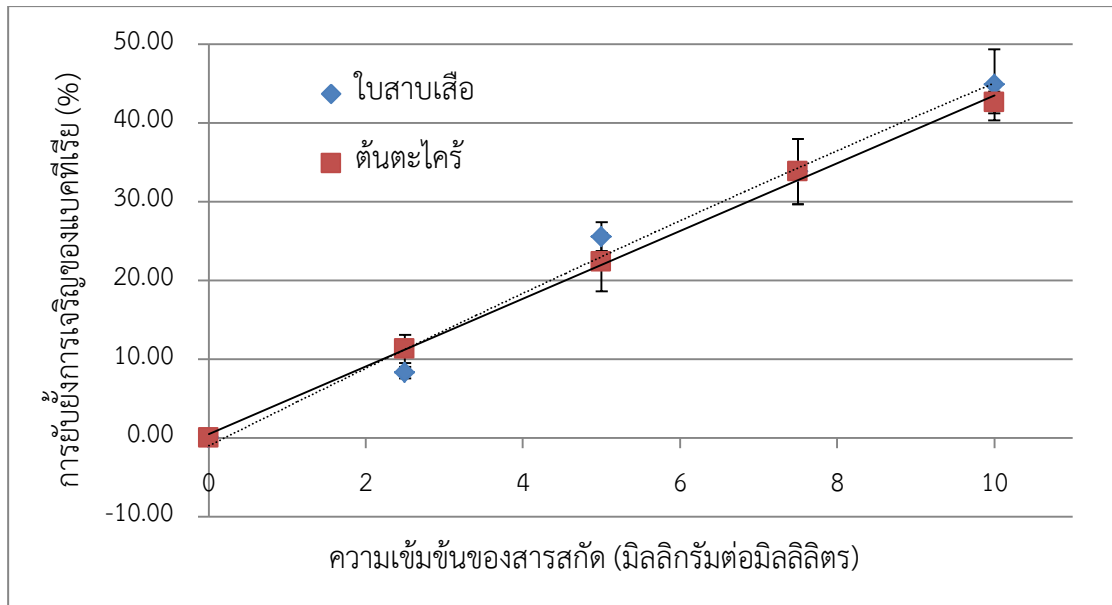
**ตารางที่ 4** อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรเทียบกับยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล

สารที่ใช้ทดสอบ	อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรเทียบกับยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล	
	<i>S. aureus</i> TISTR 746	<i>S. epidermidis</i> TISTR 2172
สบเสื่อ	0.76	0.66
ตะไคร้	0.80	0.74

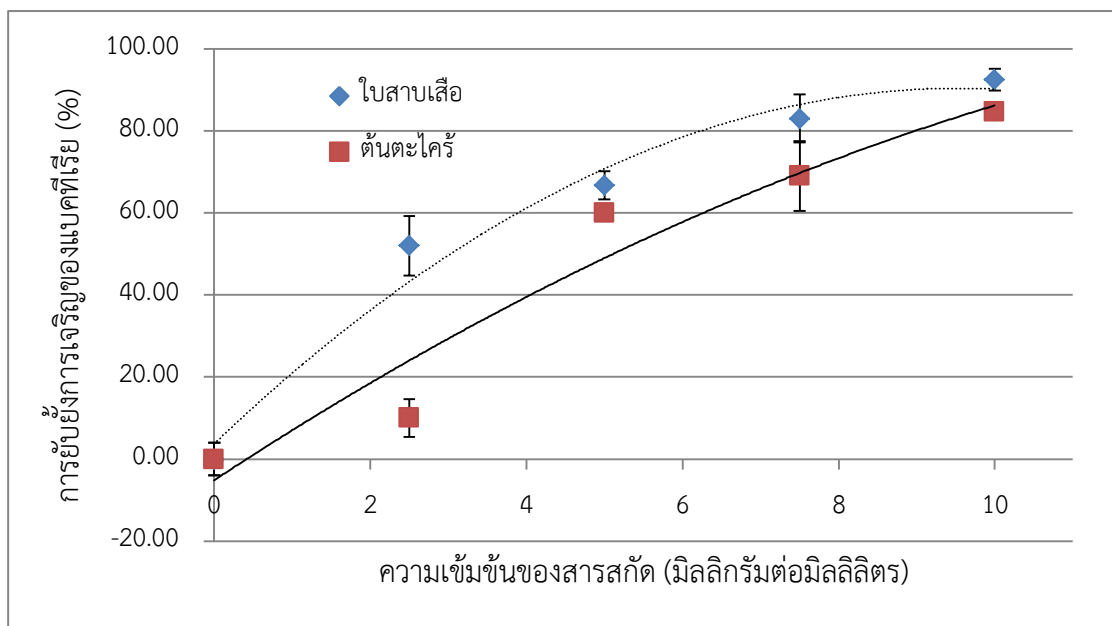
#### 4.5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 และ *S. epidermidis* TISTR 2172 เปรียบเทียบกับ 10% DMSO ซึ่งเป็นชุดการทดลองควบคุม เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองชนิด (ตารางภาคผนวกที่ ค4) โดยวิธี broth dilution พบว่าสารสกัดหยาบจากใบสบเสื่อมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 และ *S. epidermidis* TISTR 2172 เท่ากับ 2.5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดหยาบจากต้นตะไคร้มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 และ *S. epidermidis* TISTR 2172 เท่ากับ 2.5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารละลาย 10% DMSO ซึ่งเป็นชุดการทดลองควบคุม ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแสดงดังตารางที่ 5

จากผลการทดลองสามารถหาค่าความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อที่ 50% (IC<sub>50</sub>) ได้จากกราฟระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและค่าความเข้มข้นของสารสกัด พบว่าค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดจากใบสบเสื่อต่อเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 เท่ากับ 11.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดจากต้นตะไคร้เท่ากับ 11.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อแบคทีเรียเดียวกัน แสดงดังรูปที่ 7 ส่วนค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดใบสบเสื่อและต้นตะไคร้ต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. epidermidis* TISTR 2172 เท่ากับ 3.03 และ 5.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 8



รูปที่ 7 ฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดหยาดจากสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงสมการ polynomial ลำดับ 2 และค่าสหสัมพันธ์ ของการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง



รูปที่ 8 ฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของ *Staphylococcus epidermidis* ของสารสกัดหยาดจากสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงสมการ polynomial ลำดับ 2 และค่าสหสัมพันธ์ ของการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเติบโต (MIC)

สารที่ใช้ทดสอบ	(Minimum Inhibitory Concentration (MIC)) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	<i>S. aureus</i> TISTR 746	<i>S. epidermidis</i> TISTR 2172
สาบเสือ	2.5	2.5
ตะไคร้	2.5	2.5

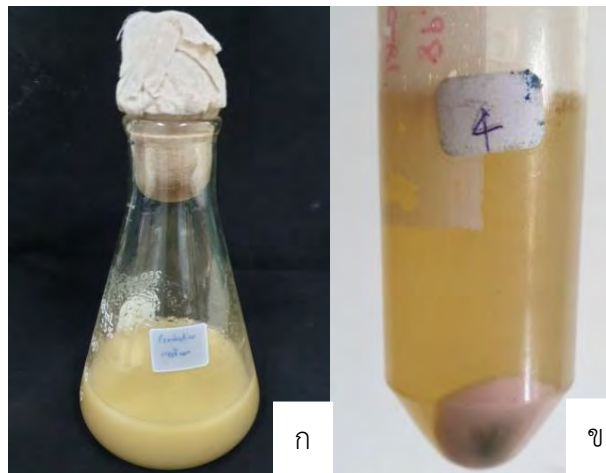
#### 4.6 การผลิตพุลลูแลน

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. pullulans* PBUAP 34 บนอาหารสูตร Yeast Malt Agar (YMA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ดังรูปที่ 9 และนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Production Medium (PM) (ภาคผนวก ก) pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ดังรูปที่ 10ก นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์และส่วนใสดังรูปที่ 10ข นำส่วนใสไปตกตะกอนพุลลูแลนด้วยเอทานอล 95% (โดยปริมาตร) ดังรูปที่ 11ก แยกตะกอนพุลลูแลนออกจากสารละลายโดยกรองด้วยกระดาษกรอง ดังรูปที่ 11ข นำพุลลูแลนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและนำมาบดให้ละเอียดดังรูปที่ 11ค พบว่าการผลิตพุลลูแลนของเชื้อ *A. pullulans* PBUAP 34 ให้น้ำหนักพุลลูแลนสูงสุด  $14.70 \pm 0.17$  กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง  $5.58 \pm 0.10$  กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.6 จากนั้นเพาะเลี้ยง *A. pullulans* PBUAP 34 ในอาหารสูตร PM และสภาวะเดิม แต่เพิ่มเติมอาหารเสริมโดยใช้น้ำมันมะกอกที่ความเข้มข้น 5% (โดยปริมาตร) พบว่าน้ำหนักพุลลูแลนสูงสุดที่เชื้อผลิตได้เท่ากับ  $19.58 \pm 0.42$  กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง  $5.95 \pm 0.45$  กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 6



รูปที่ 9 การบ่มเชื้อ *Aureobasidium pullulans* PBUAP 34 บนอาหารสูตร Yeast Malt Agar (YMA) เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน





รูปที่ 10 ลักษณะเชื้อ *Aureobasidium pullulans* PBUAP 34 ในอาหารสูตร Production Medium (PM) เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน (ก) และตะกอนเซลล์หลังจากการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที (ข)



รูปที่ 11 พูลลูแลน ตะกอนพูลลูแลนเมื่อผสม 95% เอทานอลลงในส่วนของเหลวใส (ก) การใช้กระดาษกรองแยกตะกอนพูลลูแลนด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ (ข) ผงพูลลูแลนที่ผลิตได้ (ค)



**ตารางที่ 6** ค่าเฉลี่ยน้ำหนักพุลลูแลนและน้ำหนักเซลล์ของ *Aureobasidium pullulans* PBUAP 34 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

น้ำมันมะกอกความเข้มข้น 5% (โดยปริมาตร)	ค่าเฉลี่ยพุลลูแลน* (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ยเซลล์* (กรัมต่อลิตร)
ไม่ได้เติม	14.52±0.26 <sup>b</sup>	5.77±0.22 <sup>a</sup>
เติม	19.01±0.92 <sup>a</sup>	6.24±0.51 <sup>a</sup>

\* ผลจากการทดลองจำนวน 6 ซ้ำโดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

#### 4.7 การเตรียมฟิล์มคอมโพสิตของพุลลูแลนและสารสกัดหยาบจากสมุนไพรมะขาม

เมื่อขึ้นรูปฟิล์มพุลลูแลนด้วยวิธีหล่อฟิล์ม (casting) ที่ความเข้มข้นของพุลลูแลนที่ 3 และ 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าฟิล์มสามารถลอกออกเป็นแผ่นได้ดี แต่ฟิล์มมีความเปราะค่อนข้างสูง ดังรูปที่ 12ก และ 12ค ตามลำดับ จึงเติมกลีเซอรอลซึ่งเป็นพลาสติกไซเซอร์ชนิดหนึ่งเพื่อลดความเปราะของฟิล์ม และขึ้นรูปฟิล์มพุลลูแลนที่ความเข้มข้น 3 และ 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 0.5% (โดยปริมาตร) พบว่าที่ความเข้มข้นของพุลลูแลน 3% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ฟิล์มมีลักษณะเหนียวไม่สามารถลอกออกเป็นแผ่นได้ ดังรูปที่ 12ข ที่ความเข้มข้นของพุลลูแลน 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ฟิล์มมีลักษณะเปราะ แตกหักง่าย ดังรูปที่ 12ง

จากนั้นจึงทดลองความเข้มข้นของพุลลูแลน 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพิ่มเติม เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่อยู่ระหว่าง 3 และ 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยนำมาขึ้นรูปฟิล์มพุลลูแลนร่วมกับกลีเซอรอลและทดลองหาความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมต่อการขึ้นรูปฟิล์มโดยเติมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าฟิล์มที่ผสมกับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 0 และ 0.1% (โดยปริมาตร) ฟิล์มยังมีความเปราะสูงและไม่มีความยืดหยุ่น ดังรูปที่ 12จ และ 12ฉ ตามลำดับ ขณะที่ฟิล์มที่ผสมกับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 0.5% (โดยปริมาตร) ฟิล์มมีความยืดหยุ่นดี ดังรูปที่ 12ซ ส่วนฟิล์มที่ผสมกับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 1.0% (โดยปริมาตร) ฟิล์มมีลักษณะเปราะ แตกหักง่าย ดังรูปที่ 12ช ด้วยเหตุนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของพุลลูแลน 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และความเข้มข้นของกลีเซอรอล 0.5% (โดยปริมาตร) สำหรับผลิตฟิล์มคอมโพสิตของพุลลูแลนและสารสกัดหยาบจากสมุนไพรมะขามในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 12 ลักษณะของฟิล์มพอลิเอทิลีนที่ความเข้มข้น 3 4 และ 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความเข้มข้น 3% (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ก) ความเข้มข้น 3% ผสมกับกลีเซอรอล 0.5% (โดยปริมาตร) (ข) ความเข้มข้น 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ค) ความเข้มข้น 5% ผสมกับกลีเซอรอล 0.5% (โดยปริมาตร) (ง) ความเข้มข้น 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) (จ) ความเข้มข้น 4% ผสมกับกลีเซอรอล 0.1% (โดยปริมาตร) (ฉ) ความเข้มข้น 4% ผสมกับกลีเซอรอล 0.5% (โดยปริมาตร) (ช) ความเข้มข้น 4% ผสมกับกลีเซอรอล 1.0% (โดยปริมาตร) (ซ)

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการศึกษา

#### 5.1 การสกัดสารจากสมุนไพร

จากผลการสกัดสารจากใบสาบเสือพบว่ามีปริมาณสารสกัดคิดเป็นผลผลิตเท่ากับ  $16.27 \pm 0.42\%$  ซึ่งมีค่าผลผลิตสูงกว่าการศึกษาของ Hanphakphoom และคณะ (2016) ที่ได้ผลผลิต  $8.42 \pm 0.115\%$  ซึ่งสกัดสารโดยใช้อัตราส่วนสมุนไพร 1 ส่วนต่อสารสกัด 10 ส่วน (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีค่าผลผลิตสูงกว่าการศึกษาของชาลิสา ชาญเขตรธรรม และอานุกาพ สกัจจวา (2557) ที่ได้ผลผลิต  $2.19\%$  ซึ่งสกัดสารโดยใช้อัตราส่วนสมุนไพร 1 ส่วนต่อสารสกัด 3 ส่วน (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 5 วัน ภายใต้วิธีการสกัดเดียวกัน แต่ผลการสกัดในการศึกษานี้มีค่าผลผลิตต่ำกว่าการศึกษาของ Kumsean (2005) ที่สกัดสาบเสือด้วยวิธีชอกซ์เลตเอกแทรกซ์อัตราส่วนสมุนไพร 1 ส่วนต่อสารสกัด 10 ส่วน (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ได้ผลผลิต  $38.36\%$

ส่วนสารสกัดจากต้นตะไคร้มีปริมาณสารสกัดคิดเป็นผลผลิตเท่ากับ  $10.47 \pm 0.65\%$  ซึ่งมีค่าผลผลิตสูงกว่าการศึกษาของ จิราภรณ์ บุราคร และคณะ (2554) ที่ได้ผลผลิต  $5.38\%$  โดยการสกัดใช้อัตราส่วนสมุนไพร 1 ส่วนต่อสารสกัด 4 ส่วน (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง และมีค่าผลผลิตสูงกว่าการศึกษาของ Hasim (2015) ที่ได้ผลผลิต  $6.66\%$  โดยเก็บตะไคร้อายุ 6 เดือนมาจากพื้นที่ในจังหวัดชวาตะวันตก ประเทศอินโดนีเซียและการสกัดใช้อัตราส่วนสมุนไพร 1 ส่วนต่อสารสกัด 5 ส่วน (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง แต่ใช้เอทานอล  $96\%$  (โดยปริมาตร)

จากที่กล่าวไปข้างต้นสังเกตได้ว่าแม้เป็นพืชชนิดเดียวกันแต่ผลผลิตที่ได้มีปริมาณที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ผลผลิตการสกัดสารจากพืชนั้นเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัยได้แก่ อัตราส่วนที่ใช้ระหว่างสมุนไพร กับตัวทำละลาย เวลาที่ใช้ในการสกัด (Hanphakphoom et al., 2016) สถานที่ปลูกพืช อายุของตัวอย่างพืช (จันทร์เพ็ญ โคตรภูธร, 2559) และวิธีที่ใช้ในการสกัด (Azwanida, 2015) เป็นต้น

#### 5.2 การตรวจสอบสารที่สกัดได้จากสมุนไพร

การวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดจากใบสาบเสือด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางโดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ต่าง ๆ และตรวจสอบด้วยสารละลาย Anisaldehyde sulphuric acid จากการศึกษาของ Jamuna และ Paulsamy (2016) เมื่อตรวจสอบสารด้วย Anisaldehyde sulphuric acid โดยนำแผ่น TLC ไปให้ความร้อนและสังเกตสีภายใต้แสงธรรมชาติ หากพบสาร

ในกลุ่มซาโปนินจะสังเกตเห็นจุดสีน้ำเงิน สีเหลือง สีเขียว หรือสีม่วง หากพบสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ จะสังเกตเห็นจุดสีน้ำเงินหรือสีม่วงน้ำเงิน และหากพบสารกลุ่มไกลโคไซด์จะสังเกตเห็นจุดสีม่วงชมพู และจากการศึกษาของ Farnidah (2009) หากพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จะสังเกตเห็นจุดสีแดงหรือสีต่าง ๆ จากผลการทดลองพบจุดสีน้ำเงิน สีเขียว สีส้มแดง สีน้ำตาล สีม่วงและสีม่วงชมพู แสดงว่า สารสกัดจากใบสาบเสือมีสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ และน้ำมันหอมระเหยเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Vijayaraghavan และคณะ (2018) ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอล พบสารกลุ่มแทนนิน ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน เทอร์พีนอยด์ ไกลโคไซด์ และน้ำมันหอมระเหย เป็นต้น ทั้งนี้จากการศึกษาของ Anyasor และคณะ (2011) พบว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในใบสาบเสือมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียโดยจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียส่งผลให้กระบวนการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียถูกยับยั้ง

ส่วนการวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดจากต้นตะไคร้ สังเกตเห็นจุดสีน้ำตาล สีม่วงและสีม่วงน้ำเงิน แสดงว่าสารสกัดจากต้นตะไคร้มีสารกลุ่มซาโปนิน เทอร์พีนอยด์และน้ำมันหอมระเหยเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nimrat Soodsawaweang และ Vuthiphandchai (2019) ที่ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดจากต้นตะไคร้ที่สกัดด้วยเอทานอล พบน้ำมันหอมระเหย สารกลุ่มซาโปนิน เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิก เป็นต้น

### 5.3 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Agar well diffusion

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือและต้นตะไคร้มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 และ *S. epidermidis* TISTR 2172 ได้ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ จิราภรณ์ บุราคร และคณะ (2554) ซึ่งศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากต้นตะไคร้ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538 และ *S. epidermidis* ATCC 12228 ได้ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Hrindhya และ Kulandhaivel (2017) ที่ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* MTCC 3068 ได้ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 13 มิลลิเมตร และสอดคล้องกับการศึกษา ซาลิสซา ชาญเขตรธรรม และอานุภาพ สกัจจวา (2557) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือด้วย

วิธี Disc diffusion พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923

#### 5.4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการของเชื้อ

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 และ *S. epidermidis* TISTR 2172 โดยวิธี broth dilution พบว่าสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 เท่ากับ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* TISTR 2172 คือ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบจากต้นตะไคร้มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 เท่ากับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* TISTR 2172 คือ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองนี้แสดงว่าสารสกัดจากใบสาบเสือและต้นตะไคร้มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 และ *S. epidermidis* TISTR 2172 เท่ากัน

จากการคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อที่ 50% ( $IC_{50}$ ) จากกราฟระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และค่าความเข้มข้นของสารสกัด พบว่าค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดจากใบสาบเสือต่อเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 เท่ากับ 11.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดจากต้นตะไคร้ซึ่งมีค่า 11.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกัน แสดงว่าสารสกัดจากใบสาบเสือมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 ได้ดีกว่าสารสกัดจากต้นตะไคร้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Chomnawang และคณะ (2009) ซึ่งพบว่าสารสกัดจากใบสาบเสือมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีกว่าสารสกัดจากต้นตะไคร้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อเท่ากับ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดจากต้นตะไคร้มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อเท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ขณะที่ค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดจากใบสาบเสือต่อเชื้อ *S. epidermidis* TISTR 2172 เท่ากับ 3.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดจากต้นตะไคร้ซึ่งมีค่า 5.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกัน แสดงว่าสารสกัดจากใบสาบเสือมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* TISTR 2172 ได้ดีกว่าสารสกัดจากต้นตะไคร้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Chomnawang และคณะ (2005) ซึ่งพบว่าสารสกัดจากใบสาบเสือมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* ATCC 14990 ได้ดีกว่าสารสกัดจากต้นตะไคร้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อเท่ากับ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดจากต้นตะไคร้มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อเท่ากับ มากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากที่กล่าวไปข้างต้นสังเกตได้ว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่น พบว่ามีค่าที่แตกต่างกัน สาเหตุอาจเกิดจากสารสกัดจากพืชที่ได้ใช้วิธีการสกัดที่แตกต่างกัน การเปลี่ยนอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในขั้นตอนการสกัดสารก่อนนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ อาจทำให้คอนฟอร์เมชันของโมเลกุลเปลี่ยนไปหรือทำให้โมเลกุลโปรตีนของพืชเสียสภาพไปทำให้สูญเสียการทำงานของสารไปด้วย จากการศึกษาของ Irobi (1997) เมื่อนำสารสกัดจากใบสาบเสือมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 40 ถึง 120 องศาเซลเซียส และนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเติบโตของเชื้อ พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อของสารสกัดมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น เนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้อุณหภูมิในขั้นตอนระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน 70 องศาเซลเซียส จึงอาจทำให้ฤทธิ์การยับยั้งการเติบโตของเชื้อของสารสกัดลดลง ด้วยเหตุผลดังกล่าว

### 5.5 การผลิตพุลูลแลน

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. pullulans* PBUAP 34 ในอาหารสูตร PM (ภาคผนวก ก) pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน พบว่า *A. pullulans* PBUAP 34 สามารถผลิตพุลูลแลนได้  $14.52 \pm 0.26$  กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง  $5.77 \pm 0.22$  กรัมต่อลิตร เมื่อเติมอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอกที่ความเข้มข้น 5% (โดยปริมาตร) พบว่า *A. pullulans* PBUAP 34 สามารถผลิตพุลูลแลนเพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น  $19.01 \pm 0.92$  กรัมต่อลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณพุลูลแลนของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่ไม่เติมน้ำมันมะกอก สอดคล้องกับการศึกษาของ ปริศนา มังสา (2554) ศึกษาาระดับความเข้มข้นของอาหารเสริมชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตพุลูลแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์เซตร้อน พบว่าการเติมน้ำมันมะกอกที่ความเข้มข้น 5% (โดยปริมาตร) ช่วยให้ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 สามารถผลิตพุลูลแลนเพิ่มขึ้นจาก  $35.78 \pm 0.12$  กรัมต่อลิตร เป็น  $42.08 \pm 0.19$  กรัมต่อลิตร

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำมันมะกอกกับน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมน้ำมันมะกอก พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ ปริศนา มังสา (2554) พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 เพิ่มขึ้นจาก  $4.32 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร เป็น  $8.40 \pm 0.12$  กรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำมันมะกอกเกิดความคลาดเคลื่อนเนื่องจากการแยกน้ำมันมะกอกออกไม่หมด สังเกตได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำมันมะกอกมีค่าสูงกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมน้ำมันมะกอก

จากการศึกษาของ Xiang และคณะ (2017) พบว่า น้ำมันมะกอกประกอบด้วย กรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายชนิด เช่น กรดปาล์มิติก กรดปาล์มิโตเลอิก กรดโอเลอิก กรดสเตียริก กรดลิโนเลอิกและกรดลิโนเลนิก เป็นต้น มีสารไฟโตสเตอรอลที่สำคัญคือ สติกมาสเตอร์ (Stigmasterol) และเบต้า-ซิโตสเตอรอล ( $\beta$ -Sitosterol) มีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น อัลฟา-โทโคเฟอรอล อยู่ในรูปของวิตามินอี รวมทั้งมีสารฟีนอล เช่นกรดคาเฟอิก (cafferic acid) กรดพิกูมาริก (*p*-coumaric acid) กรดเฟรุสิก (ferulic acid) เป็นต้น และการศึกษาของ Lazaridou และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตพุลลูแลนของเชื้อ *A. pullulans* โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และเพิ่มแหล่งคาร์บอนที่สองโดยการเติมน้ำมันถั่วเหลืองหรือน้ำมันมะกอก พบว่าปริมาณพุลลูแลนที่เชื้อผลิตได้เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้การศึกษาของ Zhang และคณะ (2016) ศึกษาผลกระทบของการเติมวิตามินอีในกระบวนการหมักของยีสต์พบว่า วิตามินอีมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) และความสมบูรณ์ของโครงสร้างและหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เชื้อรามีอัตราการอยู่รอดที่เพิ่มขึ้น

จากที่กล่าวไปข้างต้นสังเกตได้ว่าเนื่องจากน้ำมันมะกอกมีสารอินทรีย์หลายชนิดที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ประโยชน์และส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ทั้งกรดไขมันต่าง ๆ ที่เชื้อสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่สองได้และมีวิตามินอีที่ช่วยให้เชื้อรามีอัตราการอยู่รอดที่เพิ่มขึ้นด้วยเหตุนี้จึงทำให้น้ำหนักพุลลูแลนและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำมันมะกอกมีค่าสูงกว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมน้ำมันมะกอก

## 5.6 การเตรียมฟิล์มคอมโพสิตของพุลลูแลนและสารสกัดหยาบจากสมุนไพรว

เมื่อขึ้นรูปฟิล์มพุลลูแลนร่วมกับกลีเซอรอลด้วยวิธีหล่อฟิล์มที่ความเข้มข้นของพุลลูแลนที่ 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผสมกับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 และ 1.0% (โดยปริมาตร) พบว่าฟิล์มที่ผสมกับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 0 ถึง 0.5% ฟิล์มมีความเปราะลดลงและมีความยืดหยุ่นมากขึ้น แต่ฟิล์มที่ผสมกับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 1.0% (โดยปริมาตร) ฟิล์มมีลักษณะเปราะ แตกหักง่าย จากผลการทดลองสังเกตได้ว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลมีผลต่อสมบัติในด้านโครงสร้างความแข็งแรงและความยืดหยุ่นของฟิล์ม สอดคล้องกับการศึกษาของ Karki และคณะ (2016) เนื่องจากกลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซอร์ชนิดหนึ่ง โดยพลาสติกไซเซอร์มีสมบัติที่ช่วยลดความเปราะของฟิล์มและทำให้ความแข็งแรงของโครงสร้างโพลิเมอร์อ่อนตัวลงโดยลดแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล อย่างไรก็ตามหากใช้พลาสติกไซเซอร์ปริมาณมากไปจะไปลดแรงยึดเกาะของฟิล์มได้ด้วยเหตุนี้จึงทำให้โครงสร้างของฟิล์มที่ผสมกับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 1.0% (โดยปริมาตร) อ่อนตัวลงมาก จนแตกหักง่าย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kumar และคณะ (2019)

พบว่าหลังจากขึ้นรูปฟิล์มพอลิแลนที่ความเข้มข้น 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นของ 1.0% (โดยปริมาตร) การลอกฟิล์มออกทำได้ยากมาก เนื่องจากแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของโพลิเมอร์ลดลง

นอกจากนี้เมื่อขึ้นรูปฟิล์มพอลิแลนร่วมกับกลีเซอรอลโดยเพิ่มความเข้มข้นของพอลิแลนจาก 3 ถึง 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในขณะที่ใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 0.5% (โดยปริมาตร) พบว่าฟิล์มที่ความเข้มข้นของพอลิแลน 3% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ฟิล์มมีลักษณะเหนียวไม่สามารถลอกออกเป็นแผ่นได้ ฟิล์มที่ความเข้มข้นของพอลิแลน 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ฟิล์มมีความยืดหยุ่นมากขึ้น ในขณะที่ฟิล์มที่ความเข้มข้นของพอลิแลน 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ฟิล์มมีลักษณะเปราะแตกหักง่าย จะสังเกตได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของพอลิแลนเพิ่มขึ้น ความยืดหยุ่นของฟิล์มมีแนวโน้มที่ลดลง จากฟิล์มที่มีลักษณะเหนียวไม่สามารถลอกเป็นแผ่นได้เป็นฟิล์มที่มีความยืดหยุ่นดี และสุดท้ายฟิล์มมีลักษณะเปราะ แตกหักง่าย สอดคล้องกับการศึกษาของ Wang และคณะ (2018) เมื่อความเข้มข้นของพอลิแลนเพิ่มขึ้นในช่วง 0 ถึง 2.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความยืดหยุ่นของฟิล์มมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นของพอลิแลนเพิ่มขึ้นในช่วง 2.5 ถึง 7.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความยืดหยุ่นของฟิล์มมีแนวโน้มลดลง



## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 746 และ *S. epidermidis* TISTR 2172 ของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือและต้นตะไคร้ พบว่า สารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อทดสอบ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ (MIC) พบว่าสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดมีค่า MIC ต่อเชื้อทดสอบเท่ากับ 2.5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากผลการทดลองสามารถหาค่าความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อที่ 50% ( $IC_{50}$ ) ได้จากกราฟระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและค่าความเข้มข้นของสารสกัด พบว่าสารสกัดจากใบสาบเสือมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดจากต้นตะไคร้ โดยมีค่า  $IC_{50}$  ต่อ *S. aureus* TISTR 746 ที่ความเข้มข้น 11.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและมีค่า  $IC_{50}$  ต่อ *S. epidermidis* TISTR 2172 ที่ความเข้มข้น 3.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดจากต้นตะไคร้มีค่า  $IC_{50}$  ต่อ *S. aureus* TISTR 746 ที่ความเข้มข้น 11.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและมีค่า  $IC_{50}$  ต่อ *S. epidermidis* TISTR 2172 ที่ความเข้มข้น 5.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดจากสมุนไพร 2 ชนิดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง และตรวจสอบด้วยสารละลาย Anisaldehyde sulphuric acid พบว่าสารสกัดจากใบสาบเสือมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน เทอร์พีนอยด์และไกลโคไซด์เป็นองค์ประกอบ ในขณะที่สารสกัดจากต้นตะไคร้มีสารกลุ่มซาโปนินและเทอร์พีนอยด์เป็นองค์ประกอบ เมื่อศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มพอลูลูแลน พบว่าพอลูลูแลนที่ความเข้มข้น 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 0.5% (โดยปริมาตร) จะได้ฟิล์มที่เหมาะสมสำหรับนำไปผลิตฟิล์มคอมโพสิตของพอลูลูแลนและสารสกัดหยาบจากสมุนไพรในขั้นตอนต่อไป

### ข้อเสนอแนะ

สำหรับแนวทางในการนำฟิล์มคอมโพสิตของพอลูลูแลนและสารสกัดจากสมุนไพรไปใช้ในอนาคต ควรศึกษาสมบัติเชิงกลเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์รักษาสิวหรือผลิตภัณฑ์รักษาโรคผิวหนังที่มีอยู่ในตลาด และควรคำนวณปริมาณสมุนไพรและขนาดของแผ่นฟิล์มให้เหมาะสมกับการบริโภคต่อครั้งด้วย

## เอกสารอ้างอิง

- จันทร์เพ็ญ โคตรภูธร. 2559. การสกัดสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านเชื้อแบคทีเรียของ สารสกัดหยาดจากเพกา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- จารวี สุขประเสริฐ และสุบงกช ทรัพย์แดง. 2555. การศึกษาผลของตัวทำละลายในการสกัดสมุนไพร ที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย. วารสารผลงานวิชาการกรมวิทยาศาสตร์บริการ 1(1): 99-109.
- จิราภรณ์ บุราคร, จารวี สุขประเสริฐ และธีรดา สุขธรรม. 2554. ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของ สารสกัดสมุนไพรพื้นบ้าน. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ 187: 37-43.
- ชาลิสสา ชาญเขตรธรรม และอานุกาภ สกัจจวา. 2557. ฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ของ สารสกัดจากพืชท้องถิ่น. โครงการวิทยาศาสตร์ปริญญาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา.
- ฐิติมา ศรีสุวรรณ, ชัชววรรณ ธีระวุฒิ, ฉัตรชัย วัฒนาภิรมย์สกุล และชมจรีย์ อำนวยกิจ. 2550. แผ่นฟิล์มต้านเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดเปลือกมังคุด มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. โครงการวิทยาศาสตร์ปริญญาบัณฑิต, ภาควิชาเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ธิดา ไชยวงศ์ศรี. 2555. ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพร ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ. วารสารนเรศวรพะเยา 5: 333-342.
- ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญจนบุตร และสาธิต พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ. ใน รายงานการประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ครั้งที่ 9, หน้า 91-101. 11-12 มิถุนายน 2551 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น.
- ปริศนา มังสา. 2554. ผลของภาวะการผลิตที่มีต่อหน้าหนักโมเลกุลของพุลูลานที่ผลิตได้จาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วัชรินทร์ รังสีภานุรัตน์, พัชรี กัมมารเจษฎากุล และอิสยา จันทร์วิทยานุชิต. 2559. ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิดต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ 38: 35-48.

- สีหนาท ประสงค์สุข. 2552. การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพพูลูลูแลนและการประยุกต์ใช้. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น 37(3): 268-274.
- สุกัญญา จันทน์ ภัสสร ยืนตระกูล และชวณพิศ จิระพงษ์. 2559. การยับยั้งเชื้อ *Streptococcus pyogenes* โดยใช้แผ่นฟิล์มบริโคมผสมสารสกัดมะรุม. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ 2: 20-27.
- เสาวลักษณ์ พลอยงาม. 2552. การตรวจหาสารต้านเชื้อราจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Atlas, R.M. 1993. Handbook of microbiological media. London, England: CRC Press Inc.
- Anyasor, G.N., Aina, D.A., Olushola, M., and Aniyikaye, A.F. 2011. Phytochemical constituent, proximate analysis, antioxidant, antibacterial and wound healing properties of leaf extracts of *Chromolaena odorata*. Annals of Biological Research 2: 441-451.
- Azwanida, N.N. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. Medicinal and Aromatic Plants 4(3): 196.
- Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibensouda, S.K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis 6: 71-79.
- Brull, S., and Coote, P. 1999. Preservative agents in foods mode of action and microbial resistance mechanisms. International Journal of Food Microbiology 50: 1-17.
- Chakraborty, A.K., Rambhade, S., and Patil U.K. 2011. *Chromolaena odorata* (L.): An overview. Journal of Pharmacy Research 4(3): 573-576.
- Chessa, D., Ganau, G., and Mazzarello, V. 2015. An overview of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* with a focus on developing countries. The Journal of Infection in Developing Countries 9(6): 547-550.
- Chomnawang, M.J., Surassmo, S., Nukoolkarn, V.S., and Gritsanapan, W. 2005. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. Journal of Ethnopharmacology 101(1-3): 330-333.

- Chomnawang, M.J., Surassmo, S., Wongsariya, K., and Bunyapraphatsara, N. 2009. Antibacterial activity of Thai medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Fitoterapia 80: 102–104.
- Drosou, C., Krokida, M., and Biliaderis, C.G. 2017. Composite pullulan-whey protein nanofibers made by electrospinning: Impact of process parameters on fiber morphology and physical properties. Food Hydrocolloids 77: 726–735.
- Ekpenyong, C.E., Akpan, E., and Nyoh, A. 2015. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. Chinese Journal of Natural Medicines 13(5): 321–337.
- Farnidah, H.J.J. 2009. Biological activities and chemical constituents of *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson. Master's Thesis, Faculty of Science, University of Malaya Kuala Lumpur.
- Gniewosz, M., and Synowiec, A. 2011. Antibacterial activity of pullulan films containing thymol. Flavour and Fragrance Journal 26(6): 389-395.
- Gniewosz, M., Krasniewska, K., Woreta, M., and Kosakowska, O. 2013. Antimicrobial activity of a pullulan-caraway essential oil coating on reduction of food microorganisms and quality in fresh baby carrot. Journal of Food Science 78(8): 1242-1248.
- Gniewosz, M., Synowiec, A., Krasniewska, K., Przybyl, J., Baczek, K., and Weglarz, Z. 2014. The antimicrobial activity of pullulan film incorporated with meadowsweet flower extracts (*Filipendulae ulmariae* flos) on postharvest quality of apples. Food Control 37: 351-361.
- Gor, V., et al. 2019. Finding of Agr phase variants in *Staphylococcus aureus*. mBio 10(4): 1-13.
- Gupta, K.M., Rithu, B.S., Shruthi, A., Lokur, A.V., and Raksha, M. 2019. Phytochemical screening and qualitative analysis of *Cymbopogon citratus*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 8(4): 3338-3343.

- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., and Bourke, P. 2008. The anti-microbial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. International Journal of Food Microbiology 124: 91-97.
- Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G., and Rakesh, D.D. 2008. Extraction technologies for medicinal and aromatic plant. Trieste, Italy: International Centre for Science and High Technology.
- Hanphakphoom, S., Thophon, S., Waranusantigul, P., Kangwanrangsan, N., and Krajangsang, S. 2016. Antimicrobial activity of *Chromolaena odorata* extracts against bacterial human skin infections. Modern Applied Science 10(2): 159-171.
- Hasim, Falah, S., Ayunda, R.D., and Faridah, D.N. 2015. Potential of lemongrass leaves extract (*Cymbopogon citratus*) as prevention for oil oxidation. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 7(10): 55-60.
- Hrindhya, K.V., and Kulandhaivel, M. 2017. Antimicrobial activity of *Chromolaena odorata* against selected pyogenic pathogens. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 9(7): 1001-1007.
- Irobi, O.N. 1997. Antibiotic properties of ethanol extract of *Chromolaena odorata* (Asteraceae). International Journal of Pharmacognosy 35(2): 111-115.
- Jamuna, S., and Paulsamy, S. 2016. HPTLC fingerprints of various secondary metabolites in the traditional medicinal herb *Hypochaeris radicata* L. Journal of Botany 1:1-11.
- Kanase, V., and Shaikh, S. 2018. A Pharmacognostic and pharmacological review on *Chromoleana odorata* (Siam weed). Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 11(10): 34-38.
- Karki, S., Kim, H., Na, S.J., Shin, D., Jo, K., and Lee, J. 2016. Thin films as an emerging platform for drug delivery. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences 11(5): 559-574.
- Koyama, H., Bunwong, S., Pornponggrueng, P., and Hind, N. 2016. Compositae (Asteraceae). In T. Santisuk and H. Balslev (eds.), Flora of Thailand. pp. 143-240. Bangkok: Prachachon Co., Ltd.

- Kumar, N., Neeraj, Ojha, A., and Singh, R. 2019. Preparation and characterization of chitosan - pullulan blended edible films enrich with pomegranate peel extract. Reactive and Functional Polymers 144: 104350.
- Kumsean, A. 2005. The effects of three medicinal plant extracts in Asteraceae family on *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* causing bacterial pustule of soybean. Master's Thesis, Department of Environmental Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology.
- Lazaridou, A., Biliaderis, C.G., Roukas, T., and Izydirczyk, M. 2001. Production and characterization of pullulan from beet molasses using a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* in batch culture. Applied Biochemistry and Biotechnology 97: 1–22.
- Lertsatitthanakorn, P., Taweechaisupapong, S., Aromdee, C., and Khunkitti, W. 2006. In vitro bioactivities of essential oils used for acne control. The International Journal of Aromatherapy 16: 43–49.
- Machraoui, M., Kthiri, Z., Jabeur, M.B., and Hamada, W. 2018. Ethnobotanical and phytopharmacological notes on *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology 55 (5): 3642-3652.
- Mbajiuka, C.S., Obeagu, E.I., Chude, C.N., and Ibezio, O.E. 2014. Antimicrobial effects of *Chromolaena odorata* on some human pathogens. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 3(3): 1006-1012.
- Mosquera, T.T., Noriega R.P., Cornejo, J.C., and Pardo, M.L. 2016. Biological activity of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf and its potential cosmetic activities. International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients 3: 1-7.
- Namvar, A.E., et al. 2014. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: A systematic review. GMS Hygiene and Infection Control 9(3): 1-10.
- Nimrat, S., Soodsaweang, P., and Vuthiphandchai, V. 2019. Chemical composition and antibacterial activity of ethanol extract of lemon grass (*Cymbopogon citratus*) on pathogenic bacteria: a review. Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University 20(3): 20-28.

- Noskin, G.A., et al. 2005. The burden of *Staphylococcus aureus* infections on hospitals in the United States. Archives of Internal Medicine 165: 1756-1761.
- Odutayo, F., Ezeamagu, C., Kabiawu, T., Aina, D., and Agyei, G.M. 2017. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Chromolaena odorata* leaf extract against selected microorganisms. Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences 13(4): 1-9.
- Oladeji, O.S., Adelowo, F.E., Ayodele, D.T., and Odelade, K.A. 2019. Phytochemistry and pharmacological activities of *Cymbopogon citratus*: A review. Scientific African 6: 1-11.
- Oyen, L.P.A. and Xuan, D.N. 1999. Plant resources of South-East Asia no 19 essential-oil plants. Leiden, Netherlands: Backhuys Publishers.
- Prasongsuk, S., et al. 2007. Pullulan production by tropical isolates of *Aureobasidium Pullulans*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 34: 55–61.
- Pereira, R.P., et al. 2009. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. Neurochemical Research 34: 973-983.
- Stefano, F., Uysal, U.I., Laura, I., Maria, F.A.J., and Cozzolino, C.A. 2014. An edible film of sodium alginate/pullulan incorporated with capsaicin. Journal of Applied Polymer Science 131(13): 40539.
- Vijayaraghavan, K., Rajkumar, J., and Seyed, M.A. 2018. Phytochemical screening, free radical scavenging and antimicrobial potential of *Chromolaena odorata* leaf extracts against pathogenic bacterium in wound infections– a multispectrum perspective. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 15: 103–11.
- Wang, J., Sang, L., Sun, S., Chen, Y., Chen, .D, and Xie, X. 2019. Characterisation of *Staphylococcus aureus* isolated from rabbits in Fujian, China. Epidemiology and Infection 147: 1–5.
- Wang, B., Yang, C., Wang, J., Xia, S., and Wu, Y. 2018. Effects of combined pullulan polysaccharide, glycerol, and trehalose on the mechanical properties and the solubility of casted gelatin-soluble edible membranes. Journal of Food Processing and preservation 1: 1-9.

- Weaver, A.J.Jr., et al. 2014. Antibacterial activity of THAM trisphenylguanide against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE 9: 1-9.
- Xiang, C., Xu, Z., Liu, J., Li, T., Yang, Z., and Ding, C. 2017. Quality, composition, and antioxidant activity of virgin olive oil from introduced varieties at Liangshan. LWT - Food Science and Technology 78: 226-234.
- Yuen, S. 1974. Pullulan and its applications. Process Biochemistry 9: 7-22.
- Zahara, M. 2019. Description of *Chromolaena odorata* L. R.M King and H. Robinson as medicinal plant: a review. IOP conference series: Materials Science and Engineering. In Caroline Andrew (ed.), 1st South Aceh International Conference on Engineering and Technology, 1-6. Bristol, England: IOP Publishing.
- Zhang, S., Qin, X., Lu, H., Wan, M., and Zhu, Y. 2016. The influence of vitamin E supplementation on yeast fermentation. The Institute of Brewing & Distilling 122: 289-292.
- Zhang, S., Wei, F., and Han, X. 2018. An edible film of sodium alginate/pullulan incorporated with capsaicin. New Journal of Chemistry 42: 17756-17761.



ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

## 1. Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นวุ้นด้วยน้ำกลั่น เติมวุ้น และนำไปอุ่นให้ร้อนจนวุ้นละลายหมด ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 2. Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 3. Yeast Malt Agar (YMA)

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นวุ้นด้วยน้ำกลั่น เติมวุ้น และนำไปอุ่นให้ร้อนจนวุ้นละลายหมด ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 4. Yeast Malt Broth (YMB) (Atlas, 1993)

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	20	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 5. Production Medium (PM) (Prasongsuk et al., 2007)

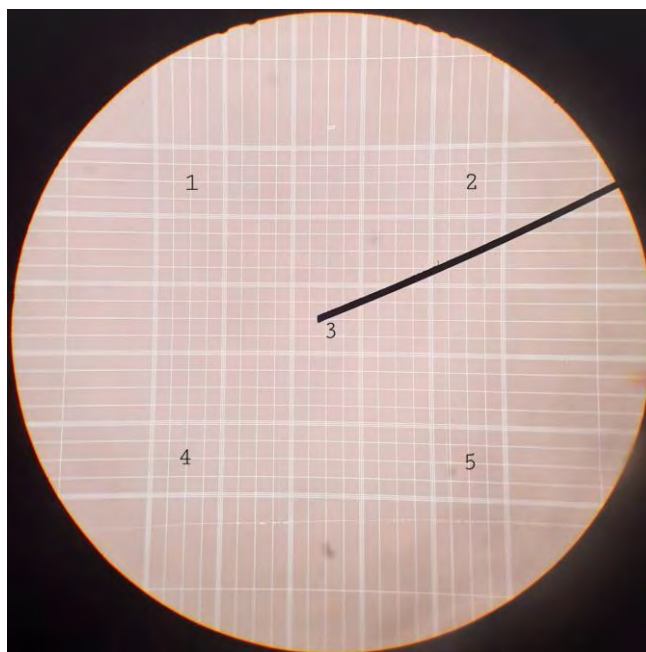
Glucose	50	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.6	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	5	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	กรัม
NaCl	1	กรัม
Yeast extract	0.4	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ใส่ไขมันมะกอก 5 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 6.5 ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข

### การนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Direct microscopic count โดยใช้ Haemocytometer

Haemocytometer เป็นอุปกรณ์ที่ถูกพัฒนามาเพื่อใช้นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือด แต่สามารถนำมาประยุกต์ใช้นับเซลล์จุลินทรีย์ได้ โดยมีลักษณะเป็นแผ่นเพลทแก้วหนาที่มีตารางหรือกริดสำหรับแบ่งพื้นที่ในการนับเซลล์ เมื่อปิดด้วยแผ่นปิด (cover slip) แล้ว จะมีช่องว่างระหว่างแผ่นเพลทกับ cover slip สำหรับบรรจุสารตัวอย่างที่ต้องการนับจำนวน ตารางจะแบ่งพื้นที่เป็นช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสจำนวน 25 ช่องขนาดใหญ่ ช่องละ  $0.2 \times 0.2$  ตารางมิลลิเมตร ภายในแต่ละช่องแบ่งออกเป็น 16 ช่องขนาดเล็ก แต่ละช่องมีขนาด  $0.05 \times 0.05$  ตารางมิลลิเมตร ส่วนความลึกของแผ่นเพลทมีขนาด 0.1 มิลลิเมตร ดังนั้นตารางจะมีปริมาตรเท่ากับ 1 มิลลิเมตร  $\times$  1 มิลลิเมตร  $\times$  0.1 มิลลิเมตร เท่ากับ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามรูปที่ ข1



รูปที่ ข1 Haemocytometer เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

#### วิธีการคำนวณ

ปริมาตรใน 25 ช่องขนาดใหญ่ (400 ช่องขนาดเล็ก) = 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร  
 นับช่องขนาดใหญ่เพียง 5 ช่อง ได้แก่ช่องบนซ้าย-ขวา ล่างซ้าย-ขวา และตรงกลาง  
 สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์จาก 5 ช่องใหญ่ = X เซลล์  
 ดังนั้นใน 0.1 ลบ.มม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด = (25)(X) เซลล์  
 ใน 1.0 ลบ.มม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด (25)(X)(10) เซลล์

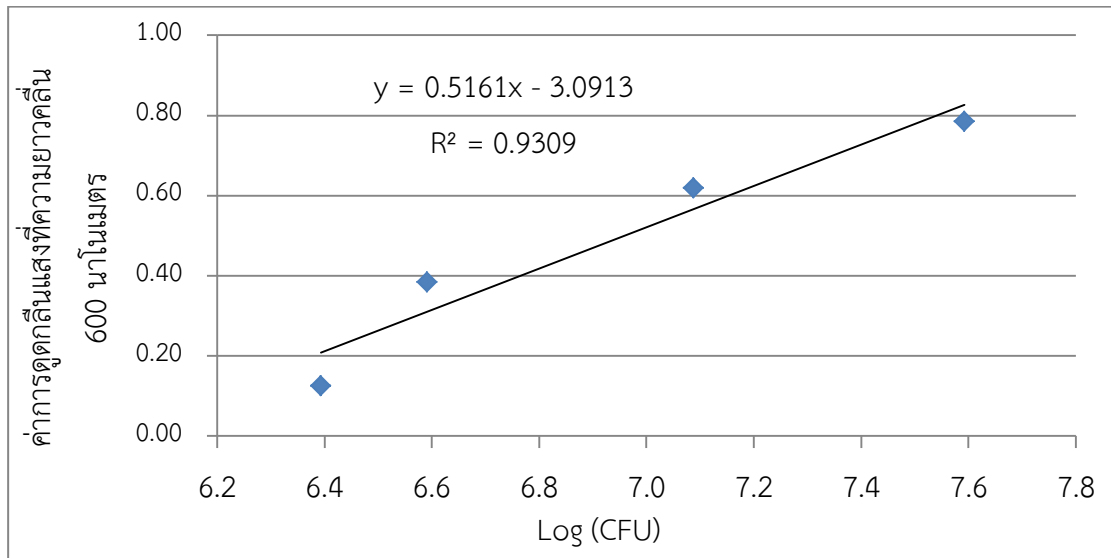
ใน 1.0 ลบ.ซม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	$(25)(X)(10)(1000)$	เซลล์
เท่ากับ	$(25)(X)(10^4)$	เซลล์ต่อมิลลิลิตร

เพื่อเพิ่มความแม่นยำและความสะดวกในการนับเซลล์ ควรทำการเจือจางสารตัวอย่างก่อน เพื่อไม่ให้เซลล์หนาแน่นจนเกินไป และเมื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมดจึงนำค่า dilution factor มาคำนวณด้วย

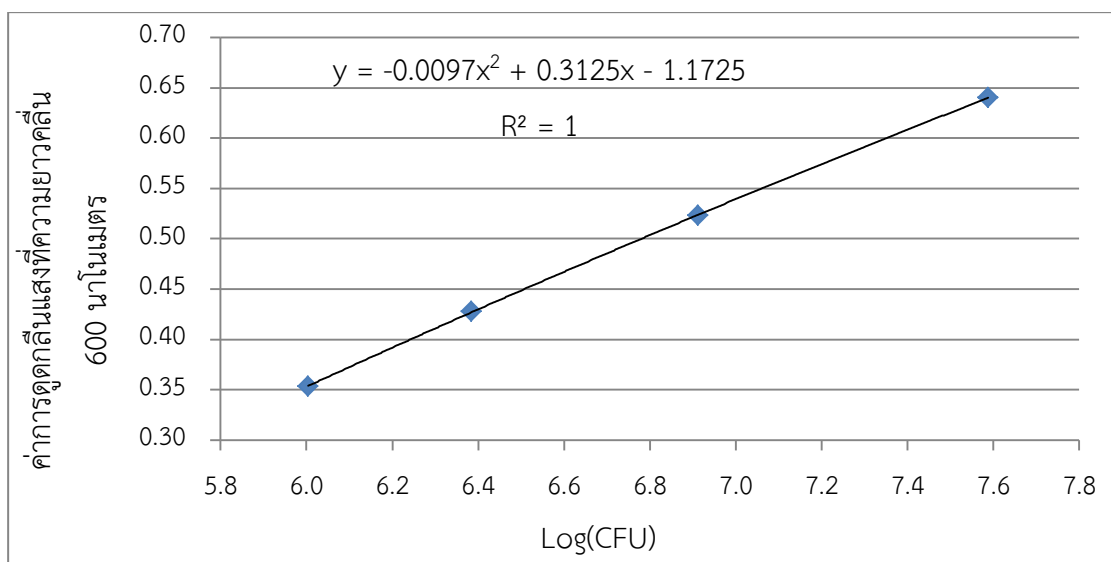
ดังนั้น 1.0 ลบ.ซม. มีจำนวนเซลล์  $(25)(X)(10^4)(\text{dilution factor})$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

### ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานค่า Log ของจำนวนแบคทีเรียที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร



รูปที่ ค1 กราฟมาตรฐาน (standard curve) แสดงค่า Log จำนวนเซลล์ของ *S. epidermidis* TISTR 2172



รูปที่ ค2 กราฟมาตรฐาน (standard curve) แสดงค่า Log จำนวนเซลล์ของ *S. aureus* TISTR 746

ตารางที่ ค1 ค่าเฉลี่ยร้อยละของน้ำหนักน้ำในสมุนไพรที่ศึกษา

สมุนไพร	ครั้งที่	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนัก แห้ง (กรัม)	น้ำหนักน้ำใน สมุนไพร (กรัม)	น้ำหนักน้ำใน สมุนไพร (%)	ค่าเฉลี่ยร้อยละ ของ น้ำหนักน้ำ ในสมุนไพร
ใบสาบเสือ	1	238.20	45.12	193.08	81.06	77.71±5.77
	2	259.74	49.26	210.48	81.03	
	3	130.66	37.83	92.83	71.05	
ต้นตะไคร้	1	133.42	24.56	108.86	81.59	80.71±0.84
	2	56.94	11.43	45.51	79.93	
	3	62.31	12.09	50.22	80.60	

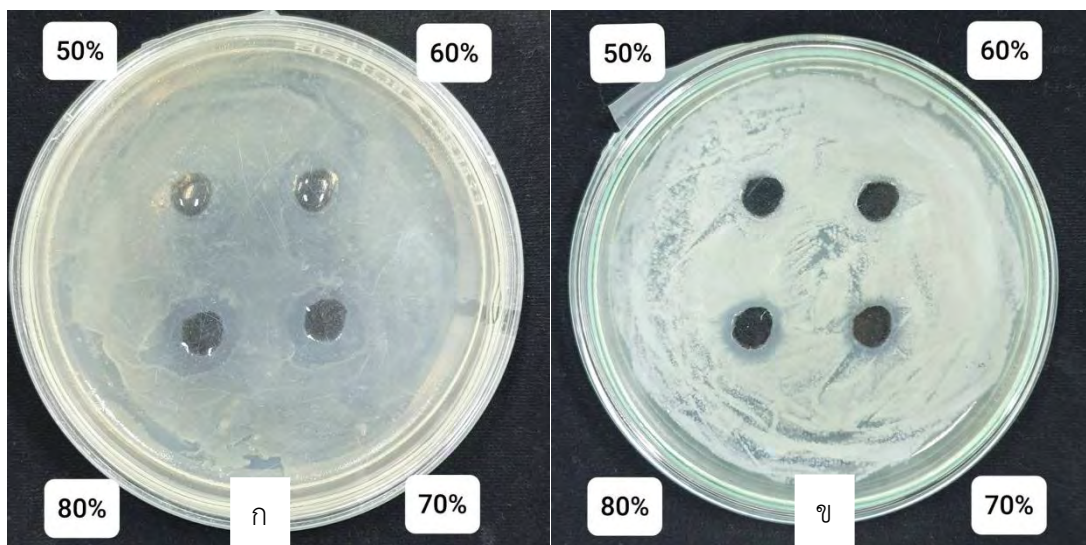
ตารางที่ ค2 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสารที่สกัดได้

สมุนไพร	สกัดครั้งที่	น้ำหนักสารที่ สกัดได้ (กรัม)	ค่าเฉลี่ยของ น้ำหนักสารที่สกัด ได้ (กรัม)
ใบสาบเสือ	1	1.66	1.63±0.04
	2	1.58	
	3	1.64	
ต้นตะไคร้	1	1.05	1.05±0.07
	2	1.11	
	3	0.98	

ตารางที่ ค3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพรและชุดการทดลองควบคุม

สารที่ใช้ทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อของสารสกัดสมุนไพร (มิลลิเมตร)					
	<i>S. aureus</i> TISTR 746			<i>S. epidermidis</i> TISTR 2172		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
สาบเสือ	11.59	11.63	12.12	11.12	11.08	11.23
ตะไคร้	12.50	12.60	12.45	12.23	12.50	12.51
คลอแรมฟินิคอล (ชุดควบคุมผลบวก)	15.50	15.26	16.01	17.02	16.79	16.58
50% DMSO (ชุดควบคุมผลลบ)	ND*	ND	ND	ND	ND	ND

\* ND คือไม่สามารถตรวจพบบริเวณการยับยั้ง



รูปที่ ค3 บริเวณยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* (ก) และ *S. epidermidis* (ข) ด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 50, 60, 70 และ 80% โดยปริมาตร



ตารางที่ ค4 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* เมื่อผสมสารละลาย DMSO ลงในอาหาร NB ที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่แตกต่างกัน

DMSO (%)	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเซลล์ในช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			
	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	0 h	24 h	0 h	24 h
0	0.3689±0.0187	0.8621±0.0054	0.4987±0.0024	1.9511±0.0689
10	0.2810±0.0028	0.6293±0.0091	0.3440±0.0049	1.2243±0.2150
20	0.1942±0.0025	0.0726±0.0151	0.2110±0.0110	0.1612±0.0018
30	0.1282±0.0172	0.0564±0.0063	0.1482±0.0040	0.0732±0.0075
40	0.0917±0.0125	0.0521±0.0017	0.1479±0.0088	0.0715±0.0026
50	0.0740±0.0005	0.0713±0.0002	0.1054±0.0015	0.1039±0.0049