



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี ๒๕๖๓

เรื่อง

การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมี และฤทธิ์การต้านเชื้อ *Escherichia coli* จากสารสกัด
หยาบใบ และกิ่งจากต้นโคลงเคลง ชะมวง บุนงาสำหรับ และพื้งกาสา

Preliminary phytochemical study and anti- *Escherichia coli* from leaves and
twigs of *Melastoma malabathricum* L., *Garcinia cowa* Roxb., *Citharexylum*
spinosum linn. and *Ardisia polycephala* Wall.

โดย

Miss Song Sok Ang รหัส 57210155

Miss Choun Molyde. รหัส 59210140

โครงการวิจัยเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ 2 จัดทำมาเพื่อเป็นการศึกษาเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Escherichia coli* (*E.coli*) จากส่วนของใบและกิ่งของสมุนไพร 4 ชนิด ซึ่งเป็นตัวแทนพืชสมุนไพรที่เก็บจากภาคตะวันออกของไทย โดยมีพืชที่เป็นตัวแทนของวัชพืช พืชสวนครัว และไม้ดอก ได้แก่ โคลงเคลง ชะมวง พลังกาสาและ บุนหงาสำหรับ ตามลำดับ ซึ่งในงานวิจัยนี้ประกอบด้วยกระบวนการศึกษาสามส่วนหลัก ๆ ได้แก่ การสกัด การทดสอบพิษเคมีเบื้องต้น และการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *E.coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เพื่อให้ทราบถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *E.coli* ของส่วนกิ่ง และใบ เพื่อให้เป็นข้อมูลในการส่งเสริมการต่อยอดการพัฒนาเป็นยาสมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆ ตลอดจนกว่าการค้นหาวิจัยด้านเภสัชวิทยา

คณะผู้จัดทำ

Miss Song Sok Ang รหัส 57210155

Miss Choun Molyde รหัส 59210140

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี ๒๕๖๓

เรื่อง: การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมี และฤทธิ์การต้านเชื้อ *Escherichia coli* จากสารสกัดหยาบใบ และกิ่งจากต้นโคลงเคลง ชะมวง บุนหาสำหรับ และพลิงกาสา

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. Miss Song Sok Ang รหัส 57210155

2. Miss Choun Molyde รหัส 59210140

อาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ดร.สุนันต์ ใจสมุทร

2. ดร.นิพัทธา อีสโร

บทคัดย่อ

การศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากใบและกิ่งของพืช 4 ชนิด ได้แก่ โคลงเคลง (*Melastoma malabathricum* L.) ชะมวง (*Garcinia cowa* Roxb. ex Choisy) บุนหาสำหรับ (*Citharexylum spinosum* L.) และ พลิงกาสา (*Ardisia elliptica* Thunb.) พบสารพฤกษเคมีที่ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แอลคาลอยด์ แทนนิน และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แต่ไม่พบสาร คูมาริน แอนทราควิโนน และซาโปนิน การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* (*E. coli*) ของส่วนสกัดเมทานอล จากพืชทั้ง 4 ชนิด พบว่าสารสกัดของใบชะมวงให้ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียดีที่สุด สารสกัดจากใบพลิงกาสา ใบโคลงเคลง และสารสกัดจากกิ่งโคลงเคลงมีฤทธิ์ในการยับยั้งระดับปานกลาง แล้วบุนหาสำหรับมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อต่ำที่สุด โดยให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone เฉลี่ยเท่ากับ 16.17 ± 1.75 , 14.17 ± 0.76 , 13.83 ± 1.89 , 13.00 ± 0.00 และ 10.00 ± 1.00 mm ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากกิ่งของชะมวง พลิงกาสา และบุนหาสำหรับไม่พบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *E. coli*

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2020

Title: Preliminary phytochemical study and anti- *Escherichia coli* from leaves and twigs of *Melastoma malabathricum* L., *Garcinia cowa* Roxb., *Citharexylum spinosum* linn. and *Ardisia polycephala* Wall.

By

1. Miss Song Sok Ang รหัส 57210155
2. Miss Choun Molyde รหัส 59210140

Advisor:

1. Dr. Sunan Jaisamut
2. Dr. Niphatha Isaro

Abstract

The preliminary phytochemical study of the leaf and twig extracts from four plant such as *Melastoma malabathricum* L., *Garcinia cowa* Roxb. ex Choisy., *Citharexylum spinosum* L. and *Ardisia elliptica* Thunb showed that there are some phytochemicals including flavonoids, alkaloids, tannins and cardiac glycosides while coumarins, saponins and anthraquinones do not exist. Antibacterial activity test of gram negative bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) of the methanol extracts revealed that the leaf extract of *G. cowa* exhibits the best antibacterial activity, the leaf extract of *A. elliptica*, *M. malabathricum*, and twig extract of *M. malabathricum* L. have a moderate inhibitory effect, and leaf extract of *C. spinosum* has the least activity with the average clear zone diameters of 16.17 ± 1.75 , 14.17 ± 0.76 , 13.83 ± 1.89 , 13.00 ± 0.00 และ 10.00 ± 1.00 mm respectively. The twig extract from *G. cowa*, *A. elliptica* and *C. spinosum* showed no activity against *E. coli*

Major advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาจาก ดร.สุนันต์ ใจสมุทร และดร.นิพัทธา อีสโร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ผู้ซึ่งคอยเพิ่มเติมข้อเสนอแนะตลอดระยะเวลาทำโครงการวิจัยครั้งนี้จึงขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง คณะผู้จัดทำโครงการวิจัย ขอขอบคุณผู้สนับสนุนโครงการวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย และขอขอบคุณถึงผู้มีอุปถัมภ์ที่ได้ให้สถานที่เพื่ออำนวยความสะดวกในการดำเนินไปของงานวิจัยที่อาคารวิจัย คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา และขอขอบคุณ ดร.เบญจวรรณ ชิวปรีชา อาจารย์ประจำภาควิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องและระบุข้อผิดพลาดในงานวิจัยฉบับนี้

คณะผู้จัดทำ

Miss Song Sok Ang รหัส 57210155

Miss Choun Molyde รหัส 59210140

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กติกกรรมการประกาศ	ง
บทที่ 1 บทนำ	
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
ขอบเขตของงานวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
กรอบแนวคิดในการดำเนินงานวิจัย	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	
2.1. โคลงเคลง	4
2.2. ชะมวง	4
2.3. บุหงาสำหรับ	5
2.4. พิลังกาสา	6
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย	
3.1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	7
I. วัสดุดิบ	7
II. เชื้อแบคทีเรีย	7
III. สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ	7
IV. เครื่องมือ	7
3.2. การเก็บตัวอย่างสมุนไพร	7
3.3. การเตรียมสารสกัดสมุนไพรด้วยการหมัก	8

3.4 การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น	8
3.4.1. การตรวจสอบสาร anthraquinone ด้วยวิธี Bornträger's test	8
3.4.2. การตรวจสอบสาร coumarin	8
3.4.3. การตรวจสอบสาร flavonoid	8
1) Cyanidin test	8
2) Ferric chloride test	9
3) Molisch's test	9
3.4.4. การตรวจสอบสาร saponin	9
3.4.5. การตรวจสอบ tannin	9
1) เตรียมสารสกัด	9
2) การตรวจสอบด้วย gelatin test	9
3) การตรวจสอบด้วย lime water	9
4) การตรวจสอบด้วย 1% ferric chloride	9
5) การตรวจสอบด้วย vanillin's reagent	9
3.4.6. การตรวจสอบสาร alkaloid	9
3.4.7. การตรวจสอบสาร cardiac glycoside	10
1) การเตรียมสารสกัด	10
2) การทดสอบ unsaturated lactone ring	10
3) การทดสอบ steroidal nucleus: Liebermann-Burchard's test	10
4) การทดสอบ deoxy sugar: Keller-Kiliani's test	10
3.5 การทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>E.coli</i> DH5a	
3.5.1 การทดสอบหา clear zone	11
3.5.2 การทดสอบหาค่า MID	11
3.5.3 การทดสอบหาค่า MBD	11
บทที่ 4 ผลการวิจัย และวิเคราะห์ผลการวิจัย	
4.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของตัวอย่าง และการทำ herbarium พืช	13
4.2 การเตรียมสารสกัด	14
4.3 การทดสอบสารพิษเคมีของพืช	16
4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>E.coli</i> DH5a	
4.4.1 การทดสอบหา Clear zone	17

4.4.2 การหาค่า MID	19
4.4.3 การหาค่า MBD	19
บทที่ 5 สรุปผลวิจัย และ ข้อเสนอแนะ	21
เอกสารอ้างอิง	22
ภาคผนวก	27
รายงานสรุปการเงิน	30

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ลักษณะของโคลงเคลง	13
2. ลักษณะใบของชะมวง	14
3. ลักษณะผลชะมวง	14
4. ลักษณะต้นชะมวง	14
5. ลักษณะของดอกบุหงาสำหรับ	14
6. ลักษณะของใบบุหงาสำหรับ	14
7. ลักษณะของใบบุหงาสำหรับ	14
8. ลักษณะของใบพิลังกาสา	15
9. ลักษณะดอกพิลังกาสา	15
10. การตากแห้ง	16
11. การสกัดสาร	16
12. การวัด clear zone จากสารสกัดใบชะมวง	17
13. การวัด clear zone จากสารสกัดใบโคลงเคลง	17
14. การวัด clear zone จากสารสกัดใบพิลังกาสา	17
15. การวัด clear zone จากสารสกัดใบบุหงาสำหรับ	17
16. การวัด clear zone จากสารสกัดกิ่งโคลงเคลง	18
17. การวัด clear zone จากสารสกัดกิ่งชะมวง	18
18. การวัด clear zone จากสารสกัดใบพิลังกาสา	18
19. การวัด clear zone จากสารสกัดใบบุหงาสำหรับ	18
20. การหาค่า MBD ของสารสกัดใบชะมวง	20
21. การหาค่า MBD ของสารสกัดใบพิลังกาสา	20

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. บัญชีทะเบียนพันธุ์ไม้อ้างอิงในห้องปฏิบัติการสัตวศาสตร์และกายวิภาคพืช	13
2. น้ำหนักสารสกัดชั้น Methanol และผลได้เป็นร้อยละ (% yields)	15
3. ผลการทดสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น	16
4. ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจากสารสกัดชั้น methanol ในปริมาณ 20 mg/disc	17
5. ผลการทดสอบหาค่า MID ของสารสกัดชั้น methanol จาก disc diffusion method	19
6. ผลการทดสอบหาค่า MBD ของสารสกัดชั้น methanol	19

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

DMSO	Dimethyl sulfoxide
BaCl ₂	barium chloride
MeOH	methanol
EtOAc	ethyl acetate
Hex.	hexane
MHA	Mueller Hinton Agar
LB	Luria-Bertani agar
DI H ₂ O	deionized water
<i>E. coli</i>	<i>Echerichia coli</i>

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนใกล้เส้นศูนย์สูตร ซึ่งมีภูมิภาคของประเทศมีลักษณะแบบร้อนชื้น ทำให้มีความอุดมสมบูรณ์ของธรรมชาติ มีความหลากหลายทางชีวภาพ และพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย เป็นที่ทราบกันดีว่าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นแหล่งที่สำคัญในการนำมาใช้เพื่อเป็นอาหาร เพื่อการรักษาโรค เช่น ชะมวง พื้งกาสา และผักหวานป่า เป็นต้น ทั้งในรูปแบบยาพื้นบ้าน ยาแผนโบราณ นอกจากนี้สมุนไพรบางชนิดที่เป็นพืชหรือไม้ประดับยังสามารถพัฒนาเป็นยาสมุนไพรได้เช่นกัน เช่น บุนหาส่าหรี โคลงเคลง ชลู่ เป็นต้น และมีการค้นพบยารักษาโรคแผนปัจจุบันชนิดใหม่ๆ ที่พัฒนามาจากพืชสมุนไพรทั้งในประเทศไทยเองและประเทศต่างๆ ทั่วโลก ดังนั้นการศึกษากลุ่มสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาเพื่อให้เกิดการค้นพบตัวยาหรือสารประกอบใหม่ๆ ในอนาคต ^[1-2]

ปัจจุบันมีการส่งเสริมการนำสมุนไพรมาใช้รักษาโรค เนื่องจากคุณสมบัติทางยาในการแพทย์สมัยใหม่ ส่วนใหญ่เกิดจากการใช้สารเคมี ซึ่งส่งผลกระทบ และผลข้างเคียงหลายอย่างต่อร่างกายมนุษย์ อีกทั้งงานวิจัยที่ประยุกต์ใช้สมุนไพรจากพืชมาทำเป็นยารักษาโรคยังไม่เป็นที่แพร่หลายและยอมรับ ^[3]

Escherichia coli (*E. coli*) เป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีแหล่งอาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น อีกทั้งยังพบในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ พืช อากาศ และดิน *E. coli* เป็นแบคทีเรียอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae สกุล *Escherichia* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่อยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม เชื้อ *E. coli* มีรูปร่างเป็นแท่ง ติดสีแกรมลบ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน เคลื่อนที่โดยใช้ Paritrichous flagella ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-40 °C โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35-37 °C ก่อให้เกิดโรคเมื่อได้รับเชื้อภายใน 18-24 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการอุจจาระร่วงบ่อยครั้ง อุจจาระเป็นมูกเลือดปวดท้อง มีอาการซีด เนื่องจากสารพิษของเชื้อไปทำลายเม็ดเลือดแดง จึงเกิดภาวะไตวายได้ แต่ผู้ติดเชื้อบางรายอาจไม่แสดงอาการของโรคแต่สามารถถ่ายทอดเชื้อให้ผู้อื่นได้ ^[43]

อาการอุจจาระร่วงที่เกิดจากเชื้อก่อโรคในลำไส้เป็นปัญหาที่เกิดขึ้นทั่วโลก แล้วก็ปัญหาใหญ่สำหรับประเทศกำลังพัฒนา เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงส่วนใหญ่จะมี *Vibrio cholerae*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp. และกลุ่มเชื้อที่อยู่ในสายพันธุ์ของ *E. coli* เช่น enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) และ enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เป็นต้น ^[5] โดยการรักษาการติดเชื้อก่อโรคเหล่านี้ต้องใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งมีราคาแพง และสามารถกระตุ้นให้เกิดสายพันธุ์เชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ เมื่อนำมาใช้ไม่ถูกต้อง ^[4]

ดังนั้นสำหรับงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้สำรวจเบื้องต้นแล้วพบว่า มีต้นโคลงเคลง ชะมวง บุนหาส่าหรี และพื้งกาสา ซึ่งเป็นตัวแทนของสมุนไพรพื้นบ้านของไทยที่พบได้ทั่วไปทั้งที่เป็นผักพื้นบ้าน (ชะมวง และพื้งกาสา) หรือพืช (โคลงเคลง) และไม้ประดับ (บุนหาส่าหรี) มีความน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเริ่มจากการแยกสกัดพืชด้วยตัวทำละลาย และจะนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรค *E. coli* ซึ่งเป็นแนวทางในการศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษากลุ่มสารพฤกษเคมีในพืชทั้ง 4 ชนิด คือโคลงเคลง ชะมวง พลังกาสา และบุหงาสำหรับ และเปรียบเทียบกลุ่มสารที่พบในใบ และกิ่งจากพืชทั้ง 4 ชนิด
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *E.coli* ของสารสกัดหยาบจากใบ และกิ่งของพืชทั้ง 4 ชนิด ตามข้อ 1

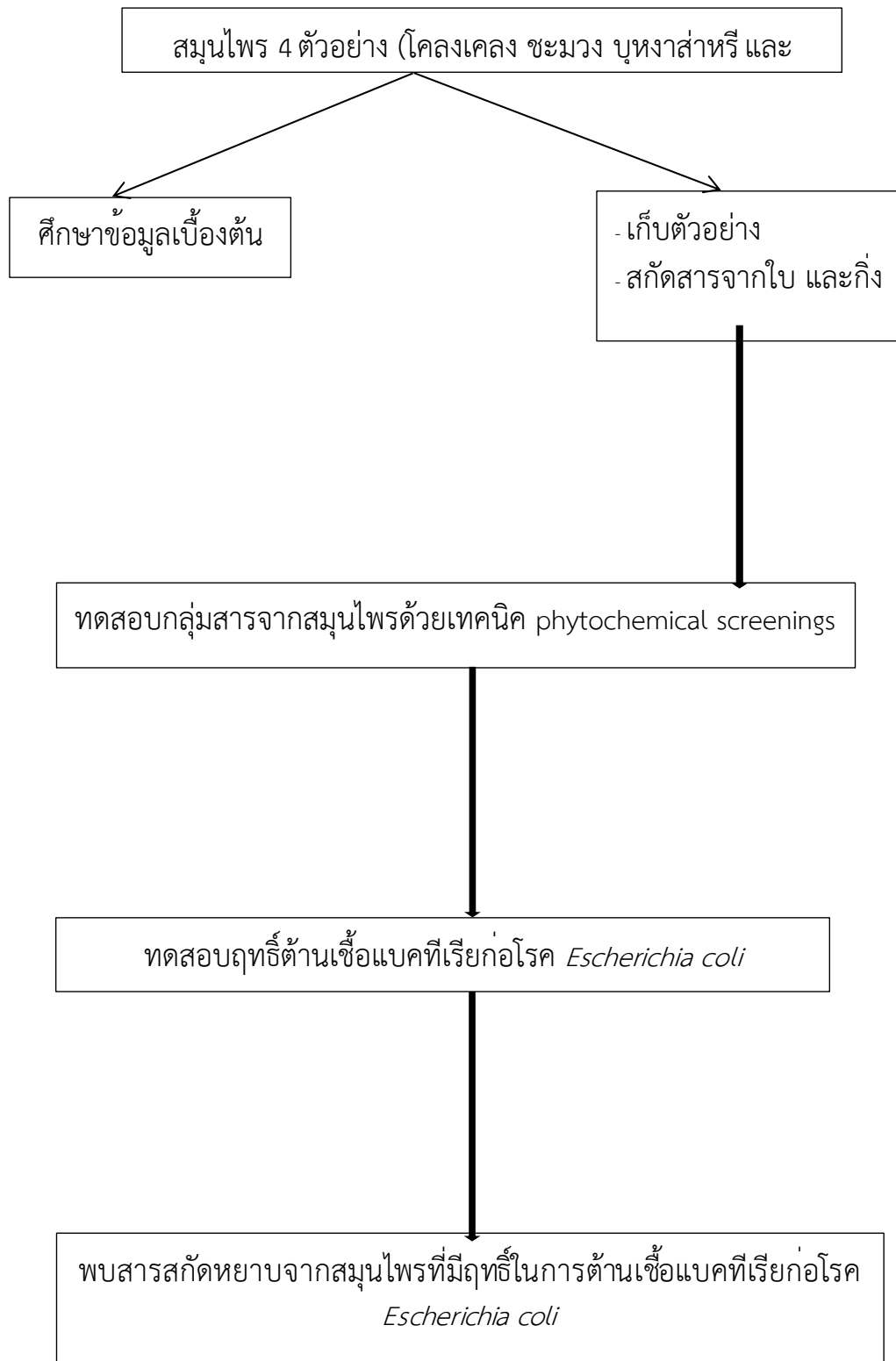
ขอบเขตการวิจัย

1. เก็บใบ และกิ่งของพืชทั้ง 4 ชนิดคือโคลงเคลง ชะมวง พลังกาสา และบุหงาสำหรับ
2. หมักตัวอย่างพืชใบ และกิ่งด้วยตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol
3. ทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นโดยใช้เทคนิค phytochemical screenings
4. ทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *E. coli* จากใบ และกิ่งของพืชทั้ง 4 ชนิดตามข้อ 1

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบกลุ่มสารจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ จากพืชทั้ง 4 ชนิด คือโคลงเคลง ชะมวง พลังกาสา และบุหงาสำหรับ และ สามารถระบุกลุ่มสารที่สกัดได้จากใบ และกิ่งของพืชทั้งเหล่านี้ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อไป
2. ทราบสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และสามารถจัดทำข้อมูลเพื่อศึกษาต่อยอดในศึกษาฤทธิ์ต่อการเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน
3. ใช้เป็นแนวทางในการส่งเสริมให้สมุนไพรพื้นบ้านมีความน่าเชื่อถือจากผู้บริโภค
4. สามารถถ่ายทอดความรู้และเทคนิคต่าง ๆ เพื่อสนับสนุนและพัฒนานักศึกษาปริญญาตรีให้เป็นนักวิจัย

กรอบแนวคิดในการดำเนินงานวิจัย



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1. โคลงเคลง (*Melastoma malabathricum* L.)

โคลงเคลงเป็นพืชอยู่ในวงศ์ Melastomaceae มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม มีความสูงประมาณ 1-3 เมตร ลำต้น และกิ่งก้านเป็นสีน้ำตาลแดง ทุกส่วนของลำต้นมีขนละเอียดสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม เป็นพืชใบเดี่ยวรูปใบหอกมีปลายแหลม ดอกเป็นช่อแบบสมบูรณ์เพศมีสีม่วงอัมชมพู กลีบดอกมี 4-6 กลีบ สามารถออกดอกได้ตลอดทั้งปี แต่จะมีมากในช่วงฤดูฝน ผลมีลักษณะคล้ายลูกข่างมีขนปกคลุม เนื้อผลมีสีแดงอมสีม่วงข้างในมีเมล็ดเวลาผลแก่เปลือกจะแห้งแตก ในความรู้พื้นบ้านโคลงเคลงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ดังนี้ ดอกใช้เป็นยารักษาโรค ห้ามเลือด รากช่วยบำรุงร่างกาย ดับพิษไข้ แก้อ่อนในกระหายน้ำ ใบต้มน้ำคั้นเป็นยาแก้ไอ แก้เจ็บคอในช่องปาก แก้ท้องร่วง รักษาแผลไฟไหม้ และโรคคอกพอก ใบอ่อนกินเป็นผักทั่วไป ใบแก่รูดปลาไหลช้ดเมือกได้ ผลสุกมีรสหวานฝาด รับประทานได้^[6]

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโคลงเคลงคือได้ศึกษาเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีจากส่วนต่างๆของพืชและพบว่ามีกลุ่มสาร flavonoids phenols steroids tannins จากใบ กิ่ง ดอก และ ผล แต่ไม่มีพบสาร saponin และ glycosides ส่วนสารกลุ่ม alkaloids พบเฉพาะในใบกับดอก และสาร terpenoids พบได้ทุกส่วนของพืช ยกเว้นกิ่ง^[7-8] นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ได้ศึกษาก่อนหน้านี้มีพบสาร ellagic acid และ anthocyanin ในสารสกัด methanol จากเปลือกต้น และสารสกัดน้ำจากดอก^[9] สำหรับฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคพบว่าสารสกัด 70% methanol จากใบ กิ่ง และดอก มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบได้^[10] โดยมีงานวิจัยหนึ่งได้ศึกษาสารสกัดน้ำ และ ethanol จากทั้งต้นของโคลงเคลง พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อด้วยเช่นกันแต่ไม่พบฤทธิ์เชื้อแกรมลบ *E. coli* และ *Klebsilla pneumonia*^[11] ในปี 2011 มีงานวิจัยศึกษาเพิ่มเติมเข้ามาพบว่า สารสกัด methanol และ acetone จากใบโคลงเคลงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแกรมบวก *Streptococcus aureus* และแกรมลบ *E. coli* ได้ด้วย^[12] แล้วในปีต่อมา 2012 มีงานวิจัยศึกษาเพิ่มเติมอีกกว่าสารสกัด methanol จากผลของโคลงเคลงก็มีฤทธิ์ต้านเชื้อแกรมบวก และแกรมลบได้เช่นกันแต่ไม่พบฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli*^[13] ส่วนสารสกัดน้ำจากใบโคลงเคลงไม่พบฤทธิ์ในการต้านเชื้อทั้ง *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* แต่ในสารสกัดจาก methanols มีฤทธิ์ต้านเชื้อด้วยในความเข้มข้นที่ 800 mg/ml มี clear zone เท่ากับ 15.0 ± 0.7 mm เทียบกับ positive control^[14] แต่จากงานวิจัยของ Wong K.C. และคณะในปี 2012 ได้ศึกษาสารสกัดน้ำต่อ methanol สารสกัด chloroform และ สารสกัด ethyl acetate จากใบ และดอกโคลงเคลงได้พบสาร ursolic acid, asiatic acid, beta sitosterol, kaempferol, quercetin อีกด้วย และก็พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E.coli* ให้ค่า clear zone 11 mm ในความเข้มข้นต่ำสุด MIC 0.25 mg/ml^[15]

2.2. ขะมวง (*Garcinia cowa* Roxb.)

ขะมวงเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Clusiaceae โดยมีลักษณะทั่วไป เป็นไม้ยืนต้นขนาดย่อม ใบแข็งหนายาว ลักษณะคล้ายใบมะดัน ดอกกลีบแข็ง สีขาวเหลือง มีกลิ่นหอม ใหญ่ราว 10-15 mm โดยขะมวงถูกนำมารักษาอาการเจ็บป่วยได้หลายชนิด เช่น เปลือก และรากเป็นยาลดไข้ ใบและผลใช้สำหรับรักษาอาการอาหารไม่ย่อย เพิ่มการไหลเวียนของเลือด และขับเสมหะ^[16-17]

จากงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการศึกษาสารพฤกษเคมี พบว่าขะมวงมีสาร triterpenes, flavonoids, xanthenes และ phloroglucinols^[50-61] จากการศึกษาวิจัยของผู้วิจัยชื่อ Negi และคณะในปี 2008 ได้นำ

สารสกัดหยาบของ hexane และ chloroform จากเปลือกผลของชะมวงมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร และทำให้อาหารเสียเช่น *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) และ *E.coli* โดยชะมวงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี และสามารถยับยั้งเชื้อแกรมบวกได้ดีกว่าเชื้อแกรมลบ โดยเมื่อนำสารสกัดจาก chloroform มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ ให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) ของเชื้อ *S.aureus* คือ 30 µg/ml และค่า MIC ของเชื้อ *E.coli* คือ 250 µg/ml^[18] ในปี 2012 Siridechakorn และคณะได้ศึกษาเกี่ยวกับการแยกสารจากการสกัดเปลือกลำต้นของชะมวงพบสาร garciniacowol กับ garciniacowone พร้อมกับสารที่เคยพบมาแล้ว 15 สาร แล้วนำสารสกัดที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 และ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1 ผลที่ได้คือสารที่ 2 กับสารที่ 9 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ MRSA SK1 ดี โดยใช้ความเข้มข้นน้อยที่สุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) คือ 2 µg/ml แล้วสารที่ 2 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ใน MIC 2 µg/ml^[19] ในปี 2014 ผู้วิจัยชื่อ Auranwiwat และคณะได้ศึกษาเกี่ยวกับการแยกสารจากผลดิบของชะมวงจากสารละลาย acetone โดยแยกได้สารกลุ่ม tetra oxygenated xanthenes 2 ชนิด เช่น garcicowanones A และ B กับสาร tetra oxygenated xanthenes ที่เคยพบมาแล้ว 8 ชนิด แล้วได้นำสารที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Bacillus cereus* TISTR 688, *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Micrococcus luteus* TISTR 884, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466, *Escherichia coli* TISTR 780, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, *Salmonella typhimurium* TISTR 292 และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. α -Mangostin สามารถยับยั้งเชื้อแกรมบวก 3 ชนิดในค่า MIC เท่ากับ 0.25-1 µg/ml garcicowanones A และ β -mangostin สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในค่า MIC เท่ากับ 0.25 µg/ml^[20]

2.3. บุนหสาหรื (*Citharexylum spinosum* linn.)

บุนหสาหรืเป็นพืชอยู่ในวงศ์ Verbenaceae เป็นไม้ต้นขนาดสูง แยกเพศต่างต้น เป็นพืชใบเดี่ยวรูปใบหอก ใบเรียงตรงกันข้ามสลับตั้งฉาก แผ่นใบเกลี้ยงหรือมีขนประปรายด้านล่าง ก้านใบสีส้มอมแดง ดอกเป็นช่อออกตามซอกใบและปลายกิ่ง แต่ละช่อประกอบด้วยดอกย่อยขนาดเล็กจำนวนมาก ปลายดอกแยกเป็น 4-5 กลีบ ดอกเป็นสีขาวมีกลิ่นหอมแรง ผลสุกสีดำอมม่วง ดอกออกตลอดทั้งปี ขยายพันธุ์ด้วยวิธีปักชำกิ่ง และตอนกิ่ง บุนหสาหรืส่วนใหญ่ปลูกเป็นไม้ประดับ พุ่มให้ร่มเงา ดอกสวยงามมีกลิ่นหอม และกิ่งอ่อนใช้รักษาเชื้อราที่ปาก เปลือกต้นช่วยแก้ไข้ ลดปวด ใช้เป็นยาปัสสาวะ แก้ท้องร่วง และช่วยการทำงานของตับ ผลดิบสามารถกินได้^[21-24] งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับบุนหสาหรืมีจำนวนน้อย ด้วยส่วนใหญ่จะศึกษาดอกของบุนหสาหรื เพราะเป็นเอกลักษณ์ของพืชนี้ และก็มีการศึกษาหาสารพฤษเคมีเบื้องต้นจากส่วนต่างๆของบุนหสาหรืด้วยเช่น ราก กิ่ง ใบ และดอก มีพบสาร carbohydrate, glycosides, tannins, flavonoids, iridoids, unsaturated sterols, triterpenes, saponins และพบสาร compound 5 และ 8 ที่เป็นผง amorphous สีเหลืองกับสีส้มจากการตรวจ chromatographic แต่ไม่มีพบสาร anthraquinone, volatiles, coumarins alkaloids และสารที่มีส่วนประกอบของ nitrogenous base^[25] ในปี 2018 Sahana BK, และคณะ ได้ศึกษาใบ และเปลือกต้นของบุนหสาหรืพบว่าสารสกัดจาก methanol มีกลุ่มสาร alkaloids และ sterols เพิ่มเติมอีก^[26] นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ศึกษาสารสกัดจาก hexane, ethyl acetate และ methanol ต่อน้ำจากส่วนต่างๆของพืชพบว่ามียุทธิด้านเชื้อราได้^[27] และสำหรับฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ก็มีงานวิจัยได้ศึกษามาเช่นกัน และพบว่าส่วนใหญ่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ แต่จะพบฤทธิ์ต้านเชื้อแกรมบวกมากกว่า และฤทธิ์ต้านเชื้อแกรมลบที่พบชัดเจนคือสามารถต้านเชื้อ *Pseudo aeruginosa* แต่สำหรับการต้านเชื้อ

E.coli มีงานวิจัยพบ และงานวิจัยไม่พบ เช่นจาก Mar A, และคณะในปี. 2014 พบสารกลุ่ม phenolic compound ในน้ำมันจากดอกบุนนาคสำหรับ นอกจากนี้สารสกัด dichloromethane และ ethanol ของดอกบุนนาคสำหรับมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E.coli* ที่ MIC 31.2 µg/mL ด้วยมี clear zone 3.7±1.3 mm สำหรับ ethanol [28]

2.4. พิลังกาสา (*Ardisia elliptica* Thunb)

พิลังกาสา หรือ รามใหญ่เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Primulaceae (Myrsinaceae) จัดเป็นไม้พุ่มกึ่งไม้ยืนต้นขนาดเล็ก มีความสูงประมาณ 1-10 m แตกกิ่งก้านสาขารอบ ๆ ต้น ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับหนาแน่นที่ปลายกิ่ง ลักษณะของใบเป็นรูปรี ใบอ่อนจะออกสีแดง แล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเมื่อใบแก่ ส่วนขอบใบเรียบ มีจุดเล็ก ๆ สีเขียวอ่อนแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อใบแก่ ใบมีขนาดกว้างประมาณ 3-5 เซนติเมตร และยาวถึง 20 เซนติเมตร โดยเนื้อใบหนาคล้ายแผ่นหนัง นุ่ม และอวบน้ำ หลังใบและท้องใบเรียบเกลี้ยง ออกดอกเป็นช่อคล้ายซี่ร่ม โดยจะออกตามซอกใบและที่ปลายกิ่ง แต่ละช่อจะมีดอกประมาณ 5-8 ดอก ก้านช่อดอกยาวประมาณ 1.5-2.5 เซนติเมตร ก้านดอกเรียว ดอกตูมเป็นรูปทรงกรวย เมื่อดอกบานจะเป็นรูปวงล้อสีชมพูอ่อน มีกลีบดอก 5 กลีบ เหมือนดวงดาว กลีบดอกเรียงบิดเวียน ปลายกลีบเรียวแหลม แล้วผลมีลักษณะเป็นรูปทรงกลม ผลอ่อนเป็นสีเขียว สีแดงเมื่อสุกแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงดำ พิลังกาสา หรือ รามใหญ่ถูกนำมารักษาอาการตับเป็นพิษ ท้องเสีย ลดอาการไข้ อาการเจ็บหน้าอก และรักษาภาวะแทรกซ้อนจากการคลอดบุตร [62-66] จากงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการศึกษาสารพฤกษเคมี พบว่าพิลังกาสา หรือรามใหญ่มีสาร α -amyrin, β -amyrin, bauerenol, bergenin, isorhamnetin, quercetin, rapanone และ syringic acid [67-70] จากการศึกษาวิจัยของผู้วิจัยชื่อ Alias และคณะในปี 2014 ได้นำสารสกัดหยาบของใบและผลพิลังกาสามาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* โดยใบมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในระดับปานกลาง และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* ได้น้อย โดยให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 13.00 และ 11.33 mm ตามลำดับ [71] จากการศึกษาวิจัยของผู้วิจัยชื่อ Phadungkit และคณะในปี 2006 ได้แยกสาร syringic acid, isorhamnetin และ quercetin ในสารสกัดของผลพิลังกาสาในชั้น ethanol มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Salmonella* โดยสารสามารถยับยั้งเชื้อ *S. enteritidis*, *S. weltevreden*, *S. typhimurium* และ *S. blockley* โดยค่า MIC อยู่ในช่วง 15.6 – 125.0 µg/ml [72]

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ และการดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

I. วัสดุดิบ

จากใบ และกิ่งของพืชสมุนไพรเก็บจากตำบลเหมือง อำเภอมะนัง จังหวัดยะลา

- i. โคลงเคลง (*Melastoma malabathricum* lin.)
- ii. บุนนาค (*Citharexylum spinosum*)
- iii. ชะมวง (*Garcinia cowa* Roxb. ex Choisy)
- iv. พิลั่งกาสา (*Adisia elliptica* Thunb.)

II. เชื้อแบคทีเรีย: เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α

III. สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วยหาซื้อ รุ้นของเครื่องมือ

- i. Hexane, Ethyl acetate, Methanol, Dimethyl sulfoxide
- ii. Luria-Bertani agar (LB agar) (Solarbio, China)
 - Yeast Extract (Oxoid, France)
 - NaCl (Ajax Finechem Pty Ltd, Australia)
 - Tryptone (Oxoid, United Kingdom)
- iii. Mueller Hinton Agar (MHA) (Benton, Dickinson and Company, France)
- iv. Barium chloride , 1% sulfuric acid
- v. Deionized water (DI water), Sterile normal saline solution

IV. เครื่องมือ

- i. Hammer mill (Retsch sk 100, Germany)
- ii. Autoclave (รุ่น Wiseclave digital fuzzy control system)
- iii. Rotary evaporator (BÜCHI)
- iv. Hot air oven
- v. Vortex mixer
- vi. Weighting scale (Mettler toledo, Switzerland)
- vii. Micropipettes
- viii. Petri dishes

3.2 การเก็บตัวอย่างสมุนไพร

เก็บตัวอย่างใบ และกิ่งของสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ โคลงเคลง (*Melastoma malabathricum* subsp. *malabathricum* code: Buu-Cho/63-7) บุนนาค (*Citharexylum spinosum* L. code: Buu-Cho/63-5) ชะมวง (*Garcinia cowa* Roxb. Ex Choisy code: Buu-Cho/63-6) พิลั่งกาสา (*Adisia*

elliptica Thunb. Code: Buu-Cho/63-4) จากตำบลเหมือง อำเภอมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี ซึ่งทั้งใบ และ กิ่งสด น้ำหนักรวม 10 กิโลกรัม นำมาล้างให้สะอาด และอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3 วิธีการเตรียมสารสกัดสมุนไพรโดยวิธีการหมัก

นำใบ และกิ่งมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำมาบดให้ละเอียดด้วย hammer mill ให้ได้ขนาดผงสมุนไพร 2 mm นำตัวอย่างสมุนไพรไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าตัวอย่างจะแห้ง นำตัวอย่างไปสกัดด้วยตัวทำละลาย *n*-hexane ethyl acetate และ methanol เป็นเวลา 5 วัน และสกัดซ้ำ 2 ครั้งนำไประเหยแห้ง โดยเครื่อง Rotary evaporator ซึ่งน้ำหนักแต่ละส่วน เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จนกระทั่งนำไปทดสอบขั้นตอนต่อไป

3.4 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น^[35-40]

การทดสอบกลุ่มสารพฤกษเคมีเบื้องต้นจากใบ และกิ่งทั้งหมดจำนวน 7 กลุ่มสาร ได้แก่ anthraquinone, coumarin, flavonoid, saponin, tannin, alkaloid และ cardiac glycoside โดยสังเกตการเปลี่ยนสี หรือการเกิดตะกอน

1) การตรวจสอบสาร anthraquinone ด้วยวิธี Bornträger's test:

ซึ่งตัวอย่างพืชที่บดหยาบ 1 g ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 150 ml เติม 10% potassium hydroxide ปริมาตร 20 ml แล้วเติม 3% hydrogen peroxide ปริมาตร 1 ml นำไป reflux บน water bath 10 นาที จับเวลาเมื่อสารละลายเริ่มเดือด เมื่อ reflux เสร็จนำไปกรองเก็บสารสกัด ปรับ pH ของสารสกัดให้เป็นกรดด้วย acetic acid ให้ได้ pH 3-4 เติม dichloromethane 15 ml เพื่อทำ partition เก็บสารสกัด dichloromethane แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2 ml หลอดที่ 1 ใช้เป็น control หลอดที่ 2 เติม สารละลาย ammonium hydroxide T.S. 2 ml เขย่าเบาๆ แล้วสังเกตสีในชั้นสารละลาย ammonium hydroxide T.S. และ dichloromethane หลังจากเวลาผ่านไป 5 นาที ถ้ามีการเปลี่ยนสีเป็นสีชมพูแดงแสดงว่าพบสาร Anthraquinone

2) การตรวจสอบสาร coumarin

การตรวจสอบสารประกอบกลุ่มคูมารินที่ระเหยได้

ซึ่งผงพืช 1 g ใน หลอดทดลอง หยด H₂O ในผงพืชให้พอมีความชื้น นำกระดาษชุบ 10% NaOH แขนงไว้บนปากหลอดทดลอง ปิดฝา และอังบน water bath 5 นาที แล้วนำกระดาษกรองไปตรวจสอบการเรืองแสง UV 366nm

การตรวจสอบสารประกอบกลุ่มคูมารินภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV)

นำตัวอย่างผงพืช 0.5 g ใน flask เติมสารละลาย 95% ethanol 10 ml กรอง แล้วหยดบนกระดาษกรอง 1-2 หยด แล้วหยด 10% NaOH 1 หยด แล้วนำกระดาษกรองไปตรวจสอบการเรืองแสง UV 366 ถ้าเป็นผลบวกจะเกิดการเรืองแสง

3) การตรวจสอบสาร flavonoid

เตรียมสารสกัดด้วยซึ่งผงพืช 500 mg สกัดด้วย 95% ethanol 10 ml ทำการทดสอบ 3 อย่างมี cyanidin test : สารสกัด 1 ml ใส่หลอดทดลอง เติม Mg ribbon 1-2 ชิ้น หยด HCl เข้มข้น 2-3 หยด (ผลบวกจะมีการเปลี่ยนสีเป็นสี เหลือง ส้ม หรือแดง) Ferric chloride test: (การทดสอบส่วน Phenolic

compound) สารสกัด 1 ml ใส่หลอดทดลอง เติม 1% ferric chloride 2-3 หยดให้ไหลตามข้างๆหลอด (ผลบวกจะให้สีน้ำเงินดำ หรือสีเขียวดำ) และการทดสอบ Molisch's test: (การทดสอบส่วน Deoxy sugar) นำสารสกัด 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง เติม 5% α -naphthol 3-4 หยด เขย่า หยด H_2SO_4 ประมาณ 1 ml ให้ไหลด้านข้างขวด (ถ้ามีเกิดวงแหวนสีม่วงขึ้น แสดงว่าพบส่วน deoxy sugar)

4) การตรวจสอบสาร saponin

ชั่งสารสกัด 200 mg ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 ml นำไปอุ่นบนเครื่อง water bath นาน 5 นาที กรอง แล้วนำสารละลายที่ได้มาเติมน้ำกลั่น 2 ml เขย่าอย่างแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่าพบสารกลุ่มซาโปนิน

5) การตรวจสอบสาร tannin

เตรียมการสกัดโดยนำตัวอย่างพืช 3 g กับ 95% ethanol 3 ml มาให้ความร้อนบน water bath นาน 10 นาที กรองจนได้สารสกัดใส นำสารละลายใส 10 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นประมาณ 20 ml หากมีตะกอนให้กรองจนกว่าจะได้สารละลายใส แล้วแบ่งสารสกัดใส่หลอดทดลอง 2 ml ใช้เป็นหลอดเปรียบเทียบ การตรวจสอบด้วย gelatin solution แบ่งสารสกัดใส่หลอดทดลอง 5 ml แล้วเติมสารละลายเกลือแกง 10% NaCl ประมาณ 3-4 หยด ถ้ามีตะกอนให้กรองตะกอนทิ้งไปแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 8 ml แบ่งสารสกัดใส่หลอดทดลอง 2 หลอด หลอดละ 3 ml ด้วยหลอดที่ 1 ใช้เป็นหลอดเปรียบเทียบ และหลอดที่ 2 เติมสารละลาย 1% gelatin solution ประมาณ 1 ml เปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้น ผลบวกสำหรับ true tannins จะเกิดตะกอนคงตัวและ pseudo tannins จะเกิดตะกอนไม่คงตัว การตรวจสอบด้วย lime water แบ่งสารสกัดใส่หลอดทดลอง 2 ml เติมน้ำยา lime water ประมาณ 1-2 ml สังเกตผลที่เกิดขึ้นผลบวกจาก hydrolysable tannins จะเกิดตะกอนสีเหลืองเงินเทา การตรวจสอบด้วย 1% ferric chloride แบ่งสารสกัดใส่หลอดทดลอง 0.5 ml เติมน้ำกลั่น 2 ml เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำยา 1% ferric chloride ประมาณ 1 หยด สังเกตผลที่เกิดขึ้นทันที ผลบวกจาก hydrolysable tannins จะเกิดตะกอนสีน้ำเงินดำ ส่วน condensed tannins จะเกิดตะกอนสีเขียวเข้ม น้ำตาล ดำ การตรวจสอบด้วย vanillin's reagent แบ่งสารสกัดที่ปรับปริมาตรมา 3 ml ระบายให้แห้ง แล้วเติม vanillin reagent ประมาณ 2-3 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้นทันที ผลบวกจาก condensed tannins จะเกิดตะกอนสีแดง

6) การตรวจสอบ alkaloid

ชั่งผงสมุนไพร 1 g ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดใหญ่ที่มีฝาปิด เติม 95% ethanol ปริมาตร 10 mL ต้ม 10 นาที กรองผ่านสำลี และนำสารสกัดที่ได้ไประเหยให้แห้งบน water bath ด้วยถ้วยระเหย นำสารสกัดแห้งมาละลายด้วย 95% ethanol ประมาณ 2 mL เพื่อใช้ทดสอบกับน้ำยาทดสอบ นำสารสกัดหยดลงบนแผ่นสไลด์ 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 1-2 หยด โดยใช้สารสกัดเพื่อการเปรียบเทียบ อีกด้านหนึ่งใช้สำหรับทดสอบกับน้ำยาทดสอบ หยด 5% HCL ลงบนสารสกัดที่ต้องการทดสอบจากนั้นหยดน้ำยาทดสอบลงบนสารสกัด ใช้แท่งแก้วคนผสมให้เข้ากัน สังเกตสี และปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้น

ตารางผลบวกจากการทดสอบ

น้ำยาที่ทดสอบ	สีตะกอน
Dragendorff's reagent	ตะกอนสีส้ม
Hager's reagent	ตะกอนสีเหลือง
Kraut's reagent	ตะกอนสีขาว
Mayer's reagent	ตะกอนสีเหลือง
Tannic acid	ตะกอนสีขาวเหลือง
Wagner's reagent	ตะกอนสีน้ำตาลแดง

7) การตรวจสอบ cardiac glycoside

ซึ่งผงสมุนไพร 1 g ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดใหญ่ (50 ml) ที่มีฝาปิด เติม 95% Ethanol ลงไป 20 ml นำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที (จับเวลาตอนเดือด) ทิ้งไว้ให้เย็น กรองสารสกัดผ่านสำลีหรือกระดาษกรองจนได้สารสกัดที่ไม่มีตะกอน จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 5 ml นำสารสกัดไป partition (โดยใช้ separating funnel) กับ CH_2Cl_2 ครั้งละ 5 ml จำนวน 2 ครั้ง เก็บสารสกัดส่วน CH_2Cl_2 รวมกัน เพื่อใช้ในการทดสอบ หากสารสกัดไม่แยกชั้นกับ CH_2Cl_2 ให้เติมน้ำกลั่น 25 ml จนกว่าสารละลายจะแยกชั้น การทดสอบ unsaturated lactone ring นำสารสกัด CH_2Cl_2 2 ml ทำให้แห้งใน evaporating dish เติม Kedde A reagent (2% 3,5-dinitrobenzoic acid ใน MeOH) 3-5 หยด ผสมให้เข้ากัน และหยด Kedde B reagent (5.7% alcoholic KOH) ลงไป 3-5 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น ผลบวกจะเกิดสีม่วงแดง และสีอาจจางลงภายใน 2-3 นาทีการทดสอบ steroidal nucleus: Liebermann-Burchard's test นำสารสกัด CH_2Cl_2 2 ml ใส่ลงใน evaporating dish ทำให้แห้งบน water bath จากนั้นเติมน้ำ acetic anhydride 10 หยด ผสมให้เข้ากัน ค่อยๆ หยด H_2SO_4 เข้มข้นให้ไหลลงด้านข้างภาชนะ สังเกตสีที่เกิดขึ้น ผลบวกจะเกิดสีน้ำเงินปนเขียว หรือสีออกทางม่วง หรือเหลือง การทดสอบ deoxy sugar: Keller-Kiliani's test นำสารสกัด CH_2Cl_2 2 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม FeCl_3 reagent (10% FeCl_3 ใน glacial acetic acid) 2 ml ผสมให้เข้ากัน เอียงหลอดทดลองแล้วค่อยๆ หยด H_2SO_4 เข้มข้นลงไปอย่างช้าๆ 30 หยด สังเกตสีตรงรอยต่อระหว่างสารสกัด และกรด H_2SO_4 ผลบวกจะเกิดวงแหวนสีม่วงหรือสีน้ำตาล ตรงรอยต่อของสารสกัด และกรด H_2SO_4 หรือเกิดสีเขียวในชั้นบน

3.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* (*E.coli*)

เป็นการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อก่อโรค โดยใช้เชื้อที่เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ *E.coli* และพืชทั้ง 4 ชนิดนี้ใช้สารสกัดจากใบ และกิ่งของพืช

การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดที่จะใช้ทดสอบในความเข้มข้น 62.5, 125, 250 และ 500 mg/ml โดยนำสารสกัดหยาบมาละลายด้วย dimethylsulfoxide (DMSO)

แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบเป็นแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* DH5 α

การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบในการต้านเชื้อ *E.coli* DH5 α

1) การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อด้วยวิธี Disc diffusion^[41]

เลี้ยงเชื้อ *E.coli* DH5 α บนอาหาร Muller Hinton Broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อ 2-3 โกลีในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร LB ปริมาตร 5 ml นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมเชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (มีปริมาณเชื้อ 1.5×10^8 CFU/ml ด้วยมี 1% BaCl₂ และ 1% H₂SO₄ เป็นตัวเทียบความเข้มข้นมาตรฐาน) จากนั้นเอาไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในเชื้อที่เตรียมไว้ นำมาป้ายให้ทั่วผิวน้ำอาหาร MHB แบบ 3 ระนาบ และทิ้งให้ผิวน้ำอาหารแห้ง แล้ววาง sterile disc ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ที่หยดสกัดในความเข้มข้น 62.5 mg/ml, 125 mg/ml, 250 mg/ml และ 500 mg/ml ด้วยจะให้ปริมาณสารสกัดต่อ disc คือ 1.875 mg, 3.75 mg, 7.5 mg, 15 mg, 17.5 mg และ 20 mg และมี disc ที่หยด DMSO เป็น negative control ส่วน disc หยดสารละลายจากตัวยา Ampicillin ในความเข้มข้น 12.5 mg/ml เป็น positive control วางบน plate นี้ด้วย แต่ละ disc มีความจุ 10-50 μ l แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่เกิดขึ้น หน่วยเป็นมิลลิเมตร (mm)

2) การหาค่าปริมาณสารสกัดต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

เลี้ยงเชื้อด้วย LB 5 ml เวลา 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วนำเชื้อมาปรับปริมาตรโดยเทียบความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ที่มีปริมาณเชื้อ 1.5×10^8 CFU/mL จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อมาจุ่มลงในเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วนำมาเกลี่ยบนอาหาร MHA ให้ทั่วผิวน้ำอาหารที่ได้เตรียมไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการป้ายแบบ 3 ระนาบแล้วทิ้งไว้ให้ผิวน้ำอาหารแห้งประมาณ 3-5 นาที

การเตรียมสารสกัดสำหรับทดสอบ

เลือกปริมาณสารสกัดต่อ disc คือ 1.875 mg, 3.75 mg, 7.5 mg, 15 mg, 17.5 mg และ 20 mg จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* DH5 α ที่ดีที่สุดมาเป็นความเข้มข้นตัวอย่าง และทำการเจือจางต่อไปให้ได้ความเข้มข้นต่ำสุดเพื่อทดสอบโดยมีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 500 mg/ml, 250 mg/ml, 125 mg/ml และ 62.5 mg/ml

การหาค่า MID (Minimum Inhibitory Dose)^[41,73,74]

นำสารสกัดที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้นมาทดสอบ ด้วยใช้ sterile disc เตรียมสารสกัดในแต่ละ disc แล้วเอามาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เตรียมไว้ วางจานละ 6 disc ด้วยมี positive control และ negative control รวมด้วย หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตผลการทดลอง ถ้ามีวงใสเกิดขึ้นแสดงว่าสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อได้ ด้วยอ่านค่าปริมาณสารสกัดต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้เป็นค่า MID มีหน่วยเป็น mg/disc^[73]

3) การหาค่าปริมาณสารสกัดต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้

นำสารสกัดที่มีปริมาณต่ำสุดที่สามารถการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MID) ที่ให้วงใสทุกความเข้มข้น มาทดสอบปริมาณสารสกัดต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBD)

การวัดค่า MBD (Minimal Bactericidal Dose) จากอาหารแข็ง^[42,73, 74]

โดยนำสารสกัดใส่ลงในหลอดทดลองที่มีเชื้อในความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ซึ่งมีเชื้อ 1.5×10^8 CFU/ml นำมา spread บนอาหาร MHA 0.01 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผล ถ้าเชื้อเจริญบนอาหารน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 โคโลนี สามารถอ่านผลได้ว่าสารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้ โดยค่า MBD มีหน่วยเป็น mg ต่อปริมาณที่ใช้

- 4) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ^[51] นำค่าที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด ข้อ 3 มาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย (Analysis of Variance : ANOVA)

บทที่ 4
ผล และการวิเคราะห์ผลวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร

การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร 4 ชนิด มี โคลงเคลง ชะมวง บุงหาสำหรับ และฟิลังกาสา เก็บในจาก ตำบลเหมือง อำเภอมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี ซึ่งทั้งใบ และกิ่งสด น้ำหนักรวม 10 กิโลกรัม ในเดือนกันยายน ซึ่งตัวอย่างพืชถูกนำไปทำกายวิภาค และระบุชนิดของพืชจาก ดร.เบญจวรรณ ชิวปรีชา อาจารย์ประจำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ตารางที่ 1 บัญชีทะเบียนพันธุ์ไม้อ้างอิงในห้องปฏิบัติการสัณฐานวิทยาและกายวิภาคพืช (ESPreL 2-010-0073-4)

พืช	Habit	Family	Scientific name	Voucher specimen No.
ฟิลังกาสา, รามใหญ่	Shrub-Small tree	Primulaceae	<i>Ardisia elliptica</i> Thunb.	Buu-Cho/63-4
บุงหาสำหรับ	Shrub	Verbenaceae	<i>Citharexylum spinosum</i> L.	Buu-Cho/63-5
ชะมวง	Small tree	Clusiaceae	<i>Garcinia cowa</i> Roxb. ex Choisy	Buu-Cho/63-6
โคลงเคลง	Shrub	Melastomataceae	<i>Melastoma malabathricum</i> subsp. <i>malabathricum</i>	Buu-Cho/63-7

Buu = Burapha University

Cho = Chonburi Province (ชื่อย่อจังหวัดที่เก็บตัวอย่างพืชได้)

63 = ปีการศึกษา 2563

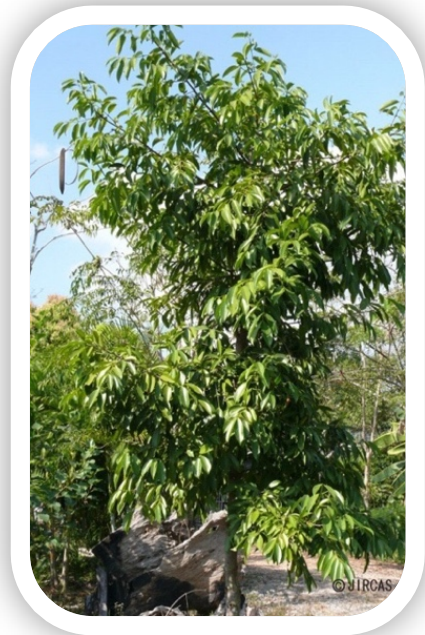
1-2 = ลำดับพันธุ์ไม้ที่ถูกระบุชนิดในโครงการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์



รูปที่ 1-2 : ลักษณะทั่วไปของต้นโคลงเคลง ที่มา: อมรรัตน์ และคณะ, 2559



รูปที่ 2 ลักษณะใบชะมวง



รูปที่ 4 ลักษณะต้นชะมวง



รูปที่ 3 ลักษณะผลชะมวง



รูปที่ 5: Flowering Fiddlewood,
Citharexylum spinosum Family.



รูปที่ 6-7: ลักษณะของใบบุหงาสำหรับ *Citharexylum spinosum*





รูปที่ 8 ลักษณะของใบพิลังกาสา



รูปที่ 9 ลักษณะดอกพิลังกาสา

4.2 ผลการเตรียมสารสกัด

ตารางที่ 2 น้ำหนักสารสกัด และผลได้เป็นร้อยละ (% yields)

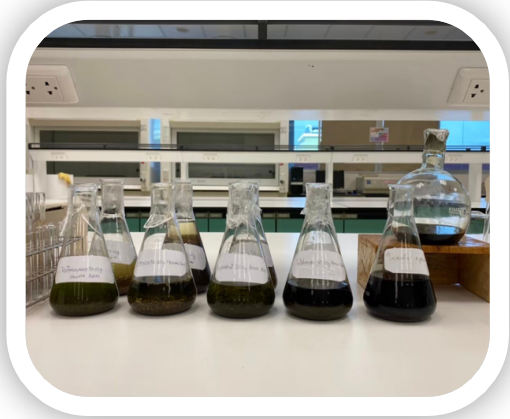
พืช	น้ำหนักพืช สมุนไพรแห้ง (g)	Hexane		Ethyl acetate		Methanol	
		น้ำหนัก สารสกัด (g)	Percent yields (%)	น้ำหนัก สารสกัด (g)	Percent yields (%)	น้ำหนัก สารสกัด (g)	Percent yields (%)
ต้นโคลงเคลง	50.03	0.1187	0.24	0.5216	1.04	0.5300	1.99
ต้นชะมวง	150.35	0.7484	0.49	0.7565	0.50	0.7617	0.51
ต้นพิลังกาสา	50.25	0.1555	0.31	0.6695	1.33	0.3600	0.72
ต้นบุหงา สำหรับ	50.19	1.7578	3.50	1.0249	2.04	1.3998	2.79
ใบโคลงเคลง	50.02	0.4094	0.82	0.9914	1.98	1.4500	2.90
ใบชะมวง	50.00	0.7785	1.55	0.9421	1.88	1.9782	3.96
ใบพิลังกาสา	50.03	2.3441	4.68	3.6072	7.21	1.4400	2.88
ใบบุหงา สำหรับ	50.06	1.3881	2.77	2.4070	4.81	4.8900	9.77

ใบ และกิ่งถูกนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ หรือนำไปบดให้ละเอียดด้วย hammer mill และ นำตัวอย่างสมุนไพรไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าตัวอย่างจะแห้ง นำตัวอย่างไปสกัดด้วยตัวทำละลาย *n*-hexane, ethyl acetate และ methanol เป็นเวลา 5 วัน และสกัดซ้ำ 2 ครั้งนำไปประเหย

แห้ง โดยเครื่อง Rotary evaporator ซึ่งน้ำหนักแต่ละส่วน เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จนกระทั่งนำไปทดสอบฤทธิ์ของการต้านเชื้อแบคทีเรีย



รูปที่ 10 การตากแห้ง



รูปที่ 11 การสกัดสาร

4.3 ผลการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

สารพฤกษเคมี	พืช							
	โคลงเคลง		ชะมวง		บุหงาส่าหรี		พื้งกาสา	
	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง
Coumarin	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoid	+	-	+	-	-	-	+	-
Tannin	-	+	+	-	+	-	-	-
Alkaloid	-	+	-	+	-	-	-	+
Cardiac glycoside	+	-	+	-	+	-	+	-
Anthraquinone	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponin	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) แปลว่าพบ; (-) แปลว่าไม่พบ

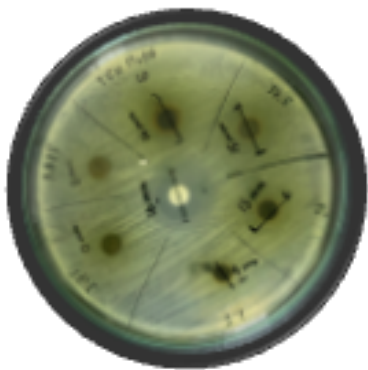
จากการศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นได้พบว่าในส่วนกิ่ง และใบของพืชทั้ง 4 ชนิดไม่มีสาร coumarin, anthraquinone และ saponin แล้วสำหรับสาร flavonoid จะพบในส่วนใบของต้นโคลงเคลง ชะมวง และ พื้งกาสา แล้ว tannin จะพบในส่วนใบของต้นชะมวง และบุหงาส่าหรี แล้วสามารถพบได้ในส่วนกิ่งของต้น โคลงเคลง แล้วสาร alkaloid จะอยู่ส่วนกิ่งของต้นโคลงเคลง ชะมวง และบุหงาส่าหรี สำหรับสาร cardiac glycoside จะพบในส่วนใบของพืชทั้ง 4 ตัว

4.4 การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพร

ตารางที่ 4 ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจากสารสกัด ในปริมาณ 20 mg/disc

ตัวอย่าง	ค่า Clear zone (Mean±SD ,n=3) (mm)					
	Hexane		Ethyl acetate		Methanol	
	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง
โคลงเคลง	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	13.83±1.89	13.00±0.00
ชะมวง	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	16.17±1.75	n.i.
บุหงาส่าหรี	n.i.	n.i.	n.i.	9.67±0.57	10.00±1.00	n.i.
พิลังกาสา	16.67±0.29	n.i.	20±0.00	n.i.	14.17±0.76	n.i.
DMSO	-	-	-	-	-	-

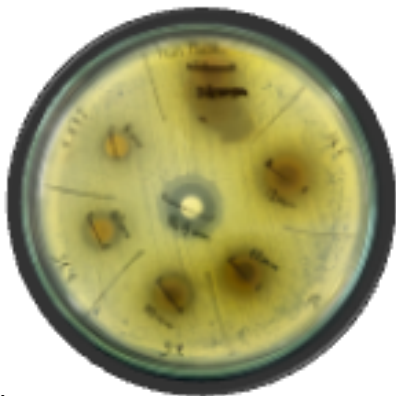
n.i. : no inhibition zone ; - : not performed



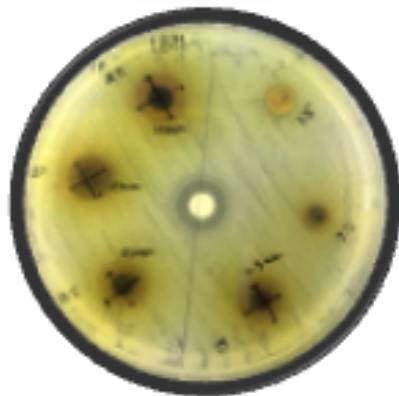
รูปที่ 12 clear zone จากสารสกัดใบชะมวง



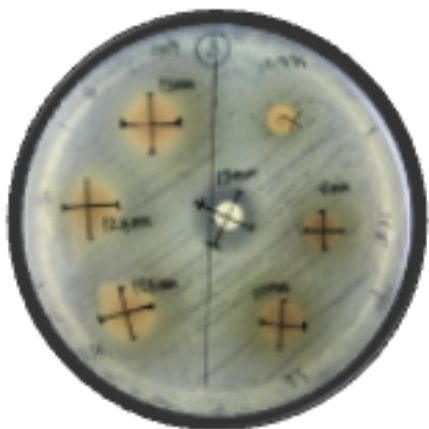
รูปที่ 13 clear zone จากสารสกัดใบโคลงเคลง



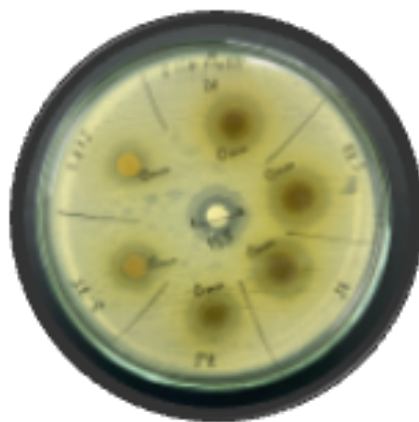
รูปที่ 14 clear zone จากสารสกัดใบพิลังกาสา



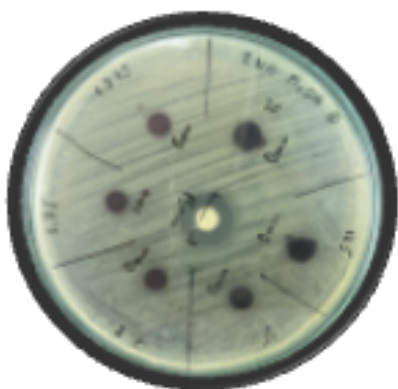
รูปที่ 15 clear zone จากสารสกัดใบบุหงาส่าหรี



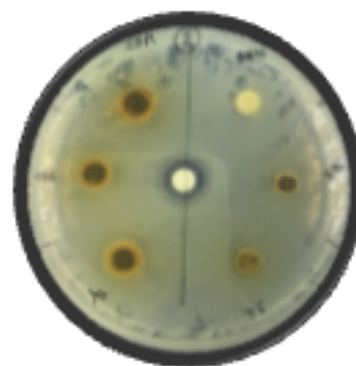
รูปที่ 16 clear zone จากสารสกัดกิงโคลงเคลง



รูปที่ 17 clear zone จากสารสกัดกิงชะมวง



รูปที่ 18 clear zone จากสารสกัดใบพลิงกาสา.



รูปที่ 19 clear zone จากสารสกัดใบบุหงาส่าหรี

ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดจากใบ และกิงของพืช 4 ชนิด ได้แก่ โคลงเคลง บุนหสาสำหรับ ชะมวง และพลิงกาสาโดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดในปริมาณ 20 mg/disc ของใบชะมวง พลิงกาสา โคลงเคลง และบุนหสาสำหรับมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจากมากไปน้อย โดยให้เส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone เฉลี่ยเท่ากับ 16.17 ± 1.75 , 14.17 ± 0.76 , 13.83 ± 1.89 และ 10.00 ± 1.00 mm ตามลำดับ แต่สารสกัดจากกิงของชะมวง บุนหสาสำหรับ และพลิงกาสาไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ โดยไม่มีการเกิด clear zone ขึ้น สำหรับสารสกัดในชั้น ethyl acetate พบว่ามีแค่สารสกัดของใบพลิงกาสา และกิงบุนหสาสำหรับที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยให้เส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone เฉลี่ยเท่ากับ 20 ± 0.00 และ 9.67 ± 0.57 mm ตามลำดับ ส่วนสารสกัด hexane พบว่ามีแค่สารสกัดจากใบพลิงกาสาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยให้เส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone เฉลี่ยเท่ากับ 16.67 ± 0.29 mm

เมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจากสารสกัดสมุนไพรทั้งหมดที่ได้ทำการทดสอบ พบว่าสารสกัดชั้น methanol ของใบชะมวง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด ซึ่งให้ผลทดลอง

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sakunpak และคณะในปี 2012 ได้ทำการทดสอบพืชที่สามารถนำมารับประทาน ได้ 22 ชนิด มาทดสอบกับเชื้อ *E.coli*, *Salmoella typhimurium*, *Salmonilla typhi*, *Shigella sonnei* และ *Helicobacter pylori* ซึ่งสารสกัดใบชะมวงของชั้น Methanol สามารถให้เส้นผ่านศูนย์กลาง 21.3 mm ในการยับยั้งเชื้อ *E.coli* โดยใช้ความเข้มข้น 1000 mg/ml 10 μ l ต่อ disc ซึ่งมีปริมาณของสารสกัด 10 mg ต่อ disc^[75] แล้วจากการศึกษาวิจัยในปี 2014 ของ Alias และคณะ ได้ทำการทดสอบองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของผล และใบพื้การสาได้แสดงให้เห็นว่าใบพื้การมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E.coli* น้อย โดยคิดเป็นร้อยละ 43.58% โดนให้เส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone เฉลี่ยอยู่ที่ 11.33 mm^[71] และ การศึกษาวิจัยของ Al-Abd และคณะ ในปี 2017 ได้ทำการทดสอบองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดของผล และใบพื้การสาจากตัวทำละลาย methanol ได้แสดงให้เห็นว่าไม่พบการยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli* เกิดขึ้น^[73] ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้ แล้วจากงานวิจัยของ Vincent และคณะ ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับโคลงเคลงในการยับยั้งเชื้อ *E.coli* โดยใช้ตัวทำละลายเป็น methanol พบว่ามีค่า clear zone อยู่ที่ 11.14 mm แล้วในส่วน กิ่งของโคลงเคลง สามารถยับยั้งการ เจริญเติบโตของเชื้อได้ โดยให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone เท่ากับ 13.00 $\pm$ 0.0 mm

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบหาค่า MID ของสารสกัดชั้น methanol จาก disc diffusion method

ตัวอย่าง	ค่า MID (mg/disc)	
	ใบ	กิ่ง
โคลงเคลง	3.75	3.75
ชะมวง	7.5	n.d.
บุหงาส่าหรี	3.75	n.d.
พื้การสา	3.75	n.d.

n.d. : not determined

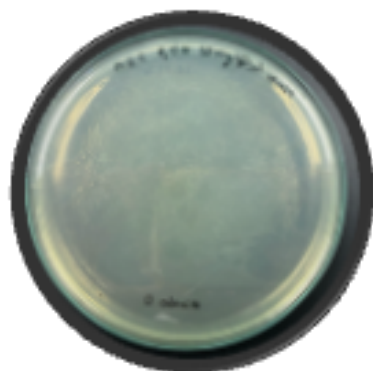
จากการฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในการหาค่าปริมาณสารสกัดต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อได้โดยเลือกเอาปริมาณสารสกัดต่ำที่สุดที่สามารถทำให้เห็น clear zone ได้ โดยใช้ disc diffusion method ที่ถูกดัดแปลงมาจาก Bobadilla *et al.* 2018 ซึ่งพบว่าใบโคลงเคลง บุหงาส่าหรี พื้การสา และกิ่งของโคลงเคลง ได้ค่า MID เท่ากับ 3.75 mg ใบชะมวงได้ค่า MID เท่ากับ 7.5 mm

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบหาค่า MBD ของสารสกัดชั้น methanol

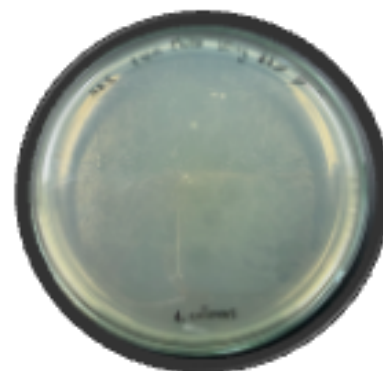
ตัวอย่าง	ค่า MBD	
	ใบ	กิ่ง
โคลงเคลง	n.d.	n.d.
ชะมวง	20 mg/ 50 μ l	n.d.

บุหงาสำหรับ	n.d.	n.d.
ฟิล์นกาสา	30 mg/ 60 µl	n.d.

n.d. : not determined



รูปที่ 20 การหาค่า MBD ของสารสกัดใบชะมวง



รูปที่ 21 การหาค่า MBD ของสารสกัดใบฟิล์นกาสา

จากการฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในการหาค่าปริมาณสารสกัดต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้โดยคิดเป็นค่า MBD จากการเอาปริมาณสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ดีที่สุดมาทดสอบต่อ โดยมีการผสมระหว่างสารสกัดกับเชื้อในปริมาตร 1:1 แล้วดูดสารผสมมา 10 µl แล้วนำมาป้ายบนอาหารแข็ง MHA และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดใบชะมวงที่มีปริมาณสารสกัด 20 mg มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโดยไม่ทำให้มีการเจริญเติบโตของเชื้อเลย ส่วนสารสกัดของใบฟิล์นกาสาที่มีปริมาณสารสกัด 30 mg ทำให้มีการเจริญเติบโตของเชื้อแค่ 4 โคโลนี

บทที่ 5

สรุปผลวิจัย และ ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของพืช 4 ชนิดเช่น โคลงเคลง ชะมวง บุนหาสำหรับ และปลิงกาสา ซึ่งเป็นตัวแทนของวัชพืช พืชผักที่กินได้ และไม้ประดับ ในพืชแต่ละชนิดเก็บส่วนของใบ และกิ่ง นำไปทดสอบกลุ่มสารพฤกษเคมี จากสารสกัดหยาบ methanol พบว่ามีสารพฤกษเคมีเช่น flavonoids tannin alkaloid และ cardiac glycoside ส่วนใหญ่สารกระจายอยู่ในใบของพืช จากการศึกษาการสกัดสารสกัดหยาบจากใบ และกิ่งของพืชทั้ง 4 ชนิดด้วยวิธีการการแช่หมัก (maceration) โดยใช้ตัวทำละลาย methanol พบว่าสารสกัดหยาบจากใบ และกิ่งของโคลงเคลง ชะมวง บุนหาสำหรับ และปลิงกาสาที่มีน้ำหนักแห้ง 50 g ยกเว้นต้นชะมวงใช้ 150 g จะได้ปริมาณสารสกัดหยาบจากส่วนใบเท่ากับ 1.4500, 1.9782, 1.4400 และ 4.8900 และส่วนกิ่งได้เท่ากับ 0.5300, 0.7617, 0.3600 และ 1.3998 ตามลำดับ นอกจากนี้การนำสารสกัดหยาบจากชิ้น methanol ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้เส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone เฉลี่ย ของใบชะมวง ปลิงกาสา โคลงเคลง บุนหาสำหรับ และกิ่งโคลงเคลง เท่ากับ 16.17 ± 1.75 , 14.17 ± 0.76 , 13.83 ± 1.89 10.00 ± 1.00 และ 13.00 ± 0.00 mm ตามลำดับ โดยใช้สารสกัดในปริมาณ 20 mg/disc ซึ่งถูกนำไปศึกษาหาค่า MBD พบว่าสารสกัดใบชะมวงที่มีปริมาณสารสกัด 20 mg และสารสกัดของใบปลิงกาสาที่มีปริมาณสารสกัด 30 mg เป็นปริมาณสารสกัดต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากใบชะมวง ปลิงกาสา โคลงเคลง และกิ่งของโคลงเคลงมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* ได้ ดังนั้นจึงสามารถนำมาพัฒนาต่อหอยอดงานวิจัย โดยการศึกษาการช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน โดยต้องศึกษาถึงประสิทธิภาพในการรักษาและความเป็นพิษที่จะเกิดขึ้นเพื่อความปลอดภัย และเป็นประโยชน์ในการผลิตเชิงพาณิชย์ต่อไป ถ้าพืชสมุนไพรสามารถช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันได้จริง จะเป็นการเพิ่มมูลค่าถึงผักพื้นบ้าน วัชพืช และไม้ประดับให้มีคุณค่ามากขึ้น ดังนั้นจึงอาจคิดค้นงานวิจัยอื่นๆ เพื่อเป็นการนำพืชทั้ง 4 ตัวนี้มาใช้ประมาณ
2. ควรศึกษาการวิจัยต่อยอดในเรื่องการแยกสกัดสารให้บริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบที่ให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด และการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

- [1] Balunas MJ, Kinghorn AD. 2005. Drug discovery from medicinal plants. Life Sciences. 78, 431 – 441.
- [2] Pan SY, Zhou SF, Gao SH, Yu ZL, Zhang SF, Tang MK, Sun JN, Ma DL, Han YF, Fong WF, Ko KM. 2013. New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. Hindawi Publishing Corporation Evidence Based Complementary and Alternative Medicine. 2013, 1-26.
- [3] Zhang, W. (2017). Phytochemical investigation and antimicrobial activity of the fruit extract of *Solanum incanum* grown in Eritrea. Ornamental= and Medicinal Plants, 1(1), 15-25.
- [4] Preidis, G. A., Hill, C., Guerrant, R. L., Ramakrishna, B. S., Tannock, G. W., and Versalovic, J. 2011. Probiotics, Enteric and Diarrheal Diseases, and Global Health. Gastroenterology. 140(1): 8-14.
- [5] Navaneethan, U., and Giannella, R. A. 2008. Mechanisms of Infectious Diarrhea. Nature Clinical Practice. Gastroenterology & hepatology. 5(11): 637-647.
- [6] โคลงเคลง สรรพคุณและประโยชน์ของต้นโคลงเคลง 24 ข้อ วันที่ 21 กุมภาพันธ์ 2014, UPDATED: 4 สิงหาคม 2017 เข้าถึง: [<https://medthai.com/โคลงเคลง/>] วันที่ 21 มิ.ย. 2020
- [7] Joffry, S. Mohd, et al. "*Melastoma malabathricum* (L.) smith ethnomedicinal uses, chemical constituents, and pharmacological properties: a review." Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012 (2012).
- [8] Danladi S, Wan-Azemin A, Sani YN, Mohd KS, US MR, Mansor SM, Dharmaraj S. Phytochemical screening, total phenolic and total flavonoid content, and antioxidant activity of different parts of *Melastoma malabathricum*. Jurnal Technology; 2015 Oct 28;77(2)
- [9] Lowry JB. The distribution and potential taxonomic value of alkylated ellagic acids. Phytochemistry. 1968;7(10):1803–1813.
- [10] Grosvenor PW, Supriono A, Gray DO. Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 2: antibacterial and antifungal activity. Journal of Ethnopharmacology. 1995;45(2):97–111.
- [11] Alnajar ZA, Abdulla MA, Ali HM, Alshawsh MA, Hadi AH. Acute toxicity evaluation, antibacterial, antioxidant and immunomodulatory effects of *Melastoma malabathricum*. Molecules. 2012 Mar;17(3):3547-59.
- [12] Choudhury MD, Nath D, Talukdar AD. Antimicrobial activity of *Melastoma malabathricum* L. Assam University Journal of Science and Technology. 2011 Apr 6;7(1):76-8.
- [13] Omar SN, Abdullah JO, Khairoji KA, Chin SC, Hamid M. Potentials of *Melastoma malabathricum* Linn. flower and fruit extracts as antimicrobial infusions. American Journal of Plant Sciences. 2012 Aug 1;3(8):1127-34.

- [14] Diris MN, Basri AM, Metali F, Ahmad N, Taha H. Phytochemicals and antimicrobial activities of *Melastoma malabathricum* and *Melastoma beccarianum* leaf crude extracts. Res J Phytochem. 2016;11(1):35-4
- [15] Wong KC, Hag Ali DM, Boey PL. Chemical constituents and antibacterial activity of *Melastoma malabathricum* L. Natural product research. 2012 Apr 1;26(7):609-18.
- [16] Mahabusarakam W, Chairerk P, Taylor WC. Xanthones from *Garcinia cowa* Roxb. latex. Phytochemistry 2005; 66: 1148-53.
- [17] Panthong K, Hutadilok-Towatana N, Panthong A. Cowaxanthone F, a new tetraoxygenated xanthone, and other anti-inflammatory and antioxidant compounds from *Garcinia cowa*. Can J Chem 2009; 87: 1636-40.
- [18] Negi PS, Jayaprakasha GK, Jena BS. Antibacterial activity of the extracts from the fruit rinds of *Garcinia cowa* and *Garcinia pedunculata* against food borne pathogens and spoilage bacteria. LWT-Food Science and Technology. 2008 Dec 1;41(10):1857-61.
- [19] Siridechakorn, I., Phakhodee, W., Ritthiwigrom, T., Promgool, T., Deachathai, S., Cheenpracha, S., Prawat, U. and Laphookhieo, S., 2012. Antibacterial dihydrobenzopyran and xanthone derivatives from *Garcinia cowa* stem barks. Fitoterapia, 83(8), pp.1430-1434.
- [20] Auranwiwat C, Trisuwan K, Saiai A, Pyne SG, Ritthiwigrom T. Antibacterial tetraoxygenated xanthones from the immature fruits of *Garcinia cowa*. Fitoterapia. 2014 Oct 1;98:179-83.
- [21] บุหงาส่าหรี เข้าถึง: [www.thairath.co.th/content/314329] วันที่ 20 ส.ค. 2020
- [22] บุหงาส่าหรี (*Citharexylum spinosum*) เข้าถึง: [www.dnp.go.th/botany/mindexdictdetail.aspx?runno=3118] วันที่ 20 ส.ค. 2020
- [23] Ajaib, Muhammad, et al. "Antimicrobial and antioxidant activity of *citharexylum spinosum*." Journal of the Chemical Society of Pakistan 39.2 (2017): 254-260.
- [24] *Citharexylum spinosum* เข้าถึง [www.tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=*Citharexylum+spinosum*] วันที่ 21 ส.ค. 2020
- [25] Kamal AM, Abdelhady MI, Tawfeek H, Haggag MG, Haggag EG. Phytochemical and biological analyses of *Citharexylum spinosum*. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. 2017 Dec 31;9(12):173-84.
- [26] Sahana BK, Dhanya Shree VS, Ayesha A, Noorain SG, Kekuda PT. Phytochemical Screening and in-vitro Antimicrobial Activity of *Citharexylum spinosum* L.(Verbenaceae). Int J Pharma Res Health Sci. 2018;6(4):S2750-4.
- [27] El Ayeib-Zakhama A, Harzallah-Skhiri F. Antifungal activity of *Citharexylum quadrangulare*

- Jacq. extracts against phytopathogenic fungi. African Journal of Microbiology Research. 2015 Jul 22;9(29):1764-9.
- [28] Mar A, Pripdeevech P. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil and extracts of *Citharexylum spinosum* flowers from Thailand. Natural product communications. 2014 May;9(5):1934578X1400900532.
- [29] Nanasombat S, Khanha K, Phan-im J, Jitaied J, Wannasomboon S, Patradisakorn S, Wongsil A. Antimicrobial and antioxidant activities of Thai local fruit extracts: application of a selected fruit extract, *Phyllanthus emblica* linn. as a natural preservative in raw ground pork during refrigerated storage. TOJSAT. 2012;2(1):1-7.
- [30] Chomsawan B, Thanasarn T, Waiyaka P, Jaikla S.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพของผักจ้ำ. KASALONGKHAM RESEARCH JOURNAL. 2017;11(3):1-9.
- [31] บุหงาส่าหรี เข้าถึง: [www.thairath.co.th/content/314329] วันที่ 20 ส.ค. 2020
- [32] บุหงาส่าหรี (*Citharexylum spinosum*) เข้าถึง: [www.dnp.go.th/botany/mindexdictdetail.aspx?runno=3118] วันที่ 20 ส.ค. 2020
- [33] Ajaib, Muhammad, et al. "Antimicrobial and antioxidant activity of citharexylum spinosum." Journal of the Chemical Society of Pakistan 39.2 (2017): 254-260.
- [34] *Citharexylum spinosum* เข้าถึง [www.tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Citharexylum+spinosum] วันที่ 21 ส.ค. 2020
- [35] รัตนา อินทรานุปกรณ์, การสกัดแยกและตรวจสอบสารสำคัญของสมุนไพรร. 2547.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- [36] Obouayeba, Abba Pacôme, et al. "Phytochemical analysis, purification and identification of Hibiscus anthocyanins." *J Pharm Chem Biol Sci* 3.2 (2015): 156-68.
- [37] Phytochemical Screening and Acute Toxicity Test of Luminescent Mushroom (*Neonothopanus nambi*) Extracts on Brine Shrimp Model เข้าได้ที่: <https://rsucon.rsu.ac.th/files/proceedings/nation2016/G1-10.pdf>
- [38] Evan, W.C. Trease and Evans Pharmacognosy 16th ed; W.D. Sauder: London, 2009.
- [39] ขวลิท สิทธิสมบัติ (2553). Tannin ในเทคนิคการสกัดแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและ การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี.เอกสารประกอบปฏิบัติการรายวิชาเภสัชเวท 1 ภาคเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- [40] อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. 2536. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 1. หน้า 86-96, 138-151.
- [41] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, 11 th ed. 2012. Pennsylvania: Wayne.
- [42] วาริรัตน์ หนูหิต. การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวสัมผัสโดยใช้สารสกัดจากพืช ตระกูลชิง (Doctoral dissertation, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

- [43] อรอนงค์ รัชตราเซนชัย. (2556). รายงานประจำปี 2556. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 51.
- [44] ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาคสอง) ว่าด้วยพฤกษชาติวัตถุธาตุ และ สัตว์วัตถุยานาชนิดของแพทย์แผนโบราณ 2520, หน้า 1.
- [45] Shen J, Yang J. Chemical constituents of branch of *Garcinia cowa* Roxb. *Zhongcaoyao* 2007;38:993–4.
- [46] Shen J, Yang J. Chemical constituents from fruit of *Garcinia cowa*. *Zhongguo Yaoxue Zazhi* 2006;41:660–1.
- [47] Panthong K, Pongcharoen W, Phongpaichit S, Taylor WC. Tetraoxygenated xanthenes from the fruits of *Garcinia cowa*. *Phytochemistry*. 2006. 67(10):999-1004.
- [48] ปิยศิริ สุนทรนนท์, อุบล ต้นสม, สมภาพ เกาทอง. การศึกษากิจกรรมต้านออกซิเดชันจากส่วนต่างๆของผล พิลังกาสา.
- [49] ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาคสอง) ว่าด้วยพฤกษชาติวัตถุธาตุ และ สัตว์วัตถุยานาชนิดของแพทย์แผนโบราณ 2520, หน้า 223.
- [50] Panthong K, Pongcharoen W, Phongpaichit S, Taylor WC. Tetraoxygenated xanthenes from the fruits of *Garcinia cowa*. *Phytochemistry* 2006;67:999–1004.
- [51] Shen J, Tian Z, Yang JS. The constituents from the stems of *Garcinia cowa* Roxb. And their cytotoxic activities. *Pharmazie* 2007;62:549–51.
- [52] Mahabusarakam W, Chairerk P, Taylor WC. Xanthenes from *Garcinia cowa* Roxb. latex. *Phytochemistry* 2005;66:1148–53.
- [53] Cheenpracha S, Phakhodee W, Ritthiwigrom T, Prawat U, Laphookhieo S. A new depsidone from the twigs of *Garcinia cowa*. *Heterocycles* 2011;83:
- [54] Trisuwan K, Ritthiwigrom T. Benzophenone and xanthone derivatives from the inflorescences of *Garcinia cowa*. *Arch Pharm Res* 2012;35:1733–8.
- [55] Xu G, Kan WLT, Zhou Y, Song JZ, Han QB, Qiao CF, et al. Cytotoxic acylphloroglucinol derivatives from the twigs of *Garcinia cowa*. *JNatProd* 2010;73:104–8.
- [56] Shen J, Yang JS. A novel benzophenone from *Garcinia cowa*. *Huaxue Xuebao* 2007;65:1675–8.
- [57] Sriyatep T, Maneerat W, Sripisut T, Cheenpracha S, Machan T, Phakhodee W, et al. Cowabenzophenones A and B, two new tetracyclo[7.3.3.3.11.03,7]tetradecane-2,12,14-trione derivatives, from ripe fruits of *Garcinia cowa*. *Fitoterapia* 2014;92:285–9.
- [58] Sakunpak A, Panichayupakaranant P. Antibacterial activity of Thai edible plants against gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone. *Food Chem* 2012;130:826–31.
- [59] Panthong K, Hutadilok-Towatano N, Panthong A. Cowaxanthone F, a new tetraoxygenated xanthone, and other anti-inflammatory and antioxidant compounds from *Garcinia cowa*. *Can J Chem* 2009;87:1636–40.

- [60] Shen J, Yang J. Chemical constituents from fruit of *Garcinia cowa*. *Zhongguo Yaoxue Zazhi* 2006;41:660–1.
- [61] Shen J, Yang J. Chemical constituents of branch of *Garcinia cowa* Roxb. *Zhongcaoyao* 2007;38:993–4.
- [62] Koop, A. L. (2004). Differential seed mortality among habitats limits the distribution of the invasive non-native shrub *Ardisia elliptica*. *Plant Ecology* 172(2): 237- 249.
- [63] Carr, G. D. (2005). *Myrsinaceae*.
- [64] FLEPPC. (2010). *Ardisia elliptica* Thunb. จรก
http://www.fleppc.org/ID_book/ardidia%20elliptica.pdf
- [65] Koh, H. L.; Chua, T. K.; Tan, C. H. A Guide to Medicinal Plant, An Illustrated, Scientific and Medicinal Approach. Singapore: World Scientific Publishing, 2009; vol. 1, p. 67.
- [66] Herbal Medicine Research Centre (HMRC) and Institute for Medicinal Research. Compendium of Medicinal Plants used in Malaysia. In: Ahmad Z., Lim H.H., Mohamed A.F.S. Eds.; Kuala Lumpur, Malaysia, 2002, p. 198.
- [67] Chow, P. W., Sim, K. Y., Lim, P. L. and Chung, V. C. (1991). Constituents of *Ardisia elliptica*; ¹³C-NMR and mass spectra of rapanone and related quinines. *Bulletin (Singapore National Institute of Chemistry)* 19: 87-93.
- [68] Liu, N., Li, Y., Gua, J. and Qian, D. (1993). Studies on the taxonomy of the genus *Ardisia* (Myrsinaceae) from China and the occurrence and quantity of Bergenin in the genus. *Acta Academiae Medicinae Shanghai* 20: 49–54.
- [69] Phadungkit, M. and Luanratana, O. (2006). Anti-Salmonella activity of constituents of *Ardisia elliptica* Thunb. *Nat Prod Res* 20(7): 693-696.
- [70] Ahmad, S. A., Catalano, S., Marsili, A., Morelli, I. and Scartoni, V. (1977). Chemical examination of the leaves of *Ardisia solanacea*. *Planta Medica* 32(2): 162-164.
- [71] Alias NZ, Kamisah N, Ishak M. Chemical Constituents and Bioactivity Studies of *Ardisia elliptica*. In *The Open Conference Proceedings Journal* 2014 May 30 (Vol. 5, No. 1).
- [72] Phadungkit M, Luanratana O. Anti-Salmonella activity of constituents of *Ardisia elliptica* Thunb. *Natural product research*. 2006 Jun 1;20(7):693-6.
- [73] Al-Abd NM, Nor ZM, Mansor M, Zajmi A, Hasan MS, Azhar F, Kassim M. Phytochemical constituents, antioxidant and antibacterial activities of methanolic extract of *Ardisia elliptica*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2017 Jun 1;7(6):569-76.
- [74] Bobadilla FJ, Novosak MG, Winnik DL, Kachuk AV, Laczeski ME, Quiroga MI. Antibacterial activity and toxicity of the ethanolic extract of *Eugenia Uniflora* L. Leaves On *Pseudomonas Aeruginosa*. 2018
- [75] Sakunpak A, Panichayupakaranant P. Antibacterial activity of Thai edible plants against gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone. *Food Chemistry*. 2012 Feb 15;130(4):82

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone เฉลี่ยของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจากสารสกัดชั้น hexane

ความเข้มข้นสารสกัด (mg/ml)	ค่า Clear zone (Mean±SD ,n=3) (mm)							
	โคลงเคลง		บุหงาส่าหรี		ชะมวง		พลึงกาสา	
	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง
400	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
200	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
100	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
50	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
25	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
12.5	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

n.i. : no inhibition zone

ตารางที่ 2 เส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone เฉลี่ยของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจากสารสกัดทั้ง ethyl acetate

ความเข้มข้นสารสกัด (mg/ml)	ค่า Clear zone (Mean±SD ,n=3) (mm)							
	โคลงเคลง		บุหงาส่าหรี		ชะมวง		พลึงกาสา	
	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง
400	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
200	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
100	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
50	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
25	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
12.5	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

n.i. : no inhibition zone

ตารางที่ 3 เส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone เฉลี่ยของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจากสารสกัดทั้ง methanol

ความเข้มข้นสารสกัด (mg/ml)	ค่า Clear zone (Mean±SD ,n=3) (mm)							
	โคลงเคลง		บุหงาส่าหรี		ชะมวง		พื้งกาสา	
	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง
400	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
200	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
100	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
50	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
25	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
12.5	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

n.i. : no inhibition zone

ตารางที่ 1-3 เป็นตารางการทดสอบการหาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่ใช้วิธีที่ยังไม่ได้ตัดแปลงจาก Wayne PA. และคณะในปี 2012 ซึ่งไม่สามารถแสดงผลในการยับยั้งเชื้อจากสารสกัดพืชได้เหมือนวิธีที่ถูกตัดแปลงแล้ว

ตารางที่ 4 เส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone เฉลี่ยของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจากสารสกัด hexane

ปริมาณสารสกัดต่อ disc (mg)	ค่า Clear zone (Mean±SD ,n=3) (mm)							
	โคลงเคลง		บุหงาส่าหรี		ชะมวง		พื้งกาสา	
	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง
1.875	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	0±0.00	n.i.
3.75	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	8±0.00	n.i.
7.5	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	14.67±0.57	n.i.
15	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	15.83±0.29	n.i.
17.5	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	16.33±0.58	n.i.
20	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	16.67±0.29	n.i.

n.i. : no inhibition zone

ตารางที่ 5 เส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone เฉลี่ยของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจากสารสกัด ethyl acetate

ปริมาณ สารสกัด ต่อ disc (mg)	ค่า Clear zone (Mean±SD ,n=3) (mm)							
	โคลงเคลง		บุหงาสำหรับ		ชะมวง		ปลั่งกาสา	
	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง
1.875	n.i.	n.i.	n.i.	6.67±0.57	n.i.	n.i.	14±0.00	n.i.
3.75	n.i.	n.i.	n.i.	7.33±0.57	n.i.	n.i.	15.83±0.29	n.i.
7.5	n.i.	n.i.	n.i.	7.67±0.57	n.i.	n.i.	15.83±0.29	n.i.
15	n.i.	n.i.	n.i.	8.33±0.57	n.i.	n.i.	18±0.00	n.i.
17.5	n.i.	n.i.	n.i.	7.67±0.57	n.i.	n.i.	19±0.00	n.i.
20	n.i.	n.i.	n.i.	9.67±0.57	n.i.	n.i.	20±0.00	n.i.

n.i. : no inhibition zone

ตารางที่ 6 เส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone เฉลี่ยของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจากสารสกัด methanol

ปริมาณ สารสกัด ต่อ disc (mg)	ค่า Clear zone (Mean±SD ,n=3) (mm)							
	โคลงเคลง		บุหงาสำหรับ		ชะมวง		ปลั่งกาสา	
	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง	ใบ	กิ่ง
1.875	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
3.75	8.67±2.08	8.00±0.00	7.00±1.00	n.i.	n.i.	n.i.	8.33±1.52	n.i.
7.5	9.67±2.51	10.50±0.50	7.66±0.57	n.i.	9.67±2.08	n.i.	10±0.00	n.i.
15	12.67±2.08	10.66±0.76	8.66±0.57	n.i.	12.17±2.84	n.i.	11.5±1.32	n.i.
17.5	13.17±1.60	12.16±0.28	9.66±0.57	n.i.	13.50±2.50	n.i.	12.83±1.04	n.i.
20	13.83±1.89	13.00±0.00	10.00±1.00	n.i.	16.17±1.75	n.i.	14.17±0.76	n.i.

n.i. : no inhibition zone

รายงานสรุปการเงิน
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมี และฤทธิ์การต้านเชื้อ *Escherichai coli* จากสารสกัดหยาบ
ใบ และกิ่งจากต้นโคลงเคลง ชะมวง บุนหงาสำหรับ และพิลังกาสา

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อ.ดร.สุนันต์ ใจสมุทร

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 2 มิถุนายน 2563 ถึง 2 เมษายน 2564

ระยะเวลาดำเนินการ 11 เดือน ตั้งแต่วันที่ 2 มิถุนายน 2563 ถึง 2 เมษายน 2564

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100 %) 6,000 บาท เมื่อ 17 กุมภาพันธ์ 2564

รายจ่าย

รายงาน	งบประมาณ ที่ตั้งไว้	งบประมาณ ที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
1. ค่าสารเคมี	6,000	6,235	-235
2. ค่าโปสเตอร์	0	300	-300
รวม	6,000	6,535	-535

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย