



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ประโยชน์ทางเภสัชกรรมของพืชสมุนไพรภาคตะวันออกของประเทศไทย

Pharmaceutical application of medicinal plant in eastern part of
Thailand

โดย

นสภ. วรปรัชญ์ ศิริสาคร 60210042

นสภ. มนต์ปริยา แหลมสมุทร 60210135

นสภ. ศศินิภา ดิเรกรุ่งเรือง 60210141

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ประโยชน์ทางเภสัชกรรมของพืชสมุนไพรภาคตะวันออกของประเทศไทย

Pharmaceutical application of medicinal plant in eastern part of
Thailand

โดย

นสภ. วรปรัชญ์ ศิริสาคร 60210042

นสภ. มนต์ปริยา แหลมสมุทร 60210135

นสภ. ศศินิภา ดิเรกรุ่งเรือง 60210141

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่พบได้ตามส่วนต่างๆ ของร่างกายมนุษย์สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อทางผิวหนังได้ ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีการใช้ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อราในการรักษาการติดเชื้อทางผิวหนังอย่างไม่สมเหตุสมผลและเกินความจำเป็นจนทำให้เกิดการดื้อยา จึงกลายเป็นปัจจัยที่สำคัญทำให้มีการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาพัฒนาเพื่อใช้ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้มีความสนใจที่จะนำกระทือ ซึ่งเป็นพืชทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาทำการสกัด เพื่อนำสารสกัดมาทำการศึกษาสารประกอบในกระทือและศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกระทือเพื่อหาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์การต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบที่จะสามารถมาทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อราในปัจจุบันได้หรือไม่ และอาจทำการศึกษาเพื่อพัฒนาสูตรตำรับและใช้สารสกัดกระทือในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราทดแทนยาที่ใช้ปัจจุบันและอนาคตได้

คณะผู้จัดทำ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2563

เรื่อง ประโยชน์ทางเภสัชกรรมของพืชสมุนไพรภาคตะวันออกของประเทศไทย

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ. วรปรัชญ์	ศิริสาคร	รหัสนิติ	60210042
2. นสภ. มนต์ปรียา	แหลมสมุทร	รหัสนิติ	60210135
3. นสภ. ศศิณีภา	ดิเรกรุ่งเรือง	รหัสนิติ	60210141

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ญ.ผศ.ดร. ธนิกานต์ แสงนิ่ม (ที่ปรึกษาหลัก)
2. ภ.รศ.ดร. กัมปนาท หวลบุตรตา (ที่ปรึกษาร่วม)

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังยังคงเป็นปัญหาสำคัญของระบบสาธารณสุขไทย แม้จะมียาฆ่าเชื้อจุลชีพแต่เนื่องด้วยปัญหาจากการที่เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราดื้อยามากขึ้น รวมถึงการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ลดลง และพบว่ายาฆ่าเชื้อจุลชีพมักมีผลข้างเคียงมาก การใช้สารสกัดจากธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหาดังกล่าว หนึ่งในสมุนไพรที่มีรายงานการใช้ในภาคตะวันออกของประเทศไทยในการยับยั้งเชื้อจุลชีพคือเหง้ากระเทียม *Zingiber zerumbet* (L.) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของวิธีการสกัดและชนิดของตัวทำละลายในการสกัด วิเคราะห์สารบ่งคุณภาพ และศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่าง ๆ จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.aureus*, *S.epidermidis* และ *C.albicans* ได้ สารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนและส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.aureus* โดยมีค่า MBC 0.01562 และ 0.03125 mg/mL ตามลำดับ ของเชื้อ *S.epidermidis* ทั้งสองส่วนสกัดมีค่า MBC 0.03125 mg/mL และของเชื้อ *C.albicans* ทั้งสองส่วนสกัดมีค่า MFC 0.0625 mg/mL ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay และ DPPH assay พบว่าส่วนสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาคือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน และส่วนสกัดเฮกเซน การประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบเบื้องต้นด้วยวิธียับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (protein denaturation) พบว่าสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดต่าง ๆ มีฤทธิ์ต้านอักเสบ การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดต่าง ๆ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในช่วงความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ คือ 1- 0.0078 mg/mL จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำสาร

สกัดจากเหง้ากระเทียมซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้เป็นสารสำคัญในเภสัชภัณฑ์เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียได้

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

Senior project academic year 2020

: Pharmaceutical application of medicinal plant in eastern part of Thailand by

- | | |
|----------------------------------|-------------|
| 1. Mister Worraphatch Sirisakorn | ID 60210042 |
| 2. Miss Monpariya Lamsamoot | ID 60210135 |
| 3. Miss Sasinipa Diregrungruang | ID 60210141 |

Advisor

1. Associate Professor Tanikan Sangnim, Ph.D
2. Associate Professor Kampanart Huanbutta, Ph.D

ABSTRACT

In Thailand, fungal and bacterial skin diseases are still major public health concerns. Despite the fact that there are numerous antimicrobial medications accessible, antibiotic resistance remains a problem. Furthermore, fewer new chemically discovered medicines, as well as their side effects, are cause for concern. As a result, identifying and utilizing natural chemicals is another alternative for resolving these issues. The rhizome of *Zingiber zerumbet* (L.) is one of the herbs that has been claimed to have been used as an antibiotic in Thailand's eastern area. As a result, the goal of this research is to develop an appropriate extraction method and solvents for rhizome of *Zingiber zerumbet* (L.). After that, the extract's biomarkers and various pharmacological activity were determined. The results showed that the ethanol

extracts had no effect on the growth of *S.aureus*, *S.epidermidis*, or *C.albicans*, whereas the hexane and dichloromethane extracts had MBC of 0.01562 and 0.03125 mg/mL for *S.aureus*, respectively. The MBC and MFC of hexane and dichloromethane extracts from *S. epidermidis* and *C. albicans* were 0.03125 mg/mL and 0.0625 mg/mL, respectively. The ethanol extracts outperformed the dichloromethane and hexane extracts in terms of antioxidant activity as measured by the ABTS and DPPH assays. Furthermore, the extracts showed anti-inflammatory properties, as determined by a protein denaturation test. Finally, the cytotoxicity assay of *Zingiber zerumbet* (L.) rhizome extract indicated nontoxicity at concentration range of 1–0.0078 mg/mL. These findings suggest that extract from the rhizome of *Zingiber zerumbet* (L.) could be employed to develop an antimicrobial medicine in the future.

Major Advisor

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยบูรพา เพื่อสนับสนุนการทำวิจัยแก่บุคลากรของมหาวิทยาลัยบูรพา คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจาก ภก.รศ.ดร. กัมปนาท หวลบุตตา และภญ.ผศ.ดร.ธนิกานต์ แสงนิม ที่คอยให้คำปรึกษา ช่วยแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้ รวมไปถึงการตรวจสอบ แก้ไขการเขียนโครงการวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงตามเป้าหมาย

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับเครื่องมือ อุปกรณ์และห้องปฏิบัติการวิจัยด้านเทคโนโลยีเภสัชกรรม รวมถึงผู้ช่วยวิจัย นางสาววิภาดา ศิริตันหยง ที่ช่วยดำเนินการวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อ	ข
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	5
โรคติดเชื้อที่ผิวหนัง	5
ข้อมูลทั่วไปของกระทือ	7
การสกัดสารจากเหง้ากระทือ	10
การวิเคราะห์สารบ่งคุณภาพในสารสกัดเหง้ากระทือด้วย HPLC	11
องค์ประกอบทางเคมี	12
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกระทือ	15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	20
สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	20
วิธีการดำเนินการวิจัย	21
บทที่ 4 ผลการวิจัย	34
การเตรียมสารสกัดจากเหง้ากระทือ	34
การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของเหง้ากระทือด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)	36
การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย	41
การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา	49
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	52
การทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบ	64
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	67

บทที่ 5 สรุปและการวิจารณ์ผลการวิจัย	70
การเตรียมสารสกัดจากเหง้ากระทือ	70
การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของเหง้ากระทือ ด้วยเทคนิค	70
โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)	
การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย	70
การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา	72
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	72
การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ	73
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	74
เอกสารอ้างอิง	76
ภาคผนวก	80

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การศึกษาองค์ประกอบของสารในกระเทียม	14
ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบ flavonoid ของสารที่สกัดจากกระเทียม	15
ตารางที่ 3 วิธีการทดสอบหาค่า MIC ของเชื้อแบคทีเรีย	24
ตารางที่ 4 วิธีการทดสอบหาค่า MIC ของเชื้อรา	27
ตารางที่ 5 แสดงปริมาณสารสกัดแห้งจากกระเทียมส่วนสกัดต่าง ๆ	35
ตารางที่ 6 ปริมาณสาร Zerumbone ในสารสกัดแห้งจากกระเทียมส่วนสกัดเอทานอล	39
ตารางที่ 7 ปริมาณสาร Zerumbone ในสารสกัดแห้งจากกระเทียมส่วนสกัดเฮกเซน	40
ตารางที่ 8 ปริมาณสาร Zerumbone ในสารสกัดแห้งจากกระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน	40
ตารางที่ 9 แสดงผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดแห้งจากกระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย	41
ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดแห้งจากกระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย	43
ตารางที่ 11 แสดงผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดแห้งจากกระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย	44
ตารางที่ 12 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดแห้งจากกระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>Staphylococcus epidermidis</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i>	46
ตารางที่ 13 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดแห้งจากกระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>Staphylococcus epidermidis</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i>	47
ตารางที่ 14 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดแห้งจากกระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่สามารถฆ่าเชื้อ <i>Staphylococcus epidermidis</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i>	48
ตารางที่ 15 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดแห้งจากกระเทียมส่วนสกัดต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Candida albicans</i>	49
ตารางที่ 16 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดแห้งจากกระเทียมส่วนสกัดต่าง ๆ ที่สามารถฆ่าเชื้อรา <i>Candida albicans</i>	51

ตารางที่ 17 แสดงค่า % ABTS radical scavenging activity ของสารละลาย มาตรฐาน Gallic acid	52
ตารางที่ 18 ค่า IC50 ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid	53
ตารางที่ 19 แสดงค่า % ABTS radical scavenging activity ของสารสกัดส่วน เอทานอล	53
ตารางที่ 20 แสดงค่า IC50 ของสารสกัดแห้งกระทือส่วนสกัดเอทานอล	54
ตารางที่ 21 แสดงค่า % ABTS radical scavenging activity ของสารสกัดส่วน เฮกเซน	55
ตารางที่ 22 แสดงค่า IC50 ของสารสกัดแห้งกระทือส่วนสกัดเฮกเซน	56
ตารางที่ 23 แสดงค่า % ABTS radical scavenging activity ของสารสกัดส่วน ไดคลอโรมีเทน	56
ตารางที่ 24 แสดงค่า IC50 ของสารสกัดแห้งกระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน	57
ตารางที่ 25 แสดงค่า % DPPH radical scavenging activity ของสารละลาย มาตรฐาน Gallic acid	58
ตารางที่ 26 แสดงค่า ค่า IC50 ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid	58
ตารางที่ 27 แสดงค่า % DPPH radical scavenging activity ของสารสกัดส่วน เอทานอล	59
ตารางที่ 28 แสดงค่า IC50 ของสารสกัดแห้งกระทือส่วนสกัดเอทานอล	60
ตารางที่ 29 แสดงค่า % DPPH radical scavenging activity ของสารสกัดส่วน เฮกเซน	60
ตารางที่ 30 แสดงค่า IC50 ของสารสกัดแห้งกระทือส่วนสกัดเฮกเซน	61
ตารางที่ 31 แสดงค่า % DPPH radical scavenging activity ของสารสกัดส่วน ไดคลอโรมีเทน	62
ตารางที่ 32 แสดงค่า IC50 ของสารสกัดแห้งกระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน	63
ตารางที่ 33 แสดงค่า % inhibition of denaturation ของสารมาตรฐาน Diclofenac	63
ตารางที่ 34 แสดงค่า IC50 ของสารละลายมาตรฐาน Diclofenac	64
ตารางที่ 35 แสดงค่า % inhibition of denaturation ของสารสกัดแห้งกระทือส่วน เอทานอล	65
ตารางที่ 36 แสดงค่า % inhibition of denaturation ของสารสกัดแห้งกระทือส่วน เฮกเซน	66

ตารางที่ 37 แสดงค่า % inhibition of denaturation ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วน ไคคโลโรมีเทน	66
ตารางที่ 38 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนเอทานอล	67
ตารางที่ 39 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนเฮกเซน	68
ตารางที่ 40 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนไคคโลโรมีเทน	69

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ลำต้นและดอกของกระทือ	8
รูปที่ 2 เหง้าสดของกระทือ	8
รูปที่ 3 ลำต้นของกระทือ	9
รูปที่ 4 ดอกของกระทือ	10
รูปที่ 5 ดอกและผลของกระทือ	10
รูปที่ 6 แสดงวิธีการสกัดสารจากกระทือ	11
รูปที่ 7 Viable lymphocyte cells at different concentration of ZZ by trypan blue assay Significantly different from control ($p \leq 0.05$)	19
รูปที่ 8 แสดงลักษณะของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอล	34
รูปที่ 9 แสดงลักษณะของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซน	34
รูปที่ 10 แสดงลักษณะของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน	35
รูปที่ 11 โคโรมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/mL}$	36
รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Zerumbone จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC	37
รูปที่ 13 โคโรมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่ 1	37
รูปที่ 14 โคโรมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซนที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่ 1	38
รูปที่ 15 โคโรมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่ 1	38
รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานแสดงค่า % inhibition of denaturation กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Diclofenac ครั้งที่ 1	64

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis* และ *Candida albicans* จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่สามารถพบได้ตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายคนปกติบริเวณผิวหนัง ภายในรูจมูก หรือติดอยู่บนเสื้อผ้า การกระจายของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราชนิดนี้สามารถเกิดจากการสัมผัส รวมถึงการใช้สิ่งของร่วมกับผู้อื่น หากเกิดการติดเชื้อดังกล่าวสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังรุนแรงได้ เช่น การติดเชื้อที่แผลผ่าตัด แผลถลอก แผลกดทับ หรือการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องจึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อราในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียและการติดเชื้อราที่ผิวหนัง แต่ในปัจจุบันพบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะและยาต้านเชื้อราอย่างไม่สมเหตุผลและเกินความจำเป็นจนทำให้เกิดการดื้อยา จึงกลายเป็นปัจจัยที่สำคัญทำให้มีการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาพัฒนาเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

หนึ่งในสารสกัดจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา มีฤทธิ์รักษาบาดแผลได้ดี และมีแนวโน้มในการนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้คือสารสกัดจากกระเทียม *Zingiber zerumbet* (L.) เป็นพืชสมุนไพรที่พบอยู่ภาคตะวันออกของประเทศไทย ซึ่งกระเทียมเป็นไม้ล้มลุก มีลำต้นเหนือดิน ลักษณะภายนอกของต้นกระเทียมลำต้นเป็นเหง้าใต้ดินสีเหลือง เนื้อภายในมีสีเทา ปนเหลืองอ่อน มีรสขม และเผ็ดเล็กน้อย สามารถเติบโตและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว ปัจจุบันจะมีงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่ากระเทียมเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจและหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ลดความดันโลหิต

อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากกระเทียมออกจำหน่ายในท้องตลาดที่น้อย ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงสนใจพัฒนาและประเมินผลิตภัณฑ์สำหรับนำส่งสารสกัดกระเทียมทางผิวหนังเพื่อเป็นแนวทางสำหรับการจำหน่ายเชิงพาณิชย์ ซึ่งนอกจากจะมีประโยชน์โดยตรงต่อผู้บริโภคที่จะมีผลิตภัณฑ์รักษาบาดแผลทางเลือกที่ได้จากสารสกัดจากธรรมชาติแล้ว ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของกระเทียมและเพื่อเพิ่มศักยภาพในด้านการแข่งขันของผู้ประกอบการอีกด้วย

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของวิธีการสกัดและชนิดของตัวทำละลายที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดเหง้ากระทือ
2. ศึกษาสารบ่งคุณภาพของสารสกัดเหง้ากระทือ
3. ศึกษาฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดเหง้ากระทือ
4. ศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดเหง้ากระทือ
5. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระทือ
6. ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือ

ทฤษฎีและสมมติฐานของการวิจัย

สารสกัดเหง้ากระทือมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

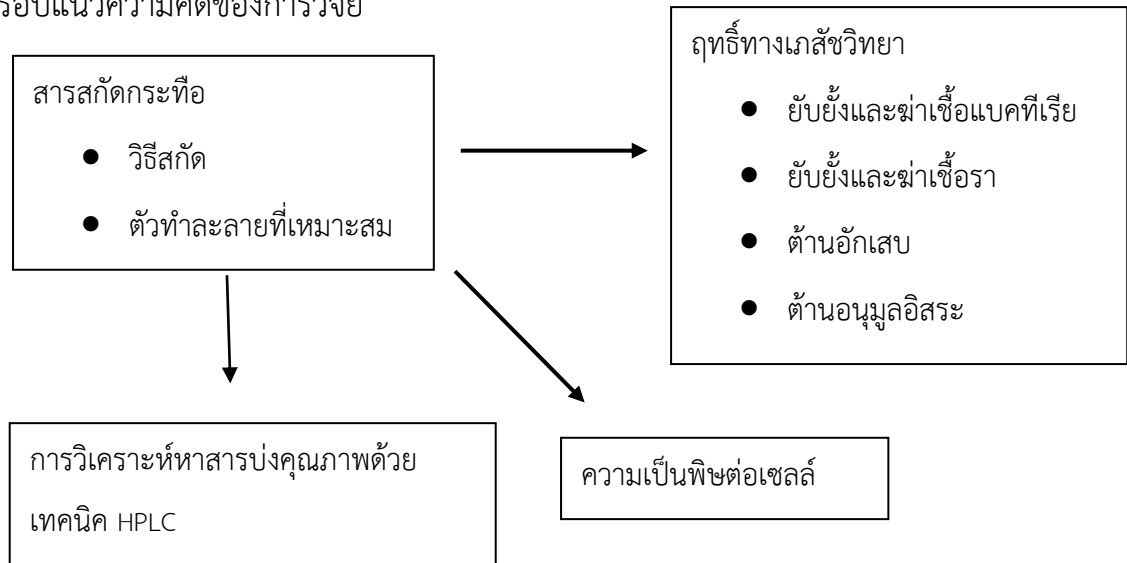
ขอบเขตของโครงการวิจัย

รวบรวมข้อมูลและทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง หาวิธีสกัดสารสำคัญจากกระทือที่เหมาะสมวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ ประเมินสมบัติทางเคมีกายภาพสารสกัดที่ได้ ทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ การยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย การยับยั้งและฆ่าเชื้อรา การลดการอักเสบ การต้านอนุมูลอิสระ ความเป็นพิษต่อเซลล์

สถานที่ทำการวิจัย

ในประเทศ/ ต่างประเทศ	ชื่อประเทศ/จังหวัด	พื้นที่ที่ทำวิจัย	ชื่อสถานที่
ในประเทศ	ชลบุรี	ห้องปฏิบัติการ	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กรอบแนวความคิดของการวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิดตัวทำละลายและวิธีการสกัดแห้งกระเทียมที่เหมาะสม
2. ทราบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดกระเทียม
3. สนับสนุนการใช้สมุนไพรในพื้นที่ของภาคตะวันออกเพื่อพัฒนาเป็นเภสัชภัณฑ์ ซึ่งเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าของพืชสมุนไพรได้
4. ลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศ

การนำไปใช้ประโยชน์ในด้าน

- ด้านวิชาการ
- ด้านนโยบาย
- ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์/อุตสาหกรรม
- ด้านสังคมและชุมชน

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ด้านวิชาการ นิสิต/นักวิชาการ/ประชาชนทั่วไป สามารถได้รับองค์ความรู้ที่เผยแพร่ผ่านการนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ รวมถึงตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

นิยามศัพท์

Zingiber zerumbet (L.) Roscoe ex Sm. คือ กระเทียม วงศ์ Zingiberaceae

Gallic acid คือ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic acid) ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านเชื้อจุลินทรีย์

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

2.1 โรคติดเชื้อที่ผิวหนัง

2.1.1 แบคทีเรียก่อโรคที่ผิวหนัง

แบคทีเรียที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง ได้แก่

2.1.1.1 *Staphylococcus aureus* (1)

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีรูปร่างกลม 0.5–1.0 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงอุ้งน แต่อาจจะพบเป็นเชลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ เรียงติดกัน ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ลักษณะโคโลนีขนาดเล็ก ขอบเรียบ นูน มีสีครีม เหลือง ส้ม โดยจะขึ้นอยู่กับชนิดของคาร์บอนในเซลล์เมมเบรน รวมถึงอุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะแวดล้อมที่ทำให้เชื้อเจริญ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6-46 °C โดยมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30-37 °C

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียที่มีอยู่ทั่วไปบนผิวหนัง หรือในโพรงจมูกของคนที่มีร่างกายปกติ ซึ่งคนที่มีร่างกายปกติ จะเป็นพาหะแบคทีเรียโดยไม่แสดงลักษณะ หรืออาการของการติดเชื้อ อย่างไรก็ตามบางครั้งแบคทีเรียอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น การติดเชื้อที่ผิวหนัง บาดแผล ระบบปัสสาวะ ปอด กระแสเลือด และอาหารเป็นพิษได้ อีกทั้งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ผิวหนัง และที่เนื้อเยื่ออ่อน เช่น สิว หนอง ฝี หรือบาดแผลติดเชื้อ บริเวณที่ติดเชื้อเป็นสีแดง บวม และมีอาการเจ็บปวด หรืออาจเกิดหนอง บางครั้งมีอาการรุนแรงมาก เช่น ติดเชื้อในกระแสเลือด ติดเชื้อในปอด อาจเกิดโรคแบคทีเรียกินเนื้อ หรือโรคเนื้อเน่า

ทำให้เกิดโรค Staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่เริ่มบริเวณใดบริเวณหนึ่งของร่างกาย แล้วเชื้อแบคทีเรียสร้างชีวพิษ (toxin) เข้าสู่กระแสเลือดทำให้เกิดอาการของโรคขึ้น โรคนี้มักพบในเด็กทารกและเด็กเล็กที่มีอายุน้อยกว่า 6 ปี มีรายงานพบในผู้ใหญ่ที่มีโรคไตวายเรื้อรัง และในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เชื่อว่าเป็นผลจากการที่เด็กเล็กยังไม่มีภูมิ

ต้านทานต่อชีวพิษ รวมถึงความสามารถของไตในการกำจัดชีวพิษยังไม่สมบูรณ์เต็มที่
(2)

2.1.1.2 *Staphylococcus epidermidis* (3)

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ขนาด 0.5-1.5 ไมโครเมตร อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ลักษณะโคโลนีขนาดเล็ก สีขาว สามารถเจริญได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยที่สุดที่ไม่สร้างเอนไซม์ coagulase นอกจากนั้นยังไม่สามารถสร้างแอลฟาท็อกซิน (α -toxin) เอกซ์โฟลเอดิน (exfoliatin) และซูเปอร์แอนติเจนท็อกซิน (superantigen toxins) ได้

Staphylococcus epidermidis เป็นแบคทีเรียที่มีอยู่ทั่วไปของคนที่มีร่างกายปกติบนผิวหนัง โพรงจมูก ช่องหู และทางเดินปัสสาวะส่วนปลาย ในอดีตไม่ค่อยเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ แต่เนื่องจากในปัจจุบันมีการใช้ catheters และ prosthesis กันอย่างแพร่หลายมากขึ้น จึงพบว่ามีบทบาทสำคัญในการก่อการติดเชื้อในโรงพยาบาลมากขึ้นโดยเฉพาะในผู้ที่มีความบกพร่องทางระบบภูมิคุ้มกัน จะทำให้มีความเสี่ยงสูงในการติดเชื้อรุนแรง เช่น เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เยื่อปอดอักเสบ ลิ้นหัวใจอักเสบ การติดเชื้อในท่อทางเดินปัสสาวะ กระเพาะปัสสาวะอักเสบ

2.1.2 เชื้อราก่อโรคที่ผิวหนัง (4)

เชื้อราที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง ได้แก่ *Candida albicans* มีรูปร่างกลมรี ขนาด 3.5-6.0×6.0-10 ไมโครเมตร เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-37 °C ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ค่อนข้างกลม สีขาวครีม ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ที่พบอยู่ตามส่วนต่างๆของร่างกายคนปกติ เช่น ในช่องปาก ในช่องคลอด โดยที่เชื้อชนิดนี้จะอยู่ปะปนกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นชนิดอื่นๆ เชื้อ *Candida albicans* สามารถก่อโรคได้เมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมให้เชื้อเติบโตแบ่งจำนวนมากขึ้น

ปัจจัยที่มีผลต่อการก่อโรคของเชื้อแคนดิดา

1. ลักษณะทางกายวิภาคของผิวหนังในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายที่ต่างกัน เช่น ผิวหนังบริเวณที่อับชื้น เช่น ซอกพับของผิวหนังและเยื่อเป็นบริเวณที่มักพบโรคแคนดิดามากกว่าผิวหนังที่แห้ง
 2. ภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ต่ำเป็นส่วนสำคัญในการก่อโรคของเชื้อแคนดิดา เช่น ผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ป่วยเอชไอวีหรือโรคเอดส์ ผู้ที่ใช้ยากดภูมิคุ้มกันหรือยาลดกรดหรือยาฆ่าเชื้อติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษามะเร็งด้วยรังสีบำบัดหรือเคมีบำบัด
 3. ลักษณะของผู้ป่วย เช่น เด็กทารกและผู้สูงอายุ (> 65 ปี), สตรีที่ตั้งครรภ์, ผู้ที่มีน้ำหนักมาก หรือผู้ที่ชอบใส่เนื้อผ้ารัดแน่นอับชื้นจะมีความเสี่ยงสูงในการเกิดโรค
- อาการและอาการแสดง

1. ผิวหนัง: ผื่นแดง คัน ลามออกเป็นวงเล็กๆ บริเวณที่พบผื่นได้บ่อยคือ ใต้ราวนม ขาหนีบ ซอกก้น ซอกรักแร้ ซอกคอและซอกนิ้ว บางครั้งพบรูขุมขนอักเสบและตุ่มหนองร่วมด้วย
2. ช่องปาก: ฝ้าขาวที่ลิ้นหรือกระพุ้งแก้มสามารถขูดออกได้ง่ายโดยไม้กดลิ้น ในผู้ที่ใส่ฟันปลอมอาจพบผื่นแดงอักเสบเรื้อรังบริเวณที่สัมผัสกับฟันปลอมหรือแผลแดงแตกบริเวณมุมปาก
3. ช่องคลอด: อาการตกขาวร่วมกับอาการคันหรือแสบที่บริเวณช่องคลอด
4. อวัยวะเพศชาย: ผื่นสีขาวหรือตุ่มหนองที่ปลายของอวัยวะเพศ อาจพบเป็นแผลร่วมด้วยได้

2.2 ข้อมูลทั่วไปของกระทือ (5)

2.2.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

ชื่อสามัญ: Shampoo ginger, Wild ginger

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.

วงศ์: Zingiberaceae

ชื่อทั่วไป: ภาคกลาง: กระทือ

ภาคเหนือ: กระเทียมป่า กระแวน กระแอน แห้วดำ เหยี่ยวข่า เหยี่ยวแดง เหยี่ยวดำ

2.2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

2.2.2.1 ลำต้น

ต้นกระเทียม (รูปที่ 1) จัดเป็นไม้ล้มลุก มีลำต้นอยู่เหนือดินสูงราว 0.9-1.5 เมตร ต้นจะโหม่งในหน้าแล้งแล้วจะงอกขึ้นใหม่ในหน้าฝน เจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนซุย ในที่ที่มีความชื้น และมีแสงแดดส่องตลอดวัน พบขึ้นมากตามป่าดงดิบ ริมลำธาร หรือชายป่า



รูปที่ 1 ลำต้นและดอกของกระเทียม (5)

2.2.2.2 เหง้า

มีเหง้าอยู่ใต้ดินเรียกว่า "เหง้ากระเทียม" หรือ "หัวกระเทียม" เปลือกนอกมีสีน้ำตาลแกมเหลือง ส่วนเนื้อในมีสีเหลืองอ่อน กลิ่นหอม มีรสขมและเผ็ดเล็กน้อย (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 เหง้าสดของกระเทียม (5)

2.2.2.3 ใบ

ใบกระทือเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับในระนาบเดียวกัน ใบสีเขียวเข้ม ลักษณะของใบคล้ายรูปหอก แกมขอบขนาน ปลายใบแหลม ขอบและแผ่นใบเรียบ ด้านล่างของใบมักมีขนนุ่ม ใบกว้าง ประมาณ 5-7.5 เซนติเมตร และยาวประมาณ 20-30 เซนติเมตร ที่ก้านใบเป็นกาบหุ้มลำต้น (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ลำต้นของกระทือ (5)

2.2.2.4 ดอก

ดอกกระทือออกดอกเป็นช่อแทงออกมาจากเหง้าขึ้นมา ลักษณะของช่อดอกเป็นรูปทรงกระบอก มีกลีบดอกสีขาวนวลออกเหลือง มีใบประดับขนาดใหญ่สีเขียวแกมแดง เรียงซ้อนกันหนาแน่นและเป็นระเบียบ โคนเชื่อมติดกันเป็นหลอด ดอกจะบานไม่พร้อมกัน (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ดอกของกระทือ (5)

2.2.2.5 ผล

ผลกระทือ ผลมีลักษณะเป็นเมล็ดสีดำ ผลค่อนข้างกลม ผลแห้งแตก ติดอยู่ในดอกประดับ และมีเนื้อสีขาวบางหุ้มเมล็ดอยู่ (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ดอกและผลของกระทือ (5)

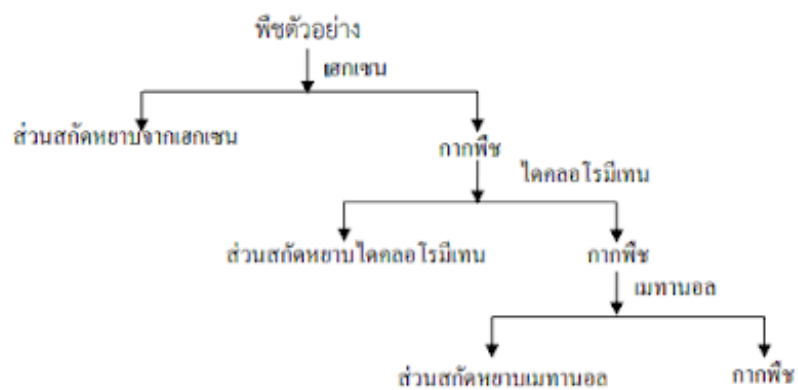
2.3 การสกัดสารจากเหง้ากระทือ

ในปี 2009 Rout และคณะ (6) ทำการสกัดสารตัวอย่างจากเหง้ากระทือโดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายในการสกัด โดยชั่งผงของเหง้ากระทือมา 2 g และใช้ Soxhlet extractor ในการสกัด จากนั้นทำให้สารสกัดเข้มข้นภายใต้สุญญากาศ แล้วนำมาละลายใหม่อีกครั้งโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายเพื่อนำมากรอง ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีปริมาตร 25 mL แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPTLC

ในปี 2016 Ali Ghasemzadeh และคณะ (7) ได้ทำการสกัดสารจากเหง้ากระเทียมโดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1 L ใช้ตัวอย่างเหง้ากระเทียมแห้งที่ทำให้เป็นผงแล้วประมาณ 50 g สกัดด้วยการทำ reflux เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 65 °C รอให้เย็นแล้วกรองสารสกัดด้วย Whatman filter paper (No. 1) ตามด้วยการระเหยตัวทำละลายที่เหลือออก แล้วเก็บส่วนสารสกัดแห้งที่เหลือที่อุณหภูมิ 20 °C

ต่อมาในปี 2019 Akhtar และคณะ (8) สกัดสารจากเหง้ากระเทียมแห้งที่ผ่านการบดละเอียดประมาณ 1.75 kg โดยใช้ 80% เอทานอลปริมาตร 3 L หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปกรองโดยใช้ Whatman filter paper (No. 1) เก็บสารสกัดทั้งหมดที่กรองได้นำไประเหยตัวทำละลายที่เหลือออกโดยใช้ rotary evaporator อุณหภูมิ 40 °C จนได้สารสกัดที่มีสีน้ำตาลเข้ม จึงนำไปทำ freeze-dried ให้ได้สารสกัดที่มีลักษณะเหนียวข้นแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

และในปี 2016 นางสาวณัฏฐิรา สมารักษ์ (25) ทำการสกัดสารจากเหง้ากระเทียม นำพืชตัวอย่างมาสกัดโดยการแช่หมักในตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลตามลำดับ ดังรูปแสดงที่ 6 จากนั้นกรองเอาส่วนตัวอย่างพืชออกนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) บันทึกน้ำหนักที่ได้ แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (%yield)



รูปที่ 6 แสดงวิธีการสกัดสารจากกระเทียม (25)

2.4 การวิเคราะห์สารบ่งคุณภาพในสารสกัดเหง้ากระเทียมด้วย HPLC

ในปี 2019 Nabilah Mohammad Yaqoob Akhtar และคณะ วิเคราะห์สารบ่งคุณภาพของสารสกัดกระเทียมได้โดยการนำสารสกัดกระเทียม 3 mg ที่สกัดด้วยเอทานอล 80% และสารสกัดมาตรฐาน zerumbone 1 mg ที่ถูกเจือจางใน methanol 1 mL และนำไปเข้าเครื่อง sonicator

เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการกรองด้วยกระดาษกรองโนลอนที่มีรูพรุน 0.45 μm เมื่อทำการกรองเสร็จแล้ว จะทำการนำสารสกัดที่กรองแล้วและสารละลายมาตรฐานมาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยมีสภาวะของ HPLC ดังนี้

Column: reversed phase C-18 column (250 mm $\times$ 4.6 mm i.d, 5 μm)

Detector: PDA ที่มีการฉีดปริมาณ 20 μL และความยาวคลื่นที่ 250 nm

ใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ 2 ตัว โดยตัวทำละลาย A คือ acetonitrile และตัวทำละลาย B คือ น้ำ โดยมีอัตราการป้อนตัวทำละลายเคลื่อนที่ 1.2 mL/min ในตอนเริ่มต้นจะใช้ตัวทำละลาย A = 65% จากนั้นจะเพิ่มขึ้นเป็น 70% หลังจากผ่านไป 10 นาที และจะเพิ่มขึ้นเป็น 75% และจะใช้ตัวทำละลาย A 75% เป็นเวลา 16 นาที ในการจำแนกส่วนประกอบในสารสกัดตัวอย่างนั้นจะเปรียบเทียบค่า retention time และ peak ที่ปรากฏกับสารมาตรฐาน การหาปริมาณของสารในสารสกัดนั้นทำได้โดยการคำนวณจากสมการที่ได้จาก standard curve ของสารมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น

2.5 องค์ประกอบทางเคมี

2.5.1 Terpenes

ในปี 1960 Dev (9) ได้ทำการสกัดแยก zerumbone ออกจากน้ำมันหอมระเหยของกระเทียม ต่อมาในปี 1962 Ramaswami และ Bhattacharyya (10) ได้ค้นพบ humulene monoxide และ humulene dioxide ในน้ำมันหอมระเหย และในปี 1963 Nigam และคณะ (11) ได้ทำการศึกษาสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยของกระเทียม โดยในน้ำมันหอมระเหยมีสารประกอบอยู่ 8 ชนิด ได้แก่ borneol, α -pinene, camphor, linalool, zerumbone, limonene, α -humulene และ β -caryophyllene

ต่อมาในปี 1968 Damodaran และ Dev (9) ได้ทำการจำแนกสารประกอบกลุ่ม sesquiterpenes ได้ดังนี้ humulene epoxide I, II และ III, humulenol I และ II และ caryophyllene oxide

ในปี 2010 Sulaiman และคณะ (12) ได้ทำการแยกและศึกษาปริมาณของสารประกอบในน้ำมันหอมระเหย พบว่าสารประกอบกลุ่ม sesquiterpenes เป็นสารประกอบหลัก โดยพบ Zerumbone ซึ่งเป็นสารประกอบที่พบมากที่สุด (36.12%) และ

รองลงมาคือ humulene (10.03%). และสารประกอบอีกกลุ่มหนึ่งที่พบรองลงมาคือ สารประกอบกลุ่ม monoterpenes ซึ่งได้ถูกทำการวิเคราะห์และศึกษาปริมาณด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (GCMS) พบว่าประกอบไปด้วย borneol (4.78%), α -pinene (3.71%), camphor (4.18%), linalool (1.06%), camphene (14.29%), eucalyptol (3.85%), γ -terpinene (2.00%) และ β -phellandrene (1.63%)

ในปี 2013 Batubara และคณะ(13) ได้ทำการศึกษาสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากกระทือและได้ทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต (%yield) 0.12% ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากกระทือประกอบไปด้วยสารประกอบ 2 กลุ่ม คือ monoterpenes และ sesquiterpenes และพบสารที่มีปริมาณมากในน้ำมันหอมระเหย คือ zerumbone (11.05%), sabinene (32.96%) และ β -myrcene (13.27%) นอกจากนี้ ในปี 2013 Dai และคณะ ได้ทำการจำแนกสารประกอบ 46 ชนิดในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากกระทือ โดยสารประกอบที่พบมากที่สุดคือสารกลุ่ม monoterpenes (76.1%) ซึ่งประกอบด้วย camphene (16.3%), sabinene (14.6%), citral (26.1%), zingiberene (7.2%) และ lavandulyl acetate (6.7%) โดยจากการจำแนกสารประกอบข้างต้นพบว่าในน้ำมันหอมระเหยนั้นมีปริมาณ zerumbone เพียง 1.2% ซึ่ง zerumbone เป็นสารประกอบ monocyclic sesquiterpene ที่เชื่อมกันด้วยพันธะคู่ 3 พันธะ โดยมีพันธะคู่ทั้งสองพันธะเชื่อมกับหมู่ carbonyl ซึ่งต่อมาในปี 2009 Rout และคณะ (6) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณของ zerumbone ในแต่ละส่วนของต้นกระทือ ซึ่งพบว่าในส่วนที่พบปริมาณ zerumbone มากที่สุดคือเหง้าของต้นกระทือ และในปี 2009 Bhuiyan และคณะ (14) ได้ทำการวิเคราะห์และจำแนกสารประกอบในน้ำมันหอมระเหย จากกระทือด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (GCMS) ซึ่งพบสารประกอบกลุ่ม terpene ซึ่งประกอบไปด้วย α -pinene, camphor, linalool, zerumbone, limonene, camphene, α -caryophyllene, 3-carene, 4-terpineol และ eucalyptol

2.5.2 Polyphenols

ในปี 2004 Jang และคณะ (15) ได้ทำการศึกษาสารประกอบกลุ่ม aromatic และ flavonoids ในกระทือ ซึ่งพบว่าในกระทือประกอบด้วย kaempferol-3,4'-O-dimethylether, kaempferol-3-O-methylether, kaempferol-3,4',7-O-

trimethylether, 4''-O-acetylfafzelin, 2'',4''-O-diacetyl-fafzelin, 3'',4''-O-diacetylfafzelin, kaempferol-3-O-(4-O-acetyl--l-rhamnoside), kaempferol-3-O-(3,4-O-diacetyl--l-rhamnopyranoside), kaempferol-3-O-(2,4-O-diacetyl--l-rhamnopyranoside)

ในปี 2007 Ruslay และคณะ(16) ได้ทำการวิเคราะห์สารประกอบในสารสกัดกระเทียม พบว่าในสารสกัดกระเทียมประกอบไปด้วย kaempferol-3-O-rhamnoside, kaempferol-3-O-(2''-O-acetyl) rhamnoside, kaempferol-3-O-(3''-O-acetyl)rhamnoside, kaempferol-3-O-(4''-acetyl)rhamnoside, kaempferol-3-O-(3'',4''-diacetyl)rhamnoside และ kaempferol-3-O-(2'',4''-diacetyl)rhamnoside

ในปี 2008 Chien และคณะ (17) ได้ทำการแยกสารประกอบกลุ่ม flavonoid จากเหง้าของกระเทียมพบว่าในเหง้ามีสารสำคัญซึ่งประกอบไปด้วย 3-methyl kaempferol, kaempferol-3-O-(2,4-di-O-acetyl- α -L-rhamnopyranoside) และ kaempferol-3-O-(3,4-di-O-acetyl- α -L-rhamnopyranoside) ซึ่งสกัดสารประกอบกลุ่ม phenolic โดยใช้ ethyl acetate และจำแนกด้วย High performance liquid chromatography-diode array (HPLC-DAD) รายงานการศึกษารายการประกอบของสารในกระเทียม แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การศึกษารายการประกอบของสารในกระเทียม (18)

Box 1
Reported principal compounds found in *Zingiber zerumbet*.

Class	Sub-class	Compounds	References
Terpene	Sesquiterpenes	Zerumbone (1), humulene (7), caryophyllene, zingiberene (18)	Nakamura et al. (2004), Abdul et al. (2008), Chung et al. (2008), Fakurazi et al. (2008), Rout et al. (2009), Keong et al. (2010), Chang et al. (2012a) and Rahman et al. (2013)
	Monoterpenes	Borneol (2), α -pinene (3), linalool (5), limonene (6), camphene (15), sabinene (16), citral (17), γ -terpinene (23), eucalyptol (22), β -myrcene	
Polyphenol	Flavonoids	Kaempferol, kaempferol-3-O-methyl; Kaempferol-3-O-(2,4-di-O-acetyl- α -L-rhamnopyranoside) (26), Kaempferol-3-O-(3,4-di-O-acetyl- α -L-rhamnopyranoside) (27), Kaempferol-3-O-(4-acetyl)rhamnoside (29), Kaempferol-3,4',7'-O-trimethylether	Masuda et al. (1991), Nakatani et al. (1991) and Chang et al. (2012c,d)

ในปี 2016 Ali Ghasemzadeh และคณะ ทำการวิเคราะห์ secondary metabolite จากเหง้าของกระเทียม โดยจะพบสารประกอบ flavonoid และ phenolic ซึ่งปริมาณและชนิดของสารประกอบ flavonoid จากใบ ต้นและเหง้านั้นมีความแตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติตามอายุของกระเทียม หากกระเทียมมีอายุมากจะพบปริมาณ TFC (Total

flavonoid content) มากขึ้น โดยส่วนที่พบ TFC มากที่สุดคือเหง้า โดยที่สารประกอบ flavonoid ทั้งหมด 6 ชนิด คือ quercetin, rutin, kaempferol, catechin, luteolin และ myricetin ซึ่งสารทั้งหมดสามารถเรียงลำดับจากปริมาณมากที่สุดไปน้อยที่สุดได้ดังนี้ catechin, quercetin, rutin, luteolin, myricetin และ kaempferol ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบ flavonoid ของสารที่สกัดจากกระเทียม (7)

Table 1 Total flavonoid content and individual flavonoid compounds from leaf, stem and rhizome extracts of *Z. zerumbet*

Plant age (month-old)	Plant parts	Total flavonoids	Quercetin	Rutin	Kaempferol	Catechin	Luteolin	Myricetin
3	leaf	21.8 ± 3.74 ^b	2.43 ± 0.69 ^b	1.77 ± 0.26 ^c	0.71 ± 0.09 ^a	5.49 ± 0.45 ^b	1.15 ± 0.14 ^a	ND
	stem	4.7 ± 0.68 ^e	0.12 ± 0.05 ^e	0.36 ± 0.07 ^g	ND	1.14 ± 0.10 ^h	ND	ND
	rhizome	11.2 ± 1.26 ^d	1.63 ± 0.41 ^c	0.81 ± 0.09 ^e	0.49 ± 0.04 ^b	2.69 ± 0.29 ^f	0.44 ± 0.03 ^c	0.59 ± 0.03 ^c
6	leaf	19.1 ± 2.69 ^b	2.26 ± 0.52 ^b	1.28 ± 0.32 ^d	0.51 ± 0.04 ^b	4.12 ± 0.21 ^d	0.82 ± 0.06 ^b	0.25 ± 0.02 ^e
	stem	4.2 ± 0.65 ^e	0.16 ± 0.05 ^e	0.21 ± 0.04 ^h	ND	1.34 ± 0.11 ^g	ND	ND
	rhizome	19.6 ± 3.48 ^b	2.49 ± 0.33 ^b	2.19 ± 0.41 ^b	0.68 ± 0.07 ^a	4.68 ± 0.27 ^c	0.76 ± 0.07 ^b	0.97 ± 0.06 ^b
9	leaf	15.2 ± 2.68 ^c	1.82 ± 0.24 ^c	0.66 ± 0.08 ^f	0.50 ± 0.03 ^b	3.37 ± 0.41 ^e	0.45 ± 0.01 ^c	0.33 ± 0.01 ^d
	stem	4.1 ± 0.66 ^e	0.22 ± 0.06 ^d	0.24 ± 0.07 ^h	0.12 ± 0.01 ^c	1.02 ± 0.06 ⁱ	ND	0.11 ± 0.02 ^f
	rhizome	29.7 ± 4.11 ^a	3.94 ± 0.81 ^a	2.79 ± 0.48 ^a	0.72 ± 0.05 ^a	6.12 ± 0.32 ^a	1.06 ± 0.11 ^a	1.19 ± 0.11 ^a

Data are means of triplicate measurements ± standard deviation. Means not sharing a common single letter in each column for each measurement were significantly different at $P \leq 0.05$. The units of total flavonoids and flavonoid compounds are mg quercetin equivalents/g DM and mg/g DM, respectively. ND: not detected

ปริมาณ TPC (Total phenolic content) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามอายุของกระเทียมเช่นเดียวกับปริมาณ TFC โดยปริมาณ TPC ในใบและเหง้ามีปริมาณต่ำสุดที่ 3 เดือน และปริมาณมากที่สุดคือ 9 เดือน ซึ่งจากการวิเคราะห์จะพบว่ามีสารประกอบทั้งหมด 4 ชนิด คือ gallic acid, caffeic acid, ferulic acid และ cinnamic acid โดยสารประกอบที่พบมากที่สุดคือ gallic acid

2.6ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกระเทียม

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบสำคัญที่สกัดจากเหง้าของกระเทียม ได้แก่ ช่วยเรื่องทางเดินอาหารทำงานผิดปกติ (stomach problems) ต้านอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านมะเร็ง (antitumoral) ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacteria) ต้านเชื้อไวรัส (antivirus) และ บรรเทาอาการปวด (analgelsic) (19)

2.6.1 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory)

การอักเสบ (inflammation) เป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งที่ทำให้เนื้อเยื่อของร่างกาย ได้รับบาดเจ็บ การตอบสนองกระบวนการอักเสบประกอบด้วย การ

เปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด การเข้ามาของเซลล์เม็ดเลือดขาว และผลกระทบที่เกิดขึ้นกับร่างกายทั้งระบบ โดยผลของการอักเสบจะทำให้เกิดการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคออกไป อย่างไรก็ตามกระบวนการอักเสบมีผลเสียที่สามารถเกิดขึ้นได้ด้วยเช่นกัน หากเกิดการอักเสบมากเกินไป หรือเกิดการอักเสบแบบเรื้อรังเป็นเวลานานจะเกิดการทำลายเนื้อเยื่อทำให้เกิดการทำงานของเนื้อเยื่อนั้นผิดปกติได้เช่นกัน (20)

กระเทียมมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ในระบบประสาทส่วนปลายและในระบบประสาทส่วนกลาง อีกทั้งสามารถยับยั้งการสังเคราะห์สารที่ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบได้อีกด้วย ซึ่งในปี 2008 Chien และคณะ (17) ได้รายงานถึงฤทธิ์การต้านการอักเสบจากสารประกอบในกระเทียม โดยใช้ต้นแบบจำลองการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยแยกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ การเกิดอุ้งเท้าบวมในหนูทดลอง และการเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ (macrophages) ในกลุ่มการเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจพบว่าสารประกอบในกลุ่ม zerumbone และ 3-O-methyl-kaempferol มีฤทธิ์ลดการสร้างสารที่ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ ซึ่งคือ Prostaglandin E₂ (PGE₂) และ Nitric oxide (NO) ส่วนในการศึกษาการเกิดอุ้งเท้าบวมในหนูทดลอง พบว่าสารประกอบ Zerumbone ในกระเทียมสามารถลดการบวมในอุ้งเท้าหนูได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ใช้ยา Indomethacin โดยกลุ่มที่ใช้ zerumbone และ 3-O-methyl-kaempferol ในการรักษาสามารถลดการบวมในอุ้งเท้าหนูได้ $38.8 \pm 16.7\%$ และในกลุ่มที่ใช้ยา Indomethacin ในการรักษาสามารถลดการบวมในอุ้งเท้าหนูได้ $51.0 \pm 16.7\%$

นอกจากนี้ M. N. Somchit และคณะ (21) ศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบจาก zerumbone ที่ทำการสกัดแยกมาจากกระเทียมเพื่อดูการยับยั้งการอักเสบและบรรเทาอาการปวดในหนูทดลอง โดยประเมินฤทธิ์การต้านการอักเสบ 30 นาทีหลังจากให้ฉีดยา zerumbone ปริมาณ 10 และ 20 mg/kg ผ่านทางช่องท้องของหนู ซึ่งในกลุ่มทดลองหนูจะได้รับ 0.05 ml λ -carrageenan (1%) หรือ Prostaglandin E₂ (100 IU) โดยการฉีดที่ใต้อุ้งเท้า ในกลุ่มควบคุมนั้นจะฉีดสารละลาย 0.9% NaCl ที่ใต้อุ้งเท้า และในกลุ่ม positive นั้นจะได้รับยา piroxicam 20 mg/kg จากนั้นจะทำการวัดขนาดอุ้งเท้าหนูก่อนและหลังการให้ λ -carrageenans หรือ PGE₂ โดยจะวัดเมื่อเวลาผ่านไป 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง โดยใช้ Ugo Basile 7140 Plethysmometer ในการวัดผล ซึ่งผลการทดลองจะแสดงออกมาใน

รูปแบบของความแตกต่างของขนาดอั่งเต้าก่อนและหลังการทดลอง โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า zerumbone 10 และ 20 mg/kg มีฤทธิ์ด้านการอักเสบอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสามารถแสดงผลการยับยั้งได้มากที่สุดถึง 45.67 และ 70.37% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับยา piroxicam พบว่า zerumbone มีฤทธิ์ด้านการอักเสบคล้ายกับยา piroxicam อย่างมีนัยสำคัญ

2.6.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidation)

ในปี 2007 Ruslay และคณะ (16) พบว่ากระเทียมมีส่วนประกอบของ glycosylated kaempferol รวมถึงอนุพันธ์ isomers ของ mono- และ diacetylated ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงเป็นการศึกษาที่สนับสนุนความเป็นไปได้ในการใช้สารสกัดจากพืชวงศ์นี้เป็นอาหารเสริมทางสุขภาพสำหรับป้องกันโรคที่เกิดจากความเสื่อมโทรมของร่างกายได้

ในปี 2013 Anish Nag และคณะ (22) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกระเทียมสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ได้แก่ ethanol methanol และ isopropanol โดยที่สารสกัดของ *Z. zerumbet* แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ DPPH scavenging activities และ hydroxyl radical scavenging activities นับว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติที่สูงเนื่องจากสารสกัดมีหมู่ phenolic เป็นจำนวนมากรวมถึง kaempferol ที่เป็นหมู่ flavonoid เป็นส่วนประกอบทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.6.3 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Anti-bacteria)

Kader และคณะ (23) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียโดยใช้สารสกัดจากเหง้าของกระเทียม โดยทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Sarcina lutea* ทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบ 8 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio mimicus*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii* และ *Pseudomonas aeruginosa* รวมถึงทดสอบกับเชื้อราที่ก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *Candida albicans*, *Aspergillus niger* และ *Saccharomyces cerevisiae* ส่วนสกัดจากจัวทำละลาย ether และ chloroform แสดงให้เห็นถึงการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้ระดับปานกลาง ส่วนสกัดจาก ethanol (400 mg/disk) มีการยับยั้ง

แบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด โดยมีบริเวณที่ยับยั้งได้ (clear zone) 10 mm และมีการยับยั้งเชื้อราได้ทุกตัวที่ทำการทดสอบ

2.6.4 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Anti-fungal)

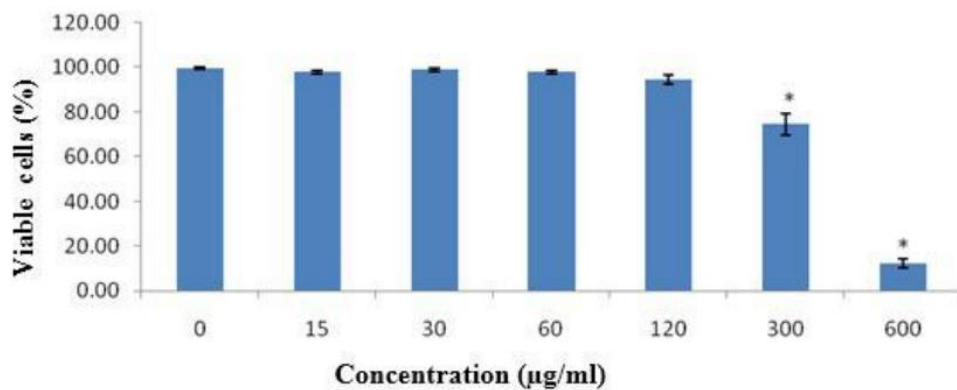
ในปี 2016 Adriana Y. Koga และคณะ (18) ศึกษาผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบด้วย ethanol และสารสกัดที่แยกส่วนออกมาในส่วน petroleum ether และ chloroform จากเหง้าของกระเทียม พบว่าพื้นที่ในการยับยั้งของสารสกัดหยาบด้วย ethanol และสารสกัดที่แยกส่วนออกมาในส่วน petroleum ether และ chloroform อยู่ในช่วง 9-10 mm, 8-9 mm และ 6-8 mm ตามลำดับที่ความเข้มข้น 400 µg/disc ส่วน petroleum ether และ chloroform มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอยู่ในระดับต่ำจนถึงปานกลาง แต่ในส่วนของสารสกัดหยาบด้วย ethanol มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียอยู่ในระดับสูงที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *V. parahemolyticus* และมีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้อย่างดีกับเชื้อราก่อโรคทุกชนิดที่ทดสอบ โดยค่า MIC ของสารสกัดหยาบด้วย ethanol และสารสกัดที่แยกส่วนออกมาในส่วน petroleum ether และ chloroform นั้นมีค่าเท่ากับ 128-256 µg/mL โดยยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ 2 ชนิด คือ *B. cereus* และ *S. lutea* แบคทีเรียแกรมลบอีก 4 ชนิด คือ *V. parahaemolyticus*, *E. coli*, *S. typhi* และ *P. aeruginosa* (23)

2.6.5 ความเป็นพิษ (Toxicity)

ในปี 2012 Chang และคณะ (24) ได้ทำการประเมินการเกิดพิษทั้งแบบเฉียบพลัน และแบบเรื้อรังของสารสกัดเหง้ากระเทียมจาก ethanol จากการวิเคราะห์ phytochemical พบว่ามีสารประกอบในสารสกัดจากเหง้ากระเทียม ได้แก่ alkaloids, saponins, flavonoids, lipids, polyphenols และ terpenoids ในการศึกษาแบบ *in vivo* โดยใช้หนูทดลองตัวผู้ แล้วให้สารสกัดกระเทียมในรูปแบบของเหลวทางปากเป็นเวลา 14 วัน เพื่อทดสอบการเกิดพิษแบบเฉียบพลัน ส่วนการทดสอบการเกิดพิษแบบเรื้อรัง จะให้สารสกัดความเข้มข้น 1000, 2000 และ 3000 mg/kg ให้สารสกัดกระเทียมในรูปแบบของเหลวเข้าทางหลอดอาหารไปยังกระเพาะอาหาร โดยที่กลุ่มควบคุมจะได้รับสารน้ำอย่างเดียวเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงในระบบโลหิตวิทยาและจุลพยาธิวิทยา จากผลการทดลองพบว่าไม่พบการเกิดพิษและไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระบบโลหิตวิทยา รวมถึงไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ทางด้านของน้ำหนักตัวและเนื้อเยื่อที่ทำการวิเคราะห์จุลพยาธิวิทยา ซึ่งการวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยามีส่วนสำคัญในการประเมินความเสี่ยงในมนุษย์ จากการทดลองนี้ได้ชี้ให้เห็นว่าทั้งการทดลองการเกิดพิษทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางคลินิก การตาย หรือความสัมพันธ์ในการเกิดพิษตามปริมาณการใช้สารสกัด

จากนั้นในปี 2013 Anish Nag และคณะ (22) ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษโดยทำ cytotoxicity assay ของสารสกัดจากกระทือโดยจะแสดงค่าเป็นกราฟ ดังรูปที่ 7 ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึง % viable cells เป็นช่วงระหว่าง 12.33 - 99.33% ซึ่งจำนวนของ viable cells ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 300 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นไป โดยค่า EC_{50} ของสารสกัดกระทือมีค่า 385.07 $\mu\text{g/mL}$



รูปที่ 7 Viable lymphocyte cells at different concentration of ZZ by trypan blue assay
Significantly different from control ($p \leq 0.05$) (22)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 สารเคมี

- เอทานอล (Ethanol) (Lot no. 20060068)
- เมทานอล (Methanol) (Lot no. 19090033)
- ไดคลอโรมีเทน (Dicloromethane) (Lot no. 21080094)
- เฮกเซน (Hexane) (Lot no. 21070007)
- อะซิโตไนไตร์ท (Acetonitrile) (21090454)
- สารมาตรฐาน Zerumbone (Lot no. S00321110)
- สารมาตรฐาน Gallic acid (Lot no. A0422721)
- Mueller ฮิลตัน อะการ์ (Mueller hinton agar) (Lot No. 0237291, Difco™)
- Mueller ฮิลตัน บอธ (Mueller hinton broth) (Lot No. 7009699, Difco™)
- ซาโบโรด์ เดกโตส อะการ์ (Sabouraud dextrose agar) (Lot no. VM584538)
- ซาโบโรด์ เดกโตส บอธ (Sabouraud dextrose broth) (Lot no. 0000454546)
- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) (Lot no. 1803260592)
- คีโตโคนาโซล (Ketoconazole) (Lot no. KZ-68/02)
- คลินดามัยซิน (Clindamycin) (Lot no. 072021)
- ไดโคลฟีแนค (Diclofenac) (Lot no. 072021)
- ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) (Lot no. Z10G016)
- DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Lot no. Q16G021)
- โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) (Lot no. 054000500)
- กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) (Lot no. H8040-1-2501)
- Tris-HCl (Tris hydrochloride) (Lot no. 0639400100)
- โบวีนเซรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin (BSA)) (Lot no. SLCF8574)

- สเตรปโตคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) (ATCC 6538, DMST 8013, Lot.St63016)
- สเตรปโตคอคคัส อีพิดีเดอริมิติส (*Staphylococcus epidermidis*) (ATCC 14990, DMST 5868, Lot.St62535)
- แคนดิดา อัลบิแคน (*Candida albican*) (ATCC 10231, DMST 5815, Lot.Cn64180)

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator, R-210, Buchi, Thailand)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, Mettler Toledo AG, Switzerland)
- เครื่องเขย่าผสมสารโดยใช้เสียงความถี่สูง (Sonicator, WUC-D22B, wisd, Korea)
- เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิทัล (Analytical balances, QUINTIX224-1S, German)
- เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader, FLUOstar Omega, BMG Labtech, Germany)
- 96-well plates (Corning, USA)
- เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, DGU-20A5R, Shimadzu, USA)
- ไมโครปิเปตต์ (MicroPipet, Pipet-lite XLS, Mettler-toledo ,USA)
- เครื่องบ่มเชื้อ (incubator, RI115, BINDER, Germany)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Clean Bio Calibration, Thailand)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave, Purister100, Cryste, Korea)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, WNE, Memmert)
- เตาไมโครเวฟ (Microwave, R-220, sharp, Thailand)

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การสกัดสารจากเหง้ากระเทียม

3.2.1.1 การเตรียมเหง้ากระเทียม

นำเหง้ากระเทียมสดมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาดแล้วลดขนาดด้วยการหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยการนำเข้าตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำไปบดให้ละเอียด

3.2.1.2 การสกัดสารจากเหง้ากระเทียม

นำเหง้าของกระเทียมที่บดแล้ว 100 กรัม มาแช่ในตัวทำละลายปริมาตร 1000 มิลลิลิตร 3 ชนิด โดยไล่จากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปสูง คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาส่วนตัวอย่างฟุ้งออก นำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ บันทึกน้ำหนักที่ได้ แล้วนำมาคำนวณหาร้อยละผลผลิต

3.2.2 การวิเคราะห์สารบ่งคุณภาพในสารสกัดเหง้ากระเทียมด้วย HPLC

เตรียมสารมาตรฐาน Zerumbone โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายเพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 500, 400, 300, 200 ,100 และ 50 µg/mL ทำโดยการชั่งสารมาตรฐาน Zerumbone ในขวดปริมาตรขนาด 10 ml แล้วใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและปรับปริมาตร จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดฟองอากาศแล้วนำสารละลายมาตรฐานที่ได้ไปกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 µm

เตรียมสารสกัดกระเทียมส่วนสกัดต่าง ๆ โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายเพื่อให้ได้สารละลายสารสกัดกระเทียมที่มีความเข้มข้น 1000 µg/mL ทำโดยการชั่งสารสกัดกระเทียมส่วนสกัดต่าง ๆ ในขวดปริมาตรขนาด 10 ml แล้วใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและปรับปริมาตร จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดฟองอากาศแล้วนำสารละลายสารสกัดกระเทียมส่วนสกัดต่าง ๆ ที่ได้ไปกรองผ่านเมมเบรน 0.45 µm

นำสารสกัดและสารละลายมาตรฐานมาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยมีสภาวะการทดลอง ดังนี้

- Column: reversed phase C-18 column (250 mm × 4.6 mm i.d, 5 µm)
- Detector: PDA
- Sample volume: 20 µL
- Wavelength: 250 nm

- Mobile phase: ใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ 2 ตัว โดย solvent A คือ acetonitrile และ solvent B คือ น้ำ โดยมีอัตราการป้อนตัวทำละลายอยู่ที่ 1.2 mL/min ในตอนเริ่มต้นจะใช้ solvent A = 65% จากนั้นจะเพิ่มขึ้นเป็น 70% หลังจากผ่านไป 10 นาที และจะเพิ่มขึ้นเป็น 75% และจะใช้ solvent A 75% เป็นเวลา 16 นาที ในการจำแนกส่วนประกอบในสารสกัดตัวอย่างนั้นจะเปรียบเทียบค่า retention time และ peak ที่ปรากฏกับสารมาตรฐาน การหาปริมาณของสารในสารสกัดนั้นทำได้โดยการคำนวณจากสมการที่ได้จาก standard curve ของสารมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

3.2.3.1 การเตรียมสารสกัดเหง้ากระเทียม

ชั่งสารสกัดกระเทียมที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane, dichloromethane และ ethanol 100 mg ปรับความเข้มข้นของสารสกัดด้วย ethanol ให้ความเข้มข้นอยู่ที่ 100 mg/mL แล้วผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นเจือจางความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมจากความเข้มข้น 100 mg/mL ให้เป็น 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 mg/mL ตามลำดับ โดยใส่ลงใน eppendorf tube จำนวน 6 หลอด

3.2.3.2 การเตรียมสารละลายยา Clindamycin

ชั่งยา Clindamycin 1-2 mg ลงใน eppendorf tube เติมน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL จากนั้นปรับความเข้มข้นให้ได้ 0.1 mg/mL โดยการดูดสารละลาย Clindamycin จากหลอดก่อนหน้ามา 100 μ L ลงใน eppendorf tube หลอดใหม่ แล้วจึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 900 μ L

3.2.3.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรีย

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งและเหลว โดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งทำได้โดยการชั่ง Mueller Hinton Agar (MHA) 15.2 g และ NaCl 8 g ใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 500 mL จากนั้นเติมน้ำกลั่น 400 mL แล้วนำไปอุ่นให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเพื่อให้สารละลายเข้ากันได้ดียิ่งขึ้นแล้วนำไปทำการ

อบฆ่าเชื้อ โดยใช้เครื่อง Autoclave เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากอบฆ่าเชื้อแล้วรอให้อาหารเย็นซักพัก แล้วจึงนำอาหารเหลวที่ได้มาทำการเทใส่ plate ปริมาณ 20 mL โดยทำใน Hood แล้วรอให้แห้ง เมื่อแห้งแล้วให้เก็บใส่ตู้เย็น

ส่วนอาหารเหลวนั้นทำได้โดยการชั่ง Mueller Hinton Broth (MHB) 8.4 g และ NaCl 8 g ใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 500 mL จากนั้นเติมน้ำกลั่น 400 mL แล้วนำไปอุ่นให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเพื่อให้สารละลายเข้ากันได้ดียิ่งขึ้น จากนั้นนำไปทำการอบฆ่าเชื้อ โดยใช้เครื่อง Autoclave เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากอบฆ่าเชื้อแล้วรอให้อาหารเย็นซักพัก แล้วจึงเก็บใส่ตู้เย็น

3.2.3.4 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

นำอาหารเหลว MHB ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง 2 หลอด ปริมาณ 2 mL จากนั้นใช้ loop ทำการตักเชื้อลงในหลอดทดลอง ประมาณ 2-3 โคโลนี โดยหลอดทดลองที่ 1 จะใส่เชื้อ *Staphylococcus aureus* และหลอดทดลองที่ 2 จะใส่เชื้อ *Staphylococcus epidermidis* แล้วนำไปบ่มในตู้อบ 37 °C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางเชื้อด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarlan จะได้เชื้อประมาณ 1×10^8 CFU/mL

3.2.3.4 การทดสอบการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเห้้ากระเทียมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเห้้ากระเทียมที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC)

ทำการเจือจางเชื้ออีกครั้งด้วยอาหาร Mueller hinton broth (MHB) อีก 100 เท่า แล้วดูดเชื้อใส่ลงในหลอดทดลองดังตารางที่ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยเปรียบเทียบความขุ่นกับหลอดควบคุม หลอดที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดและไม่มีความแตกต่างจากหลอดควบคุมถือว่าหลอดทดลองนี้เป็นค่า MIC

ตารางที่ 3 วิธีการทดสอบหาค่า MIC ของเชื้อแบคทีเรีย

หลอดที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารทดสอบ (mg/ml)	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	-	-	-
ความเข้มข้นสุดท้ายของสารทดสอบ (ug/ml)	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	-	-	-
ปริมาตรสารทดสอบ (ul)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	-	-	-
ตัวทำละลาย EtOH (ul)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	20	-
MHB (ul)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1980	-
MHB+เชื้อ(ul)	1980	1980	1980	1980	1980	1980	1980	1980	1980	1980	-	1980
Clindamycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20

หลังจากได้ค่า MIC แล้ว นำหลอดทดลองทุกหลอดที่สารละลายไม่ขุ่น (ไม่มีเชื้อเจริญเติบโต) มา streak ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ °C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดย สังเกตการเจริญของเชื้อ ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหาร ถือเป็นค่า MBC

3.2.4 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Candida albicans*

3.2.4.1 การเตรียมสารสกัดเหง้ากระทือ

ชั่งสารสกัดกระทือที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane, dichloromethane และ ethanol 100 mg ปรับความเข้มข้นของสารสกัดด้วย ethanol ให้ความเข้มข้นอยู่ที่ 100 mg/mL แล้วผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นเจือจางความเข้มข้นของสารสกัดกระทือจากความเข้มข้น 100 mg/mL ให้เป็น 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 mg/mL ตามลำดับ โดยใส่ลงใน eppendorf tube จำนวน 6 หลอด

3.2.4.2 การเตรียมสารละลายยา Ketoconazole

เตรียมสารละลายยา ketoconazole ความเข้มข้น 25 mg/ml โดยชั่งยา ketoconazole 25 mg ละลายในเอทานอลปริมาณ 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง

3.2.4.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเชื้อรา *Candida albicans*

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งและเหลว โดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งทำได้โดยการชั่ง SABOURAUD 4% dextrose agar (SDA) 26 g ใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 500 mL จากนั้นเติมน้ำกลั่น 400 mL แล้วนำไปอุ่นด้วยไมโครเวฟเพื่อให้สารละลายเข้ากันได้ดียิ่งขึ้น จากนั้นนำไปทำการอบฆ่าเชื้อ โดยใช้เครื่อง Autoclave เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากอบฆ่าเชื้อแล้วรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นซักพักแล้วจึงนำอาหารเหลวที่ได้มาทำการเทใส่ plate ปริมาณ 20 mL โดยทำใน hood แล้วรอให้แห้ง จากนั้นเก็บใส่ตู้เย็น

ส่วนอาหารเหลวนั้นทำได้โดยการชั่ง SABOURAUD 4% dextrose broth (SDB) ปริมาณ 12 g ใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 500 mL จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 mL แล้วนำไปอุ่นให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเพื่อให้สารละลายเข้ากันได้ดียิ่งขึ้น จากนั้นนำไปทำการอบฆ่าเชื้อ โดยใช้เครื่อง Autoclave เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากอบฆ่าเชื้อแล้วรอให้อาหารเย็นซักพัก จากนั้นเก็บใส่ตู้เย็น

3.2.4.4 การเตรียมเชื้อรา *Candida albicans* ที่ใช้ทดสอบ

นำอาหารเหลว SDB ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดทดลอง 2 หลอด ปริมาณ 2 mL จากนั้นใช้ loop ทำการตักเชื้อลงในหลอดทดลอง ประมาณ 2-3 โคโลนี โดยหลอดทดลองที่ 1 จะใส่เชื้อ *Staphylococcus aureus* และหลอดทดลองที่ 2 จะใส่เชื้อ *Staphylococcus epidermidis* แล้วนำไปบ่มในตู้อบ 37 °C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางเชื้อด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarlan จะได้เชื้อประมาณ 1×10^8 CFU/ml

3.3.4.5 การทดสอบการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมที่สามารถฆ่าเชื้อรา (MFC)

ทำการเจือจางเชื้ออีกครั้งด้วยอาหาร SDB อีก 100 เท่า แล้วดูเชื้อใส่ลงในหลอดทดลองตามตารางสรุปวิธีการทดสอบหาค่า MIC จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยเปรียบเทียบความขุ่นกับหลอดควบคุม หลอดที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดและไม่มีความแตกต่างจากหลอดควบคุมถือว่าหลอดทดลองนี้เป็นค่า MIC

ตารางที่ 4 วิธีการทดสอบหาค่า MIC ของเชื้อรา

หลอดที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารทดสอบ (mg/ml)	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	-	-	-
ความเข้มข้นสุดท้ายของสารทดสอบ (ug/ml)	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	1.9	-	-	-

ปริมาตรสารทดสอบ (ul)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	-	-	-
ตัวทำละลาย EtOH (ul)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	20	-
SDB (ul)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1980	-
SDB+เชื้อ (ul)	1980	1980	1980	1980	1980	1980	1980	1980	1980	1980	1980	-	1980
Ketoconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20

หลังจากได้ค่า MIC แล้ว นำหลอดทดลองทุกหลอดที่สารละลายไม่ขึ้น (ไม่มีเชื้อเจริญเติบโต) มา streak ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดย สังเกตการเจริญของเชื้อ ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหาร ถือเป็นค่า MFC

3.2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.2.5.1 การเตรียมสารสกัดเหง้ากระทือ

เตรียมสารสกัดเหง้ากระทือที่ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่ง crude extract ของสารสกัดเหง้ากระทือ 1 mg ละลายในตัวทำละลายเมทานอล 1 mL ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่าสาร จากนั้นเจือจางความเข้มข้นของสารละลายจากความเข้มข้น 1 mg/mL เป็น 0.5, 0.25, 0.125, 0.625 และ 0.3125 mg/mL ตามลำดับ จะได้สารละลายทั้งหมด 6 ความเข้มข้น

3.2.5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 100 µg/mL จากนั้นเจือจางความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานจากความเข้มข้น 100 µg/mL เป็น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.03906 และ 0.1953 µg/mL

ตามลำดับ โดยจะใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานจำนวน 7 ความเข้มข้น คือความเข้มข้นตั้งแต่ 12.5 µg/mL ถึง 0.1953 µg/mL

3.2.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS assay)

เตรียมสารละลายเอบีทีเอสความเข้มข้น 7 mM โดยเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และแบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ สารละลายมาตรฐาน gallic acid (ความเข้มข้น 12.5 - 0.1953 µg/mL) สารละลาย สารเหง้ากระทือ (ความเข้มข้น 1 - 0.3125 mg/mL) และตัวทำละลายเอทานอล จากนั้นผสมสารละลายใน 96-well microplates โดยทำแต่ละส่วน 3 ซ้ำทุกความเข้มข้นของสารละลาย เริ่มจากปิเปตสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น น้อยที่สุด คือ 0.1953 µg/mL ปริมาตร 40 µL ผสมกับสารละลายเอบีทีเอส ปริมาตร 160 µL และปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นถัดไปเรื่อย ๆ ทำจนครบทั้งหมด 7 ความเข้มข้นตามลำดับ ต่อมาปิเปตสารละลายมาตรฐาน gallic acid 40 µL ผสมเอทานอล 40 µL แล้วเติมสารละลายเอบีทีเอส 160 µL ตามลำดับความเข้มข้น

ในส่วนของสารละลายสารสกัดเหง้ากระทือ ทำการปิเปตสารละลายสารสกัดเหง้ากระทือเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก ปริมาตร 40 µL ผสมกับสารละลายเอบีทีเอส ปริมาตร 160 µL ต่อมาปิเปตสารละลายสารสกัดเหง้ากระทือ 40 µL ผสมเอทานอล 40 µL แล้วเติมสารละลายเอบีทีเอส 160 µL ทำตามลำดับความเข้มข้น และสุดท้ายเตรียมชุดควบคุมโดยปิเปตเอทานอล 80 µL และเติมสารละลายเอบีทีเอส 160 µL จากนั้นอ่านผลการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และคำนวณ ABTS radical scavenging activity ดังสมการที่ 1

$$\text{ABTS radical scavenging activity} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs control}} \times 100 \text{ (สมการที่ 1)}$$

เมื่อ Abs control (absorbance control) คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารควบคุม

Abs sample (absorbance sample) คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารที่ต้องการศึกษา

3.2.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH assay)

เตรียมสารละลายดีพีพีเอชความเข้มข้น 100 μM (26) โดยเตรียมจากสารละลายความเข้มข้น 1 mmol และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 100 μM แบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ สารละลายมาตรฐาน gallic acid (ความเข้มข้น 12.5 - 0.1953 $\mu\text{g/mL}$) สารละลายสารสกัดเหง้ากระทือ (ความเข้มข้น 1 - 0.3125 mg/mL) และตัวทำละลายเอทานอล จากนั้นผสมสารละลายใน 96-well microplates โดยทำแต่ละส่วน 3 ซ้ำ ทุกความเข้มข้นของสารละลาย เริ่มจากปิเปตสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นน้อยที่สุด คือ 0.1953 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 40 μL ผสมกับสารละลายดีพีพีเอช ปริมาตร 160 μL และปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นถัดไปเรื่อยๆ ทำจนครบทั้งหมด 7 ความเข้มข้นตามลำดับ ต่อมาปิเปตสารละลายมาตรฐาน gallic acid 40 μL ผสมเอทานอล 40 μL แล้วเติมสารละลายดีพีพีเอช 160 μL ทำตามลำดับความเข้มข้นแบบเดิม

ในส่วนของสารละลายสารสกัดเหง้ากระทือ ทำการปิเปตสารละลายสารสกัดเหง้ากระทือเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก ปริมาตร 40 μL ผสมกับสารละลายดีพีพีเอช ปริมาตร 160 μL ต่อมา ปิเปตสารละลายสารสกัดเหง้ากระทือ 40 μL ผสมเอทานอล 40 μL แล้วเติมสารละลายดีพีพีเอช 160 μL ทำตามลำดับความเข้มข้น และสุดท้ายเตรียมชุดควบคุมโดยปิเปตเอทานอล 80 μL และเติมสารละลายดีพีพีเอช 160 μL จากนั้นอ่านผลการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging activity) ดังสมการที่ 2

$$\text{DPPH radical scavenging activity} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs control}} \times 100 \quad (\text{สมการที่ 2})$$

เมื่อ Abs control (absorbance control) คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารควบคุม

Abs sample (absorbance sample) คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารที่ต้องการศึกษา

3.2.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT (3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay โดย MTT เป็นสารที่ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตและเกิดการรีดักชันของ MTT ได้ผลผลิตเป็น formazan ที่มีสีม่วง ซึ่งปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนความมีชีวิตรอดของเซลล์

3.2.6.1 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

นำเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด WS-1: Homo sapiens, human เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบไปด้วย DMEM ร่วมกับ 10% fetal bovine serum และ 1% Antibiotic antimycotic ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 75 ตารางเซนติเมตร บ่มเซลล์ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ จนกระทั่งเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 80% ของพื้นที่ ย่อยด้วย 0.25% trypsin – EDTA เพื่อแยกเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อจนได้รุ่นที่ 3 จึงทำการนับจำนวนเซลล์ที่ความเข้มข้น 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยง 96 หลุม และบ่มเซลล์ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂

3.2.6.2 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

เตรียมตัวอย่างทดสอบ ความเข้มข้น 100 mg/mL ในเอทานอล โดยเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM) ให้มีความเข้มข้น 0.002-1 mg/mL แล้วกรองผ่าน filter ขนาด 0.2 µm เตรียมสารละลายควบคุมเชิงบวก (Positive control) ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้แก่ 10% DMSO (v/v) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ นำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.2 µm และเตรียมสารละลายควบคุมเชิงลบ (Negative control) ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM) ร่วมกับ 10% Fetal bovine serum

3.2.6.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test)

ภายหลังบ่มเซลล์ WS-1 ที่มีความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ในงานเพาะเลี้ยง ขนาด 96 หลุม ครบ 24 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น

อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีสารละลายตัวอย่าง “ตัวอย่างที่ 1-4” และสารละลายควบคุม 10% DMSO (v/v) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และสารละลายควบคุมลบ อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 μL โดยแต่ละกลุ่มทำการทดสอบ 3 ซ้ำ บ่มเซลล์ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจาก 24 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงภายนอก (morphology grading) ของเซลล์เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับตัวอย่างทดสอบ ตรวจวัดการมีชีวิตของเซลล์โดยเติม สารละลาย MTT 1 mg/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 100 μL บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ให้ดูดสารละลาย MTT ออกละลายตะกอนด้วย DMSO ปริมาตร 100 μL และวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยากรดหลุม 570 nm (formazan) ซึ่งเป็นผลจากการทำหน้าที่ของ Succinate dehydrogenase enzyme ในเซลล์ที่มีชีวิต

3.2.6.4 ประเมินผลการทดสอบ

ใช้สี MTT ที่มีสีเหลือง ตรวจวัดการมีชีวิตของเซลล์ หลังจากเซลล์สัมผัสสารละลายตัวอย่างทดสอบเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง โดยให้เซลล์สัมผัสสารละลายสี MTT ในอาหารเลี้ยงเซลล์นาน 2 ชั่วโมง สำหรับเซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสี MTT จากสีเหลืองเป็นสารไม่ละลายน้ำสีม่วง แล้วใช้ DMSO ละลายสารสีม่วงออกจากเซลล์แล้ววัดความเข้มสีที่ 570 nm จากนั้นคำนวณและเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม ดังสมการที่ 3

$$\% \text{ การมีชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ}(\text{OD}_{570_s})}{\text{ดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม (อาหารเลี้ยงเซลล์)}(\text{OD}_{570_m})} \times 100 \text{ (สมการที่ 3)}$$

เมื่อ OD_{570_s} ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ

OD_{570_m} ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม (อาหารเลี้ยงเซลล์)

สารทดสอบที่สัมผัสกับเซลล์แล้วทำให้เซลล์ตายและส่งผลให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลดลงต่ำกว่า 70% จัดเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

3.2.7 การทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบ

ศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบโดยประเมินจากการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (Protein denaturation) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เติมน้ำละลาย BSA (0.2% w/v) ในสารละลาย Tris-HCl buffer (pH 6.8) จากนั้นเติมน้ำสกัดเหง้ากระทือผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วนำมาแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 75 °C 10 นาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 nm ด้วยเครื่อง UV/Vis spectrometer คำนวณ %inhibition ของการยับยั้งการตกตะกอนของโปรตีน เทียบกับตัวควบคุม คือ Diclofenac sodium

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมสารสกัดจากเหง้ากระเทียม

4.1.1 ลักษณะของสารสกัดจากเหง้ากระเทียม

- 1) ลักษณะของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอล แสดงดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงลักษณะของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอล

- 2) ลักษณะของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซน แสดงดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงลักษณะของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซน

3) ลักษณะของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน แสดงดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงลักษณะของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน

4.1.2 การคำนวณหาร้อยละผลผลิตสารสกัดจากเหง้ากระเทียม (% yield of crude extract powder)

การสกัดสารตัวอย่างจากเหง้ากระเทียม พบว่าปริมาณสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอล มีค่า 2.14 % ปริมาณสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนมีค่า 3.81 % และปริมาณสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนมีค่า 2.46 % (ตารางที่ 5)

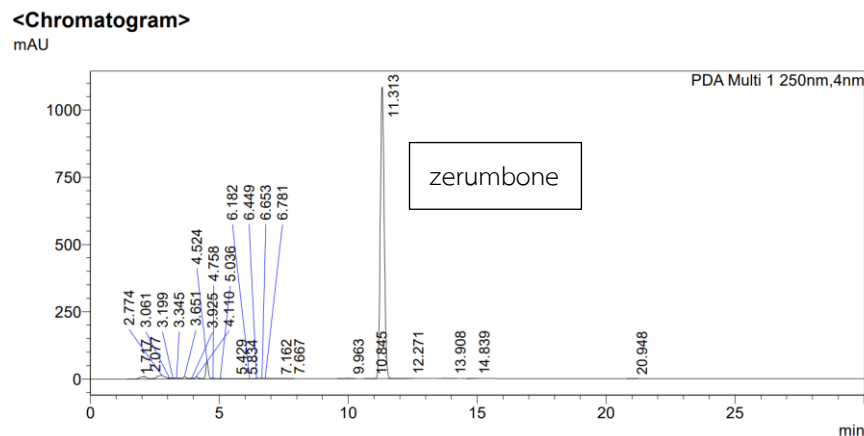
ตารางที่ 5 แสดงปริมาณสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดต่าง ๆ

ตัวทำละลายที่ใช้	% Yield of crude extract powder
เฮกเซน	3.81
ไดคลอโรมีเทน	2.46
เอทานอล	2.14

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของเหง้ากระเทียม ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)

4.2.1 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน Zerumbone

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารละลายมาตรฐาน Zerumbone ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า สารมาตรฐาน Zerumbone จะถูกชะออกมาที่เวลาประมาณ 10-11 นาที

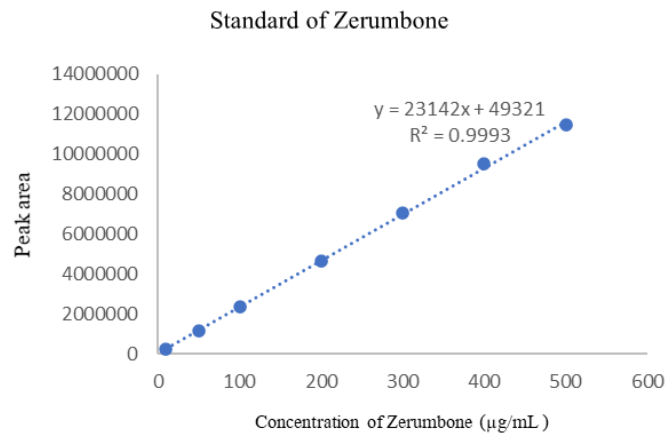


รูปที่ 11 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/mL}$

4.2.2 กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน Zerumbone

จากการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน Zerumbone ในช่วงความเข้มข้น 500-10 $\mu\text{g/mL}$ พบว่ากราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Zerumbone มีค่า correlation coefficient, R^2 เท่ากับ 0.9993 และสมการเส้นตรง คือ $y = 23142x + 49321$ ดังรูปที่ 12



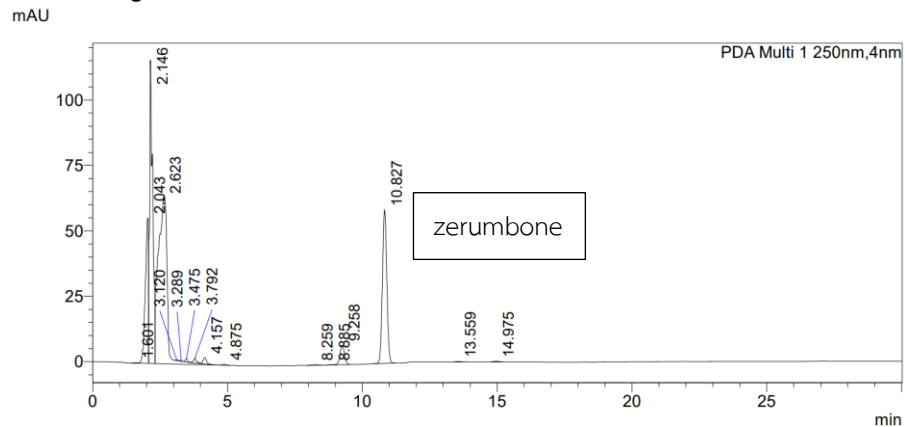
รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Zerumbone จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

4.2.3 โครมาโตแกรมของสารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียม

1) การวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอล

การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml พบว่ามีสารสำคัญ Zerumbone ซึ่งสารสำคัญ Zerumbone ถูกชะออกมาในเวลาประมาณ 10.8 นาที ดังรูปที่ 13

<Chromatogram>



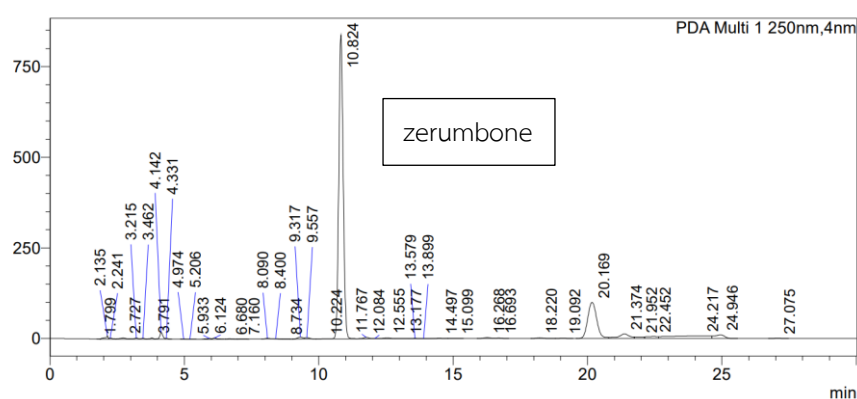
รูปที่ 13 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่มีความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่ 1

2) การวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซน

การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml พบว่ามีสารสำคัญ Zerumbone ซึ่งสารสำคัญ Zerumbone ถูกชะออกมาในเวลาประมาณ 10.8 นาที ดังรูปที่ 14

<Chromatogram>

mAU



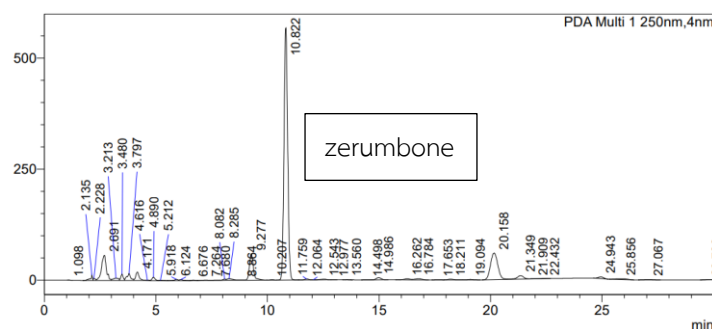
รูปที่ 14 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนที่มีความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่ 1

3) การวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน

การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml พบว่ามีสารสำคัญ Zerumbone ซึ่งสารสำคัญ Zerumbone ถูกชะออกมาในเวลาประมาณ 10.8 นาที ดังรูปที่ 15

<Chromatogram>

mAU



รูปที่ 15 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่มีความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่ 1

4.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญจากสารแห้งกระทือ

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดแห้งกระทือ พบว่ามีสารสำคัญหลายชนิด ซึ่งมีสารสำคัญที่สนใจ ได้แก่ Zerumbone ซึ่งมีปริมาณ ดังนี้

1) ปริมาณสาร Zerumbone ในสารสกัดแห้งกระทือส่วนสกัดเอทานอล

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารสำคัญ Zerumbone ในสารสกัดแห้งกระทือส่วนสกัดเอทานอลจากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง มีพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) และปริมาณสารสำคัญ แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณสาร Zerumbone ในสารสกัดแห้งกระทือส่วนสกัดเอทานอล

สารสกัดแห้งกระทือ 1 mg/ml	peak area	ปริมาณ Zerumbone (µg/mL)
ครั้งที่ 1	1468651	61.33
ครั้งที่ 2	860989	35.07
ครั้งที่ 3	958255	39.28
ค่าเฉลี่ย	1095965	45.23
S.D.	326399	14.10

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ Zerumbone ในสารสกัดแห้งกระทือส่วนสกัดเอทานอล 3 ครั้ง จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $y = 23142x + 49321$ พบว่ามีปริมาณ Zerumbone เฉลี่ยเท่ากับ 45.23 µg/mL และ %ปริมาณ Zerumbone เฉลี่ยมีค่า 4.52%

2) ปริมาณสาร Zerumbone ในสารสกัดแห้งกระทือส่วนสกัดเฮกเซน

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารสำคัญ Zerumbone ในสารสกัดแห้งกระทือส่วนสกัดเฮกเซนจากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง มีพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) และปริมาณสารสำคัญ แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 7 ปริมาณสาร Zerumbone ในสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซน

สารสกัดเหง้ากระเทียม 1 mg/ml	peak area	ปริมาณ Zerumbone (µg/mL)
ครั้งที่ 1	9540179	410.11
ครั้งที่ 2	9540811	410.14
ครั้งที่ 3	9535423	409.91
ค่าเฉลี่ย	9538804.33	410.05
S.D.	2945.32	0.13

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ Zerumbone ในสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซน 3 ครั้ง จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $y = 23142x + 49321$ พบว่ามีปริมาณ Zerumbone เฉลี่ยเท่ากับ 410.05 µg/mL และ %ปริมาณ Zerumbone เฉลี่ยมีค่า 41.01%

3) ปริมาณสาร Zerumbone ในสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารสำคัญ Zerumbone ในสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง มีพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) และปริมาณสารสำคัญ แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 8 ปริมาณสาร Zerumbone ในสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน

สารสกัดเหง้ากระเทียม 1 mg/ml	peak area	ปริมาณ Zerumbone (µg/mL)
ครั้งที่ 1	6436850	276.07
ครั้งที่ 2	6433268	275.86
ครั้งที่ 3	6443602	276.31
ค่าเฉลี่ย	6437906.67	276.06
S.D.	5247.41	0.23

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ Zerumbone ในสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน 3 ครั้ง จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $y = 23142x + 49321$ พบว่ามีปริมาณ Zerumbone เฉลี่ยเท่ากับ 276.06 $\mu\text{g/mL}$ และ %ปริมาณ Zerumbone เฉลี่ยมีค่า 27.61%

4.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

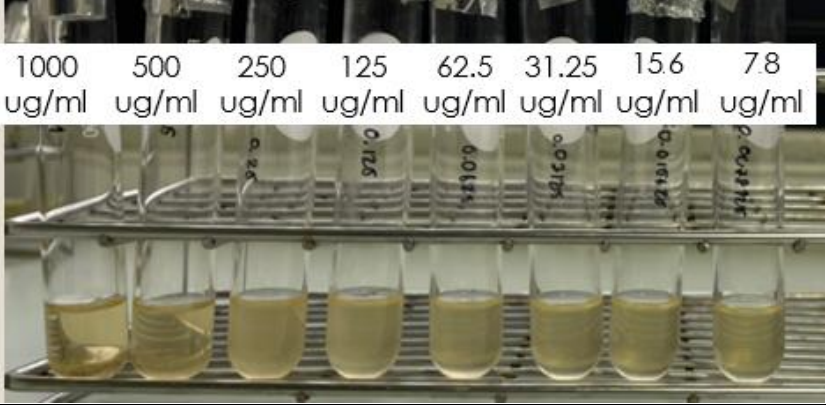
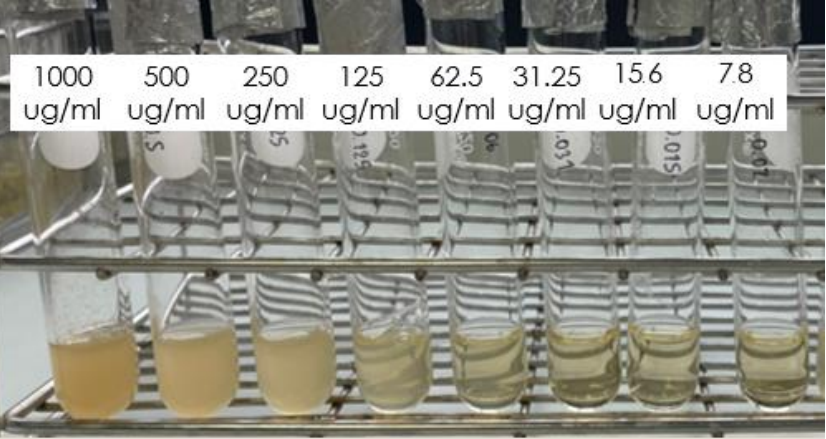
4.3.1 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย หรือ minimal inhibitory concentration (MIC)

1) การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

จากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* พบว่าตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 1- 0.0078 mg/mL หลอดทดลองที่มีลักษณะขุ่น ดังนั้นที่ความเข้มข้น 1- 0.0078 mg/mL ไม่สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

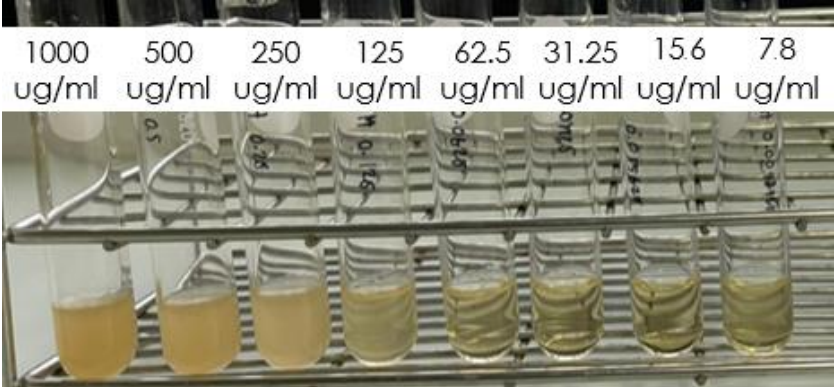
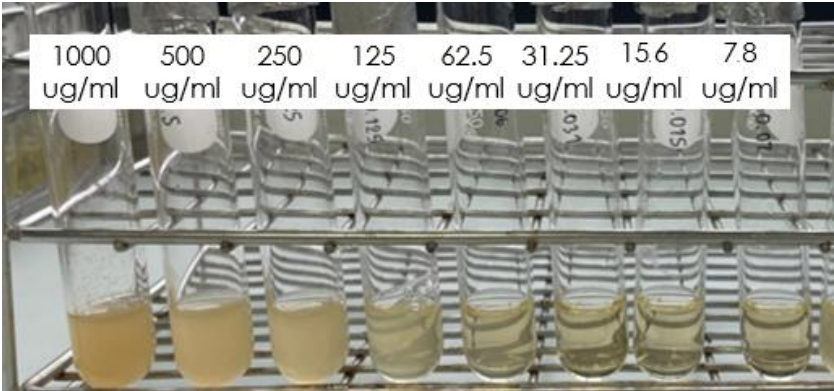
เชื้อ	ผลการทดสอบ
<i>S. epidermidis</i>	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1- 0.0078 mg/mL ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้

	
<i>S. aureus</i>	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1- 0.0078 mg/mL ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 

2) การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทเซนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

จากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทเซนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* พบว่าตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 1- 0.0625 mg/mL หลอดทดลองที่มีลักษณะขุ่นซึ่งเป็นผลมาจากการผสมของสารสกัดจากเหง้ากระทือและอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจึงต้องเปรียบเทียบกับลักษณะความขุ่นกับชุดควบคุม ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* คือ 0.03125 mg/mL และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* คือ 0.0156 mg/mL แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

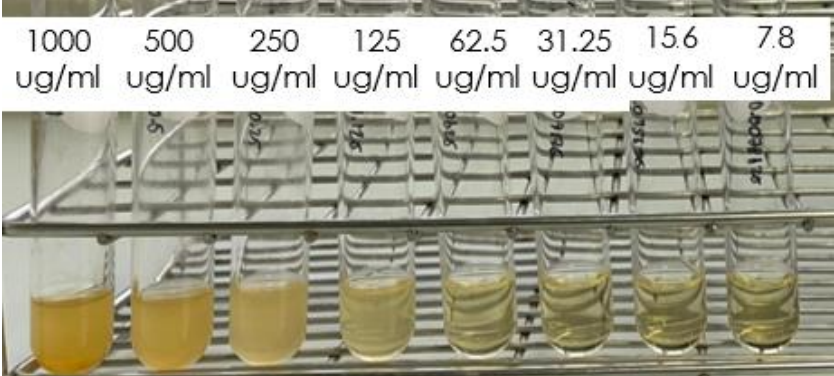
เชื้อ	ผลการทดสอบ
<i>S. epidermidis</i>	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1- 0.03125 mg/mL สามารถยับยั้งเชื้อได้ MIC คือ 0.03125 mg/mL 
<i>S. aureus</i>	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1- 0.0156 mg/mL สามารถยับยั้งเชื้อได้ MIC คือ 0.0156 mg/mL 

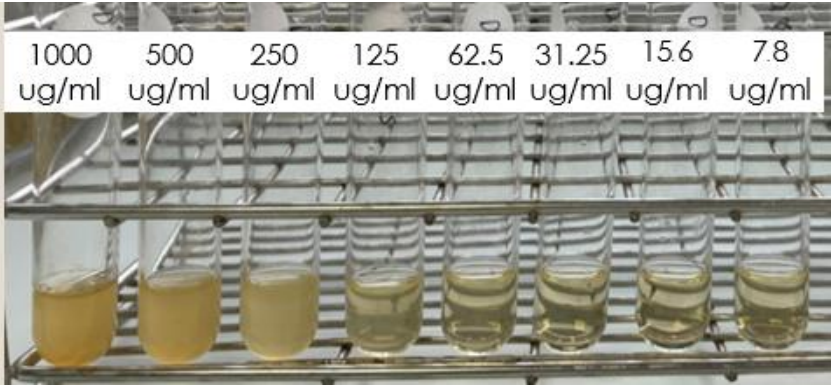
3) การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

จากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* พบว่าตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 1- 0.0625 mg/mL หลอดทดลองที่มีลักษณะขุ่นซึ่งเป็นผลมาจากการผสมของสารสกัดจากเหง้ากระทือและอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยง

เชื้อแบคทีเรียจึงต้องเปรียบเทียบกับลักษณะความขุ่นกับชุดควบคุม ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* คือ 0.03125 mg/mL และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* คือ 0.03125 mg/mL แสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ	ผลการทดสอบ
<i>S. epidermidis</i>	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1- 0.03125 mg/mL สามารถยับยั้งเชื้อได้ MIC คือ 0.03125 mg/mL 

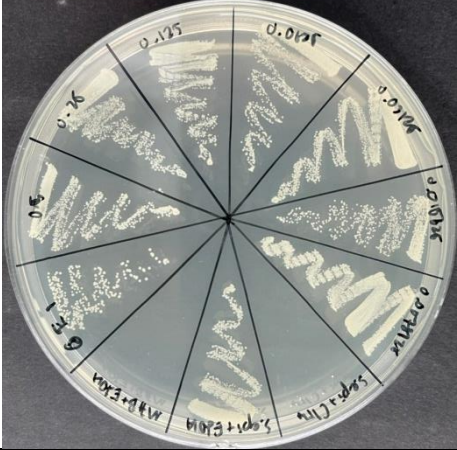
<i>S. aureus</i>	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1- 0.03125 mg/mL สามารถยับยั้งเชื้อได้ MIC คือ 0.03125 mg/mL 
------------------	--

4.3.2 การทดสอบการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย หรือ minimum bactericidal concentration (MBC)

1) การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

จากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* พบว่าตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 1-0.0078 mg/mL จะมีเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ แสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถฆ่าเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus*

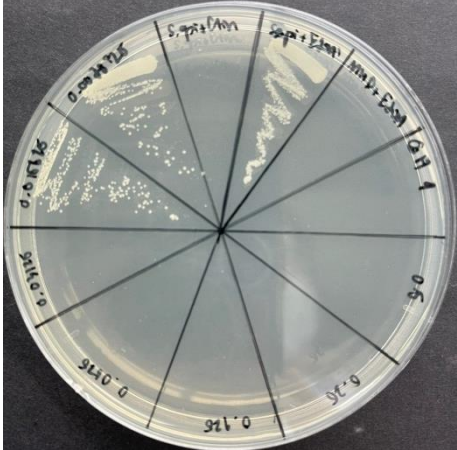
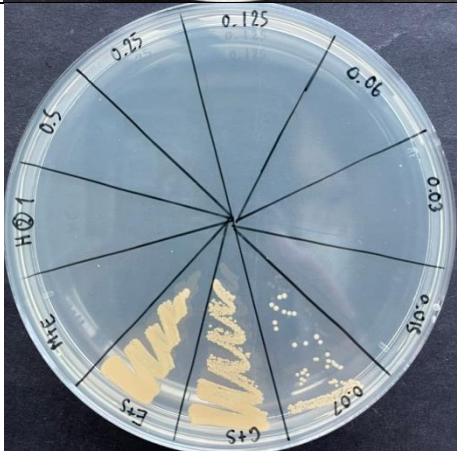
เชื้อ	ผลการทดสอบ	ภาพประกอบ
<i>S. epidermidis</i>	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-0.0078 mg/mL ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้	
<i>S. aureus</i>	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-0.0078 mg/mL ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้	

2) การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซนที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

จากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซนที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* พบว่าตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 1-0.0078 mg/mL จะมีเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้น 0.01562 mg/mL และ 0.0078 mg/mL ตามลำดับ ดังนั้นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus*

epidermidis คือ 0.03125 mg/mL และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* คือ 0.01562 mg/mL แสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซนที่สามารถฆ่าเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus*

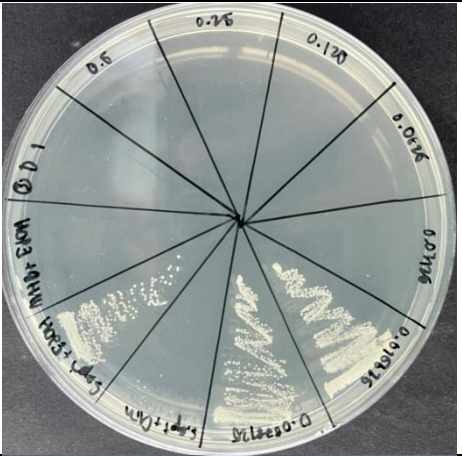
เชื้อ	ผลการทดสอบ	ภาพประกอบ
<i>S. epidermidis</i>	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-0.0078 mg/mL ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ MBC คือ 0.03125 mg/mL	
<i>S. aureus</i>	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-0.0078 mg/mL ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ MBC คือ 0.01562 mg/mL	

3) การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

จากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* พบว่าตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 1-0.0078 mg/mL จะมีเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตบน

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้น 0.01562 mg/mL ดังนั้นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด
 เหง้ากระเทียมที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* คือ 0.03125
 mg/mL และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* คือ
 0.03125 mg/mL แสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่
 สามารถฆ่าเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus*

เชื้อ	ผลการทดสอบ	ภาพประกอบ
<i>S. epidermidis</i>	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-0.0078 mg/mL ไม่สามารถยับยั้ง เชื้อได้ MBC คือ 0.03125 mg/mL	
<i>S. aureus</i>	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-0.0078 mg/mL ไม่สามารถยับยั้ง เชื้อได้ MBC คือ 0.03125 mg/mL	

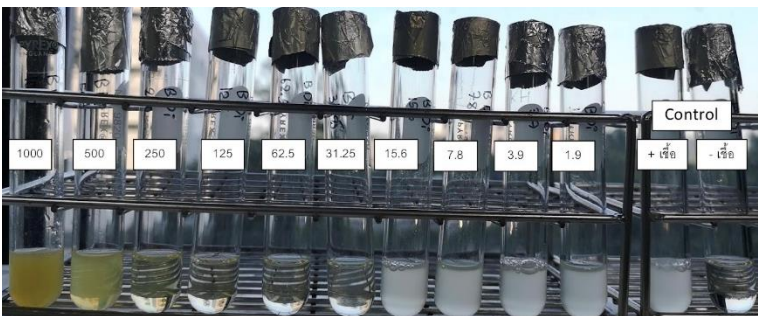
4.4 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Candida albicans*

4.4.1 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา หรือ minimal inhibitory concentration (MIC)

จากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบว่าตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 1- 0.0019 mg/mL หลอดทดลองมีลักษณะขุ่นในทุกความเข้มข้น ดังนั้นจึงไม่สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอล ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอเคเซนพบว่าที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1- 0.3125 mg/mL สามารถยับยั้งเชื้อราได้ ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอเคเซนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา คือ 0.3125 mg/mL ส่วนผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนพบว่าที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1- 0.0625 mg/mL สามารถยับยั้งเชื้อราได้ ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอเคเซนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา คือ 0.0625 mg/mL แสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Candida albicans*

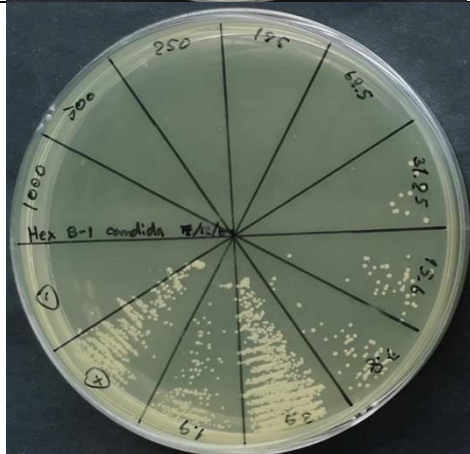
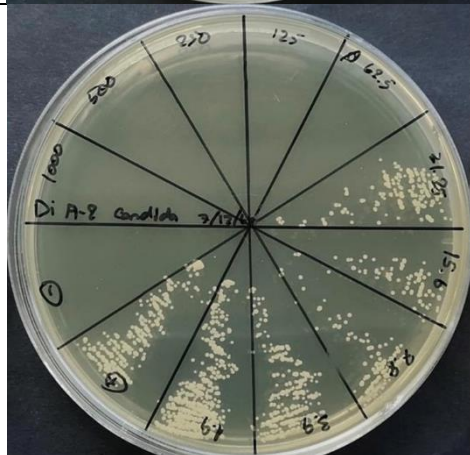
ตัวอย่างที่วิเคราะห์	ผลการทดสอบ
ส่วนสกัดเอทานอล	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1- 0.0019 mg/mL ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 

ส่วนสกัดเอ็กเซน	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1- 0.03125 mg/mL สามารถยับยั้งเชื้อราได้ MIC คือ 0.03125 mg/mL 
ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1- 0.0625 mg/mL สามารถยับยั้งเชื้อราได้ MIC คือ 0.0625 mg/mL 

4.4.2 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (minimal fungicidal concentration หรือ MFC)

จากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดต่างๆ ได้แก่ ส่วนสกัดเอทานอล ส่วนสกัดเอ็กเซน และส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน พบว่าตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 1-0.0078 mg/mL ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนส่วนสกัดเอทานอลจะมีเชื้อราเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทุกความเข้มข้น ดังนั้นจึงไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ สารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอ็กเซนและส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน พบว่าตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 1-0.03125 mg/mL จะมีเชื้อราเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอ็กเซนและส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน คือ 0.0625 mg/mL แสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดต่าง ๆ ที่สามารถฆ่าเชื้อรา *Candida albicans*

ตัวอย่างที่วิเคราะห์	ผลการทดสอบ	ภาพประกอบ
ส่วนสกัดเอทานอล	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-0.0078 mg/mL ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราได้	
ส่วนสกัดเอ็กเซน	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-0.0625 mg/mL สามารถยับยั้งเชื้อราได้ MFC คือ 0.0625 mg/mL	
ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน	ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-0.0625 mg/mL สามารถยับยั้งเชื้อราได้ MFC คือ 0.0625 mg/mL	

4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS assay)

1) สารต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ในตัวทำละลายเอทานอลโดยใช้วิธีการทดสอบ ABTS assay สามารถนำมาคำนวณหาค่า % ABTS radical scavenging activity จากค่า $A_{734 \text{ nm}}$ ได้ผลดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 แสดงค่า % ABTS radical scavenging activity ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

final conc. Gallic acid in ethanol ($\mu\text{g/mL}$)	% ABTS radical scavenging activity			
	(1)	(2)	(3)	$(\bar{x}) \pm \text{S.D.}$
12.5	87.99	87.89	88.58	88.15 ± 0.37
6.25	47.39	46.56	47.86	47.27 ± 0.66
3.125	34.99	33.94	34.56	34.50 ± 0.53
1.5625	20.89	20.47	21.65	21.00 ± 0.60
0.78125	13.10	11.40	12.56	12.35 ± 0.87
0.03906	10.52	7.95	9.93	9.47 ± 1.35
0.01953	8.64	6.03	7.89	7.52 ± 1.34

ผลการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ในช่วงความเข้มข้น 12.5-0.01953 $\mu\text{g/mL}$ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง

จากสมการที่เส้นตรงที่ได้ สามารถนำมาคำนวณหาค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ค่า IC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

Test	equation	R^2	IC_{50}
1	$y = 5.7738x + 14.69$	0.9884	6.12
2	$y = 5.8776x + 13.273$	0.9884	6.25
3	$y = 5.8698x + 14.201$	0.991	6.09
$\bar{x}$	6.15 $\mu\text{g/mL}$		
S.D.	0.08		

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน 3 กราฟ พบว่ามี IC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid เฉลี่ย เท่ากับ $6.15 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$

2) สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอล

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอล โดยใช้วิธีการทดสอบ ABTS assay นำมาคำนวณหา ค่า % ABTS radical scavenging activity จากค่า $A_{734 \text{ nm}}$ ในแต่ละครั้งได้ผลดัง ตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แสดงค่า % ABTS radical scavenging activity ของสารสกัดส่วนเอทานอล

final conc. สารสกัดเหง้า กระเทียมส่วนสกัดเอทานอล ($\mu\text{g/mL}$)	% ABTS radical scavenging activity			
	(1)	(2)	(3)	$(\bar{x}) \pm \text{S.D.}$
1000	100.50	100.66	100.37	100.51 ± 0.15
500	100.55	100.18	100.63	100.45 ± 0.24
250	100.72	99.46	100.05	100.08 ± 0.63
125	93.17	91.76	94.56	93.16 ± 1.40

62.5	71.13	72.22	77.07	73.47 ± 3.16
31.25	52.67	49.34	51.61	51.21 ± 1.70
15.6	45.45	41.58	40.52	42.52 ± 2.60
7.8	35.10	26.40	28.42	29.97 ± 4.55

ผลการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอลในช่วงความเข้มข้น 1000-7.8 $\mu\text{g/mL}$ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง

จากสมการเส้นตรงที่ได้ สามารถนำมาคำนวณหาค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % ดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอล

test	equation	R^2	IC_{50}
1	$y = 0.4375x + 39.973$	0.9857	22.92
2	$y = 0.774x + 24.719$	0.9609	32.66
3	$y = 0.8518x + 24.457$	0.9879	29.99
$\bar{x}$	28.52 $\mu\text{g/mL}$		
S.D.	5.03		

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอลจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน 3 กราฟ พบว่ามี IC_{50} ของสารสกัดเฉลี่ย เท่ากับ $28.52 \pm 5.03 \mu\text{g/mL}$

3) สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซน

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนโดยใช้วิธีการทดสอบ ABTS assay นำมาคำนวณหาค่า % ABTS radical scavenging activity จากค่า $A_{734 \text{ nm}}$ ในแต่ละครั้งได้ผลดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดงค่า % ABTS radical scavenging activity ของสารสกัดส่วนเฮกเซน

final conc. สารสกัดเหง้า กระเทียมส่วนสกัดเฮกเซน ($\mu\text{g/mL}$)	% ABTS radical scavenging activity			
	(1)	(2)	(3)	$(\bar{x}) \pm \text{S.D.}$
1000	74.96	87.03	82.06	81.35 ± 6.07
500	42.74	51.57	52.49	48.93 ± 5.38
250	31.75	42.06	37.17	36.99 ± 5.16
125	25.33	26.77	18.80	23.63 ± 4.25
62.5	19.26	18.47	11.19	16.31 ± 4.45
31.25	12.61	13.74	4.20	10.18 ± 5.21
15.6	3.27	13.03	-0.73	5.19 ± 7.08
7.8	6.93	10.23	-5.84	3.77 ± 8.49

ผลการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนในช่วงความเข้มข้น 1000-7.8 $\mu\text{g/mL}$ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง

จากสมการเส้นตรงที่ได้ สามารถนำมาคำนวณหาค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % ดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซน

test	equation	R^2	IC_{50}
1	$y = 0.0568x + 17.08$	0.9930	579.5775
2	$y = 0.0655x + 21.134$	0.9833	440.7023
3	$y = 0.0682x + 15.654$	0.9723	503.607
$\bar{x}$	507.96 $\mu\text{g/mL}$		
S.D.	69.54		

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซนจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน 3 กราฟ พบว่ามี IC_{50} ของสารสกัดเฉลี่ยเท่ากับ $507.96 \pm 69.54 \mu\text{g/mL}$

4) สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนโดยใช้วิธีการทดสอบ ABTS assay นำมาคำนวณหาค่า % ABTS radical scavenging activity จากค่า $A_{734 \text{ nm}}$ ในแต่ละครั้งได้ผล ดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 แสดงค่า % ABTS radical scavenging activity ของสารสกัดส่วนไดคลอโรมีเทน

final conc. สารสกัดเหง้า กระทือส่วนสกัดไดคลอโร มีเทน ($\mu\text{g/mL}$)	% ABTS radical scavenging activity			
	(1)	(2)	(3)	$(\bar{x}) \pm \text{S.D.}$
1000	100.26	100.24	100.29	100.26 ± 0.03
500	98.00	97.83	97.95	97.93 ± 0.09
250	76.47	78.62	79.20	78.10 ± 01.44

125	55.88	57.09	57.53	56.83 ± 0.85
62.5	40.91	41.65	41.99	41.52 ± 0.55
31.25	35.45	26.64	26.69	29.59 ± 5.07
15.6	20.75	23.89	24.01	22.88 ± 1.85
7.8	17.80	9.70	9.69	12.40 ± 4.68

ผลการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัด
ไดคลอโรมีเทนในช่วงความเข้มข้น 1000-7.8 $\mu\text{g/mL}$ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง

จากสมการเส้นตรงที่ได้ สามารถนำมาคำนวณหาค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้น
ของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % ดังตารางที่ 24

ตารางที่ 24 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน

test	equation	R^2	IC_{50}
1	$y = 0.1224x + 40.475$	0.9331	77.82
2	$y = 0.123x + 39.976$	0.9367	81.50
3	$y = 0.1254x + 38.427$	0.9534	92.29
$\bar{x}$	84.87 $\mu\text{g/mL}$		
S.D.	7.52		

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระทือส่วน
สกัดไดคลอโรมีเทนจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน 3 กราฟ พบว่ามี IC_{50}
ของสารสกัดเฉลี่ย เท่ากับ $84.87 \pm 7.52 \mu\text{g/mL}$

4.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH assay)

1) สารต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ในตัวทำละลายเอทานอลโดยใช้วิธีการทดสอบ DPPH assay สามารถนำมาคำนวณหาค่า % DPPH radical scavenging activity จากค่า $A_{517\text{ nm}}$ ได้ผลดังตารางที่ 25

ตารางที่ 25 แสดงค่า % DPPH radical scavenging activity ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

final conc. Gallic acid in ethanol ($\mu\text{g/mL}$)	% DPPH radical scavenging activity			
	(1)	(2)	(3)	$(\bar{x}) \pm \text{S.D.}$
12.5	60.71	61.80	59.41	60.64 ± 1.20
6.25	35.15	36.63	34.58	35.45 ± 1.06
3.125	29.75	31.61	29.31	30.22 ± 1.22
1.5625	14.51	17.20	14.18	15.30 ± 1.66
0.78125	11.94	14.56	11.28	12.59 ± 1.73
0.03906	9.80	12.58	9.28	10.55 ± 1.77
0.01953	1.20	3.96	1.16	2.11 ± 1.61

ผลการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ในช่วงความเข้มข้น 12.5-0.01953 $\mu\text{g/mL}$ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง

จากสมการเส้นตรงที่ได้ สามารถนำมาคำนวณหาค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % ดังตารางที่ 26

ตารางที่ 26 แสดงค่า ค่า IC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

Test	equation	R^2	IC_{50}
1	$y = 3.4148x + 16.972$	0.9715	9.67
2	$y = 3.3352x + 19.026$	0.9688	9.29
3	$y = 3.3195x + 16.895$	0.9718	9.97
$\bar{x}$	9.64 $\mu\text{g/mL}$		
S.D.	0.34		

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน 3 กราฟ พบว่ามี IC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid เฉลี่ย เท่ากับ $9.64 \pm 0.34 \mu\text{g/mL}$

2) สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอล

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอล โดยใช้วิธีการทดสอบ DPPH assay นำมาคำนวณหาค่า % DPPH radical scavenging activity จากค่า $A_{517 \text{ nm}}$ ในแต่ละครั้งได้ผล ดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 แสดงค่า % DPPH radical scavenging activity ของสารสกัดส่วนเอทานอล

final conc. สารสกัดเหง้า กระเทียมส่วนสกัดเอทานอล ($\mu\text{g/mL}$)	% DPPH radical scavenging activity			
	(1)	(2)	(3)	$(\bar{x}) \pm \text{S.D.}$
1000	93.70	95.25	94.82	94.59 ± 0.80
500	74.48	74.85	75.47	74.93 ± 0.50
250	56.42	57.50	56.30	56.74 ± 0.66
125	34.79	35.52	36.11	35.47 ± 0.66

62.5	24.97	26.49	22.36	24.61 ± 2.09
31.25	17.33	14.65	12.54	14.84 ± 2.40
15.6	10.79	9.79	14.77	11.78 ± 2.63
7.8	5.09	9.85	11.51	8.82 ± 3.33

ผลการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอลในช่วงความเข้มข้น 1000-7.8 $\mu\text{g/mL}$ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง

จากสมการเส้นตรงที่ได้ สามารถนำมาคำนวณหาค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % ดังตารางที่ 28

ตารางที่ 28 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอล

test	equation	R^2	IC_{50}
1	$y = 0.0619x + 35.837$	0.9058	228.80
2	$y = 0.0627x + 36.406$	0.9118	216.81
3	$y = 0.0623x + 36.452$	0.9152	217.46
$\bar{x}$	221.03 $\mu\text{g/mL}$		
S.D.	6.74		

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอลจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน 3 กราฟ พบว่ามี IC_{50} ของสารสกัดเฉลี่ย เท่ากับ $221.03 \pm 6.74 \mu\text{g/mL}$

3) สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซน

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนโดยใช้วิธีการทดสอบ DPPH assay นำมาคำนวณหาค่า % DPPH radical scavenging activity จากค่า $A_{517\text{ nm}}$ ในแต่ละครั้งได้ผล ดังตารางที่ 29

ตารางที่ 29 แสดงค่า % DPPH radical scavenging activity ของสารสกัดส่วนเฮกเซน

final conc. สารสกัดเหง้า กระเทียมส่วนสกัดเฮกเซน ($\mu\text{g/mL}$)	% DPPH radical scavenging activity			
	(1)	(2)	(3)	($\bar{x}$) $\pm$ S.D.
1000	88.56	88.87	92.28	89.90 ± 2.06
500	79.42	87.12	80.04	82.19 ± 4.28
250	78.74	81.29	75.58	78.54 ± 2.86
125	70.48	84.17	71.32	75.32 ± 7.67
62.5	60.93	71.36	65.67	65.99 ± 5.22
31.25	53.83	60.97	56.15	56.98 ± 3.64
15.6	45.97	48.96	46.64	47.19 ± 1.57
7.8	31.69	36.08	34.86	34.21 ± 2.27

ผลการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนในช่วงความเข้มข้น 1000-7.8 $\mu\text{g/mL}$ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง

จากสมการเส้นตรงที่ได้ สามารถนำมาคำนวณหาค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % ดังตารางที่ 30

ตารางที่ 30 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซน

test	equation	R^2	IC_{50}
1	$y = 0.8518x + 24.457$	0.9879	1231.25
2	$y = 0.0236x + 24.883$	0.9977	1064.28
3	$y = 0.0185x + 24.814$	0.9823	1361.41
$\bar{x}$	1162.97 $\mu\text{g/mL}$		
S.D.	148.94		

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซนจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน 3 กราฟ พบว่ามี IC_{50} ของสารสกัดเฉลี่ย เท่ากับ $1162.97 \pm 148.94 \mu\text{g/mL}$

3) สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนโดยใช้วิธีการทดสอบ DPPH assay นำมาคำนวณหาค่า % DPPH radical scavenging activity จากค่า $A_{517 \text{ nm}}$ ในแต่ละครั้งได้ผล ดังตารางที่ 31

ตารางที่ 31 แสดงค่า % DPPH radical scavenging activity ของสารสกัดส่วนไดคลอโรมีเทน

final conc. สารสกัดเหง้า กระทือส่วนสกัดไดคลอโร มีเทน ($\mu\text{g/mL}$)	% DPPH radical scavenging activity			
	(1)	(2)	(3)	$(\bar{x}) \pm \text{S.D.}$
1000	91.62	90.38	93.34	91.78 ± 1.49
500	65.83	66.74	67.28	66.62 ± 0.73
250	47.48	49.94	48.70	48.71 ± 1.23

125	32.47	33.31	32.19	32.66 ± 0.58
62.5	21.63	23.29	22.24	22.39 ± 0.84
31.25	17.17	16.22	17.54	16.98 ± 0.68
15.6	13.19	9.21	9.79	10.73 ± 2.15
7.8	10.38	11.01	12.80	11.40 ± 1.26

ผลการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัด
ไดคลอโรมีเทนในช่วงความเข้มข้น 1000-7.8 $\mu\text{g/mL}$ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง

จากสมการที่ได้จากกราฟข้างต้น สามารถนำมาคำนวณหาค่า IC_{50} คือ
ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 % ดังตารางที่ 32

ตารางที่ 32 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน

test	equation	R^2	IC_{50}
1	$y = 0.065x + 28.901$	0.9738	324.60
2	$y = 0.0617x + 31.165$	0.9603	305.27
3	$y = 0.0667x + 29.106$	0.9683	313.25
$\bar{x}$	314.37 $\mu\text{g/mL}$		
S.D.	9.71		

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระทือส่วน
สกัดไดคลอโรมีเทนจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน 3 กราฟ พบว่ามี IC_{50}
ของสารสกัดเฉลี่ย เท่ากับ $314.37 \pm 9.71 \mu\text{g/mL}$

4.6 การทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบ

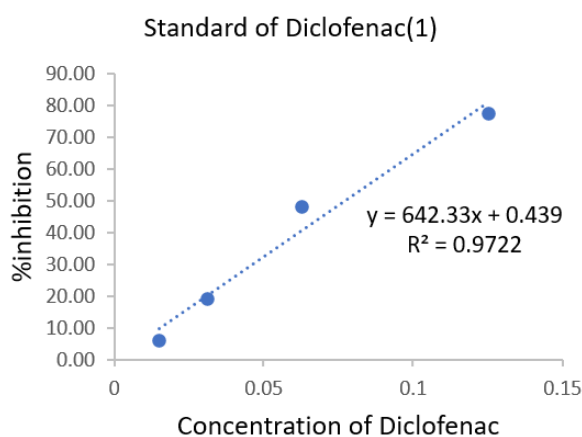
1) ฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารมาตรฐาน Diclofenac

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารมาตรฐาน ทำโดยใช้วิธีการประเมินจากการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (protein denaturation) สามารถนำมาคำนวณหาค่า % inhibition of denaturation ได้ผลดังตารางที่ 33

ตารางที่ 33 แสดงค่า % inhibition of denaturation ของสารมาตรฐาน Diclofenac

final conc. Diclofenac (mg/mL)	% Inhibition of denaturation			
	(1)	(2)	(3)	($\bar{x}$) $\pm$ S.D.
1	100.12	99.68	100.29	100.03 $\pm$ 0.32
0.5	100.51	99.91	100.34	100.25 $\pm$ 0.31
0.25	98.88	98.72	99.59	99.06 $\pm$ 0.46
0.125	77.53	81.59	84.90	81.34 $\pm$ 3.69
0.0625	48.28	53.04	59.28	53.53 $\pm$ 5.51
0.031	19.53	34.79	35.23	29.85 $\pm$ 8.94
0.015	6.40	18.48	18.72	14.54 $\pm$ 7.04

ผลการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเส้นตรงของสารมาตรฐาน Diclofenac ในช่วงความเข้มข้น 1-0.015 mg/mL โดยทำการวิเคราะห์ 3 ครั้ง ดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานแสดงค่า % inhibition of denaturation กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Diclofenac ครั้งที่ 1

จากสมการเส้นตรงที่ได้ สามารถนำมาคำนวณหาค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถต้านการอักเสบได้ 50 % ดังตารางที่ 34

ตารางที่ 34 แสดงค่า IC_{50} ของสารละลายมาตรฐาน Diclofenac

Test	equation	R^2	IC_{50}
1	$y = 642.33x + 0.439$	0.9722	0.08
2	$y = 550.41x + 14.845$	0.978	0.06
3	$y = 582.03x + 15.556$	0.9603	0.06
$\bar{x}$	0.07 mg/mL		
S.D.	0.01		

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านการอักเสบของสารมาตรฐาน Diclofenac จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน 3 กราฟ พบว่ามี IC_{50} ของสารมาตรฐาน Diclofenac เฉลี่ย เท่ากับ 0.07 ± 0.01 mg/mL

2)ฤทธิ์การต้านการอักเสบของของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอล

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านการอักเสบของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอล ทำโดยใช้วิธีการประเมินจากการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (protein denaturation) สามารถนำมาคำนวณหาค่า % inhibition of denaturation ได้ผลดังตารางที่ 35

ตารางที่ 35 แสดงค่า % inhibition of denaturation ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนเอทานอล

	% Inhibition of denaturation
--	------------------------------

final conc. สารสกัดเหง้า กระทือส่วนสกัดเอทานอล (mg/mL)	(1)	(2)	(3)	$(\bar{x}) \pm S.D.$
2	3.90	10.75	11.55	8.73 ± 4.20
1	2.12	5.99	1.07	3.06 ± 2.59
0.5	17.14	18.96	21.59	19.23 ± 2.24
0.25	14.34	8.55	8.53	10.47 ± 3.35
0.125	1.73	7.27	8.44	5.81 ± 3.58
0.0625	0.12	7.55	-0.80	2.29 ± 4.58

3) ฤทธิ์การต้านการอักเสบของของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซน

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านการอักเสบของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซน ทำโดยใช้วิธีการประเมินจากการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (protein denaturation) สามารถนำมาคำนวณหาค่า % inhibition of denaturation ได้ผลดังตารางที่ 36

ตารางที่ 36 แสดงค่า % inhibition of denaturation ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนเฮกเซน

final conc. สารสกัดเหง้า กระทือส่วนสกัดเฮกเซน (mg/mL)	% Inhibition of denaturation			
	(1)	(2)	(3)	$(\bar{x}) \pm S.D.$
2	-12.17	-14.27	-5.58	-10.67 ± 4.53
1	7.06	10.25	8.98	8.76 ± 1.61
0.5	8.96	10.91	6.38	8.75 ± 2.27
0.25	12.10	1.66	7.57	7.11 ± 5.24
0.125	6.18	8.84	10.69	8.57 ± 2.27
0.0625	-2.39	2.00	5.06	1.56 ± 3.74

4)ฤทธิ์การต้านการอักเสบของของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านการอักเสบของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน ทำโดยใช้วิธีการประเมินจากการยับยั้งการเสียสภาพของโปรตีน (protein denaturation) สามารถนำมาคำนวณหาค่า % inhibition of denaturation ได้ผลดังตารางที่ 37

ตารางที่ 37 แสดงค่า % inhibition of denaturation ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนไดคลอโรมีเทน

final conc. สารสกัดเหง้า กระทือส่วนสกัดไดคลอโร มีเทน (mg/mL)	% Inhibition of denaturation			
	(1)	(2)	(3)	($\bar{x}$) $\pm$ S.D.
2	-12.86	-3.20	-19.57	-11.88 $\pm$ 8.23
1	-1.10	2.40	-9.92	-2.87 $\pm$ 6.35
0.5	22.33	6.43	6.39	11.72 $\pm$ 9.19
0.25	-5.21	9.38	9.46	4.54 $\pm$ 8.45
0.125	30.36	30.63	-0.15	20.28 $\pm$ 17.69
0.0625	1.44	29.92	14.42	15.26 $\pm$ 14.26

4.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

4.7.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนเอทานอล

ผลการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนเอทานอลด้วยวิธี MTT assay โดยศึกษาจากปริมาณการรอดชีวิตของเซลล์ แสดงดังตารางที่ 38

ตารางที่ 38 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนเอทานอล

ความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอล ($\mu\text{g/mL}$)	% Cell viability			
	(1)	(2)	(3)	$(\bar{x}) \pm \text{S.D.}$
1000	112.77	118.46	131.18	120.80 ± 9.43
500	46.01	76.70	83.72	68.81 ± 20.06
250	68.36	70.35	80.34	73.02 ± 6.42
125	68.36	77.91	74.81	73.69 ± 4.87
62.5	45.72	74.89	82.49	67.70 ± 19.41
31.25	87.81	78.37	68.97	78.38 ± 9.42
15.625	73.88	67.47	67.43	69.59 ± 3.71
7.8125	72.71	78.82	64.36	71.97 ± 7.26

4.7.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนเฮกเซน

ผลการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนเฮกเซนด้วยวิธี

MTT assay โดยศึกษาจากปริมาณการรอดชีวิตของเซลล์ แสดงดังตารางที่ 39

ตารางที่ 39 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนเฮกเซน

ความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซน ($\mu\text{g/mL}$)	% Cell viability			
	(1)	(2)	(3)	$(\bar{x}) \pm \text{S.D.}$
1000	91.58	167.17	157.14	138.63 ± 41.05
500	73.88	103.63	111.06	96.19 ± 19.68
250	67.56	87.90	86.18	80.54 ± 11.28
125	71.70	82.75	98.77	84.41 ± 13.61

62.5	77.94	79.73	86.79	81.49 ± 4.68
31.25	73.29	85.17	88.33	82.26 ± 7.93
15.625	75.62	82.00	84.02	80.55 ± 4.39
7.8125	69.23	81.54	93.86	81.54 ± 12.31

4.7.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนไดคลอโรมีเทน

ผลการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนไดคลอโรมีเทน ด้วยวิธี MTT assay โดยศึกษาจากปริมาณการรอดชีวิตของเซลล์ แสดงดังตารางที่ 40

ตารางที่ 40 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนไดคลอโรมีเทน

ความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนไดคลอโรมีเทน (µg/mL)	% Cell viability			
	(1)	(2)	(3)	($\bar{x}$) ± S.D.
1000	313.35	237.97	305.53	285.62 ± 41.45
500	185.34	150.83	183.56	173.25 ± 19.43
250	110.01	109.08	100.92	106.67 ± 5.00
125	104.35	97.88	103.38	101.87 ± 3.49
62.5	81.71	68.84	86.94	79.16 ± 9.32
31.25	84.03	84.87	88.94	85.95 ± 2.62
15.625	93.61	106.05	89.25	96.30 ± 8.72
7.8125	78.52	96.97	99.62	91.70 ± 11.49

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 การเตรียมสารสกัดจากเหง้ากระเทียม

สกัดสารจากเหง้ากระเทียมโดยวิธีการแช่หมักด้วยเฮกเซน เก็บส่วนที่เป็นสารละลายแยกไว้ได้ เป็นสารสกัดกระเทียมส่วนสกัดเฮกเซน ส่วนที่เป็นกากพืชนำมาสกัดซ้ำโดยนำมาแช่หมักด้วยไดคลอโรมีเทน ได้เป็นสารสกัดกระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน และนำมาสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยการแช่หมักด้วยเอทานอล ได้เป็นสารสกัดกระเทียมส่วนสกัดเอทานอล แล้วนำทุกส่วนสกัดมาระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดจนได้สารมีลักษณะขุ่นหนืด สีน้ำตาลเข้ม โดยมีร้อยละผลผลิตสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอล เท่ากับ 2.14 % ส่วนสกัดเฮกเซน เท่ากับ 3.81 % และส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน เท่ากับ 2.46 %

5.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของเหง้ากระเทียม ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)

การตรวจวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอล เฮกเซน และไดคลอโรมีเทนความเข้มข้น 1 mg/ml พบว่ามีสารสำคัญ คือ Zerumbone ซึ่งสารสำคัญถูกชะออกมาที่เวลาประมาณ 10.8 นาทีในทุกส่วนการสกัด ซึ่งสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลพบว่าปริมาณ Zerumbone เฉลี่ยเท่ากับ 45.23 ± 4.52 $\mu\text{g/mL}$ และร้อยละปริมาณ Zerumbone เฉลี่ยมีค่า 4.52 ± 1.41 ปริมาณสาร Zerumbone ในสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซน พบว่ามีปริมาณ Zerumbone เฉลี่ยเท่ากับ 410.05 ± 0.13 $\mu\text{g/mL}$ และร้อยละปริมาณ Zerumbone เฉลี่ยมีค่า 41.01 ± 0.013 ปริมาณสาร Zerumbone ในสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน เฉลี่ยเท่ากับ 276.06 ± 0.23 $\mu\text{g/mL}$ และร้อยละปริมาณ Zerumbone เฉลี่ยมีค่า 27.61 ± 0.02 ซึ่งจะพบว่าปริมาณสาร Zerumbone พบมากที่สุดในส่วนสกัดเฮกเซน รองลงมาคือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนและส่วนสกัดเอทานอลตามลำดับ

5.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย หรือ minimal inhibitory concentration (MIC) พบว่าที่ความเข้มข้น 1- 0.0078

mg/mL ของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลไม่สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* ได้ เนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่ 1- 0.0078 mg/mL ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เลยแต่หากเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลให้มีความเข้มข้นมากกว่า 1 mg/mL อาจจะ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ จากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* คือ 0.03125 mg/mL และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* คือ 0.0156 mg/mL และจากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* คือ 0.03125 mg/mL และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* คือ 0.03125 mg/mL

ผลการทดสอบการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย หรือ minimum bactericidal concentration (MBC) พบว่าที่ความเข้มข้น 1- 0.0078 mg/mL ของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลไม่สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* ได้จากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* คือ 0.03125 mg/mL และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* คือ 0.01562 mg/mL จากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* คือ 0.03125 mg/mL และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* คือ 0.03125 mg/mL ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาในปี 2016 ของ Adriana Y. Koga และคณะ (18) พบในส่วนของการสกัดหยาบมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียอยู่

ในระดับสูงที่สุดในการยับยั้งเชื้อ โดยค่า MIC ของสารสกัดหยาบด้วย ethanol และสารสกัดที่แยกส่วนออกมาในส่วน petroleum ether และ chloroform นั้นมีค่าเท่ากับ 128-256 $\mu\text{g/mL}$ อย่างไรก็ตามในการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียควรจะมีการใช้ Zerumbone ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในกระเทียมมาใช้เป็นสารทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วย

5.4 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Candida albicans*

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา หรือ minimal inhibitory concentration (MIC) พบว่าตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 1- 0.0019 mg/mL ของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ดังนั้นจึงไม่สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ซึ่งหากเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลให้มีความเข้มข้นมากกว่า 1 mg/mL อาจจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ จากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 1- 0.0019 mg/mL พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา คือ 0.03125 mg/mL และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา คือ 0.0625 mg/mL

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (MFC) จากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 1-0.0078 mg/mL จะพบเชื้อราเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทุกความเข้มข้น ดังนั้นจึงไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ และจากผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนและส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน พบว่าตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 1-0.03125 mg/mL จะมีเชื้อราเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนและส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่ฆ่าเชื้อราได้ คือ 0.0625 mg/mL ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาในปี 2016 ของ Adriana Y. Koga และคณะ (18) พบว่าสารสกัดหยาบของกระเทียมมีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้อย่างดีกับเชื้อราก่อโรคทุกชนิดที่ทดสอบ อย่างไรก็ตามในการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราควรจะมีการใช้ Zerumbone ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในกระเทียมมาใช้เป็นสารทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วย

5.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS assay) การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดต่าง โดยคำนวณหาค่า % ABTS radical scavenging activity จากค่า $A_{734\text{ nm}}$ คำนวณหาค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถต้านการอักเสบได้ ร้อยละ 50 จากผลการทดลองพบว่ามีค่า IC_{50} ของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลเฉลี่ย เท่ากับ $28.52 \pm 5.03\text{ }\mu\text{g/mL}$ ค่า IC_{50} ของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนเฉลี่ย เท่ากับ $507.96 \pm 69.54\text{ }\mu\text{g/mL}$ และค่า IC_{50} ของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนเฉลี่ย เท่ากับ $84.87 \pm 7.52\text{ }\mu\text{g/mL}$ โดยสารสกัดจากส่วนสกัดเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมา คือ ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน และส่วนสกัดเฮกเซนตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH assay) การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดต่าง โดยคำนวณหาค่า % DPPH radical scavenging activity จากค่า $A_{517\text{ nm}}$ เพื่อใช้คำนวณหาค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถต้านการอักเสบได้ร้อยละ 50 จากผลการทดลองพบว่ามีค่า IC_{50} ของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลเฉลี่ย เท่ากับ $9.64 \pm 0.34\text{ }\mu\text{g/mL}$ ค่า IC_{50} ของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนเฉลี่ย เท่ากับ $1162.97 \pm 148.94\text{ }\mu\text{g/mL}$ และค่า IC_{50} ของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนเฉลี่ย เท่ากับ $314.37 \pm 9.71\text{ }\mu\text{g/mL}$ ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบด้วยวิธี DPPH assay คือ ส่วนสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด รองลงมา คือ ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน และส่วนสกัดเฮกเซนตามลำดับ

โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอสและวิธีดีพีพีเอชทั้งสองวิธีใช้สารมาตรฐาน คือ Gallic acid ซึ่งสารสกัดจากเหง้ากระเทียมมีสาร Gallic acid เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจากผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Anish Nag และคณะ (22) ที่ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกระเทียมโดยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยที่สารสกัดของ *Z. zerumbet* แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติที่สูง ซึ่งสารสกัด *Z. zerumbet* มีหมู่ phenolic เป็นจำนวนมากรวมถึง kaempferol ที่เป็นหมู่ flavonoid เป็นส่วนประกอบทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.6 การทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบ

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านการอักเสบทำโดยใช้วิธีการประเมินเบื้องต้นจากการยับยั้งการเสียดสภาพของโปรตีน (protein denaturation) เพื่อคำนวณหาค่า % inhibition of denaturation จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดต่างๆ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่เป็น Diclofenac ซึ่งผลการทดลองฤทธิ์ต้านการอักเสบมีความสอดคล้องกันกับการศึกษาของ Chien และคณะ (17) ซึ่งได้รายงานถึงฤทธิ์การต้านการอักเสบจากสารประกอบกระทือ ในการศึกษาการเกิดอุ้งเท้าบวมในหนูทดลอง พบว่าสารประกอบ Zerumbone ในกระทือสามารถลดการบวมในอุ้งเท้าหนูได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ใช้ยา Indomethacin พบว่าในกลุ่มที่ใช้ Zerumbone และ 3-O-methyl-kaempferol ในการรักษาสามารถลดการบวมในอุ้งเท้าหนูได้ร้อยละ 38.8 ± 16.7 และในกลุ่มที่ใช้ยา Indomethacin ในการรักษาสามารถลดการบวมในอุ้งเท้าหนูได้ร้อยละ 51.0 ± 16.7 อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ไม่สามารถนำมาคำนวณค่า IC_{50} ได้ เนื่องจากสมการเส้นตรงให้ค่า R^2 ต่ำเกินไปจึงไม่สามารถนำมาใช้ในการคำนวณ อีกทั้งอาจต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือให้สูงขึ้น และควรใช้วิธีวิเคราะห์อื่นเพื่อยืนยันฤทธิ์การต้านการอักเสบร่วมด้วย

5.3 ความเป็นพิษต่อเซลล์

จากผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay กรณีที่สารสกัดเหง้ากระทือสัมผัสกับเซลล์แล้วทำให้เซลล์ตายจะส่งผลให้ค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลดลงต่ำกว่าร้อยละ 70 จัดเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุมแล้วพบว่าในช่วงความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ คือ 1- 0.0078 mg/mL พบว่าการรอดของเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนจะมีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์อยู่ในช่วงความเข้มข้น 1- 0.0078 mg/mL ซึ่งถือว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ ส่วนสารสกัดเหง้ากระทือจะพบว่าการรอดชีวิตของเซลล์จะอยู่ที่ความเข้มข้น 1, 0.25, 0.125, 0.03125 และ 0.0078 mg/mL อีกทั้งพบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนที่สูงมีผลต่อการรอดของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่สารสกัดส่งผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาของ Mazlyzam และคณะ (27) ได้ศึกษาผลของสารสกัดกระทือกับการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ผิวหนังของมนุษย์ จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้น

ของสารสกัดกระเทียมที่ 750 $\mu\text{g} / \text{mL}$ สามารถทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้และสามารถเพิ่มความเข้มข้น
สารสกัดกระเทียมได้จนถึง โดยที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานเลขาธิการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. เชื้อแบคทีเรีย MRSA ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค [Available from:
http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=820.
2. รัตน์วลัย น. โรค 4S หรือ Staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล2562 [Available from:
<https://www.si.mahidol.ac.th/th/healthdetail.asp?aid=1359>.
3. นัฏฐเนศวร์ ล. การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในคลินิกผิวหนังในฤดูฝน. Journal of Medicine and Health Sciences. 2015;22:8-14.
4. พียาพรรณ ผพจ. การติดเชื้อแคนดิดาที่ผิวหนังและเยื่อ Siriraj E-public library2560 [Available from: <https://www.si.mahidol.ac.th/sidoctor/e-pl/articledetail.asp?id=1029>.
5. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ฐค. กระเทียม [Available from:
<http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=200>.
6. Rout KK, Mishra SK, Sherma J. Development and validation of an HPTLC method for analysis of zerumbone, the anticancer marker from Zingiber zerumbet. Acta Chromatographica. 2009;21(3):443-52.
7. Ghasemzadeh A, Jaafar HZ, Ashkani S, Rahmat A, Juraimi AS, Puteh A, et al. Variation in secondary metabolite production as well as antioxidant and antibacterial activities of Zingiber zerumbet (L.) at different stages of growth. BMC Complement Altern Med. 2016;16:104.
8. Akhtar NMY, Jantan I, Arshad L, Haque MA. Standardized ethanol extract, essential oil and zerumbone of Zingiber zerumbet rhizome suppress phagocytic activity of human neutrophils. BMC Complement Altern Med. 2019;19(1):331.
9. Rana VS. Chemical Composition of the Essential Oil of Zingiber zerumbet var. darcyi Natural Product Communications. 1960;Vol. 7 1369 - 70.

10. BHAT~ACHARYYA SKRSaSC. ISOLATION OF HUMULENE MONOXIDE AND HUMULENE DIOXIDE National Chemical Laboratory. 1962;18:575-9.
11. M. C. NIGAM ICN, K. L. HANDAt, and LEO LEV1 Essential Oils and Their Constituents XXVIII.

Examination of Oil of Cardamom by Gas Chromatography. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1965;54:799-801.
12. Sulaiman MR, Perimal EK, Akhtar MN, Mohamad AS, Khalid MH, Tasrip NA, et al. Anti-inflammatory effect of zerumbone on acute and chronic inflammation models in mice. Fitoterapia. 2010;81(7):855-8.
13. Batubara I. Effect of Zingiber zerumbet Essential Oils and Zerumbone Inhalation on Body Weight of Sprague Dawley Rat. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2013;16:1028-33.
14. Bhuiyan MNI, Chowdhury JU, Begum J. Chemical investigation of the leaf and rhizome essential oils of Zingiber zerumbet (L.) Smith from Bangladesh. Bangladesh Journal of Pharmacology. 2008;4(1).
15. Jang DS, Han A-R, Park G, Jhon G-J, Seo E-K. Flavonoids and aromatic compounds from the rhizomes of Zingiber zerumbet. Archives of Pharmacal Research. 2004;27(4):386-9.
16. Ruslay S, Abas F, Shaari K, Zainal Z, Maulidiani, Sirat H, et al. Characterization of the components present in the active fractions of health gingers (Curcuma xanthorrhiza and Zingiber zerumbet) by HPLC–DAD–ESIMS. Food Chemistry. 2007;104(3):1183-91.
17. Chien TY, Chen LG, Lee CJ, Lee FY, Wang CC. Anti-inflammatory constituents of Zingiber zerumbet. Food Chemistry. 2008;110(3):584-9.

18. Koga AY, Beltrame FL, Pereira AV. Several aspects of Zingiber zerumbet: a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016;26(3):385-91.
19. Sidahmed HM, Hashim NM, Abdulla MA, Ali HM, Mohan S, Abdelwahab SI, et al. Antisecretory, gastroprotective, antioxidant and anti-*Helicobacter pylori* activity of zerumbone from Zingiber zerumbet (L.) Smith. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121060.
20. สิริธิไชยากุล อนพ. Acute and Chronic Inflammation. 2554.
21. Somchit M, Mak J, Bustamam AA, Zuraini A, Arifah A, Adam Y, et al. Zerumbone isolated from Zingiber zerumbet inhibits inflammation and pain in rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012;6(2):177-80.
22. Nag A. Antioxidant Activities and Cytotoxicity of Zingiber zerumbet (L.) Smith Rhizome. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013:102-8.
23. Kader G, Nikkon F, Rashid MA, Yeasmin T. Antimicrobial activities of the rhizome extract of Zingiber zerumbet Linn. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2011;1(5):409-12.
24. Chang CJ, Tzeng TF, Liou SS, Chang YS, Liu IM. Acute and 28-Day Subchronic Oral Toxicity of an Ethanol Extract of Zingiber zerumbet (L.) Smith in Rodents. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:608284.
25. Samarak N. Development of local medicinal plant in Chanthaburi Province against important phytopathogenic microbial species. Burapha University 2562.
26. Omokhua AG, Ondua M, van Staden J, McGaw LJ. Synergistic activity of extracts of three South African alien invasive weeds combined with conventional antibiotics against selected opportunistic pathogens. *South African Journal of Botany*. 2019;124:251-7.

27. Abdul Latif, Mazlyzam. Cytotoxicity, Proliferation and Migration Rate Assessments of Human Dermal Fibroblast Adult Cells using Zingiber zerumbet Extract. Sains Malaysiana. 2019;48: 121-127

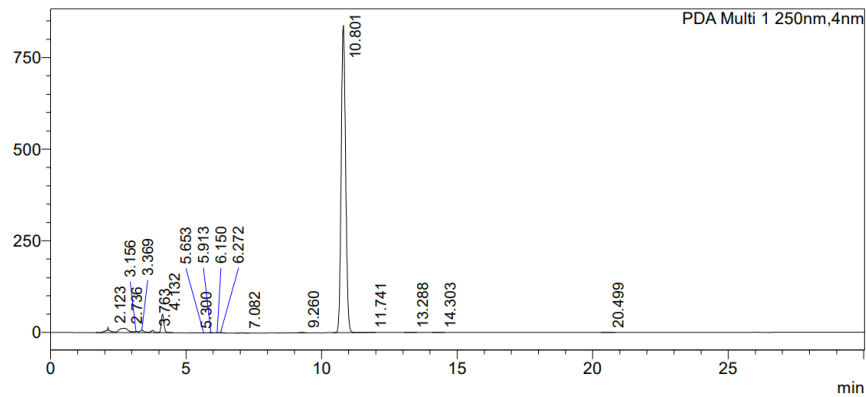
ภาคผนวก

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของเหง้ากระเทียม ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)

1.1 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน Zerumbone

<Chromatogram>

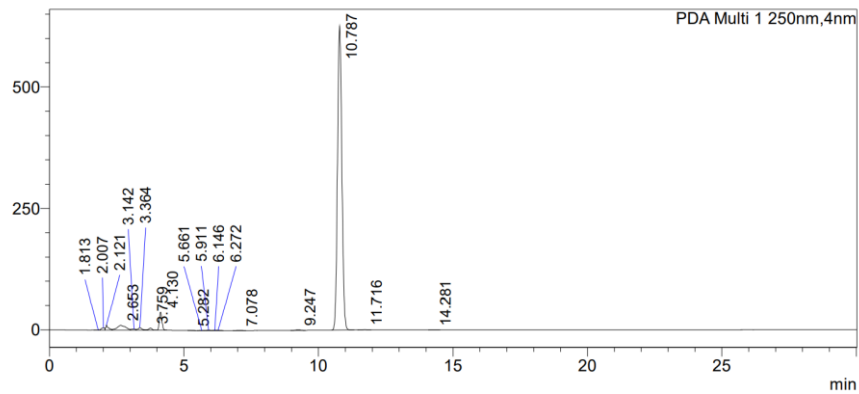
mAU



รูปแสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone ที่ความเข้มข้น 400 µg/mL

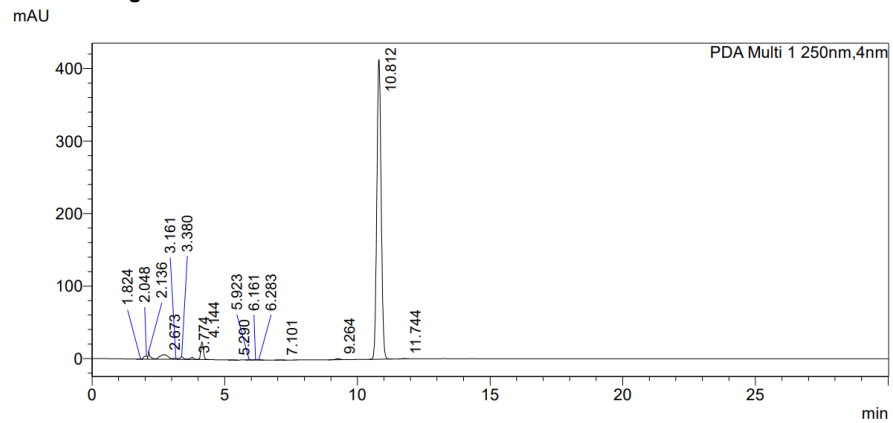
<Chromatogram>

mAU



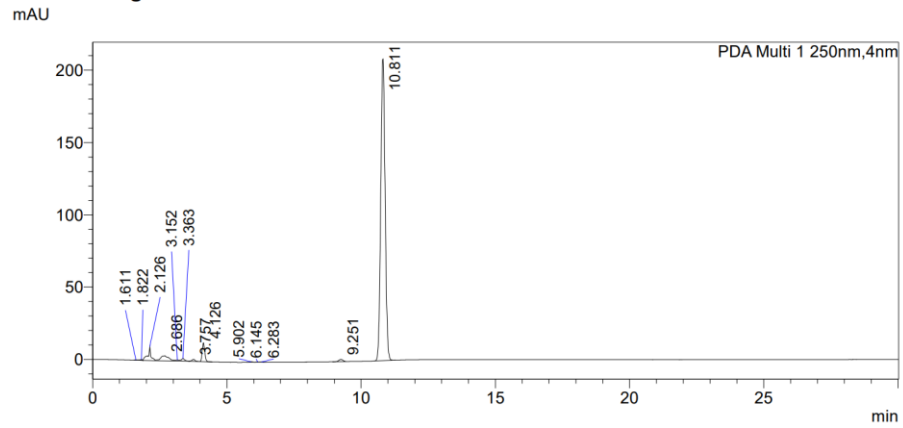
รูปแสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone ที่ความเข้มข้น 300 µg/mL

<Chromatogram>



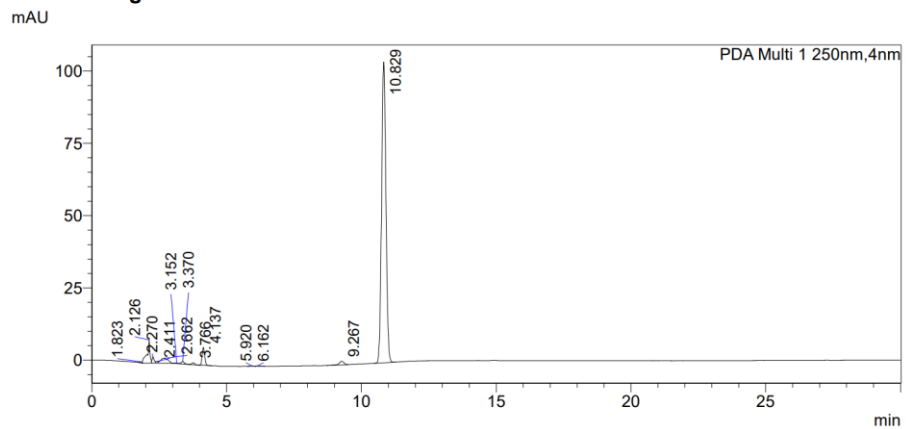
รูปแสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone ที่ความเข้มข้น 200 µg/mL

<Chromatogram>



รูปแสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL

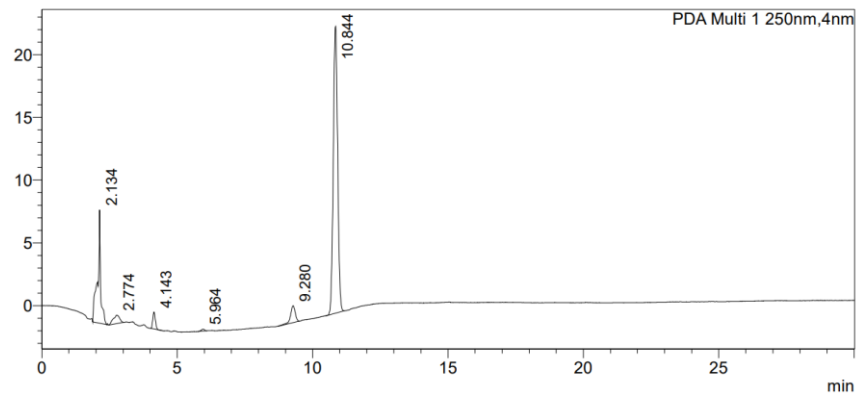
<Chromatogram>



รูปแสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL

<Chromatogram>

mAU

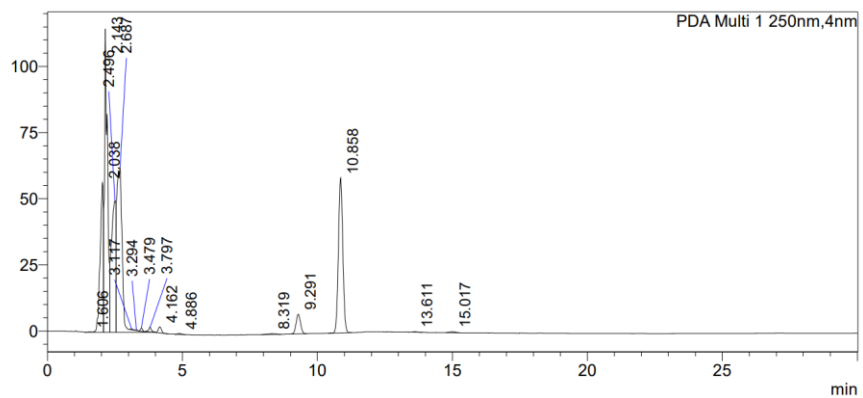


รูปแสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Zerumbone ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL

1.2 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอล

<Chromatogram>

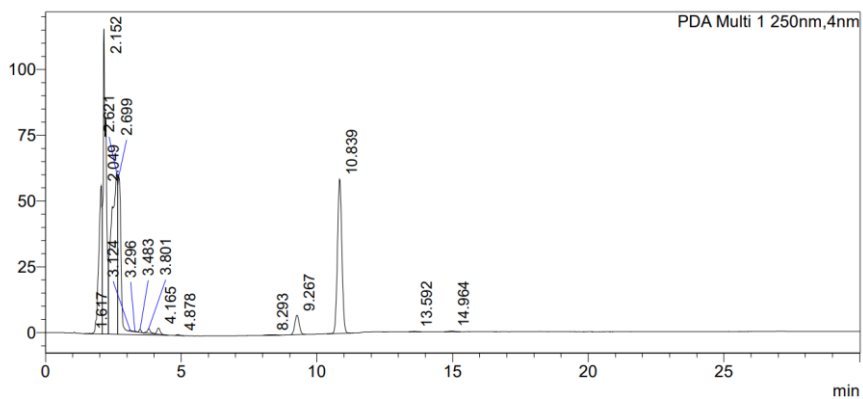
mAU



รูปแสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 1 mg/mL
ครั้งที่ 2

<Chromatogram>

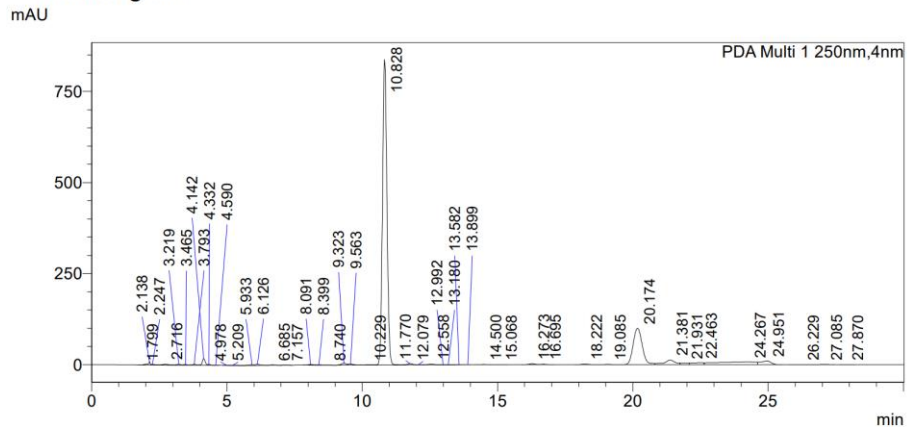
mAU



รูปแสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 1 mg/mL
ครั้งที่ 3

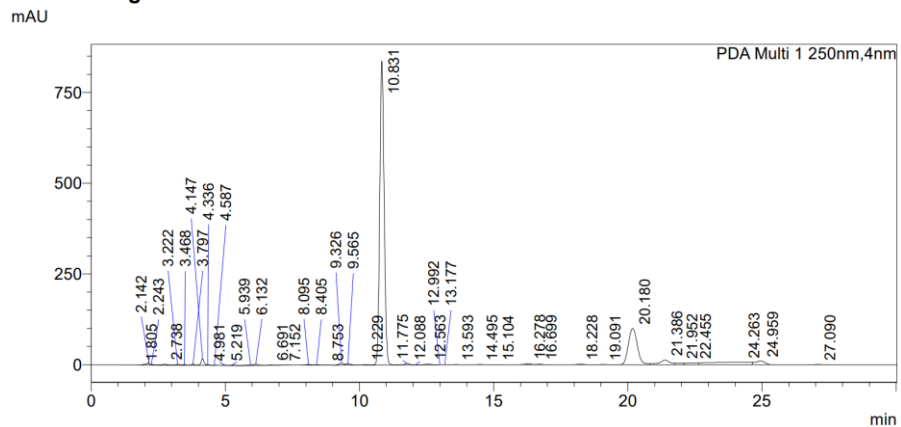
1.3 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอล

<Chromatogram>



รูปแสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่
2

<Chromatogram>

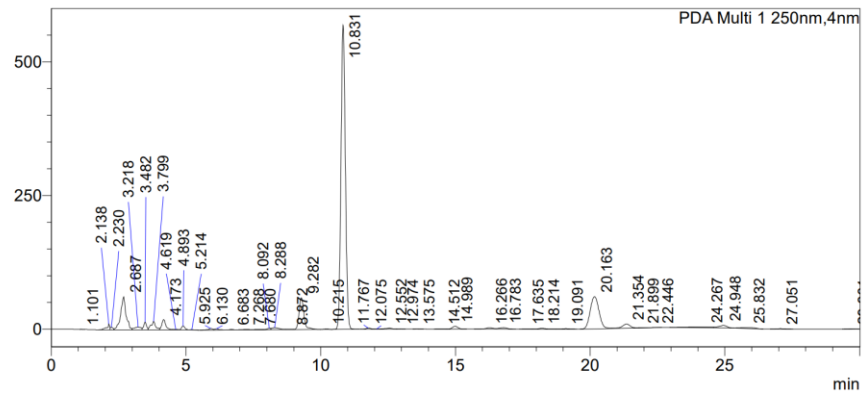


รูปแสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่
3

1.3 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน

<Chromatogram>

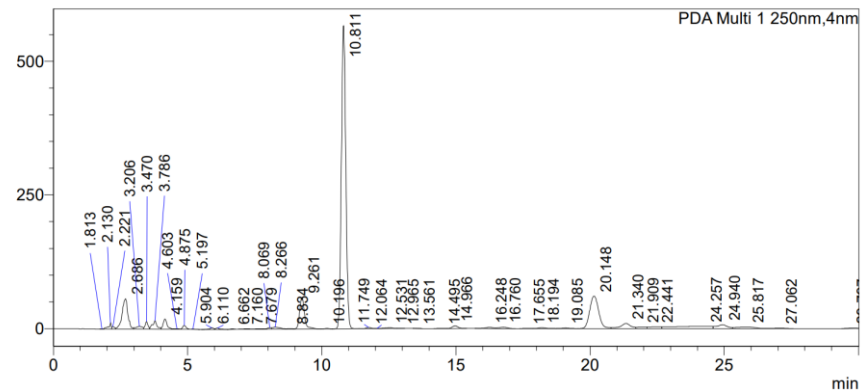
mAU



รูปแสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่ 2

<Chromatogram>

mAU

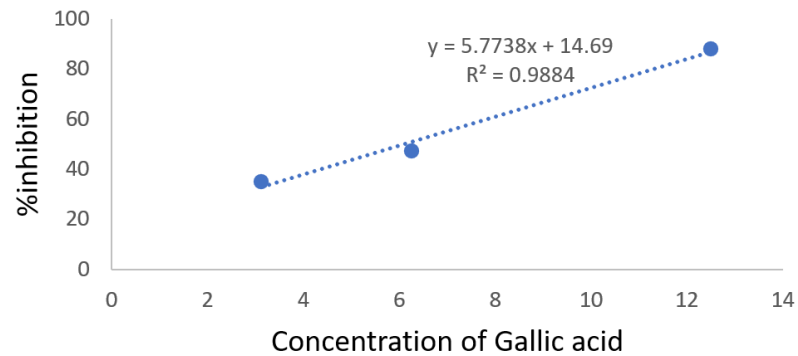


รูปที่ 28 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ครั้งที่ 3

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS assay)

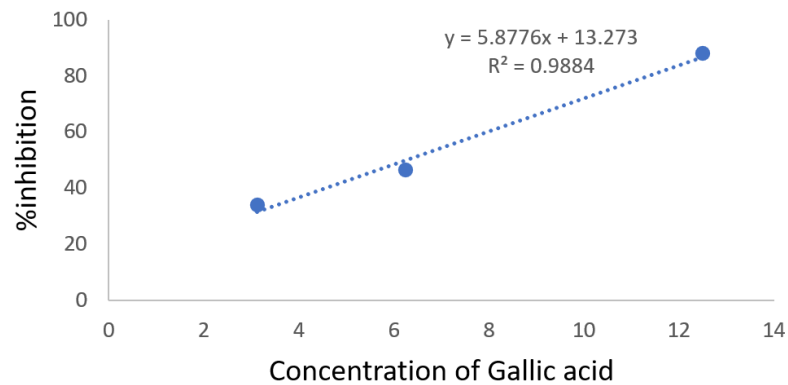
2.1 สารต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

Standard of Gallic acid (1)



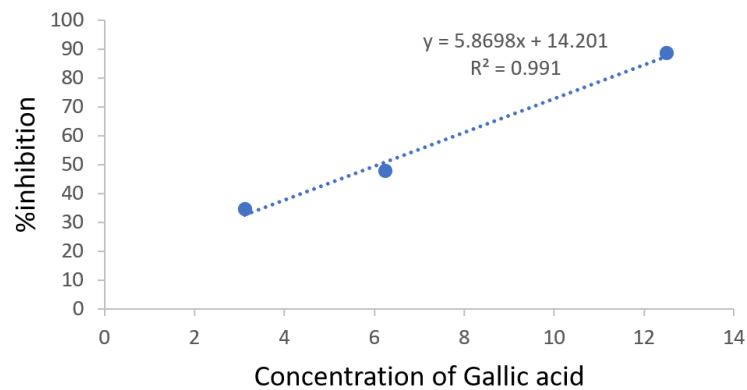
รูปแสดงกราฟมาตรฐานแสดงค่า % ABTS radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ครั้งที่ 1

Standard of Gallic acid (2)



รูปแสดงกราฟมาตรฐานแสดงค่า % ABTS radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ครั้งที่ 2

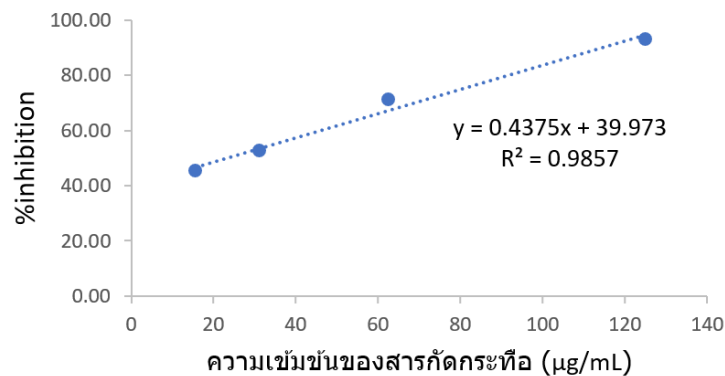
Standard of Gallic acid (3)



รูปแสดงกราฟมาตรฐานแสดงค่า % ABTS radical scavenging activity กับความเข้มข้นของ
สารละลายมาตรฐาน Gallic acid ครั้งที่ 3

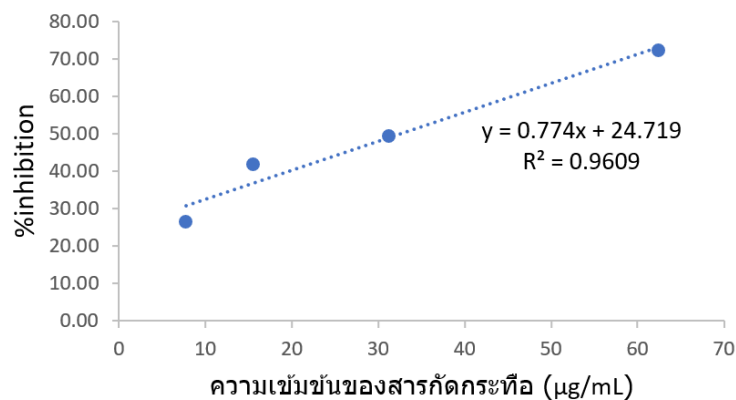
2.2 สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอล

สารสกัดกระเทียมส่วนสกัดเอทานอล(1)



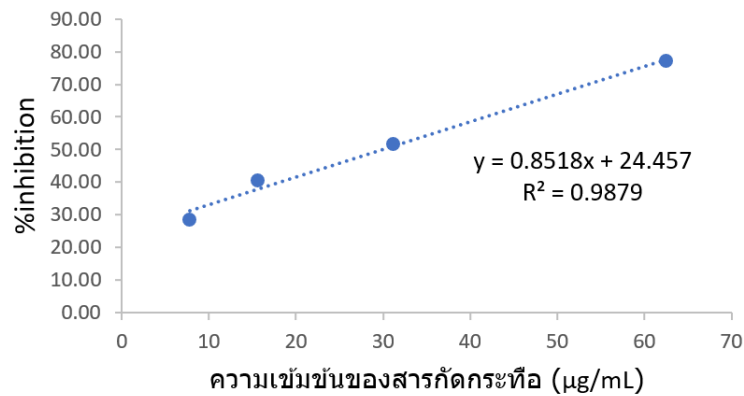
รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % ABTS radical scavenging activity กับความเข้มข้นของ
สารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลโดยวิธีการทดสอบ ABTS assay ครั้งที่ 1

สารสกัดกระเทียมส่วนสกัดเอทานอล(2)



รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % ABTS radical scavenging activity กับความเข้มข้นของ
สารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลโดยวิธีการทดสอบ ABTS assay ครั้งที่ 2

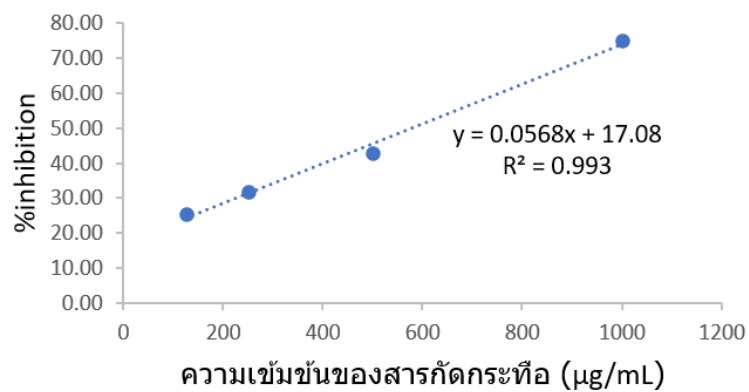
สารสกัดกระทือส่วนสกัดเอทานอล(3)



รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % ABTS radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอลโดยวิธีการทดสอบ ABTS assay ครั้งที่ 3

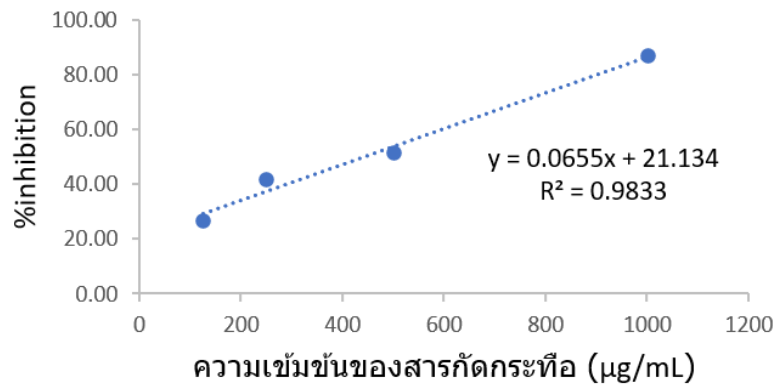
2.3 สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซน

สารสกัดกระทือส่วนสกัดเฮกเซน(1)



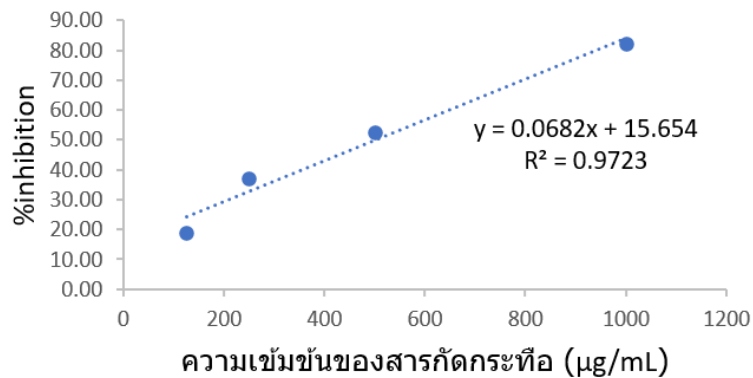
รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % ABTS radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซนโดยวิธีการทดสอบ ABTS assay ครั้งที่ 1

สารสกัดกระทือส่วนสกัดเฮกเซน(2)



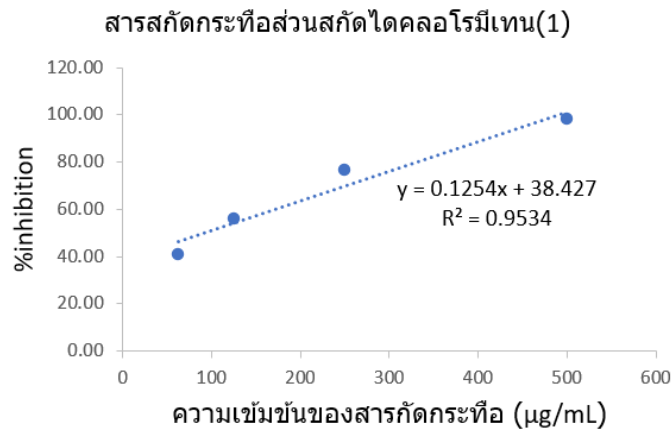
รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % ABTS radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซนโดยวิธีการทดสอบ ABTS assay ครั้งที่ 2

สารสกัดกระทือส่วนสกัดเฮกเซน(3)

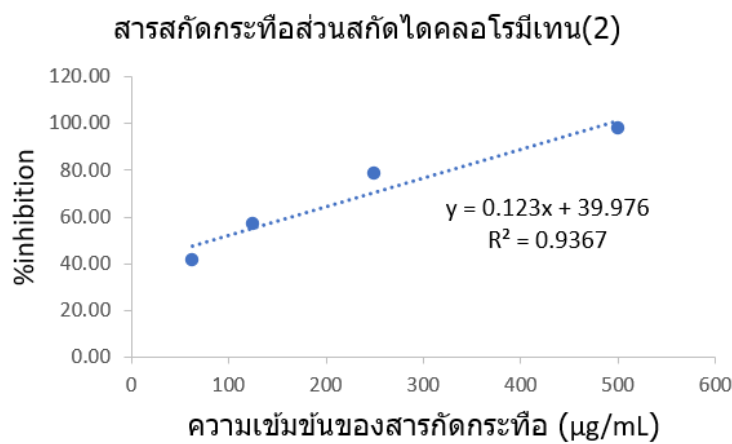


รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % ABTS radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซนโดยวิธีการทดสอบ ABTS assay ครั้งที่ 3

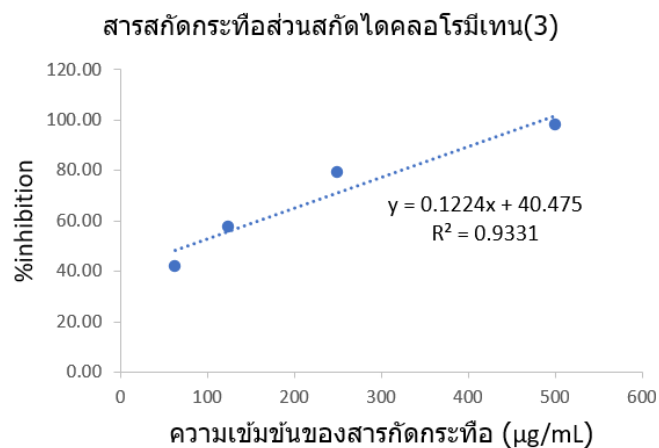
2.4 สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน



รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % ABTS radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนโดยวิธีการทดสอบ ABTS assay ครั้งที่ 1



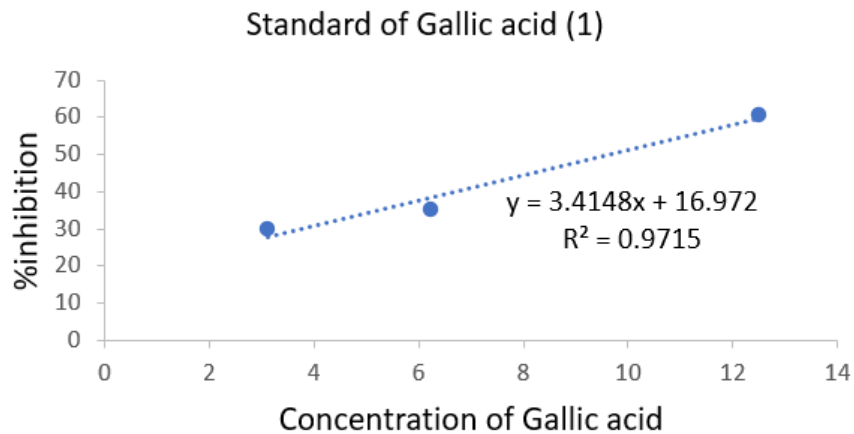
รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % ABTS radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนโดยวิธีการทดสอบ ABTS assay ครั้งที่ 2



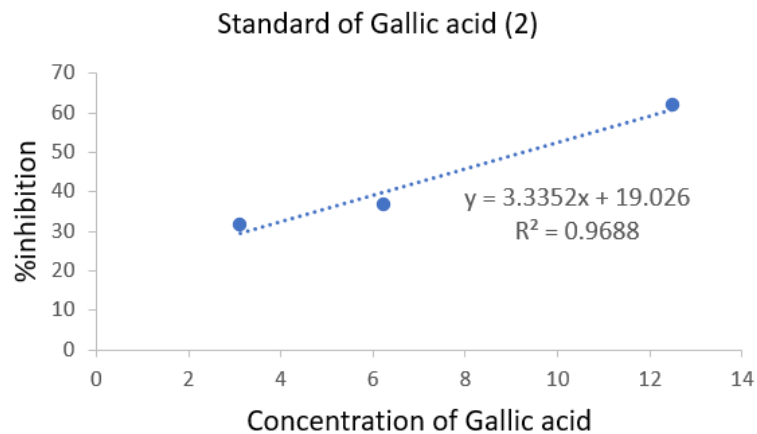
รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % ABTS radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนโดยวิธีการทดสอบ ABTS assay ครั้งที่ 3

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH assay)

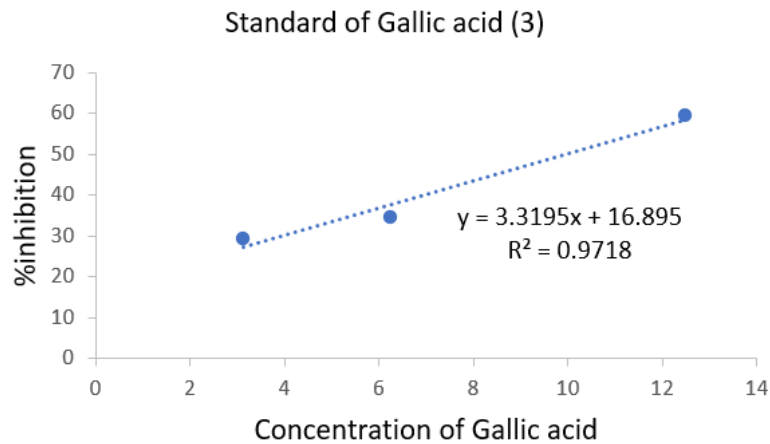
3.1 สารต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid



รูปแสดงกราฟมาตรฐานแสดงค่า % DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ครั้งที่ 1

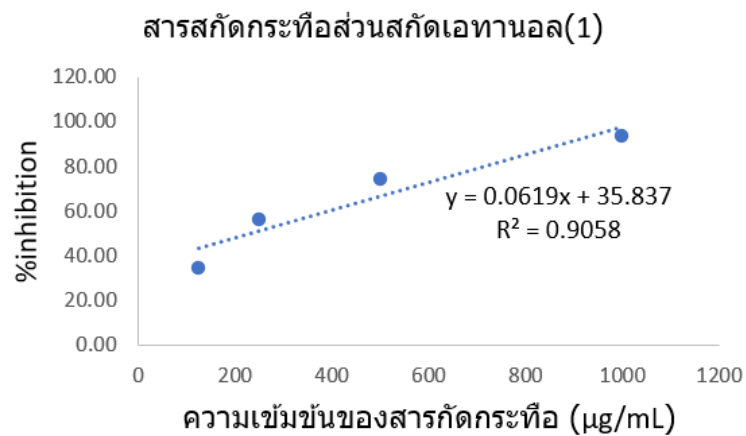


รูปแสดงกราฟมาตรฐานแสดงค่า % DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ครั้งที่ 2



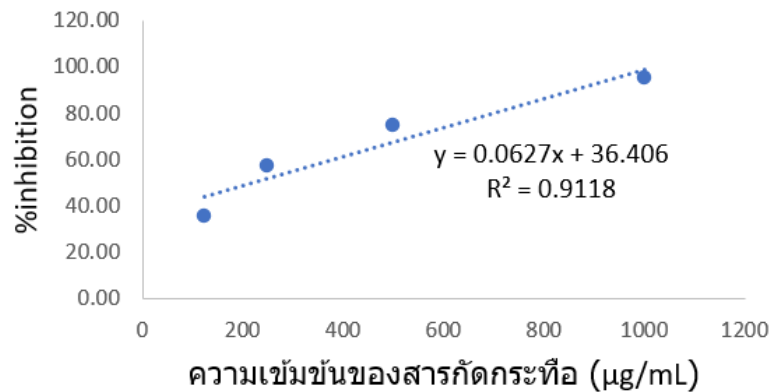
รูปแสดงกราฟมาตรฐานแสดงค่า % DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ครั้งที่ 3

3.2 สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอล



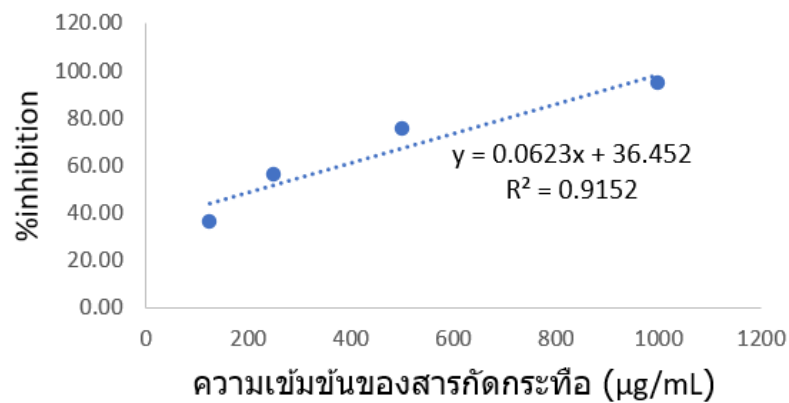
รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเอทานอลโดยวิธีการทดสอบ DPPH assay ครั้งที่ 1

สารสกัดกระทือส่วนสกัดเอทานอล(2)



รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอลโดยวิธีการทดสอบ DPPH assay ครั้งที่ 2

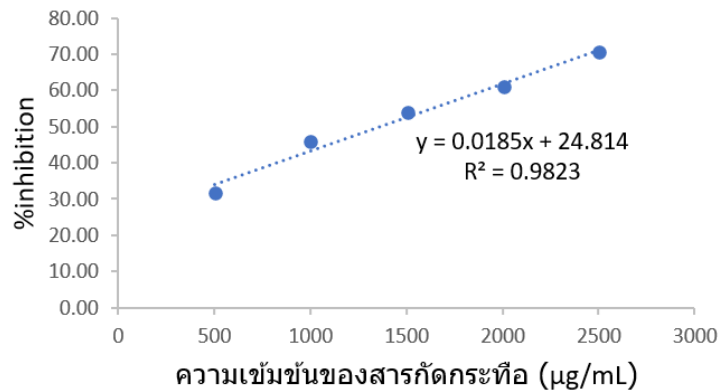
สารสกัดกระทือส่วนสกัดเอทานอล(3)



รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเอทานอลโดยวิธีการทดสอบ DPPH assay ครั้งที่ 3

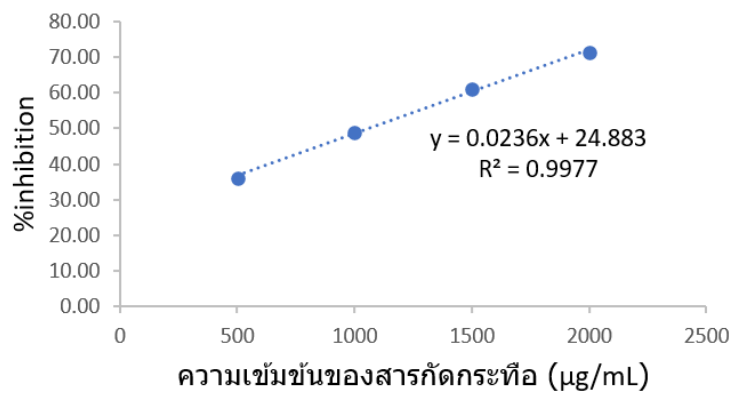
3.3 สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซน

สารสกัดกระทือส่วนสกัดเฮกเซน(1)



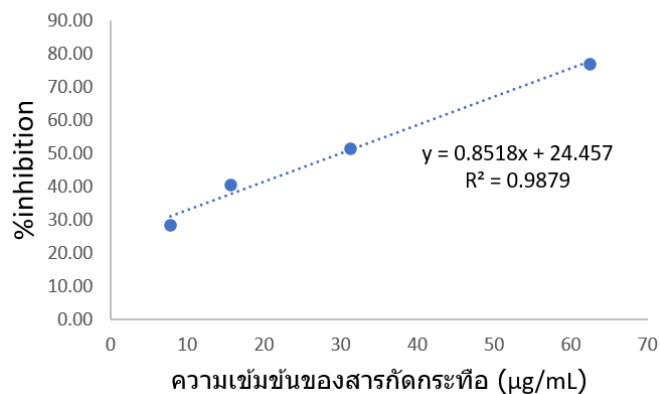
รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซนโดยวิธีการทดสอบ DPPH assay ครั้งที่ 1

สารสกัดกระทือส่วนสกัดเฮกเซน(2)



รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซนโดยวิธีการทดสอบ DPPH assay ครั้งที่ 2

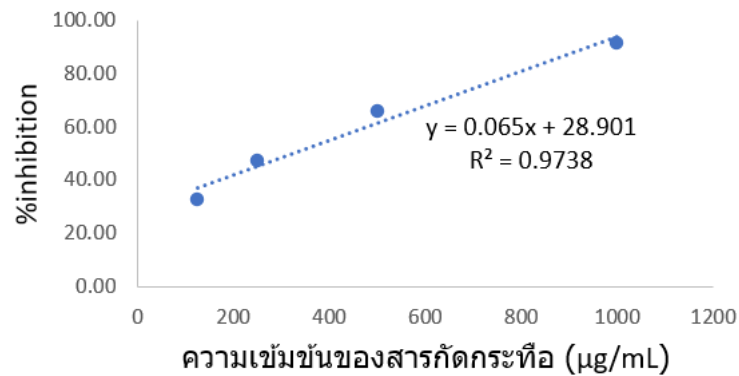
สารสกัดกระทือส่วนสกัดเฮกเซน(3)



รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดเฮกเซนโดยวิธีการทดสอบ DPPH assay ครั้งที่ 3

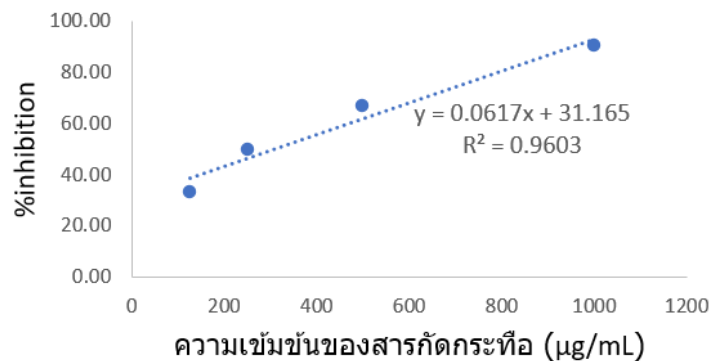
3.4 สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน

สารสกัดกระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน(1)

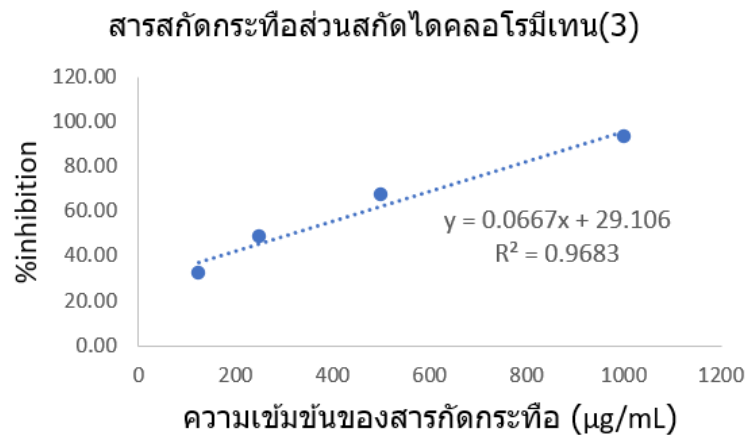


รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนโดยวิธีการทดสอบ DPPH assay ครั้งที่ 1

สารสกัดกระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน(2)



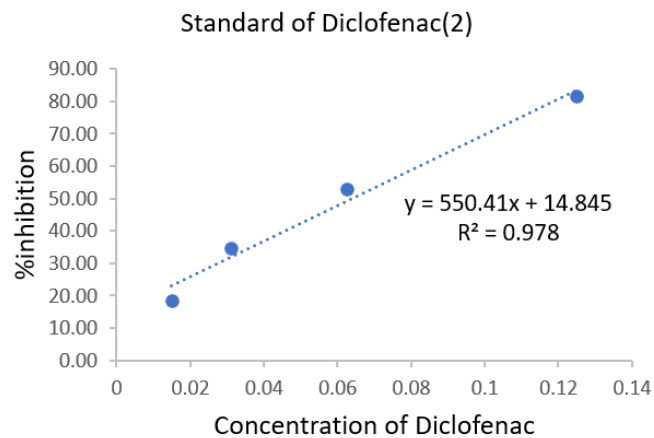
รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระเทียมส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนโดยวิธีการทดสอบ DPPH assay ครั้งที่ 2



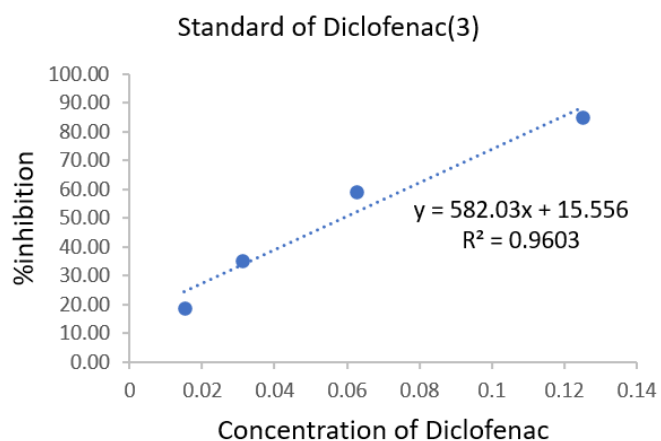
รูปแสดงกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ % DPPH radical scavenging activity กับความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนโดยวิธีการทดสอบ DPPH assay ครั้งที่ 3

4. การทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบ

4.1 ฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารมาตรฐาน Diclofenac



รูปแสดงกราฟมาตรฐานแสดงค่า % inhibition of denaturation กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Diclofenac ครั้งที่ 2



รูปแสดงกราฟมาตรฐานแสดงค่า % inhibition of denaturation กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน
Diclofenac ครั้งที่ 3

5. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ตารางแสดงร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนเอทานอล

ความเข้มข้นของสารสกัดเหง้า กระทือส่วนสกัดเอทานอล ($\mu\text{g/mL}$)	% Cytotoxicity			
	(1)	(2)	(3)	$(\bar{x}) \pm \text{S.D.}$
1000	-12.77	-18.46	-31.18	-20.80 ± 9.43
500	53.99	23.30	16.28	31.19 ± 20.06
250	31.64	29.65	19.66	26.98 ± 6.42
125	31.64	22.09	25.19	26.31 ± 4.87
62.5	54.28	25.11	17.51	32.30 ± 19.41
31.25	12.19	21.63	31.03	21.62 ± 9.42
15.625	26.12	32.53	32.57	30.41 ± 3.71
7.8125	27.29	21.18	35.64	28.03 ± 7.26

ตารางแสดงร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนเฮกเซน

ความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดเฮกเซน (µg/mL)	% Cytotoxicity			
	(1)	(2)	(3)	($\bar{x}$) ± S.D.
1000	8.42	-67.17	-57.14	-38.63 ± 41.05
500	26.12	-3.63	-11.06	3.81 ± 19.68
250	32.44	12.10	13.82	19.46 ± 11.28
125	28.30	17.25	1.23	15.59 ± 13.61
62.5	22.06	20.27	13.21	18.51 ± 4.68
31.25	26.71	14.83	11.67	17.74 ± 7.93
15.625	24.38	18.00	15.98	19.45 ± 4.39
7.8125	30.77	18.46	6.14	18.46 ± 12.31

ตารางแสดงร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนไดคลอโรมีเทน

ความเข้มข้นของสารสกัดเหง้ากระทือส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน (µg/mL)	% Cytotoxicity			
	(1)	(2)	(3)	($\bar{x}$) ± S.D.
1000	-213.35	-137.97	-205.52	-185.62 ± 41.45
50	-85.34	-50.83	-83.56	-73.25 ± 19.43
250	-10.01	-9.08	-0.92	-6.67 ± -5.00
125	-4.35	2.12	-3.38	-1.87 ± 5.00
62.5	18.29	31.16	13.06	20.84 ± 3.49
31.25	15.97	15.13	11.06	14.05 ± 2.62
15.625	6.39	-6.05	10.75	3.70 ± 8.72
7.8125	21.48	3.03	0.38	8.30 ± 11.49