# พฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียของสารสกัดองุ่นป่า (*AMPELOCISSUS MARTINI* PLANCH.)

เฉลิมขวัญ จันดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
กันยายน 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ เฉลิมขวัญ จันดี ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธาน

(ดร.เนาวรัตน์ กองคำ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นภา ตั้งเตรียมจิตมั่น)

..... กรรมการ

(ดร.เบญจวรรณ ชิวปรีชา)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษาของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 30 เดือน พฤษภาคม พ.ศ.2559

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ช่วยเหลือและสนับสนุนแนวทางแก้ปัญหาการวิจัยทุกขั้นตอนพร้อมทั้งให้กำลังใจ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่านที่ช่วยสอนวิชาเคมีทั้งส่วนเนื้อหาและปฏิบัติการอย่างเข้มข้น ปลูกฝังให้ข้าพเจ้าเป็นนักวิทยาศาสตร์และครูวิทยาศาสตร์ที่มีความรู้ทั้งภาคทฤษฎีและภาคปฏิบัติในสาขาวิชาเคมีเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ปริยา ปะบุญเรือง อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และนางสาวปาลิตา เอี่ยมหมดจด นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยให้ความรู้ และอำนวยความสะดวกในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ธรรมรัตน์ พุทธไทย อาจารย์ประจำสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ผู้ยืนยันชนิดพันธุ์พืชในงานวิจัย และให้คำแนะนำเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการอำนาจ แก้วรักษ์ และคณะครูโรงเรียนสภาราชินี จังหวัดตรัง ทุกคน ที่สนับสนุนพร้อมให้กำลังใจตลอดการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ผู้สนับสนุนทุนการศึกษาและการทำวิจัย

ขอขอบคุณนิสิตปริญญาโททุกคนที่เป็นกำลังใจ สนับสนุน และช่วยเหลือตลอดการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อประสาน จันดี คุณแม่จิตรา จันดี และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

เฉลิมขวัญ จันดี

57920065: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)
คำสำคัญ: องุ่นป่า/ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ/ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

เฉลิมขวัญ จันดี: พฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียของสารสกัดองุ่นป่า (*Ampelocissus martini* Planch.) (PHYTOCHEMICAL, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF WILD GRAPE (*AMPELOCISSUS MARTINI* PLANCH.) EXTRACTS)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จงกลณี จงอร่ามเรือง, Ph.D. 61 หน้า. ปี พ.ศ. 2559.

องุ่นป่า (*Ampelocissus martini* Planch.) จัดอยู่ในวงศ์ Vitaceae (วงศ์องุ่น) เป็นพืชล้มลุก พบได้ทางภาคเหนือและภาคอีสานของประเทศไทย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านแบคทีเรียของส่วนสกัดหยาบจากรากและเถาองุ่นป่าซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน 3 ชนิด คือ เมทานอล 95% เอทานอล 95% และเหล้าขาว 35% ผลการศึกษาพบสารพฤกษเคมี 4 กลุ่ม ได้แก่ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แทนนิน เทอร์พีนอยด์ และซาโปนิน ส่วนสกัดหยาบทุกส่วนแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบโดยวิธี TLC Screening ด้วยสารละลาย DPPH และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion พบว่า ส่วนสกัดหยาบทุกส่วนมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* และ *Staphylococus aureus* แต่ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยเปรียบเทียบบริเวณการยับยั้งกับสารมาตรฐาน chloramphenicol

57920065: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.Sc. (CHEMICAL EDUCATION)
KEYWORDS: *AMPELOCISSUS MARTINI* PLANCH./ ANTIOXIDANT/ ANTIBACTERIAL ACTIVITY

CHALERMKWUN JUNDEE: PHYTOCHEMICAL, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF WILD GRAPE (*AMPELOCISSUS MARTINI* PLANCH.) EXTRACTS. ADVISORY COMMITTEE: JONGKOLNEE JONGARAMRUONG, Ph.D. 61 P. 2016.

Wild grape (*Ampelocissus martini Planch.*) belong to family Vitaceae (Grape family) which is annual plant found in the North and East of Thailand. This research was aimed to investigate phytochemical compositions, antioxidant and antibacterial activity of the root and vine of wild grape crude extracts with three different solvents of methanol, ethanol and Thai rice whiskey. The results showed four groups of basic phytochemical compounds, namely cardiac glycosides, tannins, terpenoids and saponins. Whole crude extracts displayed antioxidant activity by TLC Screening with the DPPH assay. In addition, the crude extracts showed antibacterial activities by the disc diffusion method against the gram-positive bacteria; *Bacillus subtilis* and *Staphylococus aureus*. However, they were inactive against the gram-negative bacteria; *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by comparing a zone of inhibition with the standard chloramphenicol.

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา ..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย ..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย ..... 3

ขอบเขตของการวิจัย ..... 3

นิยามศัพท์เฉพาะ ..... 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 5

ข้อมูลพืชตัวอย่างองุ่นป่า (Ampelocissus martini Planch.) ..... 5

การสกัดสารจากพืชสมุนไพร ..... 7

อนุมูลอิสระ ..... 10

สารต้านอนุมูลอิสระ ..... 10

สารพฤกษเคมี ..... 12

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ..... 17

แบคทีเรียและการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ..... 18

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 19

3 วิธีดำเนินการวิจัย ..... 24

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ ..... 24

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ..... 24

พืชตัวอย่าง ..... 25

วิธีการวิจัย ..... 25

# สารบัญ (ต่อ)


| บทที่ | หน้า |
|---|---|
| 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล | 30 |
| สารสกัดหยาบจากส่วนรากและเถาอุ่นป่า | 30 |
| การทดสอบพฤกษเคมี | 31 |
| การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ | 32 |
| การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย | 36 |
| 5 สรุปผลการทดลอง | 38 |
| ข้อเสนอแนะ | 39 |
| บรรณานุกรม | 40 |
| ภาคผนวก | 43 |
| ภาคผนวก ก | 44 |
| ภาคผนวก ข | 47 |
| ภาคผนวก ค | 53 |
| ภาคผนวก ง | 56 |
| ประวัติย่อของผู้วิจัย | 93 |

# สารบัญตาราง


ตารางที่ หน้า

4-1 ปริมาณที่สกัดได้ (Yield) ของสารสกัดหยาบจากส่วนรากและเถาอุ่นป่าในตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล และเหล้าขาว 30

4-2 ผลการทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบจากส่วนรากและเถาอุ่นป่าในตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล และเหล้าขาว 32

4-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนรากและเถาอุ่นป่า ในตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล และเหล้าขาว 33

4-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากส่วนรากและเถาอุ่นป่า ในตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล และเหล้าขาว 47

ค-1 การหาระบบตัวทำละลายและการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 54

ง-1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Staphylococcus aureus ATCC 29523 57

ง-2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Bacillus subtilis 58

ง-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Escherichia coli ATCC 25922 59

ง-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Pseudomonas aeruginosa 60

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2-1 | ลักษณะส่วนต่าง ๆ ขององุ่นป่า (ก) ใบ (ข) เถา (ค) ราก (ง) ดอก (จ) ผล | 6 |
| 2-2 | เครื่องระเหยลดความดันแบบหมุน | 9 |
| 2-3 | โครงสร้างของคาเฟอีน | 6 |
| 2-4 | โครงสร้างหลักของสารประกอบฟลาโวนอยด์ | 13 |
| 2-5 | โครงสร้างของดิจอกซิน | 14 |
| 2-6 | โครงสร้างของแอนทราควิโนน | 14 |
| 2-7 | โครงสร้างของสาร gallic acid | 15 |
| 2-8 | โครงสร้างของคูมาริน | 15 |
| 2-9 | โครงสร้างของ isoprene unit | 16 |
| 2-10 | โครงสร้างของสเตอรอยด์ | 16 |
| 2-11 | โครงสร้างของ glycyrrhizin | 17 |
| 2-12 | โครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (ก) 22-epicalamistrin (ข) uvaribonin (ค) chalcone | 20 |
| 3-1 | แผนภาพการวิจัย | 26 |
| 3-2 | ขั้นตอนการสกัด | 27 |
| ก-1 | การสกัดองุ่นป่าส่วนรากด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% | 45 |
| ก-2 | การสกัดองุ่นป่าส่วนรากด้วยตัวทำละลายเหล้าขาว 35% | 45 |
| ก-3 | การสกัดองุ่นป่าส่วนรากด้วยตัวทำละลายเมทานอล 95% | 46 |
| ก-4 | สารสกัดองุ่นป่าส่วนเถาด้วยตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล และเหล้าขาว ตามลำดับ | 46 |
| ข-1 | การทดสอบอัลคาลอยด์ด้วยสารแวกเนอร์ | 48 |
| ข-2 | การทดสอบฟลาโวนอยด์ | 49 |
| ข-3 | การทดสอบซาโปนิน | 49 |
| ข-4 | การทดสอบแทนนิน | 50 |
| ข-5 | การทดสอบคูมาริน | 50 |
| ข-6 | การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ | 51 |

# สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ข-7 การทดสอบสเตอรอยด์ 51
ข-8 การทดสอบเทอร์พีนอยด์ 52
ข-9 การทดสอบแอนทราควิโนน 52

# บทที่ 1
# บทนำ

## ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ ในตำราพื้นบ้านมีการใช้ยาสมุนไพรพื้นบ้านในการรักษาโรคมากมาย และในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจกับการศึกษาคุณประโยชน์ทางยาจากพืชสมุนไพรมากขึ้น เนื่องจากผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ของยาสังเคราะห์ การนำเข้าของยาสังเคราะห์ที่มีราคาแพง และความต้องการของนักวิจัยในการพัฒนาคุณค่าของพืชสมุนไพรให้มีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้ยารักษาโรคนับว่ามีความจำเป็นต่อชีวิตมนุษย์อย่างยิ่งหากเกิดโรคภัยที่ไม่พึงประสงค์ขึ้นมาแล้ว โดยเฉพาะการดำรงชีวิตของคนในยุคปัจจุบันมีปัจจัยเสี่ยงต่อการสะสมสารพิษในร่างกายทั้งการผจญกับมลพิษทางสิ่งแวดล้อม และมลพิษทางอารมณ์ ทำให้ร่างกายขาดความสมดุลตามธรรมชาติ โรคภัยต่าง ๆ จึงเกิดขึ้น เช่น โรคมะเร็ง โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน โรคหลอดเลือดอุดตัน โรคปอด โรคพาร์กินสัน โรคอัลไซเมอร์ โดยอาจเกิดขึ้นอย่างฉับพลันหรือเป็นภัยเงียบที่ไม่อาจทราบได้จนกว่าจะหมดหนทางแก้ไข นอกจากนี้การใช้ยาสังเคราะห์ในบางครั้งก็ทำให้เกิดภาวะดื้อยา เกิดอาการเป็นโรคกลับซ้ำหรือพัฒนาเป็นโรคใหม่ที่ยาปัจจุบันไม่สามารถรักษาได้ ทั้งนี้อาจเกิดจากสิ่งมีชีวิตพวกแบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว หรือสิ่งไม่มีชีวิต โดยมีแรงสนับสนุนจากมลพิษ สารพิษต่าง ๆ ที่ไปกระตุ้นการเกิดโรคหรือก่อให้เกิดโรคโดยตรง

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก มีหลากหลายสายพันธุ์ มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น สามารถแพร่พระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม มนุษย์สามารถรับเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง ทั้งทางระบบหายใจ ระบบทางเดินอาหาร รวมถึงการติดเชื้อผ่านทางผิวหนังหรือบริเวณบาดแผล ก่อให้เกิดโรคได้ทั้งมนุษย์และสัตว์ เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* หรือ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งล้วนทำให้เกิดโรคต่าง ๆ มากมาย (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2555) ซึ่งแบคทีเรียบางชนิดมีการพัฒนาสายพันธุ์ที่ทำให้ยาปฏิชีวนะดั้งเดิมไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะดื้อยา โดยมีอนุมูลอิสระเป็นตัวการสำคัญหนึ่งในการก่อโรค จึงมีการค้นคว้าหายาสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเรื้อรังชนิดต่าง ๆ ที่สำคัญ ซึ่งในการดำรงชีวิตปัจจุบันทำให้ร่างกายรับสารอนุมูลอิสระเกินกว่าที่ร่างกายจะกำจัดได้ สารอนุมูลอิสระที่อยู่ในร่างกายทำให้เกิดอันตรายอย่างร้ายกาจ ทำให้เกิดความเสียหายและความผิดปกติต่อการ

ทำงานของเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย จนทำให้ร่างกายแสดงความผิดปกติออกมาโดยการเกิดโรคภัยมากมายหลายชนิด ดังนั้นการศึกษาเพื่อค้นคว้าหาสารต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรจึงเกิดขึ้นอย่างกว้างขวางและต่อเนื่องมานาน ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสำคัญที่พบในพืช คือ สารพฤกษเคมี (phytochemical) เป็นสารเคมีที่พบในพืช โดยมากเป็นสารทุติยภูมิ (secondary product) ที่พืชสังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อจุดประสงค์บางอย่าง เช่น ป้องกันตัวเองจากเชื้อโรคและแมลง ให้สีสันกับพืช ตัวอย่างของสารพฤกษเคมี ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (polyphenolic compound) แอนโทไซยานิน (anthocyanin) และไอโซฟลาโวน (isoflavones) สารพฤกษเคมีในพืชนั้นมีมากมายหลายชนิดมีฤทธิ์ต่าง ๆ กันไป แต่โดยส่วนใหญ่แล้วสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ เนื่องจากมีโครงสร้างที่ซับซ้อนและมีแนวโน้มเป็นสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ดี (ดาลัด ศิริวัน, 2551)

องุ่นป่า (wild grape) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ampelocissus martini* Planch. เป็นผลไม้ป่าที่มีลักษณะคล้ายกับองุ่น ผลสุกมีสีม่วงแดง มีชื่อเรียกในทางใต้ว่า ส้มกุ้ง ทางอีสานเรียกว่า บักอีโก่ย หรือเครืออีโก่ย เป็นพืชล้มลุกที่ทนต่อ สภาพอากาศ ที่เปลี่ยนแปลง พบได้ทั่วไปทางภาคเหนือและภาคอีสานของประเทศไทย ออกผลในช่วงฤดูฝน ผลสด มีรสเปรี้ยว ชาวบ้านนิยมนำมารับประทานกับส้มตำ ใช้เป็นยาพื้นบ้านรักษาโรคฝี แก้อาการบวม ในส่วนหมอพื้นบ้านนำมาบดเป็นผงแล้วรับประทานเป็นยาแก้ไข้ได้ สารสกัดจากผลองุ่นป่าด้วยตัวทำละลายแสดงให้เห็นว่าผลองุ่นป่าอาจจะเป็นผลไม้ที่ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี (สุริสา ศรีสุวรรณ, อัณศยา ท่อนโพธิ์ และประสงค์ สีหานาม, 2557) สารสกัดจากผลสดขององุ่นป่าก็ให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Jirum, Sangdee, & Srihanam, 2013) ปัจจุบันยังมีรายงานข้อมูลที่เกี่ยวกับสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วนรากและเถาขององุ่นป่าไม่มากนัก อีกทั้งองุ่นป่าก็ยังเป็นพืชที่นำมาใช้ประโยชน์น้อยทั้งที่เป็นพืชล้มลุกที่ทนต่อสภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้สารสกัดจากพืชหลายชนิดในสกุลเดียวกับองุ่นป่าพบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ เช่น พบสารต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งจากราก *Ampelocissus* sp (George et al., 2008) สารต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่พบในสารสกัดอะซีโตน 70% ของเหง้า *Ampelocissus grantii* (Zongo et al., 2010) ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากราก *Ampelocissus latifolia* (ROXB.) (Jitendra, Natvarlal, Amit, Amish, & Sohan, 2013) ผู้วิจัยจึงมีความสนใจ ในการศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น รวมถึงความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากรากและเถาขององุ่นป่าด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาระดับต่อไป

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสกัดสารจากส่วนรากและเถาขององุ่นป่า ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เหล้าขาว เมทานอล และเอทานอล

2. เพื่อทดสอบหาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากรากและเถาขององุ่นป่าในตัวทำละลายเหล้าขาว เมทานอล และเอทานอล

3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากรากและเถาขององุ่นป่าในตัวทำละลายเหล้าขาว เมทานอล และเอทานอล

4. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากรากและเถาขององุ่นป่าในตัวทำละลายเหล้าขาว เมทานอล และเอทานอล

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากรากและเถาขององุ่นป่าในตัวทำละลายเหล้าขาว เมทานอล และเอทานอล

2. ทราบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากรากและเถาขององุ่นป่าในตัวทำละลายเหล้าขาว เมทานอล และเอทานอล

3. ผลการวิจัยเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตยารักษาโรค เครื่องสำอาง หรืออุตสาหกรรมอาหาร

4. ผลการวิจัยช่วยเพิ่มมูลค่าให้แก่รากและเถาขององุ่นป่า และเป็นการเผยแพร่คุณประโยชน์ของพืชสมุนไพรที่พบในประเทศไทย

## ขอบเขตของการวิจัย

1. พืชตัวอย่างที่ใช้สำหรับการวิจัยครั้งนี้เป็นองุ่นป่า (Wild grape) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ampelocissus martini* Planch. เก็บตัวอย่างจากบ้านทอนหาญ หมู่ที่ 4 ตำบลคลองลุ อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง

2. สารสกัดหยาบเตรียมจากส่วนรากและเถาขององุ่นป่า โดยใช้วิธีการสกัดแบบแช่หมัก (Maceration) ด้วยการแยกแช่ในตัวทำละลายเหล้าขาว เมทานอล และเอทานอล

3. ทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเหล้าขาว เมทานอล และเอทานอล จากส่วนรากและเถาขององุ่นป่า แบ่งการทดสอบเป็น 9 กลุ่ม คือ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แอนทราควิโนน คูมาริน สเตอรอยด์ เทอร์พีนอยด์ และซาโปนิน

4. ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีทำลายอนุมูลอิสระ DPPH จากการทดสอบเชิงคุณภาพ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin layer liquid chromatography, TLC)

5. ทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบอย่างน้อย 4 ชนิด ด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยส่งทดสอบที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

**นิยามศัพท์เฉพาะ**

1. สมุนไพร ตามพระราชบัญญัติยา หมายถึง ยาที่ได้จากพืช สัตว์ หรือแร่ ซึ่งยังไม่ได้ผสมปรุง หรือเปลี่ยนสภาพ เช่น พืชก็ยังเป็นส่วนของ ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล ฯลฯ ซึ่งยังไม่ได้ผ่านขั้นตอนการแปรรูปใด ๆ

2. สารสกัดหยาบ (Crude extract) หมายถึง สารสกัดเบื้องต้นจากสมุนไพรที่ยังไม่ถึงขั้นสารบริสุทธิ์ กรรมวิธีการสกัดไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถนำไปใช้ได้โดยตรงหรือต้องผ่านกรรมวิธีผลิตก่อนที่จะนำไปใช้ประโยชน์

3. สารพฤกษเคมี (Phytochemical) หมายถึง องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากพืชที่ทำการตรวจสอบโดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีและการตกตะกอน ซึ่งใช้ระยะเวลาน้อย ทำได้ง่าย รวดเร็ว เพื่อบอกถึงกลุ่มสารเคมีที่สำคัญ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น อัลคาลอยด์ แทนนิน ฟลาโวนอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แอนทราควิโนน คูมาริน สเตอรอยด์ เทอร์พีนอยด์ และซาโปนิน

# บทที่ 2
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## ข้อมูลพืชตัวอย่างองุ่นป่า (*Ampelocissus martini* Planch.)

**1. องุ่นป่า (*Ampelocissus martini* Planch.)**

**ชื่อสมุนไพร** ส้มกุ้ง

**ชื่ออื่น ๆ** กุ่ย (อุบลราชธานี), เครืออีโกย อีโก่ย (นครราชสีมา), เถาเปรี้ยว (กรุงเทพมหานคร), เถาวัลย์ขน (ราชบุรี), ส้มกุ่ย (สระบุรี), ส้มออบ (นครศรีธรรมราช), ส้มกุ้ง (ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช), องุ่นป่า

**ชื่อวิทยาศาสตร์** *Ampelocissus martini* Planch.

**ชื่อพ้อง** *Vitis martinii* (Planch.) Ridl.

**ชื่อวงศ์** Vitaceae

**2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์**

**ไม้เถาเลื้อย** มักเกาะพันต้นไม้อื่น ไม่ผลัดใบ มีมือเกาะออกตามข้อมักออกตรงข้ามกับใบ เถาเป็นปล้อง กิ่งอ่อนยอดอ่อนมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม เถาแก่สีน้ำตาลแดง มักมีร่องยาวตามแนวยาวของเถา เถาแก่จะมีความแข็งและมีเนื้อไม้ ในส่วน**ใบ**เดี่ยวเรียงสลับ รูปหัวใจ หยักเว้า 3-5 แฉก กว้างประมาณ 10-13.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 12 เซนติเมตร โคนใบเว้ารูปหัวใจ ปลายใบแหลมหรือมน ขอบใบหยักซี่ฟันแหลม ขอบใบเว้าเป็น 3-5 แฉก ผิวใบด้านบนเกลี้ยง ผิวด้านล่างมีขนสั้นหนานุ่มสีแดงปกคลุม ก้านใบมีขน เส้นใบหลักออกมาจากจุดเดียวกันที่ฐานใบ **ดอก**ช่อ แบบช่อแยกแขนงขนาดใหญ่ ออกตรงข้ามกับใบและโคนเถา ยาวประมาณ 7.5 เซนติเมตร เถาที่ออกดอกและติดผล ใบจะร่วงหมด ดอกย่อยจำนวนมาก ขนาดเล็ก กลีบรวมสีชมพู กลางดอกสีแดงเข้ม เกสรเพศผู้มี 5 อัน เกสรเพศเมียอยู่เหนือวงกลีบ **ผล**สด มีลักษณะเป็นรูปทรงกลม เป็นพวงแน่นคล้ายพวงองุ่น เส้นผ่านศูนย์กลางผล 2-3 เซนติเมตร ผลอ่อนสีเขียว เมื่อสุกมีสีแดงคล้ำ **เมล็ด**มี 1-2 เมล็ด มีเปลือกหุ้มแข็ง พบตามป่าเต็งรัง ป่าเบญจพรรณ ป่าผลัดใบ ออกดอกราวเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม ติดผลราวเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม ยอดอ่อนและผลอ่อนรับประทานเป็นผัก

(ก) (ข) (ค)

(ง) (จ)

ภาพที่ 2-1 ลักษณะส่วนต่าง ๆ ขององุ่นป่า (ก) ใบ (ข) เถา (ค) ราก (ง) ดอก (จ) ผล

**3. ประโยชน์**

ยอดอ่อน มีรสเปรี้ยว นำมาปรุงรสอาหารได้ ผลสุกสีดำรับประทานได้ โดยนำผลสุกมาตำส้มรวมกับผลไม้ที่มีรสฝาด เช่น กล้วย ละมุด เพื่อลดอาการระคายเคืองเวลารับประทาน (ทักษิณ อาชวาคม, สมัย เสวครบุรี, บัวใส สมสูง และฤทัยวรรณ รินไธสง, 2552) ตามตำรายาไทย ประโยชน์ในส่วนของใบ ใช้เป็นยาแก้ไอ แก้ช้ำใน แก้หอบหืด ขับฟอกโลหิตระดู ส่วนเถา ขับฟอกโลหิตระดู เป็นยาระบายอ่อน ๆ และแก้ไอ และส่วนราก เป็นยาถ่ายพรรดึก (แก้ท้องผูก) แก้ช้ำในและแก้ไอ ยาพื้นบ้านอีสานใช้ส่วนรากฝนน้ำดื่ม แก้ไข้ ผสมลำต้นหรือรากรสสุคนธ์ เหง้าสับปะรด ลำต้นไผ่ป่า ลำต้นไผ่ดง งวงตาล เปลือกต้นสะแกแสง ลำต้นหรือรากเถาคันขาว ผลมะพร้าว ลำต้นรักดำ

ลำต้นก้อม ลำต้นโพ หญ้างวงช้างทั้งต้น รากกะตังใบ เปลือกต้นมะม่วง ลำต้นหนามพรม รากลำเจียก ลำต้นอ้อยแดง ลำต้นเครือพลูช้าง เหง้ายาหัว และเปลือกต้นกัดลิ้น ต้มน้ำดื่ม แก้ฝี รักษาอาการบวม

## การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

การสกัดสารจากพืชสมุนไพรสามารถทำได้หลากหลายวิธีขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อพืชหรือสารที่ต้องการสกัด ความจำเป็นในการศึกษาและวัตถุประสงค์ของผู้ทำการศึกษา การสกัดสารจากพืชในเบื้องต้นส่วนใหญ่จะได้สารสกัดหยาบที่ยังคงมีองค์ประกอบทางเคมีหลากหลายชนิดปะปนกันอยู่โดยมีทั้งองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเรียกว่า สารสำคัญ และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เรียกว่า สารเฉื่อย (กันย์ชลา แก้วอุพัย, 2556) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการสกัดสารจากพืชโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ดังรายละเอียดในหัวข้อ 2.2.1

**1. วิธีการสกัดด้วยการแช่หมัก** (maceration)

การสกัดด้วยตัวทำละลาย มีหลักการ คือ แยกสารบางชนิดออกจากสารผสมโดยใช้ตัวทำละลายสกัดออกมานั้นเป็นเทคนิคที่ใช้กันมากในเคมีอินทรีย์ สารผสมที่นำมาสกัดอาจเป็นสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ หรือสารจากการสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ การสกัดสารด้วยวิธีนี้อาศัยสมบัติของการทำละลายของสารที่ต่างกันในตัวทำละลายต่างชนิดกัน โดยการสกัดด้วยการแช่ในตัวทำละลายเป็นวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบดั้งเดิม แต่ยังคงใช้กันอยู่มากเพื่อเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม วิธีการสกัดด้วยการแช่ทำได้โดยนำสมุนไพรแช่กับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด ทิ้งไว้ 3-7 วัน เขย่า หรือคนบ่อย ๆ (สมศักดิ์ นวลแก้ว, 2556) แล้วกรองเอาสารสกัดไปใช้ ถ้าต้องการให้หมดจดอาจต้องสกัดหลายครั้ง ข้อดี คือสารไม่ถูกความร้อน ทำได้ง่าย แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมากและค่อนข้างใช้เวลานาน (ดวงกมล เรือนงาม, 2557)

**2. การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม**

ปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งของการสกัดสารจากพืช คือ การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ชนิดของสารตามวัตถุประสงค์ และได้ปริมาณสารมากที่สุด การสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับพืชหรือสารในพืชที่สนใจศึกษาจึงเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญในการเลือกใช้ตัวทำละลาย โดยทั่วไปมีหลักการในการเลือกตัวทำละลาย ดังนี้

2.1 ตัวทำละลายที่ใช้ต้องสามารถละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี

2.2 ตัวทำละลายต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด

2.3 ถ้าต้องการแยกสีตัวทำละลายต้องไม่มีสี ถ้าต้องการแยกกลิ่นตัวทำละลายต้องไม่มีกลิ่น

2.4 ไม่มีพิษ มีจุดเดือดต่ำ และแยกออกจากสารที่ต้องการสกัดได้ง่าย

2.5 ไม่ละลายปนเป็นเนื้อเดียวกับสารที่ต้องการสกัด

2.6 ไม่ควรละลายสิ่งเจือปนหรือสารที่ไม่ต้องการ

2.7 ตัวทำละลายควรหาซื้อง่าย ราคาไม่แพง

**3. การแยกตัวทำละลาย**

การแยกตัวทำละลายออกจากสารสกัดที่เป็นขั้นตอนทำให้สารสกัดมีความเข้มข้นมากขึ้น โดยทำการแยกตัวทำละลายออกไปให้ได้มากที่สุด เมื่อระเหยสารออกไปจะได้สารสกัดที่เข้มข้นมากขึ้น เรียกว่า สารสกัดหยาบหรือส่วนสกัดหยาบ โดยวิธีการแยกตัวทำละลายออกไปมีหลายวิธี ดังนี้ (อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล, 2557)

**3.1 การระเหยด้วยการให้ความร้อน**

วิธีการนี้เหมาะกับการสกัดองค์ประกอบทางเคมีที่เสถียรต่อความร้อน สารที่สกัดไม่สูญเสียสภาพเมื่อถูกความร้อน ทำได้โดยให้ความร้อนกับสารสกัดจนตัวทำละลายระเหยกลายเป็นไอ การให้ความร้อนควรให้ผ่านอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ไม่ควรให้ความร้อนกับสารสกัดโดยตรง เพื่อป้องกันสารสลายตัวเมื่อได้รับความร้อนนาน ๆ หรือกรณีระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ อาจทำให้เกิดไฟลุกไหม้และการเดือดพลุ่งพล่านได้

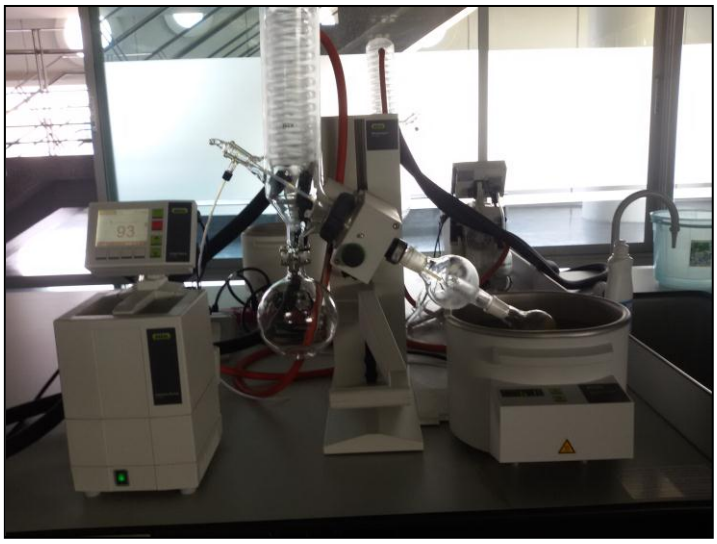
**3.2 การระเหยภายใต้ลดความดัน**

การระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดภายใต้ลดความดัน ด้วยเครื่องระเหยลดความดันแบบหมุน ดังภาพที่ 2-2 โดยเครื่องจะต่อกับปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) เพื่อลดความดันให้เกือบเป็นสุญญากาศ เครื่องมือประกอบด้วย 3 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 ส่วนให้ความร้อนและกลั่นแยก ประกอบด้วย หม้ออังน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ภาชนะที่จะกลั่น (distillation flask) เป็นขวดก้นกลม ใช้บรรจุสารสกัด เครื่องควบแน่น ที่ส่วนปลาย มีก๊อกปิดเปิด ทำให้เป็นระบบสุญญากาศ และภาชนะรองรับ (receiving flask) โดยในส่วนนี้สามารถควบคุมความเร็วในการหมุนและปรับระดับเลื่อนขึ้นลงได้

ส่วนที่ 2 ส่วนลดความดันหรือทำสุญญากาศ ซึ่งระบบจะต่อกับปั๊ม

ส่วนที่ 3 ส่วนควบคุมอุณหภูมิภายในระบบ จะเป็นอ่างน้ำหมุนเวียนที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง โดยต่อสายน้ำเข้าเครื่องควบแน่น



ภาพที่ 2-2 เครื่องระเหยลดความดันแบบหมุน

หลักการทำงานของเครื่องระเหยลดความดันแบบหมุน คือ เริ่มจากเปิดส่วนควบคุมอุณหภูมิ ให้น้ำเย็นเข้าเครื่องควบแน่น นำขวดก้นกลมที่มีสารสกัด ปริมาตรไม่ควรเกิน 2 ใน 3 ส่วน ต่อเข้ากับเครื่องมือดังภาพที่ 2-2 จากนั้นเปิดปั๊มเพื่อให้เกิดระบบสุญญากาศ ปิดระบบสุญญากาศตรงปลายเครื่องควบแน่น ให้ความร้อนกับเครื่องอังไอน้ำ และเลื่อนให้ก้นของขวดก้นกลมสัมผัสกับน้ำในเครื่องอังไอน้ำพร้อมกับหมุนขวดก้นกลมตลอดเวลา เพื่อให้สารสกัดเกิดการกระจายความร้อนอย่างสม่ำเสมอ จนกระทั่งตัวทำละลายระเหยกลายเป็นไอผ่านไปยังเครื่องควบแน่น ซึ่งต่อกับระบบหล่อน้ำเย็น ทำให้ไอควบแน่นกลายเป็นของเหลวตกลงสู่ภาชนะรองรับ ถ้าเกิดฟองอากาศเนื่องจากสารสกัดในขวดก้นกลมเดือด ให้เปิดระบบสุญญากาศตรงปลายเครื่องควบแน่นขณะหนึ่งรีบปิด เพื่อช่วยลดความดันบรรยากาศในขวดก้นกลม มิฉะนั้นสารสกัดจะพุ่งเข้าไปยังเครื่องควบแน่นได้ หลังจากระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดจนแห้งแล้ว ให้เปิดระบบสุญญากาศจนกระทั่งความดันบรรยากาศภายในขวดก้นกลมเท่ากับความดันบรรยากาศภายนอก สังเกตได้จากไม่มีเสียงการปล่อยลมออก แล้วจึงนำขวดก้นกลมออกมา ควรทำก่อนการปิดปั๊ม เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำไหล เข้าเครื่องควบแน่นและตกลงสู่ขวดก้นกลมที่มีสารสกัดหยาบอยู่

**3.3 การทำแห้งเยือกแข็ง**

การกำจัดตัวทำละลายออกจากตัวอย่างที่ไม่เสถียรเมื่อสัมผัสกับความร้อน ควรใช้กับวิธีการทำแห้งเยือกแข็ง (freeze drying) เครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (freeze dryer หรือ lyophilizer) โดยทั่วไปใช้กำจัดน้ำออกจากตัวอย่าง เครื่องมือประกอบด้วย 3 ส่วน ดังนี้

3.3.1 ส่วนบรรจุสารตัวอย่าง

3.3.2 เครื่องควบแน่น ช่วยลดอุณหภูมิของระบบ ซึ่งเท่ากับหรือต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของตัวทำละลาย ทำให้ตัวทำละลายเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็ง (หรือเกิดผลึก)

3.3.3 ปั๊มสุญญากาศ ช่วยลดความดันของระบบ จึงเกิดการระเหิดกลายเป็นไอในที่สุด

## อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเป็นสารตัวร้ายอันเป็นที่หวาดกลัวของมนุษย์ในปัจจุบันที่การดำรงชีวิตมีปัจจัยเสี่ยงต่อการสะสมอนุมูลอิสระในร่างกาย อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุให้เกิดโรค การก่อตัวที่เพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระจะทำลายเนื้อเยื่อ โปรตีน ไขมัน จนนำไปสู่ความผิดปกติและเกิดโรคต่อร่างกายมากมาย เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด ความดันโลหิตสูงขาดเลือด โรคเสื่อมและพาร์กินสัน เป็นต้น (Valko et al., 2007) อนุมูลอิสระ (free radical) คือ สารที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่หรือมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวอยู่ในโมเลกุล ทำให้โมเลกุลว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยส่วนใหญ่เป็นต้นกำเนิดของปฏิกิริยาลูกโซ่ ได้แก่ ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\bullet}$ – superoxide anion), ไฮดรอกซิลเรดิเคิล ($OH^{\bullet}$ – hydroxyl radicle), เพอร์ออกซีเรดิเคิล ($ROO^{\bullet}$ – Peroxy radicle) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เรดิเคิล ($H_2O_2^{\bullet}$ – Hydrogen Peroxide) เนื่องจากอนุมูลอิสระไม่เสถียร ดังนั้นจึงต้องการอิเล็กตรอนเพิ่มเพื่อให้ครบคู่ โดยการดึงอิเล็กตรอนจากสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ในร่างกาย โดยปกติอนุมูลอิสระเหล่านี้ เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้ว แม้ร่างกายจะมีระบบกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ออกไปโดยการสร้างเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) กลูตาไทโอนเพอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) เอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์หลักที่ร่างกายใช้ในการกำจัดสารพิษ แต่ถ้าอนุมูลอิสระมีมากกว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของร่างกาย อนุมูลอิสระที่หลงเหลืออยู่จะทำให้เกิดอันตรายต่อสารชีวโมเลกุลภายในร่างกาย เช่น ไขมัน โปรตีน ดีเอ็นเอ และคาร์โบไฮเดรตส่งผลให้เกิดความเสียหายและความผิดปกติต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย ทั้งยังทำให้เพิ่มอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคเรื้อรังชนิดไม่ติดต่อ (ดาลัด ศิริวัน, 2551)

## สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เป็นสารที่มีความสำคัญซึ่งนักวิชาการพยายามค้นคว้าวิจัยเพื่อนำมาใช้ต่อต้านอนุมูลอิสระที่ทำร้ายชีวิตมนุษย์ สารต้านอนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลของสารที่ช่วยป้องกัน ชะลอ หรือยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้แก่ กระบวนการเผาผลาญอาหาร

ภาวะความเครียด การรับประทานอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการปิ้ง ย่าง รมควัน (ดาลัด ศิริวัน, 2551) ซึ่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาที่เกี่ยวกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนของสาร ก่อให้มีอนุมูลอิสระเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ไปทำลายเซลล์ในร่างกาย ส่งผลให้ร่างกายเกิดความผิดปกติเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ และความแก่ชรา สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยการเข้าจับกับอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสามารถจำแนกออกได้ตามโครงสร้างและกลไกการต้านการเกิดออกซิเดชันที่แตกต่างกันดังนี้ (ศิริธร ศิริอมรพรรณ, 2557)

1. สารต้านอนุมูลอิสระทั่วไป (general antioxidation)

สารต้านอนุมูลอิสระทั่วไปจะมีบทบาทสำคัญในการทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้วกลายเป็นสารประกอบที่เฉื่อยต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยทั่วไปกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระเพอร์ออกซีและอัลคอกซีที่เกิดจากการสลายตัวของสารประกอบเพอร์ออกไซด์

2. สารช่วยให้สารประกอบเพอร์ออกไซด์มีความคงตัว (peroxide stabilizer)

สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มนี้จะมีบทบาทในการป้องกันหรือยับยั้งการสลายตัวของสารประกอบเพอร์ออกไซด์ไปเป็นอนุมูลอิสระ

3. สารเสริมฤทธิ์ (synergists)

สารเสริมฤทธิ์เป็นสารที่ไม่มีกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระ แต่มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมให้สารต้านอนุมูลอิสระสามารถทำงานได้ดีขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพให้เกิดผลลัพธ์ที่ดีขึ้นกว่าเดิม นั่นคือช่วยเสริมฤทธิ์ตัวต้านแต่ไม่ใช่ตัวต้าน

4. สารคีเลต (chelating agent)

สารคีเลตหรือสารจับโลหะเป็นสารที่ทำหน้าที่ในการจับกับโลหะที่เป็นตัวกระตุ้นให้สารประกอบเพอร์ออกไซด์สลายตัวไปเป็นอนุมูลอิสระ ซึ่งเมื่อสารคีเลตไปจับโลหะจะเกิดเป็นสารประกอบที่เฉื่อยต่อการเกิดปฏิกิริยา ทำให้โลหะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาที่สร้างอนุมูลอิสระได้

5. สารจับออกซิเจนซิงเกลต (singlet oxygen)

สารจับออกซิเจนซิงเกลตหรือสารจับออกซิเจนเดี่ยว มีบทบาทและความสามารถในการเปลี่ยนซิงเกลตออกซิเจนหรือออกซิเจนที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวที่อยู่ในสถานะถูกกระตุ้น (excited state) ไปเป็นทริพเลตออกซิเจนหรือออกซิเจนที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว 2 ตัว ที่อยู่ในสถานะพื้น (ground state)

นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระยังสามารถแบ่งตามแหล่งที่มาได้เป็น 2 ชนิด คือ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ดังนี้

1. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เป็นสารบริสุทธิ์ที่ช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอันเป็นสาเหตุการเกิดอนุมูลอิสระ โดยราคาไม่แพงมาก ละลายน้ำได้ไม่ดี ประสิทธิภาพค่อนข้างคงตัว ออกฤทธิ์สม่ำเสมอ แต่มีข้อจำกัดเรื่องความปลอดภัย (ศิริธร ศิริอมรพรรณ, 2557) ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่เป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

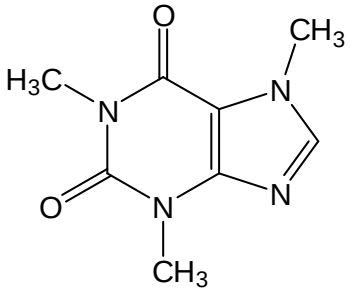
2. สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ เป็นสารที่ส่วนใหญ่ไม่ทราบองค์ประกอบแน่นอนว่าสารตัวไหนยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ประสิทธิภาพไม่สม่ำเสมอ ราคาแพง แต่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค (ศิริธร ศิริอมรพรรณ, 2557) ซึ่งสารสกัดจากพืชมากมายหลายชนิดที่ได้รับการศึกษาค้นคว้าพบสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติพบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (nonnutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารฟีนอลิก โดยเฉพาะกลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenols) เช่น แซนโธน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งโครงสร้าง ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชั่น (functional group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุมูลของ $H^{\bullet}$ แก่อนุมูลอิสระ นอกจากนี้สารประกอบพอลิฟีนอล ที่มีโครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล $OH^{\bullet}$ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ $Fe^{2+}$ และ $Cu^{2+}$ เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) สารประกอบกลุ่มพอลิฟีนอล ซึ่งพบในพืชพรรณธรรมชาตินานาชนิดสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการ (in vitro) และในสิ่งมีชีวิต (in vivo) (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

## สารพฤกษเคมี

สารต้านอนุมูลอิสระที่ทำการศึกษากันอย่างกว้างขวางในขณะนี้ คือ สารพฤกษเคมี (phytochemical) เป็นสารสำคัญที่พบในพืช โดยมากเป็นสารทุติยภูมิ (secondary product) ที่พืชสังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อจุดประสงค์บางอย่าง เช่น ป้องกันตัวเองจากเชื้อโรคและแมลง ให้สีสันกับพืช ตัวอย่างของสารพฤกษเคมี ได้แก่ แทนนิน (tannin) สารประกอบพอลิฟีนอลิก (polyphenolic compound) แอนทราควิโนน (anthraquinones) ซาโปนิน (saponins) อัลคาลอยด์ (alkaloids) และคูมาริน (coumarins) สารพฤกษเคมีในพืชมีหลายชนิดแต่ละชนิดมีฤทธิ์ต่าง ๆ กันไป แต่โดยส่วนใหญ่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ เนื่องจากมีโครงสร้างที่มีความซับซ้อนและมีแนวโน้มให้อิเล็กตรอนได้ดี (ดาลัด ศิริวัน,

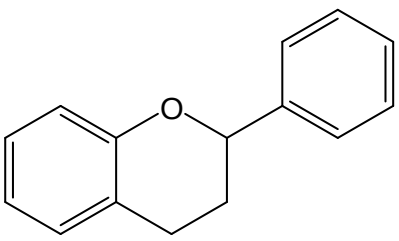
2551) โดยกลุ่มสารแต่ละชนิดจะมีลักษณะเฉพาะแตกต่างกันไป ดังนี้ (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544)

**อัลคาลอยด์ (alkaloids)** เป็นกลุ่มสารประกอบที่พบในพืชชั้นสูง เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ดังภาพที่ 2-3 ซึ่งเป็นโครงสร้างคาเฟอีนที่เป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ คุณสมบัติทั่วไปของอัลคาลอยด์ คือ มีรสขม มีฤทธิ์เป็นด่าง ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550) เป็นกลุ่มสารที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรคกันมาก และมีจำนวนไม่น้อยที่เป็นสารพิษ ตัวอย่างสารอัลคาลอยด์จากธรรมชาติ เช่น คาเฟอีนจากต้นกาแฟ



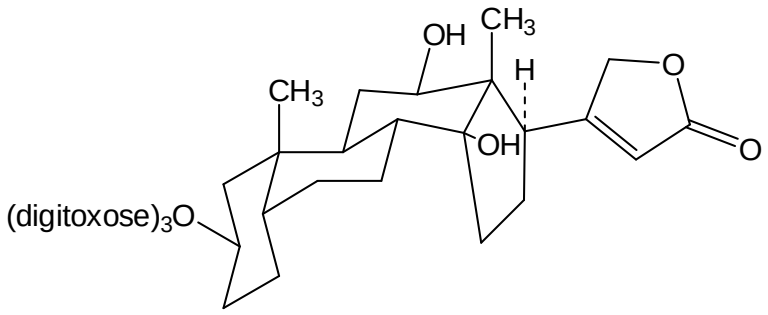

ภาพที่ 2-3 โครงสร้างของคาเฟอีน

**ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)** จัดเป็นสารประกอบพอลิฟีนอลจำพวกฟีนิลโครโมนและอนุพันธ์ โดยโครงสร้างหลักมีนิวเคลียสเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน ดังภาพที่ 2-4 พบมากในธรรมชาติ โดยส่วนใหญ่พบเป็นเม็ดสีในส่วนต่าง ๆ ของพืชโดยเฉพาะในดอกไม้ ทำให้ดอกไม้มีสีสันสวยงาม ฟลาโวนอยด์ในธรรมชาติพบทั้งฟลาโวนอยด์ในรูปอิสระและในรูปไกลโคไซด์ ฟลาโวนอยด์ที่พบในธรรมชาติ เช่น naringin ในเปลือกผลส้ม



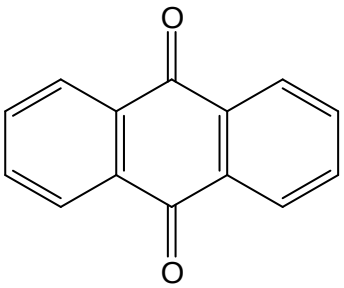

ภาพที่ 2-4 โครงสร้างหลักของสารประกอบฟลาโวนอยด์

**คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides)** เป็นสารประกอบไกลโคไซด์ที่มีอะไกลโคนเป็นสเตอรอยด์นิวเคลียส คือ มีโครงสร้างเป็นวงแหวนไซโคเพนทาโนเพอไฮโดรฟีแนนทรีนอยู่ในโมเลกุล มีฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น ดิจอกซิน จากใบของพืชสกุลดิจิทาลิส ดังภาพที่ 2-5



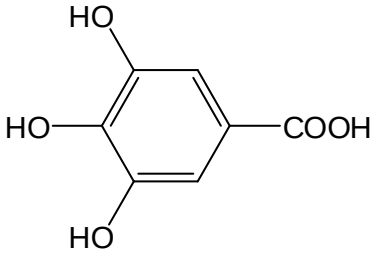

ภาพที่ 2-5 โครงสร้างของดิจอกซิน

**แอนทราควิโนน (anthraquinones)** เป็นสารควิโนนที่พบมากที่สุดมีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย 3-ring system ดังภาพที่ 2-6 พบได้ทั้งในรูปอิสระและไกลโคไซด์ ส่วนใหญ่มักพบในพืชชั้นสูงนำมาใช้ประโยชน์เป็นยาถ่ายและยาระบายอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์เป็นสีย้อมและใช้เป็นยารักษาเชื้อราที่ผิวหนังได้ ตัวอย่างแอนทราควิโนนที่พบในธรรมชาติ เช่น แอนทราควิโนนซีไกลโคไซด์ (C-glycoside) ที่พบในส่วนเปลือกใบของว่านหางจระเข้



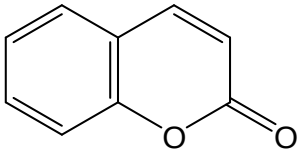

ภาพที่ 2-6 โครงสร้างของแอนทราควิโนน

**แทนนิน (tannins)** เป็นสารจำพวกพอลิฟีนอลที่มีโมเลกุลค่อนข้างใหญ่และสลับซับซ้อน พบได้ทั่วไปในพืชเกือบทุกชนิด เป็นสารที่แยกให้บริสุทธิ์ได้ยากเพราะไม่ตกผลึก พบได้ทั้งในรูปอิสระและไกลโคไซด์ สามารถละลายได้ในน้ำ แทนนินมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง ใช้เป็นยาฝาดสมาน ตัวอย่างแทนนินในธรรมชาติ เช่น สาร gallic acid ที่พบจากโกศน้ำเต้า ดังภาพที่ 2-7



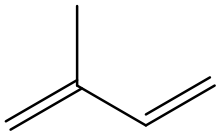

ภาพที่ 2-7 โครงสร้างของสาร gallic acid

**คูมาริน (coumarins)** เป็นสารประกอบที่โครงสร้างมีวงแหวนแลกโทน ดังภาพที่ 2-8 ในพืชพบทั้งรูปอิสระและไกลโคไซด์ มีลักษณะเฉพาะตัวคือ เป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นหอม ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในการใช้เป็นสารแต่งกลิ่น นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นยาบำรุงเลือด ช่วยป้องกันการแข็งตัวของเลือด ตัวอย่างคูมารินที่พบในธรรมชาติ เช่น สาร 4-ฟีนิลคูมาริน จากดอกสารภี



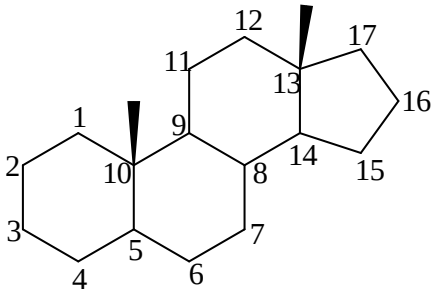

ภาพที่ 2-8 โครงสร้างของคูมาริน

**เทอร์พีนอยด์ (terpeniods)** เป็นสารประกอบที่มีหน่วยเล็กที่สุด เรียกว่า isoprene unit ดังภาพที่ 2-9 ซึ่งเป็น branch chain ของคาร์บอน 5 อะตอม และมีพันธะคู่ เทอร์พีนอยด์ส่วนใหญ่ละลายได้ดีในไขมัน สารประกอบเทอร์พีนอยด์พบกระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะในพืชมีดอก นอกจากนี้ยังพบในเชื้อรา แมลง จุลินทรีย์ และสิ่งมีชีวิตในทะเล เป็นกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย ยกตัวอย่างเช่น สารเพลาโนทอล จากใบเปล้าน้อย



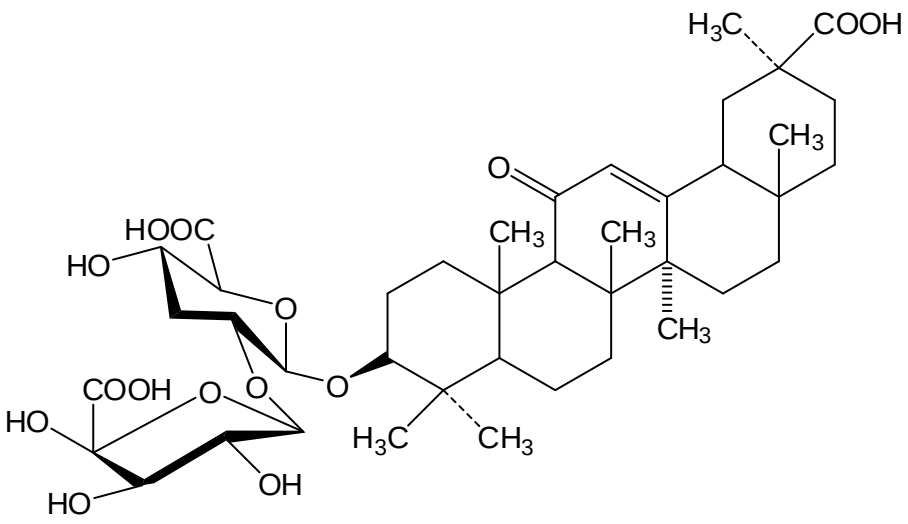
ภาพที่ 2-9 โครงสร้างของ isoprene unit

**สเตอรอยด์ (steroids)** เป็นสารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างพื้นฐานของสเตอรอยด์ เรียกว่า ไซโคลเพนทะโนเพอร์ไฮโดรฟีแนนธรีน (cyclopentanoperhydrophenanthrene) ประกอบด้วยระบบวง 6/ 6/ 6/ 5 เหลี่ยมต่อเรียงกัน ดังภาพที่ 2-10 โดยเฉพาะตำแหน่งที่ C10 และ C13 เท่านั้น จะมีหมู่เมธิล ซึ่งแตกต่างจากไตรเทอร์พีน ส่วนมากสเตอรอยด์ มีคุณสมบัติเป็นยารักษาโรค เช่น ลดการอักเสบ รักษาโรคหัวใจ ยาขับปัสสาวะ และยากดภูมิคุ้มกันร่างกาย เป็นต้น (อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล, 2557) ตัวอย่างเช่น สาร diosgenin ซึ่งได้จาก *Dioscorea spp*. เป็นสารประกอบตั้งต้นในการสังเคราะห์ยาคุมกำเนิดและฮอร์โมนเพศ




ภาพที่ 2-10 โครงสร้างของสเตอรอยด์

**ซาโปนิน (saponins)** เป็นสารประกอบในกลุ่มไกลโคไซด์ที่มีส่วนอะไกลโคน แบ่งเป็นสารพวกสเตอรอยด์และไตรเทอร์พีนอยด์ ซึ่งเรียกอะไกลโคนว่า ซาโปจีนิน ส่วนนี้จะจับกับน้ำตาล โดยมีซาโปนินมีสมบัติบางอย่างคล้ายสบู่จึงสามารถเกิดฟองได้เมื่อเขย่ากับน้ำ เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดีและสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ ยกตัวอย่างเช่น glycyrrhizin หรือ glycyrrhizic acid ดังภาพที่ 2-11 พบในรากชะเอม




ภาพที่ 2-11 โครงสร้างของ glycyrrhizin

## การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอนุมูลอิสระสามารถทำได้หลายวิธี โดยส่วนใหญ่จะใช้อนุมูลอิสระที่ค่อนข้างมีความเสถียรเป็นรีเอเจนต์ในการทดสอบ โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของสารในสภาพเป็นอนุมูลอิสระ และเสียสภาพความเป็นเรดิคัล (radical) เมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระ ในที่นี้กล่าวถึง การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นสารที่ใช้กันมาก เนื่องจาก DPPH ค่อนข้างเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร สมบัติทางกายภาพที่ใช้ทดสอบ คือ ในสภาพที่เป็นอนุมูลอิสระจะเป็นสีม่วง และจะไม่มีสีหรือถูกฟอกจางสีเมื่อเสียสภาพความเป็น radical โดยการทดสอบ จะมี 2 ส่วน คือ

**1. TLC screening for radical scavengers**

TLC screening for radical scavengers เป็นการทดสอบเชิงคุณภาพเพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารสกัด (สุชาดา มานอก, 2555) โดยหยดสารสกัดลงบน TLC แล้วนำไปแช่ในระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม ทำเครื่องหมายตำแหน่งของสารที่แยกได้บนแผ่น TLC และนำไปทดสอบกับสารละลาย DPPH โดยพ่นสารละลายของ DPPH ซึ่งมีสีม่วงลงบนแผ่น TLC ให้ทั่ว ทิ้งไว้ให้แห้ง สังเกตผลจากตำแหน่งการฟอกจาง ถ้าตำแหน่งใดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะเกิดการฟอกจางสีของ DPPH จากสีม่วงเป็นสีขาวหรือสีต่างจากเดิม

**2. spectrophotometric assay**

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในเชิงปริมาณโดยการใช้เครื่อง UV-Visible spectrophotometer เป็นวิธีที่ให้ความละเอียดในการทดสอบมากขึ้น ทำโดยผสมสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ใน ที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที (สุริสา ศรีสุวรรณ และคณะ, 2557) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง คำนวณร้อยละฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH (% inhibition) จาก สมการ

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} x100$$

ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจะแสดงเป็นค่า $IC_{50}$ คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์

จากวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเชิงคุณภาพ จึงเลือกใช้การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเฉพาะในส่วนของ TLC screening for radical scavengers เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวกรวดเร็ว และไม่ต้องใช้เครื่องมือทดสอบที่มีราคาแพง

## แบคทีเรียและการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอต (prokaryote) เป็นจุลินทรีย์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 1-2 ไมโครเมตร มักอยู่เป็นกลุ่มโคโลนี เซลล์แบคทีเรียจะมีรูปร่างที่หลากหลาย เช่น กลม (coccus) ท่อน (bacillus) เกลียว (spiral) และแบคทีเรียที่มีรูปร่างไม่แน่นอน เรียกว่า พลีโอมอร์ฟิค (pleomorphic) ประกอบด้วยรยางค์เป็นโครงสร้างที่ห่อหุ้มเซลล์ และโพรโตพลาสซึม (วีรานุช หลาง, 2554)

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสามารถทำได้หลายวิธี โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของพืชตัวอย่างดัดแปลงวิธีการมาจากการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลินทรีย์หรือยาปฏิชีวนะ (Koneman et al., 1994) สามารถแบ่งการทดสอบที่ใช้ได้ 2 วิธี คือ diffusion method และ dilution method โดยมีรายละเอียดดังนี้

**1. diffusion method**

diffusion method เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถปฏิบัติได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว การทดสอบอาศัยการแพร่ของสารต้านจุลินทรีย์จากจุดเริ่มต้น

ออกไปในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ (นริศา คำแก่น, 2551) วิธีการจึงนำสารต้านจุลินทรีย์ซึ่งอยู่ในรูปแผ่นยาที่เป็นกระดาษกรองหรือเม็ดยาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจุลินทรีย์อยู่ โดยที่นิยมมากที่สุด คือ วิธีการที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (disc diffusion method หรือ filter paper disc) และการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สังเกตจากการที่จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณที่มีสารต้านจุลินทรีย์ นั่นคือบริเวณใกล้กระดาษกรองที่มีความเข้มข้นของสารมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้จะไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ให้เห็นจึงเกิดเป็นโซนใส (inhibition zone) ขึ้น (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2536) แต่วิธีนี้ไม่สามารถอ่านผลได้โดยตรงเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

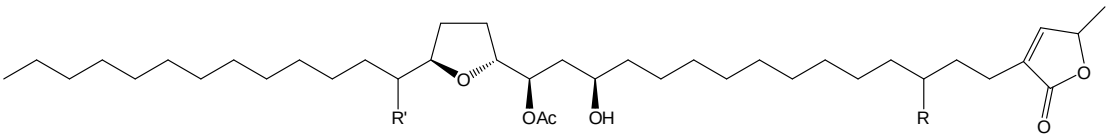
**2. dilution method**

dilution method เป็นวิธีการทดสอบที่ใช้การวัดค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเรียกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ว่า minimal inhibition concentration หรือ MIC ซึ่งการวิเคราะห์หาค่า MIC สามารถทำโดยการเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถเจือจางได้ 2 วิธี (Ingraham, Ingraham, & Harriett, 1995) ได้แก่ การเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง (agar dilution method) การเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารเหลว (broth dilution method) ซึ่งจะให้ผลการทดสอบที่มีความละเอียดมากกว่า แต่ต้องมีเครื่องมือ อุปกรณ์ เวลา และผู้มีความเชี่ยวชาญในการทดสอบมากกว่า

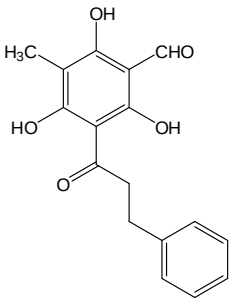
จากการวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จะเห็นได้ว่าการพิจารณาเลือกวิธีการทดสอบนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการทดลอง ปริมาณสารสกัดที่จะทดสอบ จำนวนสารสกัดที่มีตลอดจนความรู้ความเชี่ยวชาญของผู้ทำการทดสอบและงบประมาณในการทำการทดลอง ซึ่งโดยทั่วไปวิธี diffusion method จะนิยมใช้กันมากหากไม่ต้องการผลการทดลองที่มีความละเอียดมากเนื่องจากขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง

## งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

George et al. (2008) การตรวจสอบราก *Ampelocissus* sp. ของฟิลิปปินส์ในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยทำการแยกสารอะซีโตจีนินชนิดใหม่ คือ 22-epicalamistrin ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค 2D NMR และเทคนิคแมสสเปกโตรสโกปี นอกจากนี้ยังพบสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว 2 ชนิด คือ uvaribonin และ chalcone ดังโครงสร้างในภาพที่ 2-12 โดยสารประกอบทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง




(ก) R = H, R' = α-OH (ข) R = OH, R' = α-OH




(ค)

ภาพที่ 2-12 โครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (ก) 22-epicalamistrin (ข) uvaribonin (ค) chalcone

Zongo et al. (2010) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดอะซีโตนและสารสกัดน้ำของเหง้า *Ampelocissus grantii* (Baker) Planch (Vitaceae) การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocaltue การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี disc diffusion และ broth microdilution assays ทั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา สารสกัดอะซีโตนให้ผลทดสอบปริมาณฟีนอลิกรวมที่สูงมีค่าสหสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 5.6 และมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ พื้นที่ยับยั้งที่สูงที่สุด เท่ากับ 15 mm ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 0.625 mg/ mL โดยเฉพาะกับ *Enterococcus faecalis* (10907 CIP) และ *Bacillus subtilus* (ATCC 21332) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้เป็นพื้นฐานสำคัญในการใช้พืชนี้ในการรักษาโรค

Jitendra et al. (2013) ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากราก *Ampelocissus latifolia* (ROXB.) โดยการรักษาแบบให้ยาทางปากกับการใช้ยาทาภายนอก พบว่าสารสกัดจากรากด้วย hydro alcoholic ให้ผลต้านการอักเสบเมื่อรักษาโดยการให้ยาทางปากในหนูทดลองมีประสิทธิภาพดีกว่าการให้ยาทาภายนอก

Parag and Bhanu (2013) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบ *Ampelocissus latifolia* (ROXB.) โดยนำใบแห้งมาสกัดโดยวิธี soxhlet ด้วยเมทานอลเป็นเวลา 8 ชั่วโมง สารสกัดสามารถต่อต้านแบคทีเรียที่สำคัญ ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) *Micrococcus luteus* (MTCC 9207) Methicillin-resistant ที่เชื้อ *Staphylococcus*

*aureus* (ATCC 43300) เชื้อ (MTCC 1951) และยีสต์ *Malaassezia furfur* (MTCC 1374) โดยใช้การวิเคราะห์ MIC และ MBC/ MFC ให้ค่า MIC และ MBC ต่ำสุดที่ 200 mg/ mL สารสกัดมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อศึกษาด้วยวิธี DPPH ค่า $IC_{50}$ ของสารสกัด เท่ากับ 738.80 ± 0.3326 µg/ mL และกรดแอสคอบิกมาตรฐานพบว่ามีน้อยกว่า 20 µg/ mL ตามลำดับ ค่า $IC_{50}$ สำหรับสารสกัดและกรดแอสคอบิกมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 48.66 ± 6.36 µg/ mL และ 45.67 ± 1.49 µg/ mL ตามลำดับ หมู่ฟังก์ชันของสารสกัดถูกระบุด้วยวิธีอินฟาเรดสเปกโทรสโกปี

Das et al. (2014) ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและระงับปวดของสารสกัดเอทานอลของผล *Ampelocissus latifolia* (ROXB.) ผลการศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นพบ alkaloids, flavonoids, tannins, glycosides ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบพบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งคาราจีแนนที่ทำให้เกิดอาการบวมน้ำในตีนหนูได้สูงกว่า diclofenac sodium ที่ใช้เป็นยามาตรฐาน อย่างมีนัยสำคัญ และทดสอบฤทธิ์การระงับปวด พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นจะทำให้ความเจ็บปวดลดน้อยลง เป็น 94.71 % และ 82.7 % ในขนาด 250 และ 500 mg/ kg BW ในขณะที่ ยามาตรฐานเป็น 61.45 % ในชั่วโมงที่ 3 และการทดสอบด้วยวิธี acetic acid-induced ร้อยละของการยับยั้งจะเป็น 50.57 % และ 59.77 % ที่ 250 และ 500 มก./ กก. ตามลำดับ

Parag, Vanita and Bhanu (2014) ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพและสารพฤกษเคมีของใบ *Ampelocissus latifolia* (ROXB.) สกัดโดยใช้ soxhlet ด้วยตัวทำละลาย 14 ชนิด พบสารพฤกษเคมีจำนวนมาก ได้แก่ alkaloids, saponins, carbohydrates, glycosides, tannins, flavonoids, steroids, phenols, proteins, monosaccharides, hexose sugars, starch, mucilages & gums การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์เพิ่มเติมสนับสนุนผลการทดสอบสารพฤกษเคมี ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าใบของพืชชนิดนี้มีสารพฤกษเคมีจำนวนมากที่สามารถนำมาใช้เพื่อการรักษาโรคต่าง ๆ ได้

Xu et al. (2014) การตรวจสอบพฤกษเคมีของ *Ampelocissus artemisiifolia* Planch นำไปสู่การแยกได้สารแกมมาไพโรนชนิดใหม่ คือ (*E*)-2-(2-hydroxypropyl)-6-(4-hydroxystyryl)-4*H*-pyran-4-one และสารที่ทราบโครงสร้างจำนวน 8 ชนิด คือ parthenocissin A, *trans*-resveratrol, polydatin, $\beta$-sitosterol, stigmasterol, ergosterol, apigenin และ indole-3-carboxylic acid ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีและเปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัมกับสารที่เคยมีรายงานมาก่อน โดยสารทั้งหมดถูกแยกจากพืชสกุล Ampelocissus ในขณะที่สาร ergosterol, apigenin และ indole-3-carboxylic acid เป็นสารใหม่ในพืชวงศ์องุ่น

Anwesa and Sanjib (2015) ศึกษาฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ของสารพฤกษเคมีในส่วนอากาศของสารสกัดน้ำของ *Ampelocissus latifolia* (ROXB.) Planch. (AAEAL) บนเซลล์เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลาย โดยทำการทดสอบในรากและหรือเนื้อเยื่อเจริญปลายรากของถั่วเขียวและ

หัวหอม โดยวิเคราะห์การชะลอการเจริญเติบโตหรือวิเคราะห์จากค่าไมโทติกอินเดกซ์ ปริมาณสารพฤกษเคมีของ AAEAL ทำโดยการหาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนิน และปริมาณฟลาโวนอยด์ โดยใช้เกณฑ์มาตรฐาน ผลการวิจัยพบว่า AAEAL สามารถชะลอการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้อเยื่อเจริญได้อย่างมีนัยสำคัญ ในเซลล์รากหอมให้ค่าไมโทติกอินเดกซ์เท่ากับ 74% โดยใช้ 2 mg/ mL ของ AAEAL เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยพบสารจำพวกแทนนิน เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ คาร์โบไฮเดรตและแอนทราควิโนนค่อนข้างสูง ส่วนปริมาณอัลคาลอยด์ และไกลโคไซด์มีน้อย จำนวนกรัมสมมูลของ total phenols, non-tannin phenols และ tannins เท่ากับ 21.03 ± 0.9 9.54 ± 0.7 และ 12.1 ± 0.9% ตามลำดับ ในขณะที่ฟลาโวนอยด์ 11.7 ± 0.5% เป็น quercetin สรุปคือ AAEAL มีศักยภาพในการยับยั้งเซลล์เนื้อเยื่อเจริญเนื่องจากมีสารพอลิฟีนอลิกในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Maheswari and Meerabai (2015) ศึกษาฤทธิ์การลดไข้ของสารสกัดเมทานอลจากส่วนใบ ราก และลำต้น *Ampelocissus araneosa* Planch. ของบริเวอร์ยีสต์ที่ทำให้เป็นไข้ในกระต่าย ในอัตราส่วน 200 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม และ 400 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดจากใบสามารถลดไข้ได้มากกว่าลำต้นและรากอย่างมีนัยสำคัญ โดยเทียบกับยาแอสไพรินมาตรฐานขนาด 10 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม

Theng and Korpenwar (2015) ได้ทำการศึกษาโดยใช้การตรวจสอบ UV- VIS , FTIR และการวิเคราะห์ GC- MS ของหัว *Ampelocissus latifolia* สารสกัดเอทานอลของ *Ampelocissus latifolia* เมื่อตรวจสอบด้วย UV-VIS ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 409 nm, 424 nm และ 479 nm เท่ากับ 1.682 , 1.704 และ 1.479 ตามลำดับ การตรวจสอบ FTIR สเปกตรัม พบแอลกอฮอล์ อะโรมาติก อัลเคน อัลดีไฮด์ คีโตน อัลคีน เอมีน เอไมด์ สารประกอบไนโตร กรดคาร์บอกซิลิก อีเทอร์ เอสเทอร์ และอัลคิลเฮไลด์ ในสารสกัดเอทานอลของหัว *Ampelocissus latifolia* และผลการวิเคราะห์ GC- MS พบสารพฤกษเคมี 14 ชนิด การพบหมู่ฟังก์ชัน และสารพฤกษเคมีดังกล่าว ยืนยันว่าในหัว *Ampelocissus latifolia* มีบทบาทเป็นแหล่งของยาต้านเชื้อโรคต่าง ๆ ที่สำคัญ

Jirum et al. (2013) ศึกษาสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากน้ำคั้นสดของผลองุ่นป่าที่มีสีต่างกัน คือ ผลสีเขียว ผลสีแดง และผลสีดำ พบว่าผลองุ่นป่าให้ค่าปริมาณฟีอลิกและฟลาโวนอยด์ที่สูงโดยเฉพาะในผลสีดำ แต่ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลสีเขียวให้ผลสูงที่สุด ในทางตรงกันข้ามผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดผลสีแดงกว้างถึง 14 สายพันธุ์ และอย่างน้อย 6 สายพันธุ์ที่อ่อนไหวกับสารสกัดผลสีเขียว ในการศึกษาครั้งนี้ทำให้ยืนยันได้ว่าสารสกัดจากผลองุ่นป่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียที่ดี ผลที่ได้ทำให้สามารถใช้สารสกัดจากผลองุ่นป่ามีสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีมาก

Kriscelia, April, Steve, Vivian and Jay (2015) การศึกษาสารสกัดเฮกเซนจากน้ำมันเมล็ดองุ่นป่า โดยใช้เทคนิค IR สเปกโทรสโกปี ศึกษาโครงสร้างพบกรดไขมันอิสระในปริมาณค่อนข้างสูง ซึ่งกรดไขมันหลักที่พบได้แก่ linoleic acid (48.26%) palmitic acid (11.81%) stearic acid (9.0%) และ oleic acid (27.98%)

สุริสา ศรีสุวรรณ, อัณศยา ท่อนโพธิ์ และประสงค์ สีหานาม (2557) ได้สกัดผลองุ่นป่าด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอล เมทานอล และน้ำ จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายด้วย rotary evaporator ตรวจสอบสารพฤกษเคมีโดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และ colorimetric aluminum chloride ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในผลองุ่นป่าที่สกัดด้วยเมทานอลมีค่าสูงกว่าที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่าง ๆ ให้ผลดังนี้ วิธี DPPH ($IC_{50}$ = 13.8 μg/ mL), ABTS ($IC_{50}$ = 6.3 μg/ mL), FRAP (3.5 mM $FeSO_4$/ g) และ CUPRAC (1065 μg TE/ g) สรุปได้ว่า สารสกัดผลองุ่นป่าด้วยเมทานอลมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันสูงกว่าที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำ โดยพบว่าปริมาณฟีนอลิกมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.998 การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผลองุ่นป่าอาจเป็นผลไม้ที่ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) บริษัท BUCHI, Switzerland
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo รุ่น AG203-S
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo รุ่น AG245
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ บริษัท เมริทเทค จำกัด รุ่น HH-S6 ยี่ห้อ TNL
5. เครื่องส่องรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) รุ่น Benchtop Single, USA
6. ขวดก้นกลม ขนาด 500 มิลลิลิตร
7. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25, 50,100, 500 มิลลิลิตร
8. ขวดบรรจุสาร (vial) ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
9. แผ่น TLC silica gel 60 $F_{254}$
10. กระดาษกรอง Whatman No.1
11. เครื่องแก้วพื้นฐาน

## สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. Methanol: $CH_3OH$, AR grade บริษัท J. T. Baker, Germany
2. Ethanol: $C_2H_5OH$, AR grade บริษัท J. T. Baker, Germany
3. Hexane: $C_6H_{12}$, commercial grade บริษัท J. T. Baker, Germany
4. Dichloromethane: $CH_2Cl_2$, commercial grade บริษัท J. T. Baker, USA
5. Ethyl acetate: EtOAc, commercial grade บริษัท J. T. Baker, USA
6. Acetone: $C_3H_6O$, AR grade บริษัท J. T. Baker, Germany
7. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) บริษัท Fluka, Germany
8. Potassium iodide: KI, AR grade, บริษัท Merck, Thailand
9. Iodine: $I_2$, AR grade, บริษัท Merck, Thailand
10. Bismuth subnitrate, AR grade, บริษัท Riedel-De-Hacn.
11. Glacial acetic acid: $CH_3COOH$ 99% บริษัท Ajax Finechem, New Zealand
12. Sulfuric acid: $H_2SO_4$ บริษัท Ajax Finechem, New Zealand

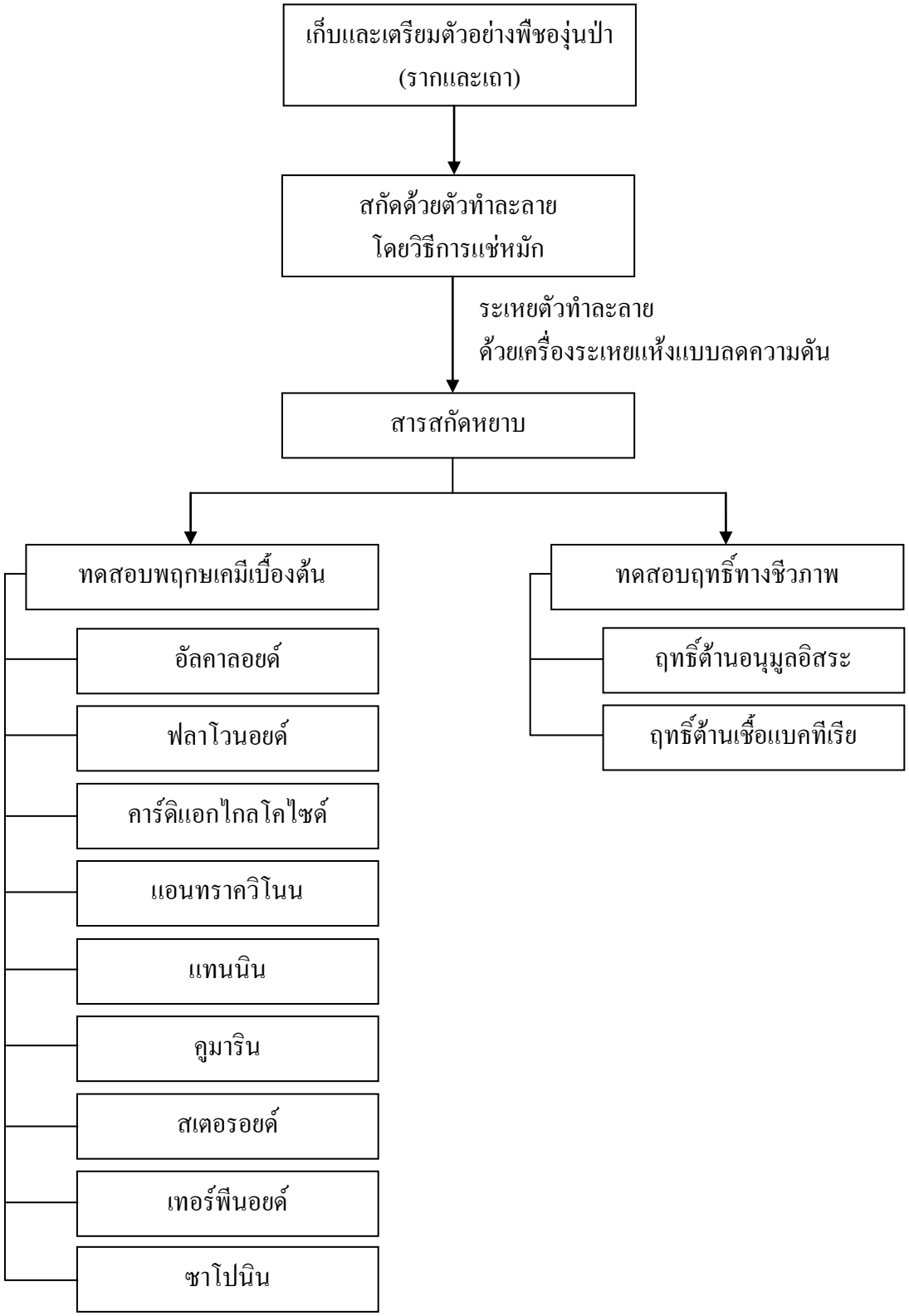
13. Iron (III) chloride: $FeCl_3$ บริษัท Ajax Finechem, Australia
14. Hydrochloric acid: HCl บริษัท Ajax Finechem, New Zealand
15. Ammonia: $NH_3$ บริษัท Ajax Finechem, New Zealand
16. Sodium hydroxide: NaOH AR grade, บริษัท Merck
17. ลวดแมกนีเซียม บริษัท Ajax Finechem, New Zealand
18. เหล้าขาว 35% ตรา รวงข้าว บริษัท นทีชัย จำกัด

## พืชตัวอย่าง

องุ่นป่า (ส่วนรากและเถา) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Ampelocissus matini* Planch. ระบุชนิดพืชโดย ดร.ธรรมรัตน์ พุทธไทย อาจารย์ประจำสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี และเก็บตัวอย่างพืชเมื่อวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2559 จากบ้านทอนหาญ หมู่ที่ 4 ตำบลคลองลุ อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง แยกเป็นส่วนรากและเถา ล้างแต่ละส่วนให้สะอาด นำมาทำการสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ ผึ่งแดดให้แห้ง และแช่ด้วยตัวทำละลาย

## วิธีการวิจัย

ชั่งน้ำหนักส่วนรากใส่ขวดโหล 3 ใบ แต่ละใบมีน้ำหนักของรากที่แห้ง 500 กรัม จากนั้นเติมตัวทำละลายเหล้าขาว เมทานอล และเอทานอล แยกใส่ในขวดโหลแต่ละใบให้พอท่วม และชั่งน้ำหนักส่วนเถาใส่ขวดโหลอีก 3 ใบ แต่ละใบมีน้ำหนักของเถาที่แห้ง 100 กรัม จากนั้นเติมตัวทำละลายในลักษณะเดียวกันกับส่วนราก ปิดฝาทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วจึงนำมากรองและระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบจากส่วนรากที่สกัดด้วยเหล้าขาว เมทานอล และเอทานอล 3 ส่วน และสารสกัดหยาบจากส่วนเถาที่สกัดด้วยเหล้าขาว เมทานอล และเอทานอล 3 ส่วน รวมเป็นสารสกัดหยาบทั้งหมด 6 ส่วน นำไปทดสอบสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ ตามแผนภาพการวิจัยในภาพที่ 3-1



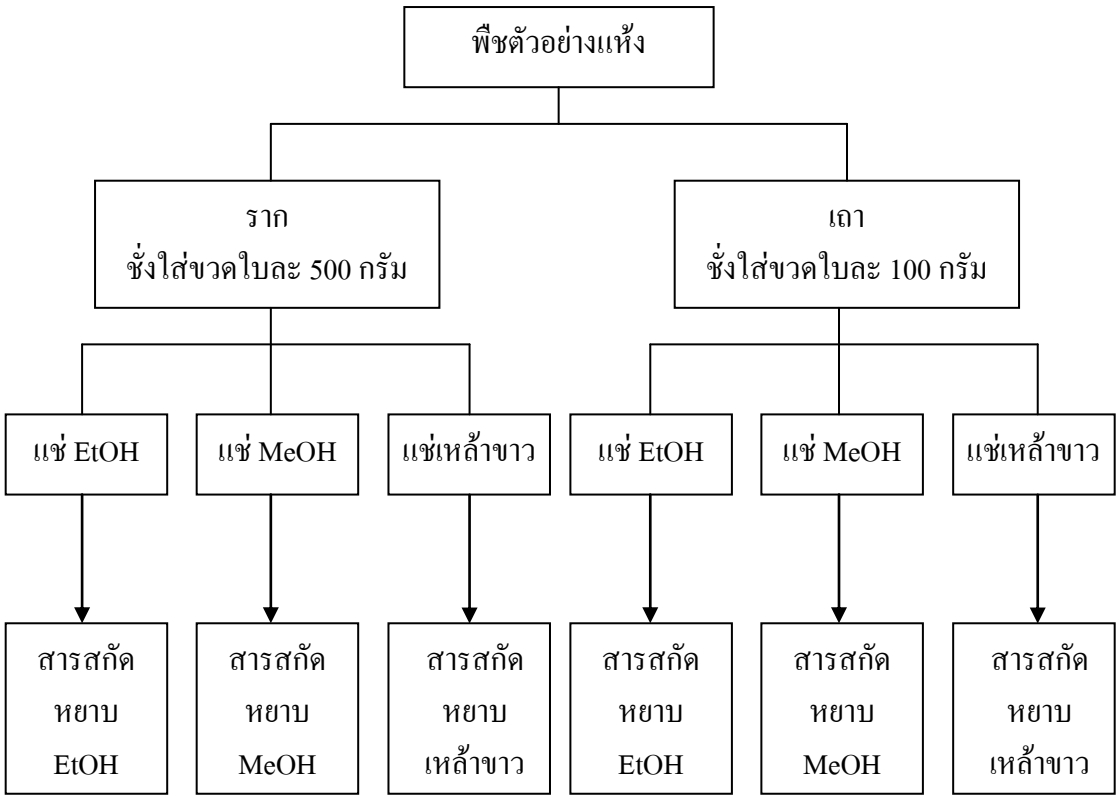

ภาพที่ 3-1 แผนภาพการวิจัย

**1. การเตรียมตัวอย่างรากและเถาของอุ่นป่า**

นำพืชตัวอย่างที่ตากแห้ง มาชั่งแบ่งออกเป็นส่วน โดยในส่วนรากชั่งแบ่งเป็น 3 ส่วน ส่วนละ 500 กรัม และในส่วนเถาชั่งแบ่งเป็น 3 ส่วน ส่วนละ 100 กรัม

**2. การสกัดสารตัวอย่าง**

ชั่งน้ำหนักรากอุ่นป่าที่ตากแห้งใส่ลงในขวดโหล 3 ใบ ๆ ละ 500 กรัม ใบที่หนึ่งเติมตัวทำละลายเอทานอล 95% ใบที่สองเติมตัวทำละลายเมทานอล 95% และใบที่สามเติมตัวทำละลายเหล้าขาว 35% โดยเติมให้พอท่วมพืชตัวอย่าง และในส่วนเถาทำเช่นเดียวกันแต่ชั่งใส่ขวดใบละ 100 กรัม ปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน เก็บสารละลายโดยการกรองผ่านกระดาษกรองแล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบ ดังภาพที่ 3-2 และนำสารไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้




ภาพที่ 3-2 ขั้นตอนการสกัด

**3. การทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น**

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นในการวิจัยครั้งนี้ จะใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีและการตกตะกอนโดยดัดแปลงจาก อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล (2557) และ ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์, วรางคณา สบายใจ และสิริมาส นิยมไทย (2556) โดยมีขั้นตอน ดังนี้

**การตรวจสอบอัลคาลอยด์** ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 2% ปริมาตร 15 mL นำไปอุ่น 2-3 นาที กรองและนำของเหลวที่ได้จากการกรอง ไปทดสอบกับสารแวกเนอร์ (Wagner's reagent) ปรากฏตะกอนสีเหลืองหรือสีน้ำตาลแสดงว่า พบอัลคาลอยด์

**การตรวจสอบฟลาโวนอยด์** ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยสารละลายเอทานอล 50% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 2-3 ชิ้น นำไปต้ม และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) ให้สารละลายสีเหลือง ส้ม หรือแดง แสดงว่าพบ ฟลาโวนอยด์

**การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์** ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรเขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากกรอง เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า เติมกรดแกลเชียลแอซีติก (glacial acetic acid) จำนวน 5 หยด เขย่า และค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. $H_2SO_4$) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลบริเวณรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบสารคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

**การตรวจสอบแอนทราควิโนน** ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลายกรดซัลฟิวริก 10% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 5 นาที นำมากรอง แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน เติมสารละลายแอมโมเนีย (10% $NH_3$) 2-3 หยด สังเกตสีชมพูแดงที่เกิดขึ้นแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

**การตรวจสอบแทนนิน** ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 5 นาที หยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) 2-3 หยด ลงไปในของเหลวที่ได้จากการกรอง หากปรากฏสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

**การตรวจสอบคูมาริน** ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 50% เอทานอล 1.0 มิลลิลิตร เขย่าและกรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (6 M NaOH) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าสารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบสารคูมาริน

**การตรวจสอบสเตอรอยด์** ชั่งสารสกัด 0.2 กรัมละลายสารด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า และกรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรองมา ค่อย ๆ เติมกรดแกลเชียลแอซีติก (glacial acetic acid) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

จำนวน 3 หยด ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียวแสดงว่าพบสารสเตอรอยด์

**การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์** ใช้การทดสอบซาลโควสกี (Salkowski test) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมไดคลอโรมีเทน 2 มิลลิลิตร เขย่า และค่อย ๆ เติม กรดซัลฟิวริกเข้มข้น หากเกิดสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลายแสดงว่าพบเทอร์พีนอยด์

**การตรวจสอบซาโปนิน** ใช้การทดสอบฟอง โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม นำมาเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มให้เดือด กรองและนำของเหลวผลกรอง (filtrate) มาเติมน้ำกลั่นลงไป 2-3 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง หากมีฟอง เกิดขึ้นแสดงว่าพบซาโปนิน

**4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ**

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ใช้วิธี TLC screening for radical scavengers โดยหยดสารสกัดลงบน TLC แล้วนำไปแช่ในระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นทำเครื่องหมายตำแหน่งของสารที่แยกได้บนแผ่น TLC จากนั้นนำไปทดสอบกับสารละลาย DPPH โดยพ่นสารละลายของ DPPH ซึ่งมีสีม่วงลงบนแผ่น TLC ให้ทั่ว ทิ้งไว้ให้แห้ง สังเกตผลจากตำแหน่งการฟอกจาง ถ้าตำแหน่งใดมีการฟอกจางสีของ DPPH จากสีม่วงเป็นสีขาวหรือสีต่างจากเดิม แสดงว่า สารสกัดมีสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (สุชาดา มานอก, 2555)

**5. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย**

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียใช้วิธี disc diffusion โดยทดสอบแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยส่งทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

# บทที่ 4
# ผลการวิจัยและอภิปรายผล

## สารสกัดหยาบจากส่วนรากและเถาองุ่นป่า

จากการนำองุ่นป่าในส่วนรากและเถา มาทำการสกัดโดยการแช่ด้วยตัวทำละลายทั้งหมด 3 ชนิด คือ ตัวทำละลายเมทานอล 95% เอทานอล 95% และเหล้าขาว 35% แล้วนำไปทำการระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 6 ชนิด มีลักษณะเป็นของหนืดสีน้ำตาลดำ โดยผลที่ได้แสดงในตารางที่ 4-1 จากตารางพบว่าในตัวทำละลายเหล้าขาวให้ปริมาณสารสกัดสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ ทั้งจากส่วนรากและเถาองุ่นป่า โดยสารสกัดหยาบเหล้าขาวจากรากองุ่นป่ามีปริมาณผลที่ได้ (yield) เท่ากับ 67.98 กรัม คิดเป็นร้อยละ 13.60 ของน้ำหนักแห้ง จากส่วนเถามีปริมาณผลที่ได้ (yield) เท่ากับ 10.61 กรัม คิดเป็นร้อยละ 10.61 ของน้ำหนักแห้ง ในขณะที่สารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนรากและเถาให้ปริมาณผลที่ได้ (yield) น้อยที่สุด คือ ร้อยละ 4.13 และ 3.41 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในตัวทำละลายเหล้าขาวมีองค์ประกอบ เป็นเอทานอล 35% ทำให้มีน้ำในปริมาณมากจึงทำให้ความมีขั้วสูง สามารถละลายสารประกอบต่าง ๆ ที่มีทั้งสภาพขั้วสูงและสภาพขั้วต่ำในตัวอย่างพืชได้ดีกว่าเอทานอลและเมทานอลซึ่งมีสภาพขั้วต่ำกว่า

ตารางที่ 4-1 ปริมาณที่สกัดได้ (Yield) ของสารสกัดหยาบจากส่วนรากและเถาองุ่นป่าในตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล และเหล้าขาว

| ตัวทำละลาย | ส่วนสกัดองุ่นป่า | ลักษณะสารสกัดหยาบ | น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม) | ร้อยละสารสกัดหยาบ (%) |
|---|---|---|---|---|
| เมทานอล | ราก | ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง | 46.81 | 9.36 |
| | เถา | ของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ | 8.00 | 8.00 |
| เอทานอล | ราก | ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง | 20.66 | 4.13 |
| | เถา | ของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ | 3.41 | 3.41 |
| เหล้าขาว | ราก | ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง | 67.98 | 13.60 |
| | เถา | ของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ | 10.61 | 10.61 |

## การทดสอบพฤกษเคมี

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น 9 ชนิด ได้แก่ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ สเตอรอยด์ แอนทราควิโนน คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แทนนิน คูมาริน เทอร์พีนอยด์ และซาโปนิน ได้ผลดังตารางที่ 4-2 (รูปภาพแสดงผลการทดลองในภาคผนวก ข) โดยพบสารพฤกษเคมีทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แทนนิน เทอร์พีนอยด์ และซาโปนิน โดยสารกลุ่มแทนนินและซาโปนินพบในสารสกัดเมทานอล เอทานอล และเหล้าขาว ทั้งส่วนรากและเถาอุ่นป่า สารกลุ่มคาร์ดิแอกไกลโคไซด์พบในสารสกัดเมทานอลและเอทานอล ทั้งส่วนรากและเถาอุ่นป่า ซึ่งผลการทดสอบมีส่วนสอดคล้องกับงานวิจัยของ Das et al. (2014) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและระงับปวดของสารสกัดเอทานอลของผล *Ampelocissus latifolia* (ROXB.) พืชในสกุลเดียวกับอุ่นป่า พบสารแทนนินและไกลโคไซด์ด้วยเช่นกัน สำหรับสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์พบในสารสกัดเมทานอล เอทานอล และเหล้าขาว จากส่วนเถา และส่วนรากพบในสารสกัดเมทานอลและเอทานอล แต่ไม่พบในสารสกัดเหล้าขาว สอดคล้องกับผลการวิจัยบางส่วนของ Parag et al. (2014) ได้ศึกษาสมบัติทางเคมีและสารพฤกษเคมีของใบ *Ampelocissus latifolia* (ROXB.) สกัดโดยใช้ soxhlet ด้วยตัวทำละลาย 14 ชนิด พบสารพฤกษเคมีจำนวนมาก ซึ่งในกลุ่มสารที่พบมีเทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน และไกลโคไซด์จากการสกัดด้วยเมทานอลและเอทานอลด้วยเช่นกัน แต่ในส่วนของตัวทำละลายเหล้าขาวจากการศึกษางานวิจัยเท่าที่สามารถสืบค้นได้ไม่พบงานวิจัยที่ใช้ตัวทำละลายเหล้าขาวในพืชอุ่นป่าหรือพืชในสกุลและวงศ์เดียวกับอุ่นป่า

ตารางที่ 4-2 ผลการทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบจากส่วนรากและเถาองุ่นป่าในตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล และเหล้าขาว

| สารสกัด | อัลคาลอยด์ | ฟลาโวนอยด์ | คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ | แอนทราควิโนน | แทนนิน | คูมาริน | สเตอรอยด์ | เทอร์พีนอยด์ | ซาโปนิน |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ส่วนราก | | | | | | | | | |
| MeOH | - | - | + | - | + | - | - | + | + |
| EtOH | - | - | + | - | + | - | - | + | + |
| เหล้าขาว | - | - | - | - | + | - | - | - | + |
| ส่วนเถา | | | | | | | | | |
| MeOH | - | - | + | - | + | - | - | + | + |
| EtOH | - | - | + | - | + | - | - | + | + |
| เหล้าขาว | - | - | - | - | + | - | - | + | + |

หมายเหตุ + คือ positive test - คือ negative test

## การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบ DPPH โดยผลการสังเกตตำแหน่งการฟอกจางสี DPPH ที่ค่า $R_f$ ต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 4-3 (รูปภาพแสดงผลการทดลองในภาคผนวก ค) ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบขององุ่นป่าทั้งส่วนรากและเถาในตัวทำละลายทุกชนิดให้ผลการต้านอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดหยาบเมทานอลและเอทานอลจากรากให้ผลต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน พบสารต้านอนุมูลอิสระในระบบตัวทำละลาย 80% EtOAc/ Hexane (เติมกรด $CH_3COOH$ 10 หยด) มากที่สุด และพบสารเรืองแสงใต้ UV 1 จุดเหมือนกัน มีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.66 สารสกัดหยาบเมทานอล เอทานอล และเหล้าขาว จากส่วนเถาในระบบตัวทำละลาย 10%, 20% และ 40% EtOAc/ Hexane (เติมกรด $CH_3COOH$ 10 หยด) ให้ผลการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน โดยพบสารที่ให้ผลการต้านอนุมูลอิสระ 1 จุด เหมือนกันในแต่ละระบบตัวทำละลาย มีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.03, 0.05 และ 0.29 ตามลำดับ และทั้ง 3 จุดสามารถเรืองแสงได้ใต้ UV แสดงว่า สารสกัดหยาบจากส่วนเถามีโครงสร้าง

ของสารที่มีหมู่โครโมฟอร์ทำให้เห็นการเรืองแสงใต้ UV และจากผลการสังเกตตำแหน่งบนแผ่น TLC ดังภาพในภาคผนวก ค สารที่มีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.03, 0.05 และ 0.29 ในระบบตัวทำละลาย 10%, 20% และ 40% EtOAc/ Hexane (เติมกรด $CH_3COOH$ 10 หยด) ตามลำดับ พบว่าเป็นสารตัวเดียวกันที่สามารถต้านอนุมูลอิสระและเรืองแสงได้ ในส่วนระบบตัวทำละลาย 60% EtOAc/ Hexane (เติมกรด $CH_3COOH$ 10 หยด) พบสารที่ให้ผลการต้านอนุมูลอิสระจำนวน 3 จุด คือ ที่ค่า $R_f$ เท่ากับ 0.07, 0.21 และ 0.28 ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกันทั้งสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล และเหล้าขาว โดยจากการทดสอบพฤกษเคมีสารที่แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระมีองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่มสารคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แทนนิน เทอร์พีนอยด์ และซาโปนิน ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการวิจัยบางส่วนของ Parag and Bhanu (2013) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบ *Ampelocissus latifolia* (ROXB.) โดยนำใบแห้งมาสกัดโดยวิธี soxhlet ด้วยเมทานอล พบการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเมทานอล และจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ามีสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีเนื่องจากมีตำแหน่งที่ฟอกจางสี DPPH จำนวนหลายจุดเมื่อใช้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม สอดคล้องกับงานวิจัยของ สุริสา ศรีสุวรรณ และคณะ (2557) ที่ได้ศึกษาสารสกัดผลองุ่นป่าด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอล เมทานอล และน้ำ พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งในสารสกัดเมทานอล เอทานอล และน้ำ

ตารางที่ 4-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนรากและเถาองุ่นป่าในตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล และเหล้าขาว

| ระบบตัวทำละลาย | สารสกัดหยาบ | ค่า $R_f$ ที่พบ | ค่า $R_f$ ที่ฟอกจางสี DPPH |
|---|---|---|---|
| 10%EtOAc/ Hexane | ราก | | |
| (เติม $CH_3COOH$ 10 หยด) | เมทานอล | 0.10, 0.93 | - |
| | เอทานอล | 0.10, 0.93 | - |
| | เหล้าขาว | 0 | 0 |
| | เถา | | |
| | เมทานอล | 0.03, 0.10 | 0.03* |
| | เอทานอล | 0.03, 0.10 | 0.03* |
| | เหล้าขาว | 0.03, 0.10 | 0.03* |

หมายเหตุ * หมายถึง ตำแหน่งที่เรืองแสงใต้ UV ความยาวคลื่น 302 nm

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

| ระบบตัวทำละลาย | สารสกัดหยาบ | ค่า $R_f$ ที่พบ | ค่า $R_f$ ที่ฟอกจางสี DPPH |
|---|---|---|---|
| 20%EtOAc/ Hexane | ราก | | |
| (เติม $CH_3COOH$ 10 หยด) | เมทานอล | 0.90 | - |
| | เอทานอล | 0.12, 0.90 | - |
| | เหล้าขาว | 0 | 0 |
| | เถา | | |
| | เมทานอล | 0.05 | 0.05* |
| | เอทานอล | 0.05, 0.17 | 0.05* |
| | เหล้าขาว | 0.05 | 0.05* |
| 40%EtOAc/ Hexane | ราก | | |
| (เติม $CH_3COOH$ 10 หยด) | เมทานอล | 0.03, 0.09, 0.22, 0.41, 0.93 | 0.03, 0.09 |
| | เอทานอล | 0.03, 0.09, 0.22, 0.41, 0.93 | 0.03, 0.09 |
| | เหล้าขาว | 0.03, 0.09, 0.22 | 0.03, 0.09, 0.22 |
| | เถา | | |
| | เมทานอล | 0.21, 0.29 | 0.29* |
| | เอทานอล | 0.21, 0.29 | 0.29* |
| | เหล้าขาว | 0.21, 0.29 | 0.29* |

หมายเหตุ * หมายถึง ตำแหน่งที่เรืองแสงใต้ UV ความยาวคลื่น 302 nm

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

| ระบบตัวทำละลาย | สารสกัดหยาบ | ค่า $R_f$ ที่พบ | ค่า $R_f$ ที่ฟอกจางสี DPPH |
|---|---|---|---|
| 60%EtOAc/ Hexane | ราก | | |
| (เติม $CH_3COOH$ 10 หยด) | เมทานอล | 0.07, 0.16, 0.22*, 0.38, 0.59, 0.90 | 0.07, 0.16, 0.22 |
| | เอทานอล | 0.07, 0.17*, 0.38, 0.59, 0.90 | 0.07, 0.17 |
| | เหล้าขาว | 0.07, 0.21, 0.34 | 0.07, 0.21, 0.34 |
| | เถา | | |
| | เมทานอล | 0.07, 0.21, 0.28, 0.34*, 0.90 | 0.07, 0.21, 0.28 |
| | เอทานอล | 0.07, 0.21, 0.28, 0.34*, 0.66, 0.90 | 0.07, 0.21, 0.28 |
| | เหล้าขาว | 0.07, 0.21, 0.34* | 0.07, 0.21 |
| 80%EtOAc/ Hexane | ราก | | |
| (เติม $CH_3COOH$ 10 หยด) | เมทานอล | 0.31, 0.40, 0.57, 0.66*, 0.74, 0.91 | 0.31, 0.40, 0.57 |
| | เอทานอล | 0.31, 0.40, 0.57, 0.66*, 0.74, 0.91 | 0.31, 0.40, 0.57 |
| | เหล้าขาว | 0.19, 0.40, 0.66, 0.74 | 0.19, 0.40, 0.66, 0.74 |
| | เถา | | |
| | เมทานอล | 0.31, 0.57, 0.66*, 0.74 | 0.31, 0.57 |
| | เอทานอล | 0.57, 0.66*, 0.74, 0.78 | 0.57 |
| | เหล้าขาว | 0.57, 0.66*, 0.74 | 0.57 |

หมายเหตุ * หมายถึง ตำแหน่งที่เรืองแสงใต้ UV ความยาวคลื่น 302 nm

## การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

เมื่อนำสารสกัดหยาบองุ่นป่าในแต่ละตัวทำละลายมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* เทียบกับยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol และ DMSO แสดงผลดังตารางที่ 4-4 (รูปภาพแสดงผลการทดลองในภาคผนวก ง) พบว่าสารสกัดหยาบทุกส่วนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเฉพาะแบคทีเรียชนิดแกรมบวกเท่านั้น โดยสารสกัดหยาบเมทานอลจากส่วนรากให้ผลยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบอื่น ให้ค่า Inhibition zone เท่ากับ 13.66±0.2 และสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนรากให้ผลยับยั้งการเจริญของ *Staphylococus aureus* ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบอื่น ให้ค่า Inhibition zone เท่ากับ 13.16±1.2 ในส่วนแบคทีเรียแกรมลบสารสกัดหยาบองุ่นป่าทุกชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* สังเกตจากไม่เกิด Inhibition zone ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zongo et al. (2010) ที่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดอะซีโตนและสารสกัดน้ำของเหง้า *Ampelocissus grantii* (Baker) Planch (Vitaceae) พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococus aureus* แต่ไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เหมือนกัน และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jirum et al. (2013) ที่ศึกษาสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากน้ำคั้นสดของผลองุ่นป่าที่มีสีต่างกัน คือ ผลสีเขียว ผลสีแดง และผลสีดำ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียให้ผลการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococus aureus* แต่ไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* ในสารสกัดผลสีเขียวและสีแดง และไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ในสารสกัดผลสีดำ

ตารางที่ 4-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากส่วนรากและเถาองุ่นป่าในตัวทำละลาย เมทานอล เอทานอล และเหล้าขาว

| **แบคทีเรียทดสอบ** | **ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ** Inbition zone (**มิลลิเมตร**)±SD* | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **ราก** | | | **เถา** | | | **ยาปฏิชีวนะ** | |
| | **เมทานอล** | **เอทานอล** | **เหล้าขาว** | **เมทานอล** | **เอทานอล** | **เหล้าขาว** | Chloramphenicol (30 **ไมโครกรัม/ ดิสก์**) | DMSO |
| *B. subtilis* | 13.5±0.50 | 13.66±0.20 | 10.16±0.20 | 9.66±0.50 | 11.33±0.20 | 9.50±0.50 | 26.50±1.40 | NZ |
| *S. aureus* | 13.16±1.20 | 12.83±0.50 | 10.16±0.70 | 10.33±0.50 | 10.66±0.70 | 9.50±0.50 | 26.33±0.80 | NZ |
| *E. coli* | NZ | NZ | NZ | NZ | NZ | NZ | 27.83±0.80 | NZ |
| *P. aeruginosa* | NZ | NZ | NZ | NZ | NZ | NZ | NZ | NZ |

หมายเหตุ NZ คือ ไม่มี Inhibition zone

* คือ ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

# บทที่ 5
# สรุปผลการทดลอง

ผลการสกัดส่วนรากและเถาขององุ่นป่า โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เมทานอล 95% เอทานอล 95% และเหล้าขาว 35% เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีโดยวิธีการทดสอบการเกิดสีและตะกอน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการฟอกจางสี DPPH และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี Disc Diffusion ในสารสกัดหยาบ สามารถสรุปผล ดังนี้

1. ปริมาณสารสกัดหยาบเมทานอลจากรากและเถาองุ่นป่า คิดเป็นร้อยละ 9.36 และ 8.00 สารสกัดหยาบเอทานอลจากรากและเถาองุ่นป่า คิดเป็นร้อยละ 4.13 และ 3.41 และสารสกัดหยาบเหล้าขาวจากรากและเถาองุ่นป่า คิดเป็นร้อยละ 13.60 และ 10.61 โดยลักษณะสารสกัดหยาบที่สกัดจากส่วนเถามีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีดำ และสารสกัดหยาบที่สกัดจากส่วนรากมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง ซึ่งจากปริมาณสารที่สกัดได้ พบว่าสารสกัดจากส่วนรากให้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงกว่าจากส่วนเถา และสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเหล้าขาวให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่าเมทานอล และเอทานอล ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดหยาบมีปริมาณมากขึ้นตามสภาพขั้วที่สูงขึ้นของตัวทำละลาย

2. ผลการศึกษา สารพฤกษเคมีโดยการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสีและการตกตะกอนพบว่าสารสกัดหยาบทั้งจากส่วนรากและเถาองุ่นป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอล มีสารพฤกษเคมี ได้แก่ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แทนนิน เทอร์พีนอยด์ และซาโปนิน แสดงว่าสารสกัดทั้งสองส่วนมีสารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่ไม่แตกต่างกัน และสารสกัดหยาบจากส่วนรากที่สกัดด้วยเหล้าขาวพบแทนนินและซาโปนิน ในขณะที่สารสกัดหยาบจากส่วนเถาที่สกัดด้วยเหล้าขาวพบแทนนิน เทอร์พีนอยด์ และซาโปนิน แสดงว่าสารสกัดด้วยเหล้าขาวจากส่วนรากและเถามีสารพฤกษเคมีที่แตกต่างกันบางส่วน

3. ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการทดสอบ DPPH ด้วยวิธี TLC screening พบสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบด้วยเหล้าขาวจากส่วนรากในระบบตัวทำละลาย 80% EtOAc/ Hexane (เติมกรด $CH_3COOH$ 10 หยด) มากที่สุด มองเห็นจุดที่ฟอกจางสี DPPH 4 จุด ให้ค่า $R_f$ เท่ากับ 0.19, 0.40, 0.66 และ 0.74 สำหรับสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากส่วนเถาพบมากที่สุดในสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอล และเอทานอล มองเห็นจุดที่ฟอกจางสี DPPH 3 จุด ในระบบตัวทำละลาย 60%EtOAc/ Hexane (เติมกรด $CH_3COOH$ 10 หยด) ให้ค่า $R_f$ เท่ากับ 0.07, 0.21 และ 0.28 ตามลำดับ

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disc Diffusion พบว่าสารสกัดหยาบทุกตัวมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococus aureus* แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* เทียบกับยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol และ DMSO โดยสารสกัดหยาบเมทานอลจากส่วนรากให้ผลยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบอื่น ให้ค่า Inhibition zone เท่ากับ 13.66±0.2 และสารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนรากให้ผลยับยั้งการเจริญของ *Staphylococus aureus* ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบอื่น ให้ค่า Inhibition zone เท่ากับ 13.16±1.2 มิลลิเมตร

จากผลการทดสอบสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดอุ่นป่าแสดงให้เห็นว่าหากทำการศึกษาอย่างละเอียดมากขึ้น อุ่นป่านับเป็นพืชทางเลือกหนึ่งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีและมีกลุ่มสารพฤกษเคมีที่น่าสนใจสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

## ข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวสารพฤกษเคมี สารต้านอนุมูลอิสระ และต้านแบคทีเรียของพืชอุ่นป่า โดยใช้วิธีการสกัดอย่างง่ายด้วยการแช่ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด และศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสีและตกตะกอนบางวิธีเท่านั้น ดังนั้นหากต้องการรายละเอียดของสารสกัดสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและทราบองค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้ ต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไปนี้

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระควรใช้วิธีการวัดโดยเครื่องมือ และเลือกใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่หลากหลายเพื่อให้ข้อมูลที่มีความชัดเจนและมีข้อมูลค่าตัวเลขที่น่าเชื่อถือมากขึ้น นอกจากนี้ตัวทำละลายที่ใช้สกัดมีขั้วสูงเกินไปจึงทำให้มีองค์ประกอบทางเคมีปนกันมากจึงหาระบบตัวทำละลายได้ยาก

# บรรณานุกรม


กันย์ชลา แก้วอุพัย. (2556). *ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเอื้องหมายนาจากป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีศึกษา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์*, *1*(1), 59-70.

ดาลัด ศิริวัน. (2551). พฤกษเคมี สารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร: ของขวัญจากธรรมชาติ. *อาหาร*, *38*(1), 45-48.

ดวงกมล เรือนงาม. (2557). การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง, 23*(2), 120-139.

นริศา คำแก่น. (2551). *การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพร*. กรุงเทพฯ: ก็อปปี้บ็อกซ์.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2544). *ยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เล่ม 1*. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.

บัญญัติ สุขศรีงาม. (2536). *จุลชีววิทยา*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2550). *การตรวจสอบและการสกัดแยกสาระสำคัญจากสมุนไพร* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วีรานุช หลาง. (2554). *จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์, วรางคณา สบายใจ และสิริมาส นิยมไทย. (2556). การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำ. *วารสารวิทยาศาสตร์ มข., 41*(3), 723-730.

ศิริธร ศิริอมรพรรณ. (2557). *สารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (2552). *พืชกินได้ในป่าสะแกราช เล่ม 2*. นนทบุรี: สหมิตรพริ้นติ้งแอนด์พับลิสชิ่ง.

สมศักดิ์ นวลแก้ว. (2556). *การสกัดแยกสารเบื้องต้น*. มหาสารคาม: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. เอกสารการสอน.

สุชาดา มานอก. (2555). การตรวจสอบสมบัติของการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร.*ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์, 12*(2), 34-46.

สุรางค์รัตน์ แดงจิระ. (2558). *องค์ประกอบทางเคมี การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของบอนหอม.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีศึกษา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

สุริสา ศรีสุวรรณ, อัณศยา ท่อนโพธิ์ และประสงค์ สีหานาม. (2557). สารสกัดจากผลอุ่นป่า: พฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, 10*, 373-382.

อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล. (2557*). เคมีพืชสมุนไพรท้องถิ่น*. นครปฐม: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม. เอกสารการสอน.

Anwesa, C., & Sanjib, R. (2015). Antiproliferative activity of phytochemicals present in aerial parts aqueous extracts of *Ampelocissus litifolia* (Roxb.) planch. on apical meristem cells. *International Journal of Pharma and Bio Sciences, 6*(2), 99-108.

Das, B. K., Fatema, U. K., Hossain, M. S., Rahman, R., Akbar, M. A., & Uddin, F. (2014). Analgesic and anti-inflammatory activities of the fruit extract of *Ampelocissus latifolia (Roxb)* on Laboratory Animals. *British Journal of Pharmaceutical Research, 4*(12), 1477-1485.

George,P. R., Venugopal, M. J. R. V., Gordon, C., Delbert, H. L., John, K. C., Cherry, H. L., & Jean, C. C. (2008). Antineoplastic agents. 558. *Ampelocissus* sp. Cancer cell growth inhibitory constituents. *Journal of Natural Products, 71*, 130-133.

Ingraham, J. L., & Ingraham, C. A. (1995). *Introduction to microbiology*. Belmont, CA: Wadsworth.

Jirum, J., Sangdee, A., & Srihanam, P. (2013). Phytochemical and biological activities in fresh juice extracts of wild grape (*Ampelocissus martini* Planch.) fruits. *International journal of Research in Ayurveda & Pharmacy, 4*(3), 337-341.

Jitendra, P. G., Natvarlal, P. M., Amit P. A., Amish P. J., & Sohan, P. (2013). Comparison of anti-inflammatory activity of *Ampelocissus latifolia* (Roxb.) root extract: Oral administration Vs. Topical application. *Journal of natural Product and Plant Resourse, 3*(5), 64-70.

Koneman, W. E., Allen, D. S., Janda, M. W., Schreckenberger, C. P., & Washington, C. (1994). *Introduction to diagnostic microbiology*. Philadelphia: J.B. Lippincott.

Kriscelia, V. H., April, O. J. S., Steve, J. P., Vivian, T. A., & Jay, M. O. (2015). Characterization of BIKA (*Ampelocissus martini* Planch.) Seed Oil Using FTIR and GC-FID. *Community Center A Lobby 30th Philippine Chemistry Congress* (p.34). Philippines.

Maheswari, B. U., & Meerabai, R. S. (2015). Antipyretic Activity of *Ampelocissus araneosa* Planch. (Vitaceae) on Brewer s Yeast Induced Pyrexia in Rabbit. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, *2*(10), 120-122.

Parag, P. A., & Bhanu, R. (2013). Antimicrobial and Antioxidant Potential with FTIR Analysis of *Ampelocissus litifolia* (Roxb.) Planch. Leaves. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 6*(1), 157-162.

Parag, P. A., Vanita, K., & Bhanu, R. (2014). Physico Chemical and Phytochemical Evaluation of *Ampelocissus latifolia* (Roxb.) Planch. Leaves. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6*(6), 504-507.

Theng, K. B., & Korpenwar, A. N. (2015). Phytochemical Analysis of Ethanol Extract of *Ampelocissus litifolia* (Roxb.) Planch Tuberous Root Using UV-VIS, FTIR and GC-MS. *International Journal Phamaceutical Sciences and Research, 6*(9), 3936-3942.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39*, 44-84.

Xu, Z.-L., Yang, F.-Q., Wang, L.-J., Lu, J., Gao, D., Huang, W.-H., & Xia, Z.-N. (2014). A New γ-Pyrone from *Ampelocissus artemisiifolia*. *Chemistry of Natural Compounds, 50*(6), 982-984.

Zongo, C., Savadogo, A., Ouattara, L., Bassole, I. H. N., Ouattara, C. A. T., Ouattara, A. S., Barro, N., Koudou, J., & Traore, S. A. (2010). Polyphenols Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Ampelocissus grantii* (Baker) Planch. (Vitaceae): A Medicinal Plant from Burkina Faso. *International Journal of Pharmacology, 6*(6), 880-887.

# ภาคผนวก

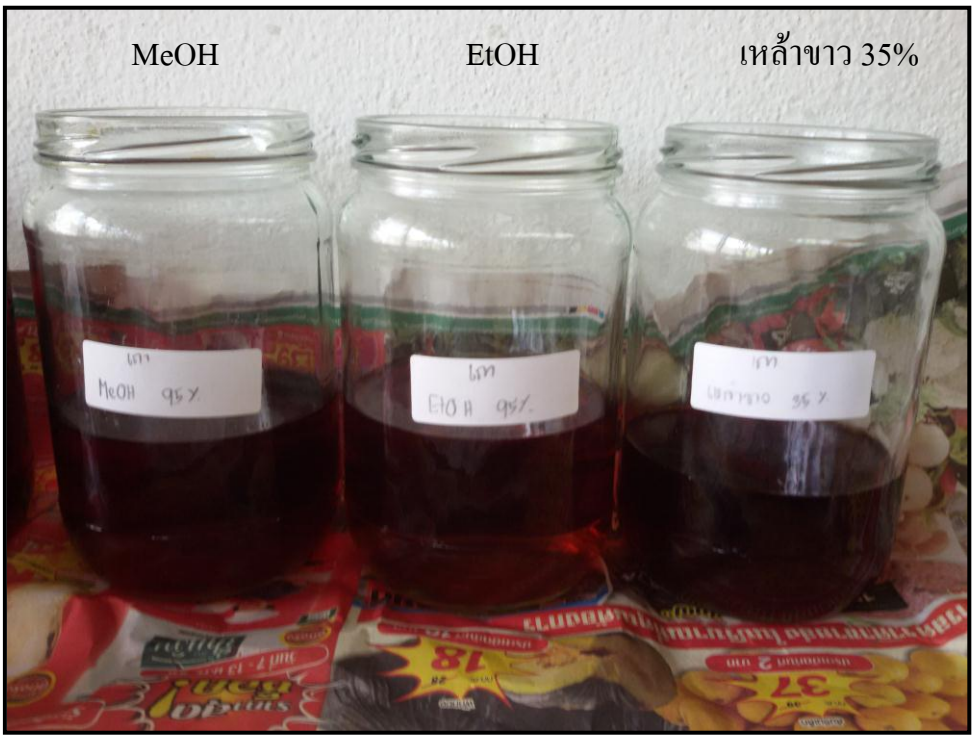
**ภาคผนวก ก**

การสกัดสารจากองุ่นป่า

ภาพที่ ก-1 การสกัดองุ่นป่าส่วนรากด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95%

ภาพที่ ก-2 การสกัดองุ่นป่าส่วนรากด้วยตัวทำละลายเหล้าขาว 35%

ภาพที่ ก-3 การสกัดองุ่นป่าส่วนรากด้วยตัวทำละลายเมทานอล 95%




ภาพที่ ก-4 สารสกัดองุ่นป่าส่วนเถาด้วยตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล และเหล้าขาว ตามลำดับ

**ภาคผนวก ข**

การทดสอบสารพฤกษเคมี

กำหนดให้

หมายเลข 1 คือ สารสกัดหยาบเมทานอลจากส่วนราก

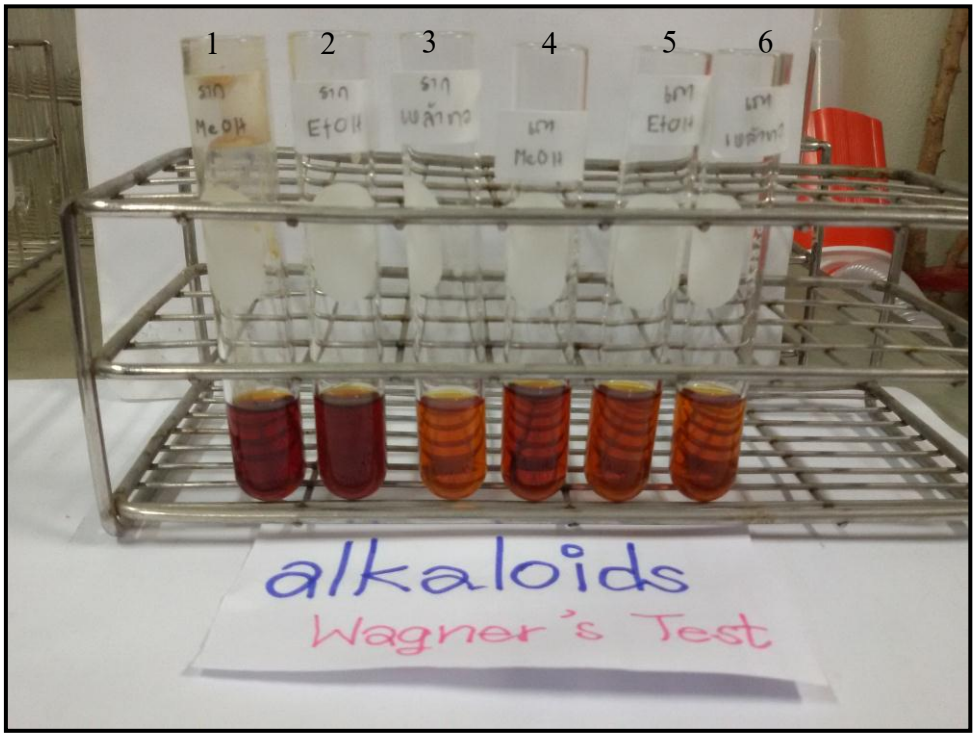
หมายเลข 2 คือ สารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนราก

หมายเลข 3 คือ สารสกัดหยาบเหล้าขาวจากส่วนราก

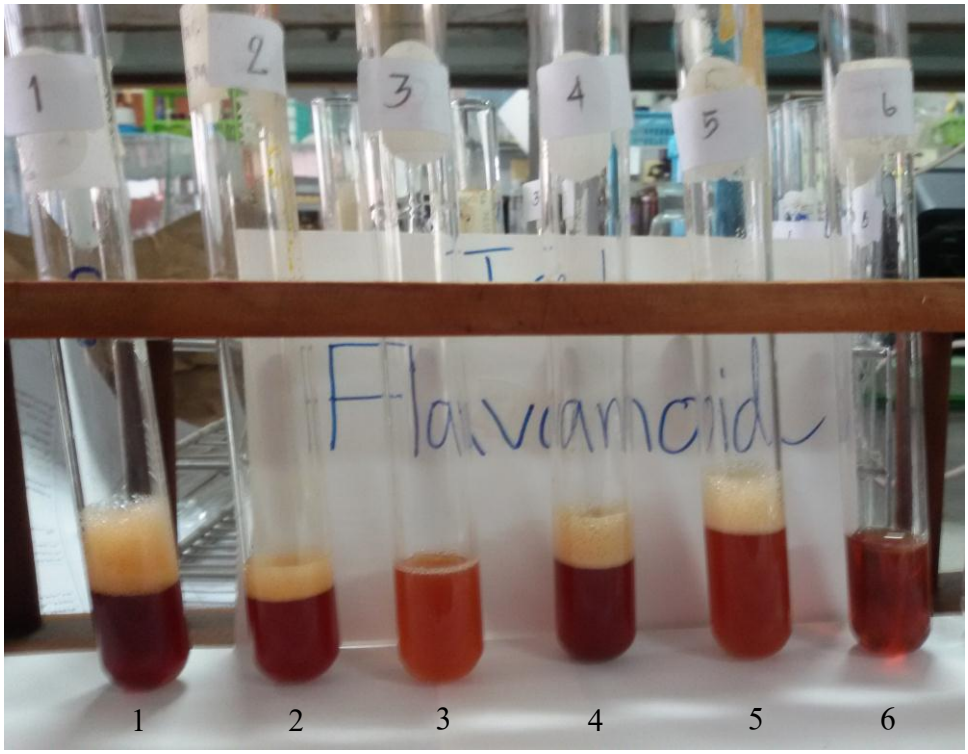
หมายเลข 4 คือ สารสกัดหยาบเมทานอลจากส่วนเถา

หมายเลข 5 คือ สารสกัดหยาบเอทานอลจากส่วนเถา

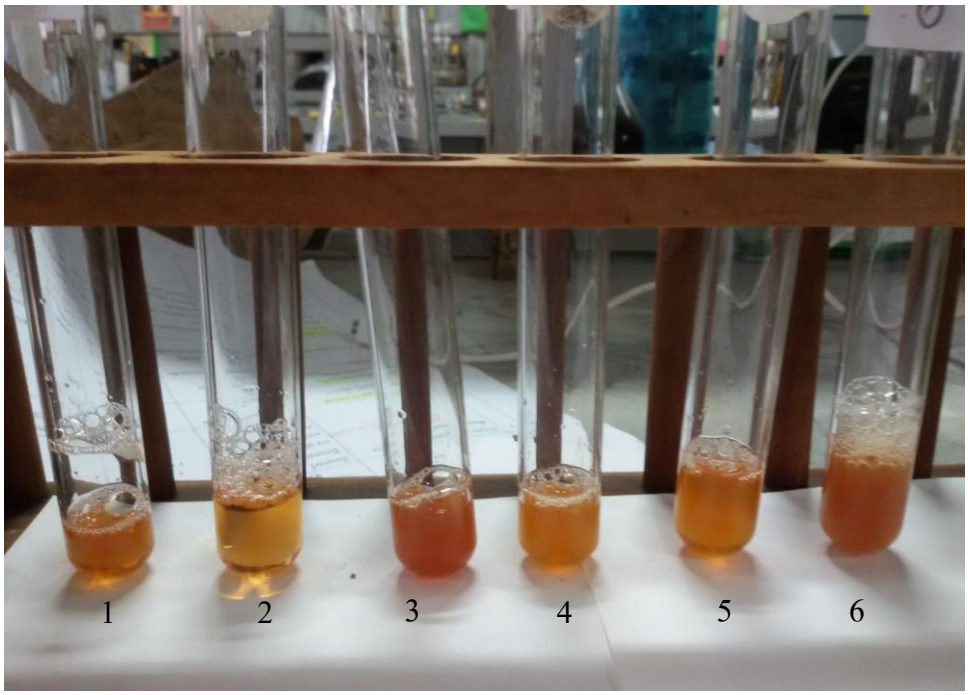
หมายเลข 6 คือ สารสกัดหยาบเหล้าขาวจากส่วนเถา



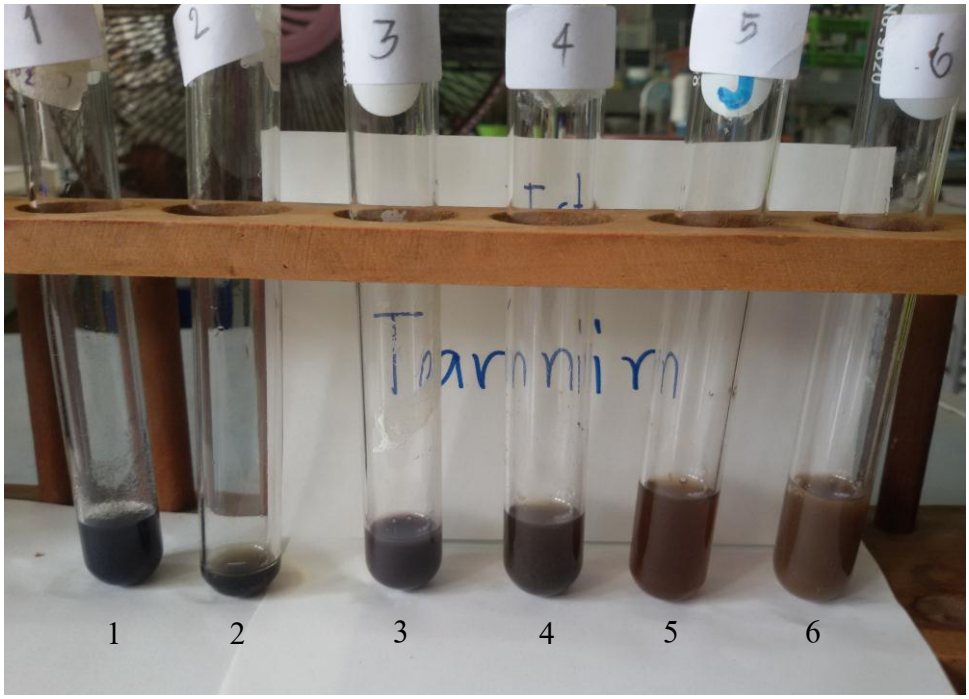

ภาพที่ ข-1 การทดสอบอัลคาลอยด์ด้วยสารแวกเนอร์



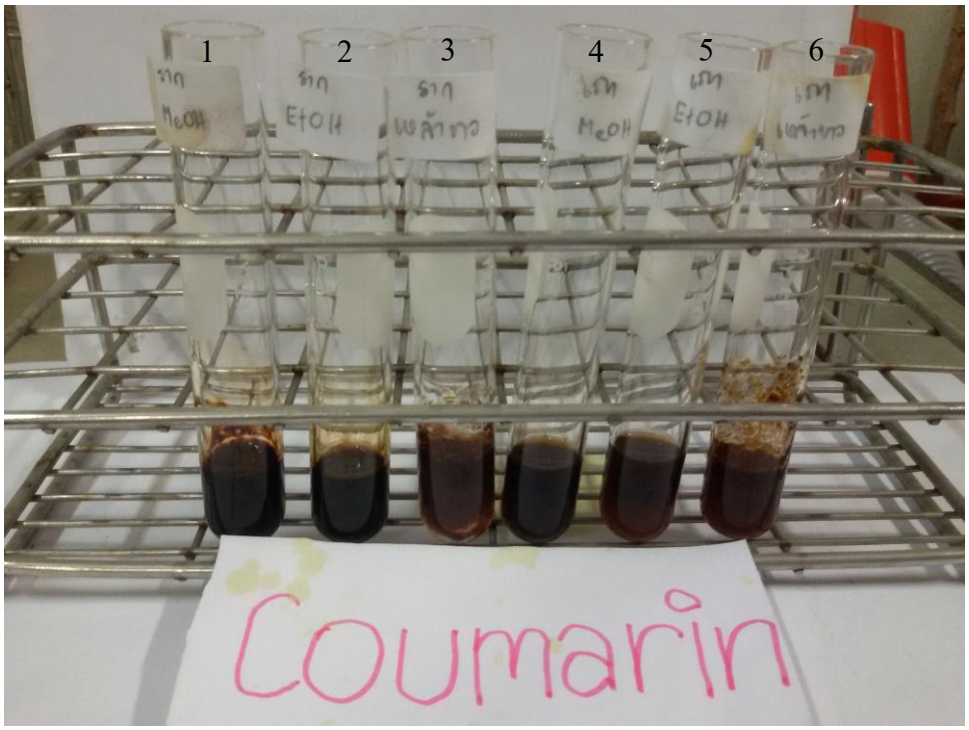

ภาพที่ ข-2 การทดสอบฟลาโวนอยด์



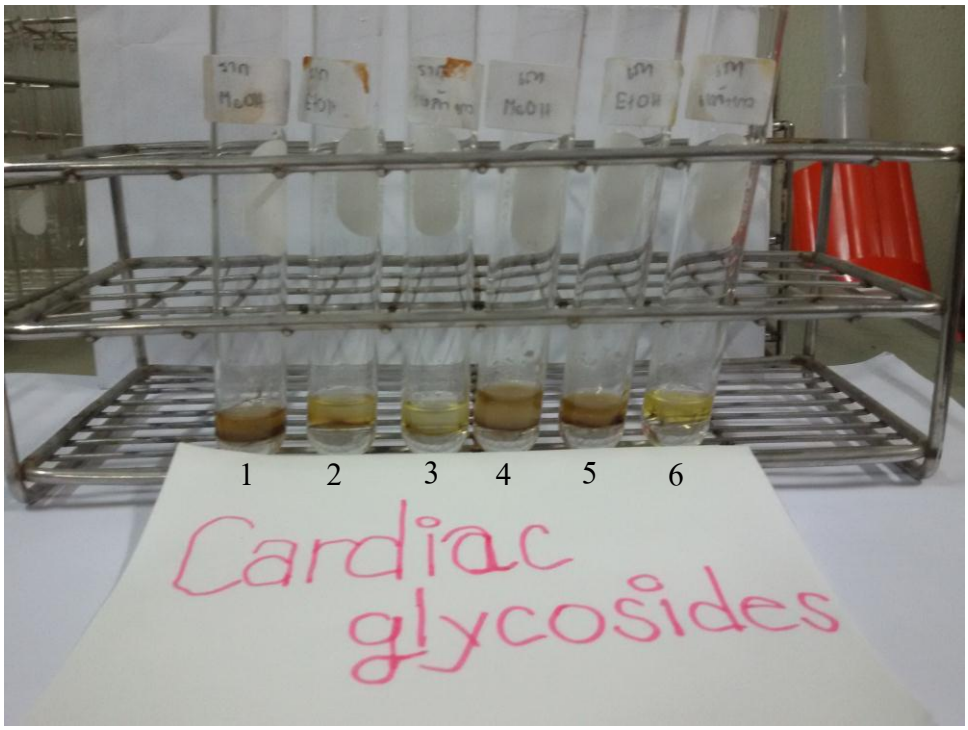

ภาพที่ ข-3 การทดสอบซาโปนิน




ภาพที่ ข-4 การทดสอบแทนนิน

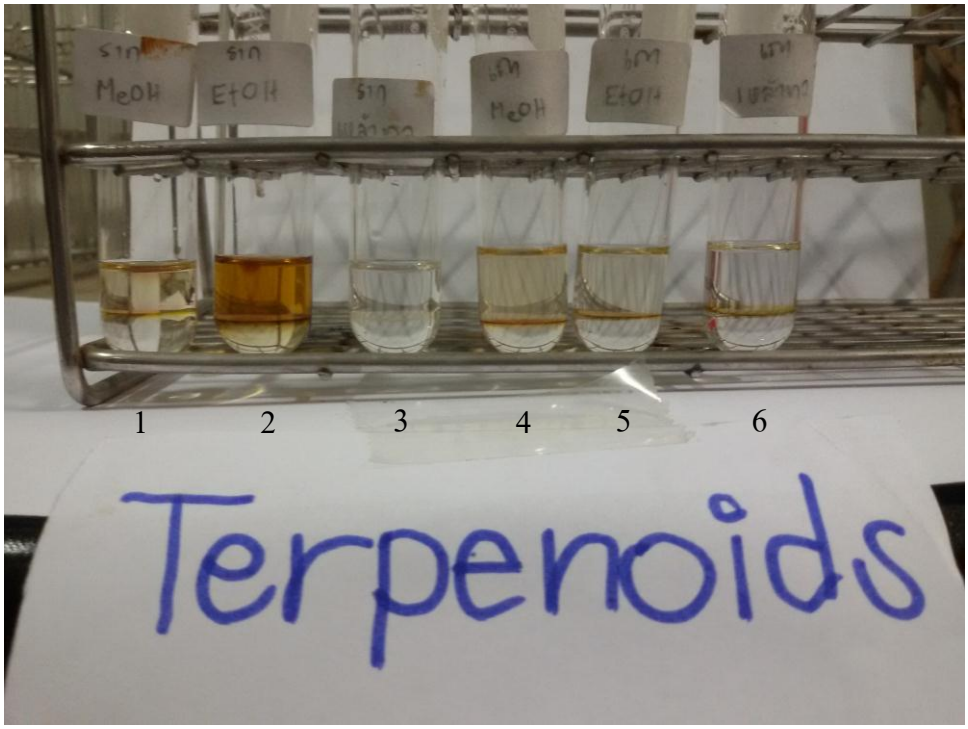



ภาพที่ ข-5 การทดสอบคูมาริน




ภาพที่ ข-6 การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

ภาพที่ ข-7 การทดสอบสเตอรอยด์



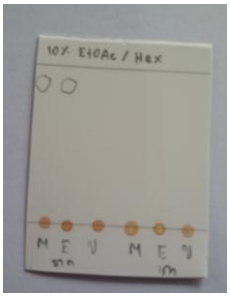
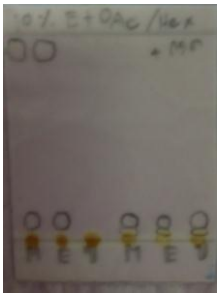
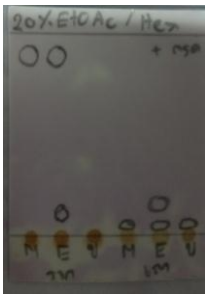
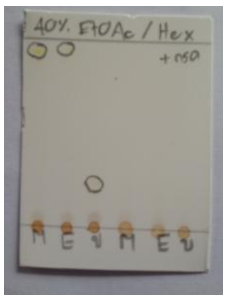
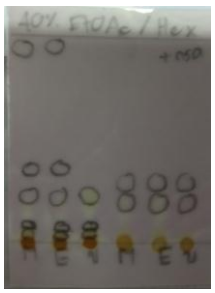
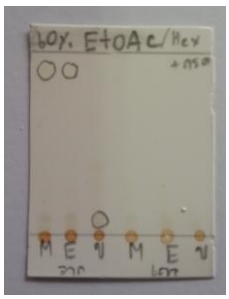
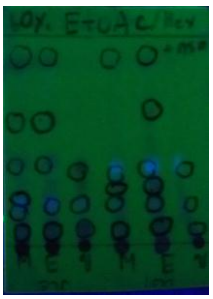
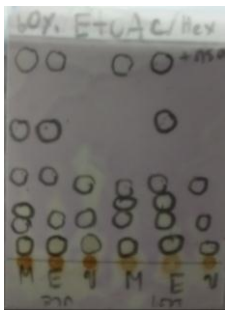

ภาพที่ ข-8 การทดสอบเทอร์พีนอยด์

ภาพที่ ข-9 การทดสอบแอนทราควิโนน

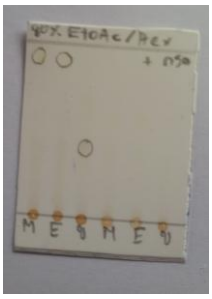
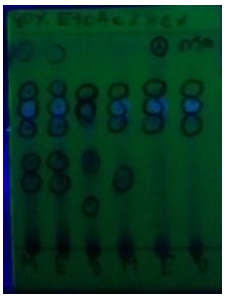
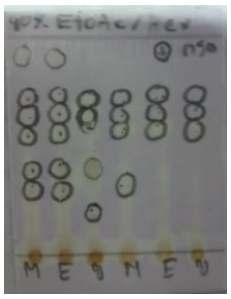
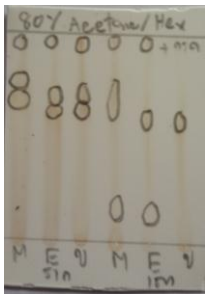
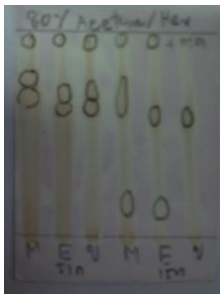
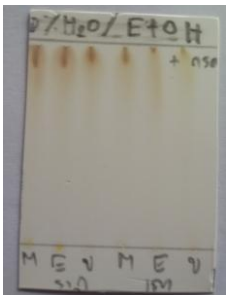
**ภาคผนวก ค**

การหาระบบตัวทำละลายและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ ค-1 การหาระบบตัวทำละลายและการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

| ระบบตัวทำละลาย | ก่อนดู UV | ใต้แสง UV | การฟอกจางสี DPPH |
|---|---|---|---|
| 10%EtOAc/ Hexane (เติม $CH_3COOH$ 10 หยด) |  | |  |
| 20%EtOAc/ Hexane (เติม $CH_3COOH$ 10 หยด) | | |  |
| 40%EtOAc/ Hexane (เติม $CH_3COOH$ 10 หยด) |  | |  |
| 60%EtOAc/ Hexane (เติม $CH_3COOH$ 10 หยด) |  |  |  |

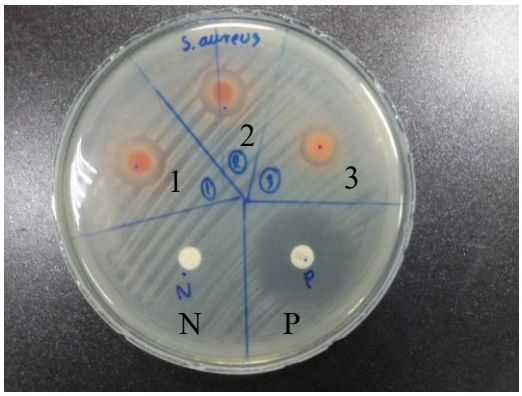
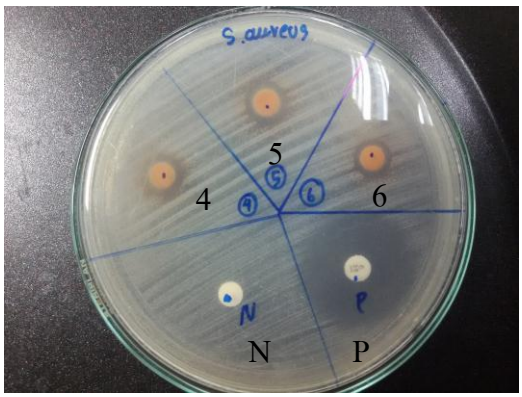
ตารางที่ ค-1 (ต่อ)

| ระบบตัวทำละลาย | ก่อนดู UV | ใต้แสง UV | การฟอกจางสี DPPH |
|---|---|---|---|
| 80%EtOAc/ Hexane (เติม $CH_3COOH$ 10 หยด) |  |  |  |
| 80%Acetone/ Hexane (เติม $CH_3COOH$ 10 หยด) |  | |  |
| 10%$H_2O$/ EtOH (เติม $CH_3COOH$ 10 หยด) |  | | |

**ภาคผนวก ง**

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

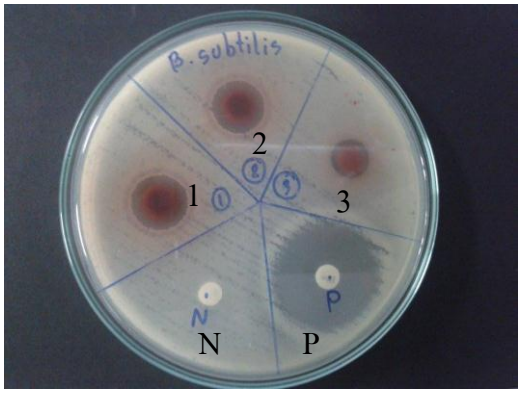
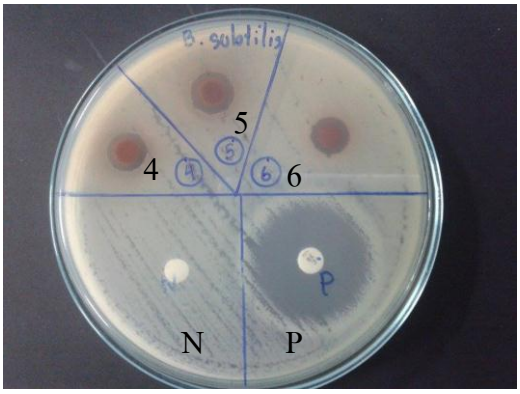
ตารางที่ ง-1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 29523

| **ชนิดของแบคทีเรีย** | **Inhibition zone (mm)** | | |
|---|---|---|---|
| ***Staphylococcus aureus* ATCC 29523** | | | |
| **สารสกัดองุ่นป้าจากส่วนราก** | **EtOH (1)** | **MeOH (2)** | **เหล้าขาว (3)** |
|  | 13.16±1.20 | 12.83±0.50 | 10.16±0.70 |
| **สารสกัดองุ่นป้าจากส่วนเถา** | **EtOH (4)** | **MeOH (5)** | **เหล้าขาว (6)** |
|  | 10.33±0.50 | 10.66±0.70 | 9.5±0.50 |

N : ดิสก์ยา chloramphenicol 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

P : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)

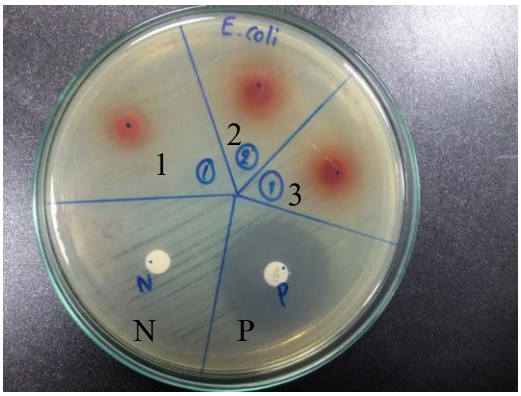
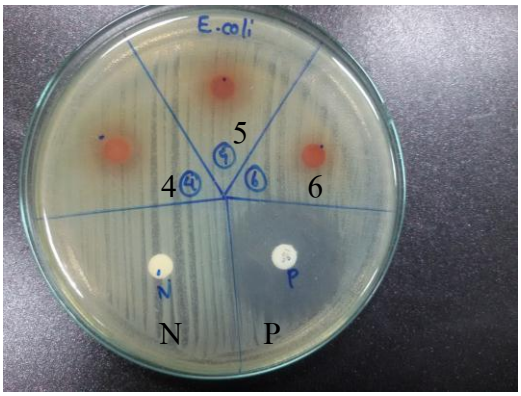
ตารางที่ ง-2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

| **ชนิดของแบคทีเรีย** | **Inhibition zone (mm)** | | |
|---|---|---|---|
| ***Bacillus subtilis*** | | | |
| **สารสกัดองุ่นป่าจากส่วนราก** | **EtOH (1)** | **MeOH (2)** | **เหล้าขาว (3)** |
|  | 13.5±0.50 | 13.66±0.20 | 10.16±0.20 |
| **สารสกัดองุ่นป่าจากส่วนเถา** | **EtOH (4)** | **MeOH (5)** | **เหล้าขาว (6)** |
|  | 11.33±0.20 | 9.50±0.50 | 26.50±1.40 |

N : ดิสก์ยา chloramphenicol 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

P : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)

ตารางที่ ง-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922

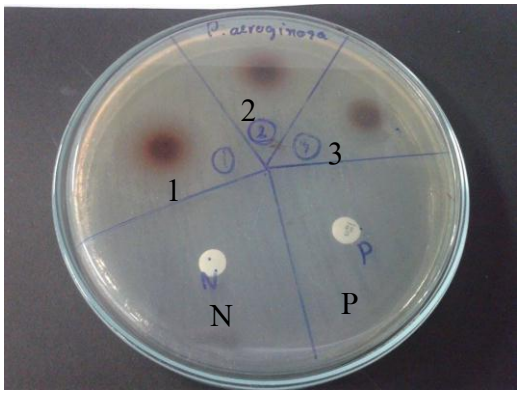
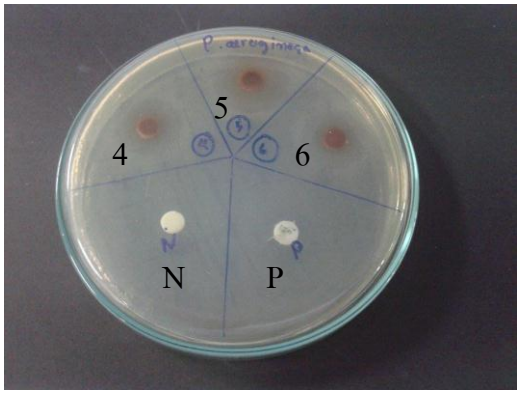
| **ชนิดของแบคทีเรีย** | **Inhibition zone (mm)** | | |
|---|---|---|---|
| ***Escherichia coli* ATCC 25922** | | | |
| **สารสกัดองุ่นป่าจากส่วนราก** | **EtOH (1)** | **MeOH (2)** | **เหล้าขาว (3)** |
|  | NZ | NZ | NZ |
| **สารสกัดองุ่นป่าจากส่วนเถา** | **EtOH (4)** | **MeOH (5)** | **เหล้าขาว (6)** |
|  | NZ | NZ | NZ |

N : ดิสก์ยา chloramphenicol 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

P : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)

NZ : ไม่มี Inhibition zone

ตารางที่ ง-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*

| **ชนิดของแบคทีเรีย** | **Inhibition zone (mm)** | | |
|---|---|---|---|
| ***Pseudomonas aeruginosa*** | | | |
| **สารสกัดองุ่นป่าจากส่วนราก** | **EtOH (1)** | **MeOH (2)** | **เหล้าขาว (3)** |
|  | 13.16±1.20 | 12.83±0.50 | 10.16±0.70 |
| **สารสกัดองุ่นป่าจากส่วนเถา** | **EtOH (4)** | **MeOH (5)** | **เหล้าขาว (6)** |
|  | 10.33±0.50 | 10.66±0.70 | 9.50±0.50 |

N : ดิสก์ยา chloramphenicol 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (positive control)

P : ดิสก์บรรจุ DMSO (negative control)