

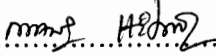
การประเมินศักยภาพในการต้านแบคทีเรียและการกระจายเชิงพื้นที่ของ
มะฮีก *Clausena excavata* Burm. f. ในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด
(มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี

วัชรพร ธรรมโชติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
สิงหาคม 2560
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ วัชรพร ชรรม โชติ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมของมหาวิทยาลัยบูรพาได้


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....  อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ดร. กาญจนา หิริมเพ็ง)

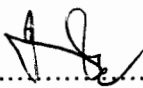
.....  อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกกรัตน์ ศรีสุข)

.....  อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร. กฤษณีย์ เจริญจิตร)

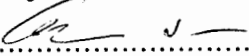
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....  ประธาน


(รองศาสตราจารย์ประสงค์ สงวนธรรม)

.....  กรรมการ

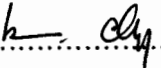
(ดร. กาญจนา หิริมเพ็ง)

.....  กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกกรัตน์ ศรีสุข)

.....  กรรมการ

(ดร. กฤษณีย์ เจริญจิตร)

.....  กรรมการ

(ดร. เบญจวรรณ ชิวปรีชา)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....  คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกกรัตน์ ศรีสุข)

วันที่ 1๙ เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2560

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ดร.กาญจนา หริ่มเพ็ง อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผศ.ดร.เอกรัฐ ศรีสุข อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.กฤษณ์ชัย เจริญจิตร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ.ประสงค์ สงวนธรรม ประธานกรรมการ และ ดร.เบญจวรรณ ชิวปริชา กรรมการ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วน และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมีในการทำงานวิจัย

เนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2556-2557 จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์เข้าใช้พื้นที่และเก็บตัวอย่างพืชในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณคณะกรรมการจัดงานประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 8 ระหว่างวันที่ 30 ถึง 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2559 ณ อาคารเรียนรวม มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้โอกาสในการนำเสนอผลงาน

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อพิชัย ธรรมโชติ คุณแม่วาสนา อุ่นอบ และญาติพี่น้องทุกคน ที่คอยเป็นกำลังใจ และสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และพี่ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจและให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย ในครั้งนี้ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงมาได้

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบมอบเป็นกตัญญูตเวทิตาแด่ บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบนานเท่านานนี้

วัชรพร ธรรมโชติ

56910499:สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วท. ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

คำสำคัญ: มะสีก/ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย/ *Staphylococcus aureus*/ เอ็มอาร์เอสเอ

วัชรพร ธรรมโชติ: การประเมินศักยภาพในการต้านแบคทีเรียและการกระจายเชิงพื้นที่ของมะสีก *Clausena excavata* Burm. f. ในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี (POTENTIAL EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND SPATIAL DISTRIBUTION OF *CLAUSENA EXCAVATA* BURM. F. IN BAN ANG-ED OFFICIAL COMMUNITY FOREST, CHANTABURI PROVINCE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: กาญจนา หริ่มเพ็ง, Ph.D., เอกรัฐ ศรีสุข, Ph.D., กฤษณัยน์ เจริญจิตร, Ph.D. 105 หน้า. ปี พ.ศ. 2560.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกสารบริสุทธิ์จากใบของมะสีก (*Clausena excavata* Burm. f.) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยาเมทิซิลลิน (Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA) และ *S. aureus* ATCC 43300 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาเมทิซิลลิน (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) โดยใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพนำการคัดแยกสาร (Bioassay-guided isolation) และวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่ได้โดยใช้เทคนิคทางเอ็นเอ็มอาร์ สเปกโทรสโกปี โดยทำการเตรียมสารสกัดหยาบจากใบมะสีกโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล และนำสารสกัดหยาบเอทานอลที่ได้มาทำการสกัดแยกลำดับส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดทั้งสามชนิดที่ได้มาทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA) และ *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) ด้วยวิธี disk diffusion พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของมะสีก แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด การตรวจหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากใบมะสีกที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration, MIC) และฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration, MBC) ด้วยวิธี broth macrodilution พบว่าค่า MIC และ MBC ของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากใบมะสีกที่ใช้ในการต้านแบคทีเรียทดสอบทั้งสองสายพันธุ์มีค่าอยู่ในช่วง 32-64 และ 128-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การคัดแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทดสอบจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท โดยทำการแยกสารประกอบต่าง ๆ ในส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ตรวจสอบรูปแบบและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทดสอบของสารที่แยกได้แต่ละส่วนแยกย่อยด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบางและไบโอออโตกราฟี (bioautography) ตามลำดับ สามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง MSSA และ MRSA ได้จากส่วนแยกย่อยลำดับที่ F3 และ F6 เมื่อนำมาวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมี พบว่า

สารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดที่แยกได้คือ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin และ Clauslactone A ตามลำดับ โดยค่า MIC ของสารทั้งสองชนิดอยู่ในช่วง 2-4 และ 256-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า MBC ของ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin อยู่ในช่วง 2-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ค่า MBC ของ Clauslactone A ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบยังไม่สามารถห่าเชื้อทดสอบได้ (1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) การสำรวจการกระจายเชิงพื้นที่ของต้นมะฮึกในพื้นที่โครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด ตำบลคกพรหม อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี พบต้นมะฮึกกระจายอยู่ทั่วพื้นที่ที่ทำการศึกษ โดยส่วนใหญ่การเจริญเติบโตของต้นที่อยู่ภายในป่าจะมีขนาดเล็กกว่าต้นที่พบบริเวณขอบป่า

56910499: MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; M.Sc. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORDS: *CLAUSENA EXCAVATA* BURM. F./ ANTIBACTERIAL ACTIVITY/
STAPHYLOCOCCUS AUREUS/ MRSA

WATCHARAPORN THAMMACHOTH: POTENTIAL EVALUATION OF
ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND SPATIAL DISTRIBUTION OF *CLAUSENA EXCAVATA*
BURM. F. IN BAN ANG-ED OFFICIAL COMMUNITY FOREST, CHANTABURI
PROVINCE. ADVISORY COMMITTEE: KARNJANA HRIMPENG, Ph.D., EKARUTH
SRISOOK, Ph.D., KRITSANAI CHAREONCHIT, Ph.D. 105 P. 2017.

The main objective of this research was to isolate and characterize the purified bioactive compounds possessing antibacterial activity against Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) from the leaves of *Clausena excavata* Burm f. using bioassay guided isolation and NMR spectroscopy, respectively. Crude extract of the plant leaves was prepared using 95% ethanol and then the plant ethanol extract was subjected to further sequential extract with the other two solvents, namely hexane and ethyl acetate, respectively. Antibacterial activity of those plant extracts against the strains of MSSA (*S. aureus* ATCC 25923) and MRSA (*S. aureus* ATCC 43300) was investigated via disk diffusion method. As a result, the ethyl acetate extract revealed the most potent effect against the tested strains. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of those extracts were also determined through broth macrodilution method. With a similar activity, the MIC and MBC values of the ethyl acetate extract against both strains of the tested bacteria were within the range of 32-64 µg/ml and 128-256 µg/ml, respectively. The antibacterial compounds consisting in the ethyl acetate extracts were isolated and purified using Bioassay guided isolation technique which includes a sequential fractionation of the extract through column chromatography and antibacterial activity analysis via thin layer chromatography and bioautography, respectively. As a result, two purified active compounds were isolated from the subtractions no F3 and no F6, respectively. The chemical structure of these compounds were identified as 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin and Clauslactone A by NMR spectroscopy, respectively. The MIC values of their compound were in range of 2-4 and 256-512 µg/ml,

respectively. The MBC values of 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin were in range of 2-8 $\mu\text{g/ml}$ whereas the MBC values of Clauslactone A could not be detected at the highest test concentration (1024 $\mu\text{g/ml}$). Finally, the spatial distribution of the *C. excavata* Burm. f. in Ban Ang-Ed official community forest was investigated. Although, the *C. excavata* trees were found scattered throughout the studied area, most of the trees grown inside the forest were smaller than the outside ones.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
สมมติฐานของการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
พืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา.....	6
สารสำคัญในพืชสมุนไพร.....	13
แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา.....	18
กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ.....	21
กลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย.....	24
การสกัดสารจากพืชที่ใช้ในการทดลอง.....	26
โครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin-layer chromatography; TLC).....	27
คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography).....	28
ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (Geographic information system; GIS).....	29
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....	31

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	37
วัสดุอุปกรณ์และเครื่องแก้ว.....	37
สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	38
อุปกรณ์ภาคสนาม.....	38
ตัวอย่างพืชและการเตรียมตัวอย่างพืช.....	38
ตัวอย่างแบคทีเรียทดสอบและการเก็บรักษา.....	39
วิธีการทดลอง.....	40
4 ผลการวิจัย.....	48
การสกัดไบโमะฮีกด้วยตัวทำละลายเอทานอลและการแยกลำดับส่วนด้วยตัว ทำละลายเฮกเซน และเอทิลอะซิเตทจากส่วนสกัดหยาบเอทานอลจากไบ มะฮีก.....	48
การคัดเลือกส่วนสกัดย่อยต่าง ๆ จากไบโमะฮีกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง แบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด.....	48
การคัดแยกสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากส่วนสกัดย่อยที่คัดเลือกได้ (ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท).....	52
การตรวจสอบกลไกการยับยั้งแบคทีเรียเบื้องต้นของสารบริสุทธิ์จากไบโमะฮีก ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	61
สำรวจการกระจายของมะฮีกและจัดทำแผนที่การกระจายของต้นมะฮีกใน โดยใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (Geographic Information System ; GIS).....	66
5 อภิปรายและสรุปผล.....	69
อภิปรายผลการทดลอง.....	69
สรุปผลการทดลอง.....	77
ข้อเสนอแนะ.....	77

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บรรณานุกรม.....	79
ภาคผนวก.....	89
ภาคผนวก ก แสดงผลการวิจัยเพิ่มเติม.....	90
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	105

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 สารประกอบจากมะฮะฮัก.....	9
2-2 สารประกอบของมะฮะฮัก (<i>Clausena excavata</i> Burm. f.) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	12
4-1 ปริมาณร้อยละ (% Yield) ของไบมะฮะฮักที่สกัดด้วยเอทานอล ของส่วนสกัด ย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทที่สกัดได้จากส่วนสกัดหยาบ เอทานอล.....	48
4-2 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 25923 และ <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ของส่วนสกัดชนิดต่าง ๆ จากไบมะฮะฮัก.....	50
4-3 ค่า MIC และ MBC ของส่วนสกัดหยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วน สกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และยาปฏิชีวนะ Oxacillin ต่อเชื้อ <i>S. aureus</i> ATCC 25923 และ <i>S. aureus</i> ATCC 43300.....	51
4-4 ระบบของตัวทำละลายของแต่ละส่วนแยก (fractions) ที่แยกได้จากส่วนสกัด ย่อยเอทิลอะซิเตท.....	52
4-5 แสดงน้ำหนัก และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วน สกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากไบมะฮะฮัก.....	53
4-6 ตารางเปรียบเทียบสเปกตรัม ¹ H NMR ของสาร 5-geranyloxy-7- hydroxycoumarin.....	55
4-7 ตารางเปรียบเทียบสเปกตรัม ¹³ C NMR ของสาร 5-geranyloxy-7- hydroxycoumarin.....	56
4-8 ตารางเปรียบเทียบสเปกตรัม ¹ H NMR ของสาร Clauslactone A.....	58
4-9 ตารางเปรียบเทียบสเปกตรัม ¹³ C NMR ของสาร Clauslactone A.....	59
4-10 ค่า MIC และ MBC ของสาร 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin, Clauslactone A และ ยาปฏิชีวนะ Oxacillin ต่อ <i>S. aureus</i> ATCC 25923 และ <i>S. aureus</i> ATCC 43300.....	60
4-11 ลักษณะดินและความเข้มแสงในแต่ละจุดพื้นที่.....	68
ก-1 ระบบของตัวทำละลายในอัตราส่วนต่าง ๆ ของวัฏภาคเคลื่อนที่ ของตัวอย่างที่ F3.....	100

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ก-2 ระบบของตัวทำละลายในอัตราส่วนต่าง ๆ ของวัฏภาคเคลื่อนที่ของตัวอย่างที่ F3-1+F3-2.....	100
ก-3 ระบบของตัวทำละลายในอัตราส่วนต่าง ๆ ของวัฏภาคเคลื่อนที่ ของตัวอย่างที่ F6.....	101
ก-4 ระบบของตัวทำละลายในอัตราส่วนต่าง ๆ ของวัฏภาคเคลื่อนที่ ของตัวอย่างที่ F6-2.....	101
ก-5 ระบบของตัวทำละลายในอัตราส่วนต่าง ๆ ของวัฏภาคเคลื่อนที่ ของตัวอย่างที่ F6-2-2.....	101

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะฮ็อก <i>Clausena excavata</i> Burm. f.....	7
2-2 สูตรโครงสร้างของ Caffeine.....	14
2-3 สูตรโครงสร้างของ Flavonoids skeleton.....	14
2-4 สูตรโครงสร้างของ Anthraquinones skeleton.....	15
2-5 สูตรโครงสร้างของ Coumarin skeleton.....	15
2-6 สูตรโครงสร้างของ Saponin.....	16
2-7 สูตรโครงสร้างของ Tannic acid.....	16
2-8 สูตรโครงสร้างของ Squalene.....	17
2-9 สูตรโครงสร้างของ Testosterone.....	17
2-10 สูตรโครงสร้างของ Digitoxigenin.....	18
2-11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>S. aureus</i>	19
3-1 แผนภูมิออกแบบการทดลอง.....	39
3-2 แผนภูมิการเตรียมส่วนสกัดย่อยชนิดต่าง ๆ จากใบมะฮ็อกด้วยเทคนิค Sequential extraction.....	41
4-1 ฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (ภาพที่ 4-1ก.) และ <i>S. aureus</i> ATCC 43300 (ภาพที่ 4-1ข.) ของส่วนสกัดหยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจากใบมะฮ็อกเมื่อทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion.....	49
4-2 TLC pattern ที่แยกโดยใช้ Ethyl acetate : Hexane 40 : 60 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (ภาพที่ 4-2ก.) และ Bioautograph แสดงฤทธิ์ต้าน <i>S. aureus</i> ATCC 43300 (ภาพที่ 4-2ข.) ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (CE EtOAt) และ CE EtOAt subfraction ลำดับที่ 3 (F3)	53
4-3 TLC pattern ที่แยกโดยใช้ Ethyl acetate : Hexane 40 : 60 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (ภาพที่ 4-3ก.) และ Bioautograph แสดงฤทธิ์ต้าน <i>S. aureus</i> ATCC 43300 (ภาพที่ 4-3ข.) ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (CE EtOAt) และ CE EtOAt subfraction ลำดับที่ 6 (F6).....	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-4	54
4-5	55
4-6	57
4-7	61
4-8	62
4-9	62
4-10	63
4-11	63
4-12	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-13 ลักษณะจุลสัณฐานภายใต้กล้อง SEM ของ <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ที่สัมผัสกับสาร 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin ที่ความเข้มข้น 1/2MIC ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง.....	64
4-14 ลักษณะจุลสัณฐานภายใต้กล้อง SEM ของ <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ที่สัมผัสกับสาร 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin ที่ความเข้มข้น 1/4MIC ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง.....	65
4-15 ลักษณะจุลสัณฐานภายใต้กล้อง SEM ของ <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ที่สัมผัสกับสาร Clauslactone A ที่ความเข้มข้น 1/2MIC ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง...	65
4-16 ลักษณะจุลสัณฐานภายใต้กล้อง SEM ของ <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ที่สัมผัสกับสาร Clauslactone A ที่ความเข้มข้น 1/4MIC ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง....	66
4-17 แผนที่การกระจายของด้นมะฮักในพื้นที่ป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดฯ.....	67
ก-1 ผลการทดสอบหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ Oxacillin ต่อ <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB พบว่าค่า MIC เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ชุดควบคุมคุณภาพของระบบทดสอบ)	91
ก-2 ผลการทดสอบหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ Oxacillin ต่อ <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่า MIC เท่ากับ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ชุดควบคุมคุณภาพของระบบทดสอบ).....	91

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
<p>ก-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ของส่วนสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะฮึกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB (ค่า MIC ของของส่วนสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะฮึกในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 25923 เท่ากับ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)</p>	91
<p>ก-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ของส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจากใบมะฮึกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 8-1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB (ค่า MIC ของของส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจากใบมะฮึกในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 25923 เท่ากับ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร).....</p>	92
<p>ก-5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮึกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB (ค่า MIC ของของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮึกในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 25923 เท่ากับ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร).....</p>	92
<p>ก-6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ของส่วนสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะฮึกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (ค่า MIC ของส่วนสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะฮึกในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 43300 เท่ากับ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร).....</p>	93
<p>ก-7 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ของส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจากใบมะฮึกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 8-1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (ค่า MIC ของส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจากใบมะฮึกในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 43300 เท่ากับ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร).....</p>	93

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ก-8 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮึกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (ค่า MIC ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮึกในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 43300 เท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	94
ก-9 ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่า <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ของส่วนสกัดหยาบเอทานอล (ก.) ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน (ข.) ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (ค.) จากใบมะฮึก และ ยาปฏิชีวนะ Oxacillin (ง.) โดยใช้เทคนิค Drop plate ในอาหาร MHA.....	95
ก-10 ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่า <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ของส่วนสกัดหยาบเอทานอล (ก.) ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน (ข.) ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (ค.) จากใบมะฮึก และ ยาปฏิชีวนะ Oxacillin (ง.) โดยใช้เทคนิค Drop plate ในอาหาร MHA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์.....	96
ก-11 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ของสารบริสุทธิ์ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin จากใบมะฮึกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25-32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB (ค่า MIC ของสารบริสุทธิ์ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin จากใบมะฮึกในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 25923 เท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร).....	97
ก-12 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ของสารบริสุทธิ์ Clauslactone A จากใบมะฮึกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 32-1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB (ค่า MIC ของสารบริสุทธิ์ Clauslactone A จากใบมะฮึกในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 25923 เท่ากับ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	97

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ก-13 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ของสารบริสุทธิ์ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin จากใบมะฮิที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25-32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (ค่า MIC ของสารบริสุทธิ์ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin จากใบมะฮิในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 25923 เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร).....	98
ก-14 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ของสารบริสุทธิ์ Clauslactone A จากใบมะฮิที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 32-1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (ค่า MIC ของสารบริสุทธิ์ Clauslactone A จากใบมะฮิในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> ATCC 25923 เท่ากับ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	98
ก-15 ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่า <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ของสารบริสุทธิ์ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin (ก.) สารบริสุทธิ์ Clauslactone A (ข.) จากใบมะฮิ โดยใช้เทคนิค Drop plate ในอาหาร MHA.....	99
ก-16 ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่า <i>S. aureus</i> ATCC 43300 ของสารบริสุทธิ์ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin (ก.) สารบริสุทธิ์ Clauslactone A (ข.) จากใบมะฮิ โดยใช้เทคนิค Drop plate ในอาหาร MHA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์.....	99
ก-17 สเปกตรัม ^1H NMR ของส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตจากใบมะฮิ.....	102
ก-18 สเปกตรัม ^1H NMR ของ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin.....	102
ก-19 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin.....	103
ก-20 สเปกตรัม ^1H NMR ของ Clauslactone A.....	103
ก-21 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ Clauslactone A.....	104
ก-22 ผลการวิเคราะห์ดิน.....	104

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ป่าไม้เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นมนุษย์หรือสัตว์ เพราะป่ามีประโยชน์ทั้งการเป็นแหล่งวัตถุดิบของปัจจัยสี่ คือ อาหาร เครื่องนุ่งห่ม ที่อยู่อาศัย และยารักษาโรคสำหรับมนุษย์ แต่จากสถานการณ์การตัดไม้ทำลายป่าอย่างต่อเนื่องจากอดีตจนถึงปัจจุบันทำให้ทรัพยากรป่าไม้ลดลงเป็นจำนวนมาก ซึ่งส่งผลกระทบต่อสมดุลทางธรรมชาติ เช่น เกิดการชะล้างพังทลายของดิน น้ำท่วมหนัก เกิดความแห้งแล้งที่รุนแรง เกิดปัญหาโลกร้อนขึ้น ปัจจัยบางประการที่ทำให้เกิดการตัดไม้ทำลายป่าในระดับมหภาคคือ ความไม่เอาใจใส่หรือความรู้คุณค่าที่แท้จริง ขาดการให้คุณค่า การจัดการป่าไม้ที่ไม่เข้มงวด ดังนั้นจึงต้องมีการจัดการทรัพยากรป่าไม้ เช่น การมีป่าชุมชน (เพิ่มศักดิ์ มกราภิรมย์, 2540; กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม, ม.ป.ป.; Moutinho & Schwartzman, 2005)

ป่าชุมชน (Community Forest) เป็นวิถีปฏิบัติและเป็นการปรับตัวของการจัดการทรัพยากร และเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาพื้นที่ป่าและความสมบูรณ์ของนิเวศป่าไม้ เพื่อให้ระบบนิเวศคงความสมดุลเนื่องจากป่าชุมชนเป็นกลไกที่สำคัญที่เป็นช่องทางให้ชุมชนเข้ามามีส่วนร่วมในการอนุรักษ์ จัดการ ฟื้นฟูให้ป่ามีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้น และมีการใช้ทรัพยากรและผลผลิตจากป่าได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อความมั่นคงแห่งชีวิตของคนในชุมชน และที่สำคัญยิ่งคือ เพิ่มความสามารถให้กับมนุษย์ได้เรียนรู้การอยู่อย่างสมดุลกับธรรมชาติและดำรงชีพอยู่ได้อย่างมีความสุข (สำนักงานส่งเสริมการปลูกป่า กรมป่าไม้, 2538; ฉลาดชาย รมิตานนท์, 2548; สมหญิง สุนทรวงษ์, 2557)

ป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด ตำบลตกรวม อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี เป็นป่าชุมชนในโครงการที่ถูกจัดตั้งขึ้นตามพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ซึ่งทรงพระราชทานให้สำนักงานมูลนิธิชัยพัฒนา ดำเนินการรับโอนที่ดินซึ่งครอบครอง “ลักษณะประสิทธิ์” มีความประสงค์ขอพระราชทานน้อมเกล้าฯ ถวายที่ดินจำนวน 14 แปลง เนื้อที่รวม 160 ไร่ 1 งาน 46 ตารางวา ตั้งอยู่ที่ ตำบลตกรวม อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี เพื่อใช้ประโยชน์ในมูลนิธิชัยพัฒนา (มูลนิธิชัยพัฒนา, 2554) ซึ่งป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดเป็นป่าเพียงผืนเดียวที่เหลืออยู่ของตำบลตกรวมเป็นปาร์กร้างที่ไม่มีการใช้ประโยชน์แต่มีสภาพที่สมบูรณ์และมีพืชสมุนไพรจำนวนมากหลายชนิดที่น่าสนใจ แต่การศึกษาข้อมูลและการให้ความสำคัญของพืชสมุนไพรใน

ป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดยังมีน้อย ซึ่งสมุนไพรมีประโยชน์ทางการแพทย์สามารถนำมาใช้รักษาโรคได้หลายชนิด และสามารถนำมาใช้แทนยาแผนปัจจุบันที่ก่อปัญหาทางสิ่งแวดล้อม เช่น ยาปฏิชีวนะ ปัจจุบันปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะมากเกินไปจนเกินความจำเป็นในการรักษาโรคติดเชื้อทั้งในมนุษย์ สัตว์ พืช และยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตในปศุสัตว์ด้วย จึงทำให้มีการปล่อยยาปฏิชีวนะออกสู่สิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปนเปื้อนที่เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ผลิตยาปฏิชีวนะ (Boxall, 2004) จนเกิดการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อมเป็นจำนวนมาก และทำให้เชื้อแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมมีโอกาสได้รับยาปฏิชีวนะจนเกิดเชื้อดื้อยาขึ้น (Cheng et al., 2014; Jiang et al., 2014)

เมื่อมีการปล่อยยาปฏิชีวนะลงสู่สิ่งแวดล้อม ยาปฏิชีวนะสามารถแพร่กระจายไปในระบบนิเวศรวมทั้งสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศก็สามารถได้รับยาปฏิชีวนะเข้าไปด้วย ยาปฏิชีวนะจึงเป็นปัญหาสำคัญที่ก่อให้เกิดเชื้อดื้อยาในระบบนิเวศ (Martinez, 2009) ถ้าเชื้อจุลินทรีย์สัมผัสกับยาปฏิชีวนะในปริมาณน้อยเชื้ออาจมีพัฒนาการดื้อยาจนก่อให้เกิดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะและถ่ายทอดยีนไปยังเชื้อตัวอื่น ๆ ได้ เมื่อสัตว์และมนุษย์ได้รับยาปฏิชีวนะ แบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้จะมีพัฒนาการดื้อยา และแบคทีเรียดื้อยาสามารถที่จะตกค้างในเนื้อสัตว์ เมื่อมนุษย์รับประทานเนื้อสัตว์ที่ปรุงแบบสุก ๆ ดิบ ๆ แบคทีเรียดื้อยาก็จะตกค้างในร่างกายของมนุษย์เช่นกัน นอกจากนี้ถ้าสิ่งขับถ่ายที่มีเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำหรือนำไปทำปุ๋ย เชื้อดื้อยาก็จะสามารถเข้าไปปนเปื้อนในผักและผลไม้ เมื่อมนุษย์นำไปรับประทานก็จะได้รับเชื้อดื้อยาเข้าไปด้วย ดังนั้นมนุษย์ที่ได้รับเชื้อดื้อยาก็สามารถแพร่กระจายเชื้อดื้อยาได้เช่นกัน เช่น มนุษย์ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล มนุษย์ก็สามารถแพร่กระจายเชื้อดื้อยาให้กับผู้ป่วยในโรงพยาบาลหรือคนในพื้นที่ชุมชนได้ ซึ่งปัญหาการติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะทำให้มนุษย์ติดเชื้อดื้อยาและยากต่อการรักษา ในแต่ละปีในสหรัฐอเมริกามีคนล้มป่วยเพราะการดื้อยาของเชื้อโรคมากถึง 2,049,442 ราย จากจำนวนดังกล่าวนี้มีผู้เสียชีวิตไปมากถึง 23,000 ราย และการดื้อยานี้ทำให้รัฐบาลต้องจ่ายเงินเพิ่มขึ้นในการประกันสุขภาพประมาณ 600,000 ล้านบาทในแต่ละปี (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2013)

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สามารถก่อโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ ก่อให้เกิดเป็นแผลฝี และหนอง หากเชื้อเข้าสู่กระแสเลือดอาจทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อน เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และปอดบวม เป็นต้น จากปัญหานำมาสู่การพัฒนาต้านจุลินทรีย์ เช่น ยาเพนิซิลลิน (Penicillin) ที่เป็นยาในกลุ่มเบต้าแลคแทม (Beta-lactam) ทำให้โรคติดเชื้อหลาย ๆ ชนิดสามารถรักษาให้หายได้ แต่หลังจากเริ่มใช้ยาเพนิซิลลินได้ไม่นานก็มีการดื้อยาเพนิซิลลินขึ้น

ซึ่งเชื้อสามารถสร้างเพนิซิลลินเนส (Penicillinase) มาทำลายยาทำให้เชื้อดื้อยา ต่อมามีการพัฒนายา เมทิซิลลิน (Methicillin) ที่ไม่ถูกทำลายด้วยเพนิซิลลินเนสแต่เชื้อก็มีพัฒนาการไปกว่านั้นคือ สร้าง เอนไซม์ PBP2a ซึ่ง PBP2a มีคุณสมบัติในการจับกับยาในกลุ่มเบต้าแลคแทมได้ต่ำมาก ดังนั้นการใช้ ยาในกลุ่มเบต้าแลคแทม เช่น เพนิซิลลิน หรือ เพนิซิลลินกึ่งสังเคราะห์ (Semisynthetic penicillin) เช่น ออกซาซิลลิน (Oxacillin) และ เมทิซิลลิน (Methicillin) จึงไม่ได้ผลกับเชื้อกลุ่ม MRSA (CDC, 2013) เมื่อมีเชื้อดื้อยาเพิ่มมากขึ้นผู้ผลิตยาปฏิชีวนะจำเป็นต้องผลิตยาปฏิชีวนะตัวใหม่ ๆ ขึ้นมา เพื่อ จัดการกับเชื้อดื้อยา แต่พอใช้ไปนาน ๆ เชื้อก็มีพัฒนาการคือยามากขึ้น ในอดีตมีการพัฒนา ยาปฏิชีวนะขึ้นค่อนข้างมาก แต่ในปัจจุบันอุตสาหกรรมยาให้ความสนใจในการพัฒนา ยาปฏิชีวนะ น้อยลง เพราะฉะนั้นทั่วโลกจึงหันมาให้ความสนใจกับแหล่งสารต้านจุลชีพใหม่ ๆ โดยเฉพาะ วัตถุชีวที่มาจากธรรมชาติ อาทิเช่น พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรไทยเป็นที่รู้จักโดยทั่วไปในการนำมาเป็นยารักษาโรคต่าง ๆ และมีการนำมา บริโภคเพื่อส่งเสริมสุขภาพมากขึ้น เนื่องจากหาได้ง่าย ราคาถูก และสามารถปลูกใช้ได้เองภายใน ครัวเรือน การใช้สมุนไพรช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายของครอบครัว ตลอดจนช่วยลดการขาดดุลการค้า ของประเทศในการสั่งซื้อยาเป็นจำนวนมากอีกด้วย นอกจากนี้ที่กล่าวมาแล้วสมุนไพรหลายชนิดใน ประเทศไทยยังมีฤทธิ์อีกด้านหนึ่งที่สำคัญคือ มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้

มะฮิก *Clausena excavata* Burm. f. มีชื่อพื้นบ้านอื่น ๆ ว่า สัน โศก สมัดใหญ่ หัสคุณ โศก หัสคุณเทศ และหมุยขาว เป็นต้น มะฮิกเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านชนิดหนึ่งที่น่าสนใจมีสรรพคุณใช้ ในการขับเลือดและหนอง แก้โรคผิวหนัง แก้ผื่นคัน แก้อาการอักเสบวม และรักษาบาดแผล เป็น ต้น (Manosroi, Saraphanchotiwitthaya, & Manosroi, 2005; Arbab et al., 2011; Kumar, Saha, & Saha, 2012) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบมะฮิกมีฤทธิ์ในการยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* (พิชญพงษ์ ศิริเดช, 2557) การศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาถึง สารสำคัญแต่ละชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของมะฮิก การใช้สารสกัดจากธรรมชาติถือเป็น ทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อและสามารถนำไปประยุกต์ใช้แทนสารเคมีที่ ผสมในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด และเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะมาสนับสนุนให้ เห็นถึงภูมิปัญญาชาวบ้านที่สามารถนำสมุนไพรมาใช้แทนยาปฏิชีวนะเพื่อลดการปนเปื้อนยา ปฏิชีวนะและเชื้อดื้อยาในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงทำการคัดแยกและวิเคราะห์หา สารออกฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะฮิกในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ไวและดื้อ ต่อยาเมทิซิลลิน ได้แก่ Methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA) และ Methicillin resistance *S. aureus* (MRSA) ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามในการศึกษาวิจัยมะฮิกในป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดเพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาให้เป็นพื้นที่อนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและเป็นแหล่งเรียนรู้ให้กับเยาวชนและคนในชุมชนในเห็นคุณค่าของพืชสมุนไพรที่พบในป่าชุมชน ในการศึกษาคั้งนี้ผู้วิจัยจึงจัดทำแผนที่การกระจายของมะฮิกในป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด โดยใช้เครื่องมือทางภูมิสารสนเทศ (GIS) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเข้าถึงแหล่งของพืชสมุนไพร (มะฮิก) การใช้ประโยชน์ และการอนุรักษ์อย่างยั่งยืน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกและวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์จากใบมะฮิก *Clausena excavata* Burm. f. ด้วยวิธี Bioassay guided isolation
2. สสำรวจการกระจายของมะฮิกและจัดทำแผนที่การกระจายของต้นมะฮิกโดยใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (Geographic Information System ; GIS) เบื้องต้น

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. ส่วนสกัดหยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจากใบมะฮิกมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ MSSA และ MRSA แตกต่างกัน
2. ใบมะฮิกมีสารพิษเคมีที่แยกได้หลายชนิดและมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของ MSSA และ MRSA
3. บั๊จยถึงแวดลอมมีอิทธิพลต่อความหนาแน่นและความสมบูรณ์ของต้นมะฮิกที่พบในป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. จากการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากส่วนสกัดของใบมะฮิกที่เป็นสมุนไพรในป่าชุมชนสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านจุลชีพชนิดใหม่มาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่ื้อยาปฏิชีวนะได้ในอนาคต และเป็นข้อมูลในการสนับสนุนให้ใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแทนยาปฏิชีวนะเพื่อลดการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อม
2. ในการศึกษาบั๊จยถึงแวดลอมและการกระจายของมะฮิกในพื้นที่ป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานการกระจายรวมถึงแหล่งที่พบเพื่อการอนุรักษ์ การเพาะปลูกและการเข้าถึงแหล่งสมุนไพรธรรมชาติในป่าชุมชน เป็นแหล่งเรียนรู้และใช้เป็นฐานข้อมูลของทรัพยากรธรรมชาติ

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำมะฮิกมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียคือยาปฏิชีวนะ โดยทำการเตรียมสารสกัดหยาบจากใบมะฮิกโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล และนำสารสกัดหยาบเอทานอลที่ได้มาทำการสกัดแยกลำดับส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ นำส่วนสกัดทั้งสามชนิดที่ได้มาทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง MSSA สายพันธุ์ *S. aureus* ATCC 25923 และ MRSA สายพันธุ์ *S. aureus* ATCC 43300 ด้วยวิธี disk diffusion ทดสอบเชิงปริมาณเพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC) กับเชื้อทดสอบ 2 isolates ด้วยวิธี broth macrodilution จากนั้นนำส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ดีที่สุดมาคัดแยกหาสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี Bioassay guided isolation โดยทำการแยกสารประกอบต่าง ๆ เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography) ตรวจสอบรูปแบบและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทดสอบของสารที่แยกได้แต่ละส่วนแยกย่อยด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin Layer Chromatography; TLC) และ bioautography ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์ แมกเนติก เรโซแนนซ์ สเปกโตรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy; NMR) นำสารบริสุทธิ์ที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง MSSA และ MRSA ศึกษากลไกการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบเบื้องต้นของสารบริสุทธิ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning electron microscope; SEM) และสำรวจการกระจายของมะฮิกที่เป็นพืชสมุนไพรที่พบในป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดฯ โดยสำรวจแปลงถาวรของโครงการจำนวน 39 แปลง ระบุตำแหน่งพิกัดทางภูมิศาสตร์ และจัดทำแผนที่การกระจายของต้นมะฮิกโดยใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (GIS)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาวิจัยเรื่องการประเมินศักยภาพในการต้านแบคทีเรียและการกระจายเชิงพื้นที่ของมะฮึก (*Clausena excavata* Burm. f.) ในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี ผู้วิจัยได้รวบรวมเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาเพื่อนำมาเป็นแนวคิดในการศึกษาวิจัย ดังนี้

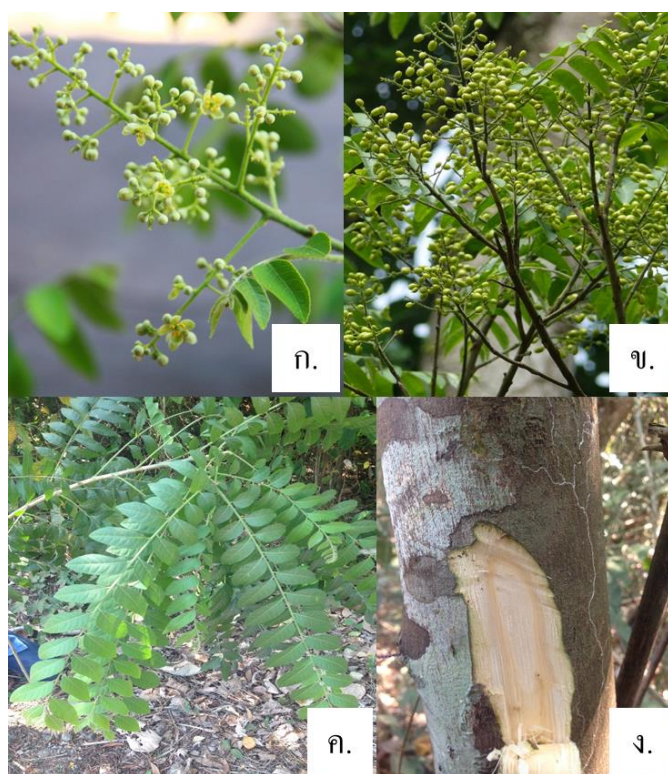
1. พืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา
2. สารสำคัญในพืชสมุนไพร
3. แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา
4. กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ
5. กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะ
6. การสกัดสารจากพืชที่ใช้ในการทดลอง
7. โครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin-layer chromatography หรือ TLC)
8. คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography)
9. การสำรวจโดยใช้ GIS
10. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

2.1 พืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มะฮึก *Clausena excavata* Burm. f. เป็นพืชในวงศ์ Rutaceae มีชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ ว่า สันโศก หัสคุณโคก หัสคุณเทศ และหมุยขาว เป็นต้น พบได้ในป่าดิบชื้น ป่าผลัดใบที่มีการรบกวนน้อย ป่าเขตร้อน และกึ่งเขตร้อน และมีการกระจายอย่างแพร่หลายในประเทศอินเดีย ประเทศจีน เทือกเขาหิมาลัย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งในประเทศไทยพบได้ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี เชียงใหม่และจันทบุรี (Manosroi, et al., 2005; Kumar et al., 2012; Arbab et al., 2011) มะฮึกสามารถขึ้นได้ในดินทุกชนิด เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก โดยทั่วไปสูงประมาณ 2-4 เมตร แต่บางต้นอาจสูงได้ถึง 15 เมตร ลำต้นโตมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 เซนติเมตรเปลือกมีสีน้ำตาล ผิวเรียบ แตกกิ่งก้านสาขาอย่างไม่เป็นระเบียบ มีขนละเอียดอ่อนนุ่มสั้น ๆ ปกคลุมที่บริเวณปลายกิ่ง ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกสองชั้นเรียงแบบสลับช่อ ขนาดของใบยาวประมาณ 15-50 เซนติเมตร

โคนช่อใบอาจมีช่อใบย่อยหลายช่อโดยมีใบย่อย 15-31 ใบต่อช่อ ปลายช่อเป็นใบเดี่ยว ก้านใบย่อย สีเขียว ลักษณะของใบเป็นรูปขอบขนาน รูปเคียว รูปไข่ รูปรี หรือรูปใบหอก กว้างประมาณ 1-7 เซนติเมตร ยาว 2-20 เซนติเมตร ปลายแหลมหรือเรียวแหลม โคนใบเบี้ยวด้านหนึ่งสอบเป็นรูปลิ้ม อีกด้านโค้งมน ขอบใบเรียบหรืออาจเป็นซี่หยาบเล็ก ๆ ใบมีขนนุ่มสีน้ำตาล ท้องใบมีขนบาง ๆ ใบแก่ ด้านบนเกลี้ยงไม่มีขน ด้านล่างมีขนละเอียดบาง ๆ ดอกออกเป็นช่อที่ปลายกิ่ง มีดอกย่อยจำนวนมาก ก้านดอกย่อยยาวประมาณ 0.5-2.0 มิลลิเมตร วงกลีบเลี้ยงเล็กมาก กลีบดอก 4-5 กลีบ ลักษณะเป็น รูปไข่ขอบขนานยาวประมาณ 3.5-5.0 มิลลิเมตร กลีบดอกเป็นสีขาวแกมเหลือง หรือสีขาวปนเขียว มีเกสรตัวผู้ 8 อัน ก้านชูอับเรณูยาวประมาณ 1.5-3.5 มิลลิเมตร โคนโต ส่วนก้านชูเกสรตัวเมียมี ลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก ปลายกว้างยาวประมาณ 1.8 มิลลิเมตร ส่วนรังไข่มีขนละเอียด ปกคลุม ออกดอกในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนมิถุนายน ผลเป็นผลสด ลักษณะของผลเป็นรูป กระสวย รูปกลม รูปรี หรือรูปไข่ยาวขนาดเล็กมีความยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร ผิวใสฉ่ำน้ำ ผิวเกลี้ยงหรืออาจมีขนละเอียดบาง ๆ ผลอ่อนเป็นสีเขียวปนเหลือง ส่วนผลแก่เป็นสีส้มอมชมพูหรือ สีแดง ภายในผลมีเมล็ดมาก (สุदारัตน์ หอมหวล, 2555)



ภาพที่ 2-1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะฮึก *Clausena excavata* Burm. f. ดอก (ก.) ผล (ข.) ใบ (ค.) และ เปลือกต้น (ง.)

2.2.2 สรรพคุณทางยาของมะฮิก

มะฮิกเป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์ทางการแพทย์พื้นบ้านมาเป็นเวลาช้านาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการรักษาโรคมะเร็งในภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย (Guntupalli, Kumar, Kumar, & Tubati, 2012) และใช้รักษาโรคต่าง ๆ หลายชนิด ใบและลำต้นใช้สำหรับแก้อาการจุกเสียด แก้ไอ แก้ปวดหัว แก้จุกอึกเสบ รักษาบาดแผล และในบางประเทศใช้ในการล้างพิษ ลำต้นสามารถนำมาต้มน้ำอาบแก้ผื่นคัน (คนเมือง) ลำต้นและใบ ต้มน้ำดื่มเป็นยาแก้สรรพพิษ (คนเมือง) กิ่งและใบ นำมาต้มน้ำอาบหรืออบตัว สามารถใช้ดื่มร่วมกับกล้วยตานี และกล้วยป่า เพื่อแก้ไข้ และหลังจากคลอดลูก (กะเหรี่ยงแม่ฮ่องสอน) ใบสามารถนำไปใช้ไล่ไรไก่อ เพราะใบมีกลิ่นเหม็นรุนแรง (คนเมือง) เปลือกต้นพบสารที่มีฤทธิ์ต้านสารพิษที่ทำลายตับ ต้านอาการปวดและอักเสบ นอกจากนี้ ใบ ดอก ผล ลำต้น และราก สามารถใช้แก้ไข้มาลาเรีย วัณโรค รักษาโรคผิวหนัง ห้ามเลือด และฆ่าเชื้อโรคได้ (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550) ชาวเขาเผ่าลีซอใช้ใบต้มน้ำอาบให้ไก่เพื่อกำจัดไรไก่ หรือให้คนอาบเพื่อกำจัดเหาและไร หรือแก้แผลเปื่อย แผลที่เกิดจากอาการคัน ชาวม้งใช้ใบตำและอาจจะผสมกับใบพืชอื่น ๆ เช่น ส้มโอ เครือเขาคำ และท้อ ตำรวมกันห่อผ้ารัดที่ข้อมือด้านหนึ่งและข้อเท้าอีกด้านหนึ่ง แก้ไข้มาลาเรีย ชาวกะเหรี่ยงใช้ทั้งต้นต้มน้ำอาบแก้อาการวิงเวียนศีรษะ ชาวเขาโดยทั่วไปใช้ใบตำพอกแก้อาการอักเสบ บวมอันเกิดจากไฟไหม้ น้ำร้อนลวกหรือสาเหตุอื่น ๆ ชาวไทยใหญ่ใช้รากต้มน้ำเป็นยาบำรุงกำลัง เป็นต้น (สุธรรม อริกุล, จำรัส อินทร, สุวรรณ ทาเขียว และอ่องเต็ง นันทแก้ว, 2551)

2.2.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของมะฮิก

มะฮิกมีสารพิษศาสตร์เคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักได้แก่ Carbazole Alkaloids และ Coumarins เป็นต้น (Manosroi et al., 2005)

สารประกอบที่แยกได้จากมะฮิกมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย อย่างเช่น การหาค่าความเข้มข้นที่สารมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (Inhibitory concentration 50 % ; IC₅₀) ของสาร Clausine D ในกรดอะราคิโดนิค (Arachidonic acid) และคอลลาเจนรวมกับเกล็ดเลือด พบว่ามีค่า IC₅₀ เท่ากับ 9.0 ± 1.1 และ 58.9 ± 0.9 ไมโครโมล ตามลำดับ (Wu, Ko, Wu, & Teng, 1994) และสาร Dentatin, nordentatin, clausinidin, 3-formylcarbazole, mukonal, clausoline J 3-methoxycabonyl carbazole, 2-hydroxy-3-formyl-7-methoxy และ carbonylcarbazole มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยมีค่า MIC₅₀ เท่ากับ 50, 100, 200, 100, 200, 50, 100, และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สาร 3-formylcarbazole, mukonal, 3-methoxycabonyl carbazole และ 2-hydroxy-3-formyl-7-methoxy แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 13.6, 29.3, 9.5 และ 2.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Sunthitikawinsakul et al., 2003) Clausinadin และ nordentatin

ยับยั้งไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์ HepA2 และนอกจากนี้ Clausinadin nordentatin และ clausarin ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด ได้แก่ A549, MCF7, KB และ KB-VIN ซึ่งผลที่น่าสนใจที่สุดในการทดสอบความเป็นพิษคือ Clausinadin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (KB-VIN) ที่คือต่อยาหลายชนิด (Su et al., 2009) Clausenaguinone-A แสดงฤทธิ์ยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือดของกระต่ายรวมทั้งความเป็นพิษของเซลล์เนื้องอก (Wu, Huang, Wu, & Lee, 1994) Clausenaguinone-A และ *O*-demethylmurrayafoline A แสดงฤทธิ์ยับยั้งความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งหลากหลายสายพันธุ์ในหลอดทดลอง (Zhang & Lin, 2003) และพบว่า Clauslactones A-D มีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเ็บสไตบาร์ (Epstein-Barr virus) ก่อนสร้างแอนติเจนในเซลล์ราจี (Raji cell) (Ito et al., 2000) Limoniod, Clausenolind-1-Et ether, Dentatin และ Nordentatin มีฤทธิ์ยับยั้ง HIV-1 สารเหล่านี้สกัดได้จากส่วนสกัดคลอโรฟอร์มจากรากมะฮ็อก (Sunthitikawinsakul et al., 2003)

ตารางที่ 2-1 สารประกอบจากมะฮ็อก (Bindulem, 2010)

- | | |
|------------------------|---------------|
| a. Carbazole Alkaloids | c. Flavonoids |
| b. Coumarins | d. Limonoids |

Scientific name	Part	Compounds
<i>Clausena excavata</i>	เปลือก	Clausine D, a1
		Clausine F, a2
		O-Methylclausinolide, d1
		Zapoterin, d2
		Clausine A, a3
		Clausine C, a4
		Clausine G, a5
		Clausine J, a6
		Clausine B, a7
		Clausine E, a8
Clausine H, a9		
Clausine I, a10		

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

Scientific name	Part	Compounds
<i>Clausena excavata</i>	เปลือก	Clausine K, a11
		Mukonal, a12
		Mukonine, a13
		Lasine, a14
		Glycozolidal, a15
		3-Methylcarbazole, a16
		Heptasoline, a17
		Heptaphylline, a18
		Murrayanine, a19
		2-Hydroxy-3-methylcarbazole, a20
		Clauszoline A, a21
		Clauszoline B, a22
		Clauszoline D, a23
		Clauszoline E, a24
		Clauszoline F, a25
		Clauszoline G, a26
		Clauszoline K, a27
		Clauszoline L, a28
		Clausine TY, a29
	รากและเปลือกลำต้น	Clausenin, b1
	Clausenidin, b2	
เปลือกราก	Clausenidinaric acid, b3	

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

Scientific name	Part	Compounds
<i>Clausena excavata</i>	เปลือกกราก	Nordentatin, b4
		Xanthoxylatin, b5
		Claucavatin A, b6
		Claucavatin B, b7
		Xanthyletin, b8
		Kinocoumarin, b9
		Osthol, b10
		Liquiritigenin, c1
		Clausine M, a30
		Clausine W, a31
		Clausine T, a32
		Furoclausine A, a33
		Furoclausine B, a34
		Clausevatin D, a35
		Clausevatin E, a36
	Clausevatin F, a37	
	Clausevatin G, a38	
ราก ใบ	Clauszoline H, a39	
	Clausine L, a40	
	Rutin, c2	

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

Scientific name	Part	Compounds
<i>Clausena excavata</i>	ใบ	Clauszoline M, a41
	เหง้า	Clausenolide -1-Et Ether, d3
	ใบและลำต้น	clausine Z, a42
		Clauslactone R, b11
		Clauslactone S, b12
	ผลและลำต้น	Clauslactone T, b13
Saselin, b14		

ตารางที่ 2-2 สารประกอบของมะฮึก (*Clausena excavata* Burm. f.) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
(Arbab et al., 2011)

Common name	Chemical class	Plant Part	Bioactivity
Clausine-B	Carbazole alkaloid	Stem bark	Anticancer
Clausine-TY	Carbazole alkaloid	Stem bark	Anticancer
Clausenidin, clausarin, dentatin	Pyranocoumarins, coumarin	Root bark	Anticancer
Xanthoxyletin, murrayanine	Carbazole derivatives	Leaves	Antibacterial
Mukonal	Limonoid	Stem bark	Antifungal
Dentatin	Coumarin	Rhizomes	Anti-HIV-1
Clausene-D	Alkaloid	Leaves	Antiplatelet
Sansoakamine	Carbazole alkaloid	Stems	Anti-malarial

2.2 สารสำคัญในพืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรมีมากมายหลายชนิดที่ใช้สำหรับการรักษาโรค สมุนไพรแต่ละชนิดประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด บางชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งเรียกว่าเป็นสารสำคัญซึ่งเป็นสารประกอบที่พืชสร้างขึ้นด้วยกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) รวมทั้งสารอนุพันธ์ต่าง ๆ มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสรรพคุณเป็นยาหรือสารพิษที่พืชสังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อปกป้องตนเองให้รอดจากการถูกทำลายจากเชื้อโรคและศัตรูพืช เช่น เชื้อรา ไวรัส แบคทีเรีย นก และหนู เป็นต้น สารประกอบทางเคมีที่พืชสร้างขึ้นถูกแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

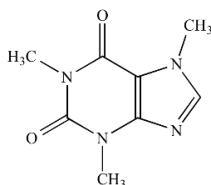
1. สารเมแทบอลิท์ปฐมภูมิ (Primary Metabolite) เป็นสารที่มีอยู่ในพืชทั่วไป เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthesis) รวมทั้งสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ นอกจากนี้ยังมีการหายใจ (Respiration) ที่มีสารประกอบต่าง ๆ เกิดขึ้นมากมาย และมีการสร้างพลังงานด้วย ได้แก่ สารพวกคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) ไขมัน (Lipid) กรดอะมิโน (Amino acid) โปรตีน (Protein) เพียวรีน (Purine) และไพริมิดีน (Pyrimidine)

2. สารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ (Secondary Metabolite) เป็นสารที่ได้มาจากการนำสารเมแทบอลิท์ปฐมภูมิมารวมเข้าสู่กระบวนการชีวสังเคราะห์ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีลักษณะพิเศษพบต่างกันในแต่ละชนิด สังเคราะห์เพื่อให้พืชนั้น ๆ มีความสามารถพิเศษปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี สารออกฤทธิ์สำคัญมีหลายชนิดมีฤทธิ์ทางยาที่ดี บางประเภทอาจเป็นโทษต่อสัตว์ ได้แก่ สารพวก อัลคาลอยด์ (Alkaloids) ฟีนอลิก (Phenolics) อะซีโทจีนิน (Acetogenins) และเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) เป็นต้น (อรุณรัตน์ สันฐิติกวินสกุล, 2548; Wadood et al., 2013)

ในการจำแนกประเภทของสารทั้ง 2 ประเภทนี้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีของสารชนิดต่าง ๆ เช่น คาร์โบไฮเดรตเป็นสารประกอบที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชจากโมเลกุลของน้ำ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งถูกสร้างเป็นโมเลกุลของน้ำตาลและสารโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharides) ได้แก่ น้ำตาลไตรโอส (Trioses) เทโตรส (Tetroses) เพนโทส (Pentoses) เฮกโซส (Hexoses) และเซปโทส (Heptoses) ส่วนสารโพลีแซคคาไรด์ซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ นั้น ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลาย ๆ โมเลกุลเชื่อมต่อกัน ได้แก่ แป้ง (Starch) ซึ่งเป็นอาหารสะสม และเซลลูโลส (Cellulose) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ สารอนุพันธ์ของโพลีแซคคาไรด์ ได้แก่ เด็กซ์ทริน (Dextrins) ฟรุคแทน (Fructans) กรดอัลจีนิค (Alginic acid) วุ้น (Agar) และยาง (Gums)

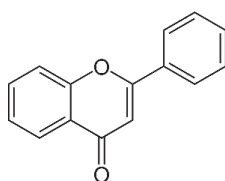
สารทุติยภูมิสามารถแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ดังนี้ (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544; วัณดี กฤษณพันธ์, 2544)

อัลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบมีสูตรโครงสร้างที่ซับซ้อนและแตกต่างกันมากมาย พบได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ราก ต้น ใบ ดอก ผล ฯลฯ แตกต่างตามชนิดของพืช ปัจจุบันพบอัลคาลอยด์ไม่น้อยกว่า 5,000 ชนิด อัลคาลอยด์ส่วนใหญ่มีรสขม ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์มีฤทธิ์เป็นด่าง มีประโยชน์ในทางเภสัช สามารถรักษาโรคได้อย่างกว้างขวาง เช่น ยางฝิ่นมีอัลคาลอยด์มอร์ฟีน (Morphine) ช่วยระงับปวด ควินิน (Quinine) เปลือกชงโคมาใช้รักษาไข้มาเลเรีย รีเซอปีน (Reserpine) รากระย่อมน้อยใช้ลดความดัน คาเฟอีน (Caffeine) ในใบชาและเมล็ดกาแฟช่วยกระตุ้นประสาทส่วนกลาง ทำให้กระปรี้กระเปร่า วินบลาสทีน (Vinblastine) และวินคริสทีน (Vincristine) ในต้นแฉงพวยฝรั่งใช้รักษามะเร็ง และนิโคติน (Nicotine) ในใบยาสูบซึ่งเป็นสารพิษ เป็นต้น



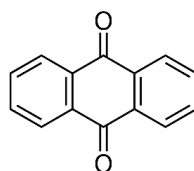
ภาพที่ 2-2 สูตรโครงสร้างของ Caffeine

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นสารสีที่พบในส่วนต่าง ๆ ของพืช มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น C₆-C₃-C₆ ส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วย Pyran ring จับกับ 3 carbon chain และ 1 benzene ring ฟลาโวนอยด์หลายชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น การรักษาโรคเส้นเลือดฝอยเปราะ แก้อักเสบ และขับปัสสาวะ เป็นต้น ในดอกไม้สีเหลืองมักจะพบสารจำพวกฟลาโวนส์ (Flavones) ฟลาโวนอล (Flavonols) ชาลโคนส์ (Chalcones) หรือออโรนส์ (Aurones) ส่วนในดอกไม้สีแดง ม่วง น้ำเงิน มักพบสารจำพวกแอนโทไซยานินส์ (Anthocyanins)



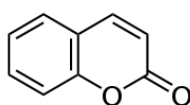
ภาพที่ 2-3 สูตรโครงสร้างของ Flavonoids skeleton

แอนทราควิโนน (Anthraquinones) เป็นสารควิโนนที่พบมากที่สุด อยู่ในรูปอิสระ และ กลัยโคไซด์ มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย 3 วงแหวน ได้แก่ วงแหวนเบนซีน (benzene ring) 2 วง (ซ้ายและขวา) เชื่อมต่อกับวงควิโนน ซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง เป็นสารที่มีสีแดง-ส้ม ส่วน Aglycone ของแอนทราควิโนนละลายได้ดีในด่าง ให้สีชมพู-แดง ละลายได้ในตัวทำละลาย เช่น เบนซีน อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม แอนทราควิโนนเกือบทุกตัวมีจุดหลอมเหลวสูง ส่วนใหญ่นำมาใช้ประโยชน์เป็นยาระบายและยาถ่าย นอกจากนี้ใช้เป็นสีย้อม ยารักษาเชื้อราที่ผิวหนังอีกด้วย ตัวอย่างเช่น Chrysophanol พบในชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* (L.) Roxb.) และ Emodin พบในฝักกูด (*Cassia fistula* L.)



ภาพที่ 2-4 สูตรโครงสร้างของ Anthraquinones skeleton

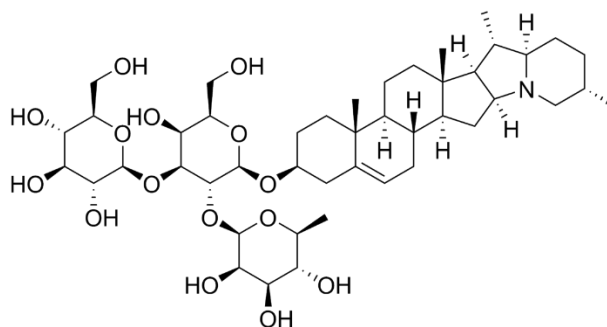
คูมาริน (Coumarin) เป็นแลคโตนของ *O*-hydroxy cinnamic acid ในพืช พบได้ทั้งในรูปอิสระและในรูปกลัยโคไซด์ คูมารินเกือบทั้งหมดในธรรมชาติจะมีออกซิเจนที่ตำแหน่งที่ C-7 (อาจพบในรูปของ hydroxyl หรือ alkoxy) สารบางตัวระเหยได้ นำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น ใช้เป็นยาบำรุงเลือดสารแต่งกลิ่น รักษาโรคต่างขา



ภาพที่ 2-5 สูตรโครงสร้างของ Coumarin skeleton

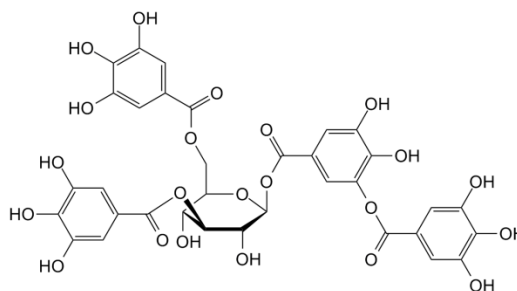
ซาโปนิน (Saponins) หรือซาโปนิน กลัยโคไซด์ มีส่วน Aglycone เป็นสารพวก Steroids หรือ Triterpenoids ส่วนนี้จะจับกับส่วนน้ำตาล หรืออนุพันธ์ของน้ำตาลที่ตำแหน่ง C3 ได้เป็น *O*-glycoside ซาโปนินกลัยโคไซด์มีคุณสมบัติบางอย่างคล้ายสบู่ เช่น สามารถเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดี และทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ เป็นพิษต่อสัตว์เลือดเย็นจึงใช้เป็นสาร

เป็นปลา ตัวอย่างเช่น Glycyrrhizin พบในชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* Linn.) ซึ่งมีอะไกลโคน เป็น Triterpenoids และมีโมเลกุลของน้ำตาล 2 โมเลกุลเกาะตำแหน่งที่ 3



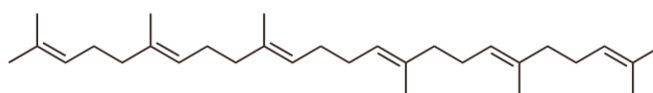
ภาพที่ 2-6 สูตรโครงสร้างของ Saponin

แทนนิน (Tannins) เป็นสารจำพวกโพลีฟีนอลิกที่มีโมเลกุลค่อนข้างใหญ่และซับซ้อน พบได้ทั่วไปในพืชเกือบทุกชนิด เป็นสารที่แยกให้บริสุทธิ์ได้ยากเพราะไม่ตกผลึก พบได้ทั้งในรูปอิสระและรูปกลัยโคไซด์ คุณสมบัติและชนิดของแทนนินขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุล แทนนินใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง เนื่องจากแทนนินสามารถตกตะกอนโปรตีนที่หนังสัตว์ได้ หรือใช้เป็นยาฝาดสมาน เป็นส่วนผสมในยาแก้ท้องเสีย หรือใช้กับบาดแผลที่ผิวหนัง เพื่อให้แผลหายเร็วขึ้น เช่น เปลือกทับทิม (*Punica granatum* L.) เปลือกอบเชย (*Cinnamomum* spp.) ใบฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) เป็นต้น



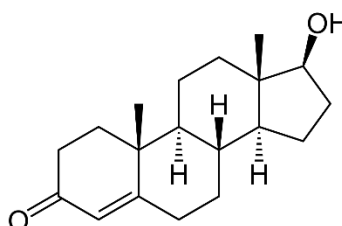
ภาพที่ 2-7 สูตรโครงสร้างของ Tannic acid

เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) เป็นสารทุติยภูมิที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ ประกอบด้วยหน่วยที่เล็กที่สุด เรียกว่า Isoprene unit ซึ่งเป็นสายโซ่กิ่ง (Branch chain) ของคาร์บอน 5 อะตอม เทอร์พีนอยด์ มีโครงสร้างได้หลายแบบ และมีหมู่ฟังก์ชัน (Functional group) ต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการจัดเรียงตัวของคาร์บอนใน Isoprene unit การปิดวงแหวน และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation reaction) หรือปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction reaction) เทอร์พีนอยด์ส่วนใหญ่ละลายได้ดีในไขมัน ไม่มีสี พบได้ในไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ของเซลล์ หรือเนื้อเยื่อพิเศษ ตัวอย่างเช่น Squalene ที่พบมากในปลาฉลาม



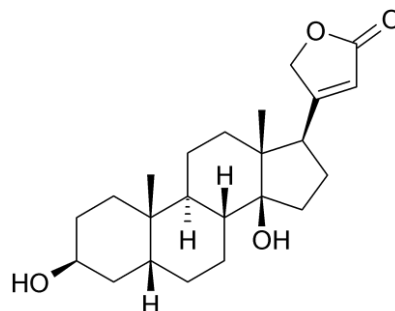
ภาพที่ 2-8 สูตรโครงสร้างของ Squalene

สเตอรอยด์ (Steroids) เป็นสารที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น cyclopentanoperhydrophenanthrene nucleus สารจำพวกสเตอรอยด์มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารในกลุ่ม Tetracyclic Triterpenes มาก นำมาใช้ประโยชน์เป็นยาลดการอักเสบ รักษาโรคหัวใจ ยาขับปัสสาวะ ตลอดจนนำมาสังเคราะห์เป็นฮอร์โมนเพศ และยากุมกำเนิดหลายชนิด



ภาพที่ 2-9 สูตรโครงสร้างของ Testosterone

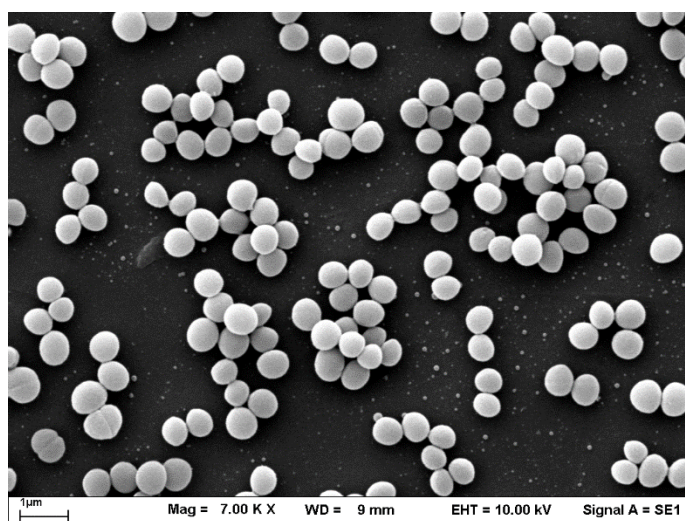
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) เป็นไกลโคไซด์ที่ออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อหัวใจ โดยไปเพิ่มแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ ใช้รักษาโรคหัวใจวาย ผลการรักษาขึ้นอยู่กับชนิดของ aglycone และจำนวนของน้ำตาล น้ำตาลจะช่วยให้คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ละลายได้ดีขึ้น เป็นผลให้การดูดซึมและการกระจายตัวของสารในร่างกายเพิ่มขึ้น จึงช่วยให้การออกฤทธิ์ของสารดียิ่งขึ้น เช่น Digitoxigenin



ภาพที่ 2-10 สูตร โครงสร้างของ Digitoxigenin

2.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก จัดอยู่ในวงศ์ Staphylococcaceae มีลักษณะเป็นทรงกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ 0.5-1.5 ไมโครเมตร) (ภาพที่ 2-2) พบโคโลนี (Colonize) อยู่ในคนปกติบางคน เซลล์มีการแบ่งตัวในแนวระนาบ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ บางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูลทำให้โคโลนีเป็นเมือก (Slime) ทำให้เชื้อมีความทนทานต่อการทำลายของยาปฏิชีวนะและภูมิคุ้มกันของร่างกาย เชื้อ *S. aureus* สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป เช่น Nutrient Agar (NA) Tryptic Soy Agar (TSA) และ Brain Heartinfusion Agar (BHI) เป็นต้น และเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเล็กน้อย (Microaerophilic) เจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง การเจริญในอาหารเหลวจะไม่มีการสร้างรงควัตถุ แต่การเจริญบนอาหารแข็งจะมีการสร้างรงควัตถุโคโลนีมีลักษณะกลม นูนเล็กน้อย ผิวมันเรียบ มีสีขุ่นเป็นสีเหลืองหรือสีเหลืองทอง และโปร่งแสง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-4 มิลลิเมตร เชื้อ *S. aureus* สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544; Harris, Foster, & Richards, 2002) *S. aureus* มีคุณสมบัติทางเคมีที่สำคัญคือ เมื่อนำมาข้อมสีแกรมติดสีแกรมบวก สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส (Catalase) ให้ผลบวก และฮีโมไลซิน (Hemolysin) ชนิดเบต้า ฮีโมไลซิน (Beta-hemolysin) ทำให้เกิดวงใสที่ชัดเจนบน Blood agar สามารถใช้แมนนิทอล (Mannitol) และสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (Coagulase) ที่ทำให้พลาสมาเกิดการแข็งตัว โดยเปลี่ยนไฟบริโนเจน (Fibrinogen) เป็นไฟบริน (Fibrin) โดยไฟบรินที่เกิดขึ้นจะช่วยป้องกันกระบวนการฟาโกไซโทซิส (Phagocytosis) ของเม็ดเลือดขาว และการเข้าจับของยาปฏิชีวนะได้ทำให้ประสิทธิภาพในการก่อโรครุนแรงขึ้น (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544; Harris et al., 2002; Brown et al., 2005)



ภาพที่ 2-11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *S. aureus*

เชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อประจำถิ่นที่สามารถพบได้ทั่วไปตามร่างกายมนุษย์ เช่น โพรงจมูก เยื่อทางเดินหายใจ ผิวหนังและระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น (Costa et al., 2013) และเป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อบนผิวหนังโดยเฉพาะโรคฝีหนอง ทำให้มีอาการอักเสบ บวม แดง ร้อน และมีอาการปวด นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *S. aureus* ได้ตามอุปกรณ์ทางการแพทย์ในโรงพยาบาลและชุมชน โดยเฉพาะเชื้อที่พบภายในโรงพยาบาลมักก่อโรคในลักษณะเชื้อฉวยโอกาส ก่อโรคในผู้ป่วยที่มีร่างกายอ่อนแอหรือติดต่อทางบาดแผลดลอก แผลไฟไหม้ หรือแผลจากการผ่าตัด เชื้อจะบุกรุกเข้าไปในเนื้อเยื่อชั้นใน และเข้าสู่กระแสเลือดแพร่กระจายออกไปตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายและก่อให้เกิดโรคได้ (Stark, 2013; Costa et al., 2013) เช่น (1) โรคติดเชื้อที่ผิวหนัง การเกิดตุ่มหนองที่ผิวหนัง (Impetigo) มักเป็นตุ่มหนองตื้น ๆ อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม พบบ่อยบริเวณใบหน้า แขน ขา เมื่อตุ่มหนองแตกออก กลายเป็นรอยดลอกตื้น ๆ และถ้ามีการติดเชื้อที่ต่อมไขมันจะทำให้เกิดการอักเสบมีการสะสมของเม็ดเลือดขาวที่ตายแล้ว รวมทั้งแบคทีเรียที่เม็ดเลือดขาวกินเข้าไปทำให้เกิดฝี (Furuncle) และฝีฝักบัว (Carbuncles) บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ Epidermolytic toxin (ET) ที่ทำให้เกิดโรคผิวหนังหลุดลอกที่เรียกว่า Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS) (Iwatsuki, Yamasaki, Morizane, & Oono, 2006) (2) โรคปอดบวม (Staphylococcal pneumonia) การติดเชื้อมักเกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่มีร่างกายอ่อนแอ เช่น ป่วยเป็นไข้หวัดใหญ่ โรคหัดหรือคนที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้มีโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อสูงกว่าคนปกติ อาการของโรคอาจเกิดขึ้นทันทีที่ติดเชื้อ จึงจัดว่าเป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยทำให้มีอัตราการตายสูง โดยที่การติดเชื้อ

จะทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อและเกิดฝีจำนวนมากที่ปอด (Iwatsuki et al., 2006) (3) การติดเชื้อที่กระดูก (Osteomyelitis) และข้อ (Pyoarthrosis) การติดเชื้อที่กระดูกมักมีสาเหตุจากการติดเชื้อในกระแสเลือด และเมื่อเชื้อเข้าไปอยู่ในส่วนของไดอะไฟซิส (Diaphysis) ของกระดูกยาว (Long bones) จะทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงและมีการสะสมของหนองบริเวณผิวของกระดูก เกิดเป็นหนองใต้เยื่อหุ้มกระดูก ข้อต่อกระดูกที่มีหนองจากการติดเชื้อจะทำลายกระดูกอ่อนของข้อต่อทำให้เกิดความพิการของข้อต่ออย่างถาวร (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544) (4) โรคที่เกิดจากสารพิษ (Toxins) สารพิษที่สร้างจาก *S. aureus* มีหลายชนิด เช่น ฮีโมไลซิน (Hemolysin) เป็นโปรตีนที่ทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือด ทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตก นอกจากนี้ยังพบว่าบางสายพันธุ์จะสร้างสารพิษ Pantovallentineleukocidin (PVL) เป็นโปรตีนที่ทำลายเม็ดเลือดขาว ทำให้เกิดโรคปอดอักเสบอย่างรุนแรงประมาณร้อยละ 75 ของผู้ป่วยจะเสียชีวิตโดยพบได้จากเชื้อ Community-acquired methicillin resistant *S. aureus* (CA-MRSA) นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ โดยการสร้างเอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) ที่มีคุณสมบัติทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส นานถึง 30 นาที และทนต่อกรดในกระเพาะ ทำให้ผู้ป่วยมีอาการอาเจียนและท้องร่วงอย่างรุนแรง บางสายพันธุ์ทำให้เกิดกลุ่มอาการที่ช็อกซ็อก (Toxic-shock syndrome) ทำให้มีไข้สูง คลื่นไส้ อาเจียน มีความดันต่ำ มีผื่นแดง ตามตัว การทำงานของไตมักจะล้มเหลวและเกิดอาการช็อก (Iwatsuki et al., 2006)

การระบาดของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์คือยาถูกพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2483 จากการตรวจแผลติดเชื้อไฟไหม้จากผู้ป่วยในอังกฤษ โดยพบว่าเชื้อคือยาซัลโฟนาไมด์ (Sulphonamide) ดังนั้นจึงเปลี่ยนไปใช้ยาเพนิซิลลิน (Penicillin) พบว่าใช้ยับยั้งการติดเชื้อได้ผล หลังจากนั้นจึงมีการผลิตยาเพนิซิลลินเพิ่มมากขึ้นและมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่จากการใช้ยาเพนิซิลลินอย่างไม่ถูกวิธี ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาอันเนื่องมาจากเชื้อที่กลายพันธุ์และสามารถสร้างเอนไซม์เบต้า-แลคแทมเมส (Beta-lactamase) ซึ่งเกิดจากการควบคุมของยีนบนพลาสมิดและโครโมโซม โดยทำหน้าที่ทำลายวงแหวนเบต้า-แลคแทม (Beta-lactam ring) ที่เป็นโครงสร้างหลักของยาเพนิซิลลินทำให้ยาไม่สามารถทำงานได้ โดยพบว่าจากการคัดแยกเชื้อ *S. aureus* ในปี พ.ศ. 2489 พบเชื้อที่ดื้อยาเพนิซิลลินร้อยละ 6 จากในโรงพยาบาลของอังกฤษ และเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 50 ในปี พ.ศ. 2491 จากปัญหาการดื้อยา เพนิซิลลินที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทำให้มีการพัฒนายาชนิดใหม่คือเตตราไซคลิน (Tetracycline) อิริโทรมัยซิน (Erythromycin) คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol) และสเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) โดยในระยะแรกยาสามารถรักษาอาการติดเชื้ออย่างได้ผล แต่ต่อมาพบว่าเชื้อสามารถเกิดการดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว เชื้อคือยาปฏิชีวนะที่สำคัญมี 3 ชนิดคือ

Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), Vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA) และ Vancomycin resistant *S. aureus* (VRSA)

Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) คือเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อยาเมธิซิลลิน (Methicillin) จากการที่เชื้อ *S. aureus* ดื้อยาเพนิซิลลินเพิ่มมากขึ้นจึงเกิดการพัฒนายาเพนิซิลลินใหม่ มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2503 มีการพัฒนายาเพนิซิลลินกึ่งสังเคราะห์ (Semisynthetic penicillin) โดยการเปลี่ยนแปลง side chain ของเพนิซิลลิน-จี (Penicillin-G) ทำให้ได้ยาชนิดใหม่ เช่น เมทริซิลลิน นาฟซิลลิน (Nafcillin) และออกซาซิลลิน (Oxacillin) ซึ่งมีความสมบัตินทานต่อการย่อยของเอนไซม์เบต้า-แลคแตม จึงใช้ยาในกลุ่มนี้ในการรักษา *S. aureus* ที่ดื้อยา แต่ในปี พ.ศ. 2504 เริ่มพบเชื้อดื้อยาเมทริซิลลิน โดยทั่วไป *S. aureus* จะไวต่อยาปฏิชีวนะเบต้า-แลคแตม เนื่องจากยาปฏิชีวนะเข้าไปแย่งจับกับ PBPs (Penicillin binding proteins) ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมพันธะเพปไทด์ระหว่าง N-acetylmuramic acid สองโมเลกุลในการสร้างเปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) แต่เชื้อ MRSA มีการพัฒนากลไกในการสร้าง PBP2a ซึ่ง PBP2a มีความสามารถในการจับกับยาในกลุ่มเบต้า-แลคแตมได้ดีมาก ดังนั้นการใช้ยาในกลุ่มเบต้า-แลคแตม เช่น เพนิซิลลิน หรือเพนิซิลลินกึ่งสังเคราะห์ (Semisynthetic penicillin) เช่น ออกซาซิลลิน และเมทริซิลลิน จึงไม่ได้ผลกับเชื้อกลุ่ม MRSA นอกจากนี้ เชื้อ MRSA ยังสามารถต้านยาทั้งสังเคราะห์ชนิดอื่นด้วย เช่น แอมพิซิลลิน (Ampicillin) เมทริซิลลิน นาฟซิลลิน เซฟาโลสปอริน (Cephalosporin) เตตราซัยคลิน อิริโทรมัยซิน คลอแรมฟินิโคล สเตรปโตมัยซิน และ แวนโคมัยซิน (Vancomycin) เป็นต้น และนอกจากนี้ เชื้อ MRSA ยังสามารถสร้างเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมสมาทำลายโครงสร้างเบต้า-แลคแตมของยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ เช่น ออกซาซิลลิน เรียก *S. aureus* สายพันธุ์นี้ว่า Porderline oxacillin resistant *S. aureus* Borderline oxacillin resistant *S. aureus* (BORSA) ซึ่งสามารถรักษาด้วยยาปฏิชีวนะร่วมกัน เช่น Ampicillin/sulbactam และ Amoxicillin/clavulanate เป็นต้น นอกจากนี้การดื้อยา เมทริซิลลินยังเกิดจากการเพิ่มจำนวนของ PBP ชนิดอื่น ที่ไม่ใช่ PBP2a เรียกสายพันธุ์นี้ว่า Modified PBP *S. aureus* (MODSA) แต่ทั้ง BORSA และ MODSA มักไม่ดื้อยาปฏิชีวนะข้ามไปกลุ่มอื่น ๆ (ศศิธร ลิขิตนุกูล, ชัชฌู พันธุ์เจริญ, สถาพร รัตติวิเชียรเลิศ, นลินี อัสวโกที, และยุพิน ศุพุทธมงคล, 2543)

2.4 กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) เป็นยาในกลุ่มหนึ่งของยาต้านจุลินทรีย์ ที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์ หรือได้จากกระบวนการสังเคราะห์สารด้วยปฏิกิริยาเคมี เพื่อใช้ในการรักษาและการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (Bacteriostatic)

หรือใช้ฆ่าเชื้อ (Bactericidal) จุลลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ และนอกจากนี้ยังมีผลต่อเชื้อรา และ โปโตซัว ด้วย แต่ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์มนุษย์ ยาปฏิชีวนะไม่ได้มีประสิทธิภาพต่อไวรัส เช่น ไข้หวัดใหญ่ หรือ ไข้หวัดและอาจจะเป็นอันตรายเมื่อนำมาใช้อย่างไม่เหมาะสม ยาปฏิชีวนะสามารถแบ่งตาม กลไกการออกฤทธิ์ได้ 4 กลุ่ม ได้แก่

1. การออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย แบคทีเรียมีผนังเซลล์ (Cell wall) เป็นส่วนนอกสุดของเซลล์ มีโครงสร้างเป็นสายเพปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของ โปรตีนและน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็น Cross link เป็นชั้นที่แข็งแรงสุดทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ จากภาวะแวดล้อมและสิ่งที่อยู่ในเซลล์ การสร้างผนังเซลล์จะใช้เอนไซม์ทรานสเพปติเดส (Transpeptidase) ซึ่งไม่มีในมนุษย์ การยับยั้งการสร้างผนังเซลล์มีผลทำให้เชื้อถูกทำลาย (-lysis) หรือหยุดการเจริญเติบโต (-static) ยาที่มีกลไกยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ยับยั้ง การสังเคราะห์เพปติโดไกลแคนของแบคทีเรีย ยาในกลุ่มนี้ เช่น เบต้าแลกแทม (β -lactam) และ ไกลโคเพปไทด์ (กิตติศักดิ์ ศรีภา และคณะ 2551)

1.1 ยาปฏิชีวนะกลุ่มเบต้าแลกแทมเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มแรกที้นำมาใช้ในการรักษา โรคติดเชื้อ *S. aureus* โดยสกัดได้จากรา *Penicillium* คือเพนนิซิลิน จี (Penicillin G) และเพนนิซิลิน วี (Penicillin V) ซึ่งยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียในขั้นตอนสุดท้ายโดยเอนไซม์ Cell wall transamidase (CWT) โครงสร้างหลักที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ของยาประกอบด้วยวงแหวนเบต้า-แลกแทม (β -lactam ring) เชื่อมต่อกับวงแหวนคาร์บอนขนาด 5 อะตอมหรือ 6 อะตอม ยาปฏิชีวนะ ในกลุ่มเบต้า-แลกแทมมีหลายชนิดได้แก่ ยาในกลุ่มเพนนิซิลินและเซฟาโลสปอริน (Cephalosporin)

เพนนิซิลินจัดเป็นสารที่มีวงแหวนเบต้า-แลกแทมเป็นโครงสร้างพื้นฐาน ออกฤทธิ์ โดยห้ามการสร้างผนังเซลล์ โดยจับกับ Penicillin-binding-protein (PBP) ชนิด 1-3 ทำให้ไม่เกิด Transpeptidation จึงทำให้ไม่มีการสร้างเพปติโดไกลแคนอันเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ แบคทีเรีย แบคทีเรียถูกยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ทำให้สภาพเซลล์ไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถทนทาน ต่อความกดดันภายในเซลล์ที่สูงกว่าสภาพภายนอกได้ เซลล์ของแบคทีเรียจึงแตก (Autolysis) และ ตายไปในที่สุด

เซฟาโลสปอรินจัดเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มเบต้า-แลกแทมที่มีโครงสร้างหลักเป็นวง ซีเฟม (Cephem) ประกอบด้วยวงแหวนเบต้า-แลกแทมเชื่อมต่อกับวงแหวน Dihydrothiazine ยากลุ่มนี้ทนต่อเอนไซม์ Penicillinase ใช้ได้ดีในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

1.2 ยาปฏิชีวนะกลุ่มไกลโคเพปไทด์เป็นสารพวก Complex glycopeptide ที่มีฤทธิ์ ฆ่าแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น โดยเฉพาะกลุ่ม Staphylococci และ เชื้อ MRSA โดยจะไปรวมจับกับ

Acyl-D-alanyl-D-alanine อย่างถาวร ทำให้ไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ เช่น แวนโคมัยซิน (Vancomycin) และ ไตโคแพลนิน (Teicoplanin) ได้มาจากเชื้อ *Nocardia orientalis* และ *Actinophanes teichomyceticus* โดยมีโครงสร้างประกอบด้วยเพปไทด์ (Peptide) ที่มีกรดอะมิโน 7 ตัว มีเป้าหมายเหมือนยาในกลุ่มเบต้า-แลคแทม คือยับยั้งกระบวนการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (กิตติศักดิ์ ศรีภา และคณะ 2551; วิรัช พุททวงศ์ และวยา เสงี่ยมประชา, 2550)

2. การรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) เยื่อหุ้มเซลล์เป็น Osmotic barrier ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้สารต่าง ๆ เข้าหรือออกจากเซลล์ง่ายเกินไป อีกทั้งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งเพื่อคัดเลือกสารต่าง ๆ เข้าหรือออกจากเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียยังมีองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับ Electron transport และ Oxidative phosphorylation เพื่อเป็นแหล่งให้พลังงาน โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องอยู่ในส่วนของ Oxysome ตัวอย่างของยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่สามารถรบกวนการทำงานต่าง ๆ ของเยื่อหุ้มแบคทีเรีย ได้แก่ ยาในกลุ่ม Tyrocidins เช่น Tyrocidin A ยาในกลุ่ม Gramicidins เช่น Gramicidins S ยาในกลุ่ม Polymyxins เช่น Polymyxin B ยาในกลุ่ม Ionophores เช่น Valinomycin ซึ่งยาปฏิชีวนะกลุ่ม Tyrocidins และ Gramicidins นี้สามารถออกฤทธิ์รบกวนของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สร้างพลังงานในแบคทีเรียน้อยลง นอกจากนี้ยาทั้งสองกลุ่มยังทำลาย Osmotic barrier ของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย สำหรับยาในกลุ่ม Polymyxins สามารถจับกับ Ionized phosphate group ใน Phospholipid ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ Lipoprotein ถูกทำลาย ส่วนยาในกลุ่ม Ionophores ช่วยเพิ่มการผ่านของ Inorganic ions ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น ยาแวนโคมัยซินสามารถจับกับ K^+ ทำให้การผ่านของไอออนเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้น จนทำให้เกิดการสะสมและมีผลกระทบต่อการทำงานภายในเซลล์ (กิตติศักดิ์ ศรีภา และคณะ 2551; วิรัช พุททวงศ์ และวยา เสงี่ยมประชา, 2550)

3. การยับยั้งการสร้างโปรตีน กระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (Protein synthesis) ได้จากการแปลรหัสบน mRNA หรือเรียกว่า Translation กระบวนการนี้เกิดขึ้นโดยการทำงานของไรโบโซม (Ribosome) ปกติแบคทีเรียจัดเป็นเซลล์โพรแคริโอต (Prokaryote) ซึ่งมีไรโบโซมที่ใช้ในการสร้างโปรตีนเป็นชนิด 70S ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยคือ 30S และ 50S ในหน่วยย่อย 30S แบ่งได้เป็น 16S rRNA และในหน่วยย่อยของ 50S แบ่งย่อยได้เป็น 23S และ 5S rRNA ขณะที่ไรโบโซมของสัตว์ชั้นสูง ซึ่งจัดเป็นเซลล์ยูแคริโอต (Eukaryote) มีขนาดใหญ่กว่าคือเป็นชนิด 80S แบ่งเป็นชนิดย่อยหน่วยย่อย 40S และ 60S ไรโบโซม 70S ของเซลล์โพรแคริโอตเป็นเป้าหมายหลักในการออกฤทธิ์ของยาที่จะยับยั้งการสร้างโปรตีน ยาแต่ละชนิดออกฤทธิ์ที่ไรโบโซมในส่วนย่อยแตกต่างกันไป ตัวอย่างเช่น อะมิโนกลัยโคไซด์ และเตตราไซคลินออกฤทธิ์กับไรโบโซม 30S ในขณะที่แมค-โครไลด์ ลินโคซายด์ คลอแรมเฟนิคอล สเตอริบโทแกรมมิน และออกซาโวลิดิโนน ออกฤทธิ์ที่ไรโบโซม 50S ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ และ

การซ่อมแซมตัวเอง ผลที่เกิดขึ้นกับตัวเชื้อส่งผลให้ยาในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือทำให้แบคทีเรียตายได้ (กิตติศักดิ์ ศรีภา และคณะ 2551; วีรัชย์ พุททวงศ์ และวยา เล็งประชา, 2550)

4. การยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) กระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์โปรตีน เอนไซม์ และขั้นตอนของการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ ซึ่งกรดนิวคลีอิกที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตมี 2 ชนิด คือ Deoxyribonucleic acid (DNA) และ Ribonucleic acid (RNA) DNA และ RNA เกิดจาก Polymerization ของนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ซึ่งนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยฟอสเฟต (Phosphate) จับกับน้ำตาลสลับกันเป็นแกน และจับกับ Nitrogenous base ชนิดหนึ่งชนิดใด ซึ่ง Base ที่สำคัญที่พบใน DNA คือ Adenine (A) Guanine (G) Cytosine (C) และ Thymine (T) ส่วนใน RNA จะมี Uracil (U) แทน T ทั้ง A และ G เป็น Purine base ส่วน C T และ U เป็น Pyrimidine base น้ำตาลที่พบใน DNA เป็น Deoxyribose ส่วนที่พบใน RNA เป็น Ribose กลุ่มยาต้านแบคทีเรียส่วนใหญ่ยับยั้งการทำงานของกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกรสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ส่วนใหญ่เป็นยาต้านแบคทีเรียที่สังเคราะห์ มีหลายชนิดสำหรับตัวอย่างยาต้านเชื้อแบคทีเรีย คือยาปฏิชีวนะในกลุ่มซัลโฟนาไมด์ (Sulfonamides) กลุ่มไดอะมิโนไพริมิดีน (Diaminopyrimidines) กลุ่มโฟร์-ควิโนโลน (4-quinolones) และกลุ่มแอค-ติโนไมซิน (Actinomycin) (กิตติศักดิ์ ศรีภา และคณะ 2551; วีรัชย์ พุททวงศ์ และวยา เล็งประชา, 2550)

2.5 กลไกการดื้อยาของแบคทีเรีย

การใช้ยาปฏิชีวนะกันอย่างแพร่หลาย ใช้อย่างไม่ถูกต้องและใช้เกินความจำเป็นเช่นการนำมาใช้ในด้านเกษตร ปศุสัตว์ การประมงและการรักษาตามคลินิก การใช้อย่างไม่เหมาะสม ส่งผลให้แบคทีเรียมีพัฒนาการดื้อยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่อง แบคทีเรียสามารถพัฒนาพันธุกรรมให้สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ จากเชื้อที่ไวต่อยาปฏิชีวนะต่อมาเกิดการดื้อยาในภายหลังเพื่อความอยู่รอด ยีนดื้อยาในแบคทีเรียอาจจะปรากฏอยู่บน โครโมโซมหรือพลาสมิด การพัฒนาทางพันธุกรรมนี้ทำให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรียซึ่งมีกลไก 4 ประเภท (มาลิน จุลศิริ, 2540; Crossley, Jefferson, Archer, & Fowler Jr, 2009)

1. การทำลายฤทธิ์ของยาคด้วยเอนไซม์ แบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์มายับยั้งหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยา มีผลทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้เนื่องจากยาไม่สามารถเข้าไปจับกับบริเวณยับยั้งของเชื้อได้ ซึ่งเป็นกลไกหลักที่สำคัญและพบบ่อยที่สุดในกลไกการดื้อยาทั้งหมด ยาที่นิยมนำมาใช้ในคลินิกเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มเบต้า-แลคแตมจากการใช้ยา

ปฏิชีวนะกลุ่มเบต้า-แลคแตม พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิดคือต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้ เช่น เชื้อ *S. aureus* ที่ต่อต่อยาเพนนิซิลินหรือยาเซฟฟาโลสปอริน เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ Bata-lactamase ที่สามารถย่อยสลายวงแหวนเบต้า-แลคแตม ของยาบางชนิด ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ คือ Penicilloic acid และ Cephalosporoic acid ที่ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ ส่วนเชื้อที่ต่อยา Chloramphenicol เนื่องจากมีการสร้างเอนไซม์ Chloramphenicol acetyltransferase ที่เกิดปฏิกิริยาอะซิทิลเลชัน (Acetylation) ที่หมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl Group) ใน chain ของยา Chloramphenicol ทำให้ได้ 1,3-diacetoxychloramphenicol ซึ่งไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ ส่วนเชื้อที่ต่อยาในกลุ่ม Aminoglycoside พบว่ามีเชื้อหลายชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยา Acetylation Adenylation หรือ Phosphorylation ที่หมู่ Amino หรือ Hydroxyl ของยาบางชนิด ทำให้ยาเหล่านี้ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ (กิตติศักดิ์ ศรีภา และคณะ 2551; พรรณพิศ สุวรรณกุล, ชุมนาสวนกระต่าย และธีรพงษ์ ตัฒทวิเชียร, 2549)

2. การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา กลไกการคือยาปฏิชีวนะประเภทนี้เกิดจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ต่อยาปฏิชีวนะมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีนเพื่อให้สร้างโปรตีนที่ไปจับกับเป้าหมายได้ลดลง แบคทีเรียจึงไม่ถูกยับยั้งด้วยยาปฏิชีวนะนั้น ๆ แต่ความแตกต่างของยาปฏิชีวนะในแต่ละกลุ่มหรือในแต่ละชนิดก่อให้เกิดการคือยาแตกต่างกัน กลไกการคือยาชนิดนี้มักเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ เช่น การคือยาในกลุ่มเบต้า-แลคแตม เชื้อจะเปลี่ยนเป้าหมายของยา คือ Penicillin binding protein (PBP) ซึ่งมีได้ 2 ลักษณะ คือ การสร้าง PBP ชนิดใหม่ที่จับไม่ได้ให้มากขึ้น หรือ ไปลดการสร้าง PBP ชนิดที่จับได้ ทั้งสองกรณีล้วนส่งผลให้เกิดการคือยากกลุ่มเบต้า-แลคแตม ซึ่งเกิดการคือยาในกลุ่ม Penicillinase-resistant penicillin, Cephalosporins, Monobactam และ Carbapenams ของเชื้อ MRSA ลักษณะการคือยาเป็นผลมาจากการได้รับยีน *mecA* โดยทำหน้าที่สร้าง PBP ชนิดพิเศษ คือ PBP2 ไปจับกับยาในกลุ่มเบต้า-แลคแตมได้ไม่ดีจึงไม่ถูกยับยั้ง นอกจากนี้การสร้างผนังเซลล์โดยไม่ใช่ D-Ala-D-Ala-containing pentapeptide ที่เป็นเป้าหมายของ Glycoside ของเชื้อ Enterococci ทำให้เชื้อคือยากกลุ่ม Glycopeptides รวมทั้งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบนยีนที่สร้าง DNA Gyases และ Topoisomerases จึงเกิดการคือยาในกลุ่ม Quinolones อย่างไรก็ตามการคือยาดังกล่าวพบได้น้อยในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แต่พบมากกว่าในเชื้อแกรมบวก (พรรณพิศ สุวรรณกุล และคณะ, 2549; ภัทรชัย กิรติสิน, 2549)

3. การลดการผ่านของสารเข้าสู่เซลล์ การลดปริมาณยาปฏิชีวนะในเซลล์โดยการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเมมเบรนแบ่งเป็น 1) การลดความสามารถของเมมเบรนในการนำยาเข้าสู่เซลล์ ทำให้อาไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ 2) โดยการเพิ่มการปั๊มยาออกนอกเซลล์ (active efflux)

ยาในกลุ่มเตตราไซคลิน (Tetracycline) และแมคโครไลด์ การเข้าสู่ภายในเซลล์แบคทีเรียของยาต้านจุลชีพบางชนิด เช่น เบต้า-แลคแตมไม่สามารถซึมผ่านเข้าได้โดยตรง ต้องใช้ช่องทางในการนำยาเข้า เรียกว่า Porin โดยปกติ Porin เป็นก้อนโปรตีนที่ประกอบขึ้นให้มีลักษณะคล้ายช่องที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) สำหรับนำสารที่ละลายน้ำได้ดีเข้าสู่เซลล์เมื่อเชื้อลดการสร้าง Porin ช่องทางสำหรับนำยาเข้าเซลล์จึงลดลง ส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อยาต้านจุลชีพได้ (มาลิน จุลศิริ, 2540)

4. การเพิ่มปริมาณการผลิตสารและเอนไซม์เพื่อแข่งขันกับปริมาณยา พบว่ายาปฏิชีวนะบางชนิดมีสูตร โครงสร้างคล้ายสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม ทำให้เกิดการแย่งจับเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการ หากเชื้อสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตสารดังกล่าวเพื่อแข่งกับปริมาณยาสามารถแย่งจับเอนไซม์กลับคืนมา เพื่อดำเนินการเมแทบอลิซึมต่อไปได้ เช่น การเพิ่มระดับของ p-Aminobenzoic acid ส่งผลให้เชื้อสามารถดื้อยาในกลุ่ม Sulfonamides ขณะเดียวกันหากมีการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ชนิดที่ถูกขัดขวางการทำงานด้วยยาปฏิชีวนะ เชื้อก็สามารถดื้อยาได้ เนื่องจากยังมีเอนไซม์บางส่วนยังคงทำงานต่อไปได้ถึงแม้ว่าเอนไซม์บางส่วนจะถูกขัดขวาง เช่น การเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์ Xanthosine monophosphate aminase ทำให้เชื้อดื้อต่อยา Psicofuranine ได้ หรือถ้ามีการเพิ่มเอนไซม์ Dihydropteroate synthetase มีผลทำให้เชื้อดื้อยา Trimethoprim ได้ (พรรณพิศ สุวรรณกุล และคณะ, 2549)

2.6 การสกัดสารจากพืชที่ใช้ในการทดลอง

การสกัดของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสามารถสกัดโดยใช้สารละลายอินทรีย์หรือน้ำเป็นตัวทำละลาย โดยการนำสมุนไพรอบให้แห้งชั่งน้ำหนักแห้ง บดให้ละเอียดใส่ในถุงผ้าขาวบาง จากนั้นแช่ถุงผ้าในตัวทำละลายเอทานอลที่ต้องการเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5-7 วัน ทำการเขย่าโหลแช่ทุกวันในช่วงเวลาเช้าและเย็น เมื่อครบกำหนดเวลาในการแช่ให้นำถุงผ้าออกและแช่ในตัวทำละลายเอทานอลใหม่ซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำสารสกัดเอทานอลที่ได้มารวมกันกรองด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และนำไปทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) และเครื่องดูดสุญญากาศ (Vacuum pump) ตามลำดับ ช่างน้ำหนักส่วนสกัดเอทานอลที่ได้และเก็บไว้ในโหลแก้วที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนสกัดเอทานอลที่ได้มาละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเติมน้ำเพื่อให้ละลายสารสกัดให้หมด และเติมเฮกเซน ในกรวยแยกเขย่าและไขส่วนที่เป็นน้ำออก จากนั้นนำส่วนน้ำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทในกรวยแยกอีกครั้งและทำการไขส่วนน้ำออก ตามแผนผังการสกัดในรูปที่ 3 จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

แบบหมุนและเครื่องดูดสุญญากาศ ตามลำดับซึ่งน้ำหนักส่วนสกักน้อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และ น้ำที่ได้นำไปเก็บไว้ไม่ให้โดนแสงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (อนุชิต พลับรูการ, 2545)

2.7 โครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin-layer chromatography หรือ TLC)

โครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin-layer chromatography หรือ TLC) เป็นเทคนิค เกี่ยวข้องกับการกระจายของสารระหว่างวัฏภาคหนึ่งซึ่งเป็นตัวดูดซับที่เคลือบอยู่บนแผ่นแก้ว แผ่น อลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติกแข็งและตัวทำละลาย ซึ่งเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เคลื่อนผ่านตัวดูดซับ TLC จึงจัดเป็น Solid-liquid adsorption chromatography เช่นเดียวกับคอลัมน์โครมาโตกราฟีแต่เดิม TLC ใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพ สำหรับสารประกอบอินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยเพื่อหาจำนวนสารที่อยู่ใน สารผสมและใช้พิสูจน์สาร โดยเปรียบเทียบ R_f ของสารกับสารแท้ (Authentic sample) TLC ยังใช้ สำหรับหาตัวทำละลาย ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการแยกสารผสมที่มีปริมาณมาก โดยวิธีคอลัมน์ โครมาโตกราฟี

การทำ TLC ต้องเริ่มด้วยการเตรียมแผ่นที่มีวัฏภาคหนึ่งเคลือบอยู่ โดยทั่วไปสามารถทำได้ เอง โดยจุ่มแผ่นกระจก (ขนาดประมาณแผ่นสไลด์ที่ใช้กับกล้องจุลทรรศน์) ที่สะอาดลงในสาร แขนวลอย ที่ชั้นเหลว (Slurry) ของสารที่เป็นวัฏภาคหนึ่งในตัวทำละลายที่เหมาะสม ยกขึ้นมาให้ได้ การเคลือบที่ สม่ำเสมอแล้วทิ้งให้แห้ง ในปัจจุบันมีการทำแผ่นทินแลร์สำเร็จรูปซึ่งเคลือบวัฏภาคหนึ่ง ไว้บนแผ่นอะลูมิเนียมบาง ๆ จำหน่าย โดยมักผสมสารเรืองแสง เช่น ซิงค์ซัลไฟด์ (ZnS) ไว้ด้วย ซึ่ง จะทำให้ สามารถสังเกตเห็นด้วยตำแหน่งของสาร โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต UV

ควรเตรียมสารตัวอย่างให้อยู่ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นประมาณ 1 % แม้ว่า ตัวอย่างนั้น จะเป็นของเหลวอยู่แล้วก็ตาม แล้วจุด (Spotting) ลงบนแผ่นทินแลร์ ให้ห่างจากปลาย ด้านล่างขึ้นมาประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร นำแผ่นดังกล่าวไปจุ่มลงในบีกเกอร์ ที่มีตัวทำละลายใส่ไว้ เพียงเล็กน้อยโดยให้ระดับตัวทำละลายสูง ไม่เกินระดับที่เติมสารตัวอย่าง (อย่าให้ท่วมจุดสาร ตัวอย่าง) และอิมตัวด้วยไอของตัวทำละลาย (ซึ่งต้องเตรียมไว้ก่อนหน้านี้นี้โดยใช้กระดาษกรองบุไว้ ที่ผนังด้านในของบีกเกอร์แล้วปิดด้วยกระดาษนาฬิกา) คอยสังเกตรอยเปียกของตัวทำละลายที่ซึมขึ้น ด้านบนของแผ่น TLC ขอบของรอยเปียกของตัวทำละลายนี้เรียกว่า Solvent front เมื่อมาเกือบถึง ปลายด้านบนของแผ่น (ห่าง 92 จากปลายบนลงมา 0.5-1 เซนติเมตร) ก็ให้รีบเอาแผ่นออก ใช้ดินสอด ขีดบ่งรอย Solvent front ไว้ เพื่อใช้ในการ คำนวณค่า R_f (Retention factor) ต่อไป ระหว่างที่รอต้อง แน่ใจว่าแผ่น TLC อยู่ในระบบปิดตลอดเวลา ค่า R_f นี้เป็นอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ จากจุดที่ทำการเติมไปถึงตำแหน่งสุดท้ายเปรียบเทียบกับระยะทางทั้งหมดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (จาก Spotting ถึง Solvent front) เนื่องจาก สารต่างชนิดกันจะถูกดูดซับด้วยวัฏภาคหนึ่งได้ไม่เท่ากัน

จึงถูกตัวทำละลายพาเคลื่อนที่ขึ้นมาสูงได้ไม่เท่ากัน การแยกจึงเกิดขึ้น ค่า R_f ของสารแต่ละชนิด ในวัฏภาคหนึ่ง และวัฏภาคเคลื่อนที่หนึ่ง ๆ จะเป็นค่าคงที่ และใช้ในการบ่งบอกชนิดของสารได้โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

ค่า R_f เป็นค่าประจำตัวของสารประกอบภายใต้สภาวะต่าง ๆ (ตัวดูดซับ, ตัวทำละลาย และความหนาของชั้นตัวดูดซับ) ที่กำหนด ค่านี้แปรเปลี่ยนได้ถ้าสภาวะในการทดลองเปลี่ยน ค่า R_f ถูกนิยามไว้ดังนี้ (ธีรยุทธ วิไลวัลย์, ศุภสร วณิชเวสารุ่งเรือง, วรวรรณ พันธุมนาวิน, และวิภาวี โฮเว่น , 2546)

$$R_f = \frac{\text{ระยะที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

2.8 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography)

คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้แยกสารต่าง ๆ มากมายหลายชนิด อาทิ การแยก องค์ประกอบต่าง ๆ ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ การแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากปฏิกิริยา เทคนิคนี้สามารถปรับขนาดคอลัมน์ให้เหมาะกับปริมาณสารที่ต้องการแยกได้โดยมีวัฏภาคหนึ่งที่เป็นของแข็ง เช่น ซิลิกาเจลบรรจุอยู่ในคอลัมน์ จากนั้นจึงเติมสารผสมที่ต้องการแยก ลงไปด้านบนของคอลัมน์ก่อนที่จะผ่านตัวทำละลายที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ลงไปเพื่อทำให้เกิดการแยก วัฏภาคหนึ่งจะมีแรงดึงดูดกับสารชนิดต่าง ๆ กันด้วยความแรงต่างกัน ซิลิกาเจลมีความมีขั้วสูงจึงมีแรงดึงดูดกับสารที่มีขั้วมาก ๆ ได้แข็งแรงกว่าสารไม่มีขั้ว ดังนั้นตัวทำละลายหรือวัฏภาคเคลื่อนที่ จึงชะสารต่างชนิดออกมาไม่พร้อมกัน สารที่ถูกดูดซับไว้ได้ดี (สารมีขั้วสูง ๆ) จะออกมาจากคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาได้ช้ากว่าสารที่ถูก ดูดซับได้ไม่ดี (สารมีขั้วต่ำ ๆ)

สารที่นิยมใช้เป็นวัฏภาคหนึ่งได้แก่ ซิลิกาเจล อะลูมินา เซลลูโลส ซูโครส แป้ง แคลเซียมคาร์บอเนต โดยซิลิกาเจล และอะลูมินาเป็นวัฏภาคหนึ่งที่มีความนิยมนิยมมากที่สุด โดยทั่วไปอะลูมินาจะมีขั้วสูงกว่าซิลิกาเจล ซิลิกาเจลนั้นใช้ในการแยกสาร ได้เกือบทุกชนิด ยกเว้นสารที่มีขั้วมาก ๆ หรือสารที่มีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นเบสมาก ๆ ส่วนอะลูมินานั้นมีความว่องไวในการดึงดูดสารตัวอย่างหรือกัมมันตภาพ (activity) หลายระดับขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำ (ค่า X) ที่อยู่ในโครงสร้างของ $Al_2O_3 \cdot xH_2O$ พวกที่ปราศจากน้ำจะมีแอกติวิตีสูงสุด เมื่อเติมน้ำลงไปก็จะมีแอกติวิตีลดลงตามลำดับ

ปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดว่าสารตัวอย่างจะออกมาเร็วหรือช้าอย่างไร และการแยกจะเป็นไปได้โดยมีประสิทธิภาพดีหรือไม่ ได้แก่ แรงดึงดูดระหว่างสารตัวอย่างกับวัฏภาคหนึ่ง และการละลายของสารตัวอย่างในวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนั้น ความมีขั้วของสารที่จะแยกและความมีขั้วของตัวทำ

ละลายที่เลือกใช้ (วัฏภาคเคลื่อนที่) จึงมีผลต่อการแยกมาก โดยทั่วไปแล้วพอจะเรียงลำดับความมีขั้วของสารได้ดังนี้ alkanes < alkenes < dienes < aromatic hydrocarbons < ethers < esters < ketones < aldehydes < amines < phenols < alcohols และ organic acids ตามปกติสารไม่มีขั้วจะเคลื่อนที่ลงมาอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามโมเลกุลที่มีผลด้วยเช่นกัน กล่าวคือถ้าสารไม่มีขั้วซึ่งมีมวลโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าสารที่ไม่มีขั้วที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า

ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีมักเริ่มต้นด้วยการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีขั้วน้อย ๆ เพื่อชะสารที่ถูกดูดซับไว้ไม่ให้ออกมาก่อน จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วมากขึ้นตามลำดับเพื่อชะสารที่ถูกดูดซับได้ดีขึ้นตามลำดับ ในบางกรณีถ้าหาตัวทำละลายเดี่ยวที่มีขั้วตามต้องการไม่ได้ก็อาจจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายผสม ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีเรียงตามลำดับจากมีขั้วน้อยไปมาก ได้แก่ petroleum ether หรือ hexane < cyclohexane < chloroform < carbon disulfide < diethyl ether < dichloromethane < acetone < 2-propanol < methanol

ความสามารถในการชะ (Eluent strength) จะมีความสัมพันธ์กับสภาพขั้ว โดยลำดับนี้เปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวดูดซับ (วัฏภาคนิ่ง) ตัวทำละลายที่มีขั้วมากจะมีความสามารถในการชะสูงกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยเมื่อตัวดูดซับเป็นสารมีขั้ว เช่น ซิลิกาเจล แต่จะมีความสามารถในการชะต่ำกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยเมื่อตัวดูดซับเป็นสารไม่มีขั้ว เช่น ถ่านกัมมันต์ หรือซิลิกาเจลที่ถูกเคลือบผิวด้วยหมู่ไฮโดรคาร์บอนหรือหมู่ไฮโดรเจน (ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และคณะ, 2546)

2.9 ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (Geographic Information System : GIS)

ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์เป็นศาสตร์สารสนเทศที่เน้นการบูรณาการ เทคโนโลยีทางการสำรวจ การทำแผนที่ และการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพื้นที่เข้าด้วยกัน เพื่อศึกษาเกี่ยวกับพื้นที่บนโลกประกอบด้วย ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (GIS) การรับรู้จากระยะไกล (RS) และระบบกำหนดตำแหน่งบนพื้นโลก (GPS) เทคโนโลยีทั้งสามประเภทนี้สามารถทำงานเป็นอิสระต่อกัน หรือสามารถนำมาเชื่อมโยงร่วมกัน ทำให้ประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ เช่น การจัดทำแผนที่ภูมิประเทศ การทำแผนที่เฉพาะเรื่อง การทำแผนที่โลกดิจิตัล การทำแผนที่แม่บทชุมชน แผนที่โครงสร้างพื้นฐานชุมชน การสำรวจและการทำแผนที่เพื่อพัฒนาท้องถิ่น การทำผังเมืองและชนบท รวมถึงการจัดการทรัพยากรธรรมชาติ การจัดการภัยพิบัติต่าง ๆ หรือแม้แต่ในเชิงธุรกิจก็ได้มีการนำเทคโนโลยีภูมิสารสนเทศศาสตร์มาประยุกต์ใช้และประกอบการวางแผนการตัดสินใจในเรื่องต่าง ๆ ได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ

1. องค์ประกอบของระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์

องค์ประกอบหลักของระบบ GIS จัดแบ่งออกเป็น 5 ส่วนใหญ่ ๆ คือ บุคลากร (People) ข้อมูล (Data) อุปกรณ์คอมพิวเตอร์ (Hardware) โปรแกรม (Software) และ ขั้นตอนการทำงาน (Methods) โดยมีรายละเอียดของแต่ละองค์ประกอบดังต่อไปนี้

1.1 บุคลากร (Personnal) บุคลากรที่เกี่ยวข้องกับการทำงานในระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ เช่น ผู้นำเข้าข้อมูล ช่างเทคนิค ผู้ดูแลระบบฐานข้อมูล ผู้เชี่ยวชาญสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล ผู้บริหารซึ่งต้องใช้ข้อมูลในการตัดสินใจ บุคลากรจะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดในระบบ GIS เนื่องจากถ้าขาดบุคลากร ข้อมูลที่มีอยู่มากมายมหาศาลนั้น ก็จะเป็นเพียงขยะไม่มีคุณค่าใดเลยเพราะไม่ได้ถูกนำไปใช้งาน อาจจะกล่าวได้ว่า ถ้าขาดบุคลากรก็จะมีระบบ GIS

1.2 ข้อมูล (Data) ข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จากแหล่งข้อมูลที่จะใช้ในระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์และถูกจัดเก็บในรูปแบบของฐานข้อมูล โดยได้รับการดูแลจากระบบจัดการฐานข้อมูล หรือ DBMS โดยแหล่งข้อมูลจะอยู่ในรูปแบบของข้อมูลกระดาษและข้อมูลเชิงเลข ซึ่งข้อมูลจะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญรองลงมาจากบุคลากร ข้อมูลทางภูมิศาสตร์มีที่นำมาประมวลในระบบนี้มี 2 รูปแบบ คือ ข้อมูลเชิงพื้นที่ และข้อมูลที่ไม่ใช่เชิงพื้นที่

1.2.1 ข้อมูลเชิงพื้นที่ คือ ข้อมูลที่แสดงถึงลักษณะทางด้านกายภาพของสิ่งต่าง ๆ ที่ปรากฏอยู่บนพื้นผิวโลก โดยสามารถถ่ายทอดออกมาในรูปแบบการแสดงผลบนแผนที่ได้ในลักษณะของสัญลักษณ์ประกอบด้วย จุด เส้น และพื้นที่ ข้อมูลเชิงพื้นที่ดังกล่าวต้องสามารถอ้างอิงกับพิกัดทางภูมิศาสตร์ได้ ลักษณะของข้อมูลเชิงพื้นที่ในระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ยังสามารถจำแนกออกได้ดังต่อไปนี้

1.2.1.1 แรสเตอร์ (Raster) ข้อมูลแบบแรสเตอร์มีโครงสร้างเป็นช่องสี่เหลี่ยมเรียกว่าจุดภาพ หรือ โครงสร้างข้อมูลแบบแรสเตอร์สามารถจัดเก็บข้อมูลเชิงพื้นที่โดยการแทนค่าข้อมูลจากพื้นที่จริงลงในจุดภาพซึ่งมีตำแหน่งตามแนวแกน X และ Y ตรงกัน ค่าที่เก็บในแต่ละจุดภาพสามารถเป็นได้ทั้งข้อมูลลักษณะสัมพันธ์ หรือรหัสที่ใช้อ้างอิงถึงข้อมูลลักษณะสัมพันธ์ที่เก็บอยู่ในฐานข้อมูลก็ได้

1.2.1.2 เวกเตอร์ (Vector) คือ ข้อมูลที่สร้างขึ้นโดยอ้างอิงกับข้อมูลแรสเตอร์ เพื่อใช้เป็นตัวแทนของสิ่งที่ปรากฏอยู่บนพื้นที่จริงโดยจะแสดงในรูปแบบของจุด เส้น และพื้นที่ ซึ่งในทางคณิตศาสตร์คุณสมบัติของเวกเตอร์ต้องประกอบด้วย จุดเริ่มต้น ขนาด และทิศทาง

1.2.1.3 รูปแบบของจุด (Point Features) เป็นหน่วยย่อยที่จุดของเวกเตอร์ ซึ่งจุดเริ่มต้น โดยขนาดและทิศทางมีค่า 0 จุดเป็นเพียงตำแหน่งซึ่งไม่สามารถวัดพื้นที่ได้

1.2.1.4 รูปแบบของเส้น (Linear Features) ประกอบด้วยเวกเตอร์ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นตรงเรียงต่อเนื่องกันเป็นลำดับเส้นมีเพียง 1 มิติ คือ มีความยาว แต่ไม่มีความกว้าง

1.2.1.5 รูปแบบของพื้นที่ (Polygon Features) ประกอบด้วยเวกเตอร์ที่เรียงต่อเนื่องกันเป็นอนุกรม ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นปิด ดังนั้น ข้อมูลประเภทอาณาบริเวณจึงสามารถวัดพื้นที่ได้

1.2.2 ข้อมูลที่ไม่ใช่เชิงพื้นที่ มี 3 ลักษณะ คือ ข้อมูลเชิงปริมาณ ข้อมูลเชิงคุณภาพ และข้อมูลลักษณะประจำ สำหรับอธิบายคุณลักษณะต่าง ๆ ในพื้นที่นั้น ๆ เช่น ข้อมูลของอาคารภายในเขตเทศบาล ได้แก่ ที่อยู่ประเภทอาคาร เป็นต้น ข้อมูลที่ไม่ใช่เชิงพื้นที่ แบ่งออกได้ 2 ประเภท คือ ตารางข้อมูลที่เชื่อมโยงกับกราฟิก และตารางข้อมูลที่ไม่เชื่อมโยงกับกราฟิก

1.3 อุปกรณ์คอมพิวเตอร์ (Hardware) เครื่องคอมพิวเตอร์รวมไปถึงอุปกรณ์ต่อพ่วงต่าง ๆ เช่น Digitizer, Scanner, Plotter, Printer หรืออื่น ๆ เพื่อใช้ในการนำเข้าข้อมูล ประมวลผล แสดงผล และผลิตผลลัพธ์ของการทำงาน

1.4 โปรแกรม (Software) คือชุดของคำสั่งสำเร็จรูป เช่น โปรแกรม Arc/Info, MapInfo ฯลฯ ซึ่งประกอบด้วยฟังก์ชัน การทำงาน และเครื่องมือที่จำเป็นต่าง ๆ สำหรับนำเข้าและปรับแต่งข้อมูล จัดการระบบฐานข้อมูล เรียกคน วิเคราะห์และ จำลองภาพ

1.5 ขั้นตอนการทำงาน (Methods) คือวิธีการที่องค์กรนั้น ๆ นำเอาระบบสารสนเทศ ภูมิศาสตร์ไปใช้งาน โดยแต่ละระบบแต่ละองค์กรมีความแตกต่างกันออกไปฉะนั้นผู้ปฏิบัติงานต้องเลือกวิธีการในการจัดการกับปัญหาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับของหน่วยงานนั้น ๆ (สำนักงานพัฒนาเทคโนโลยีอวกาศและภูมิสารสนเทศ, 2552)

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

พิชญพงศ์ ศิริเดช (2557) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลจากโสมมะฮาก (สัน โศก) ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA) และ *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) โดยตรวจกรองฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดเอทานอลจากโสมมะฮากด้วยวิธี Disk diffusion พบว่าดิสก์บรรจุสารสกัดเอทานอลจากโสมมะฮาก 0.25 มิลลิกรัมต่อดิสก์ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้งสองชนิดได้เท่ากัน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อเท่ากับ 10.67 มิลลิเมตร การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งทดสอบ (MIC)

ด้วยวิธี Agar dilution พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบมะฮิอกแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ได้เท่ากัน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

อรุณรัตน์ สัจฉิตกวินสกุล (2548) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเหง้ามะฮิอก (สันโศก) พบว่าสารบริสุทธิ์จำพวก Coumarin 3 ชนิด ได้แก่ Clausenidin, Dentatin และ Nordentatin รวมทั้ง O-methylated clausenidin มีฤทธิ์ยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 200, 50, 100, และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่าสารบริสุทธิ์จำพวก Carbazole 5 ชนิด ได้แก่ Clauszoline J, 3-Formyl-2, 7-dimethoxycarbazole, 3-Carbomthoxycarbazole, Mukonal และ Mukonine แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *M. tuberculosis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 100, 100, 50, 200, และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเหง้ามะฮิอก พบว่าสารบริสุทธิ์จำพวก Carbazole 4 ชนิด ได้แก่ 3-Formylcarbazole, 3-Carbomrthoxycarbazole, Mukonal และ Murrayanine แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *Candida albicans* โดยมีค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถลดการเจริญของเชื้อได้ 50 เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 13.6, 9.5, 29.3 และ 2.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV-1 ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเหง้ามะฮิอก พบว่าสารบริสุทธิ์จำพวก Coumarin 1 ชนิด ได้แก่ Clausenidin และสารบริสุทธิ์จำพวก Carbazole 3 ชนิด ได้แก่ Clauszoline J, 3-Formyl-2, 7-dimethoxycarbazole และ O-Methylmukonal และสารบริสุทธิ์จำพวก Limonoid 1 ชนิด ได้แก่ Clausenolide-1-ethyl ether แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV-1 โดยมีค่าดัชนีการรักษา (Potential Therapeutic Index, PTI) เท่ากับ >3.1, 1.6, 7.9, 56.7 และ 16 ตามลำดับ

Rahman, Alimuzzaman, Shilpi, and Hossain (2002) ศึกษาฤทธิ์ลดอาการปวดของสารสกัดเอทานอลจากใบมะฮิอก ทดสอบโดยวิธี Acetic acid induced writhing (การเหนียวน่าให้เกิดอาการชักในหนูทดลองด้วยกรดอะซิติก) จากนั้นทำการป้อนสารสกัดเอทานอลจากใบมะฮิอกขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม พบว่าสารสกัดเอทานอลจากมะฮิอกมีฤทธิ์ยับยั้งอาการปวดในหนูได้ 40.83, 60.32 และ 71.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับยาแผนปัจจุบันแอสไพริน (Aspirin หรือ Acetylsalicylic acid) 150 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมที่สามารถยับยั้งอาการปวดได้ 83.49 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดเอทานอลจากใบมะฮิอกมีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดในหนู

Wiat et al. (2004) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของส่วนสกัดเมทานอลจากใบและเปลือกลำต้นของมะฮิก ทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion จากการทดสอบพบว่าส่วนสกัดเมทานอลจากเปลือกลำต้นของมะฮิกมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 8, 13 และ 11 มิลลิเมตร และส่วนสกัดเมทานอลจากใบมะฮิกไม่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ

Kongkathip, Kongkathip, Sunthitikawinsakul, Napaswat, and Yoosook (2005) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV-1 โดยสารบริสุทธิ์ในกลุ่มคาร์บาโซลที่แยกได้จากรากมะฮิก (สัน โศก) ซึ่งสารในกลุ่มคาร์บาโซลได้แก่ *O*-methylmukonal, 3-formyl-2, 7-dimethoxycarbazole Clausoline J, Pyranocoumarin, และ Clausenidin ทดสอบโดยวิธี Syncytial assay ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 12, 29.1, 34.2 และ 5.3 μM ตามลำดับ และมีค่า Potential therapeutic index (PTI) เท่ากับ 56.7, 8.0, 1.6 และ 7.0 ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารบริสุทธิ์ทั้ง 5 ชนิดมีประสิทธิภาพที่จะพัฒนาไปใช้เป็นยารักษาโรคเอดส์ได้

Thatoi, Panda, Rath, and Dutta (2008) ทำการตรวจกรองฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดน้ำจากใบและรากของมะฮิก โดยวิธี Agar well diffusion พบว่าสารสกัดน้ำจากใบมะฮิกที่มีความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อหลุม แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus brevis* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 20 มิลลิเมตร และพบว่าสารสกัดน้ำจากรากมะฮิกที่มีความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อหลุม แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus*, *Shigella flexneri*, *B. licheniformis*, *B. brevis* และ *Vibrio cholera* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อเท่ากับ 15, 15, 13, 14 และ 16 มิลลิเมตร ตามลำดับ

Su et al. (2009) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านไวรัสและฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารบริสุทธิ์จำพวก Pyranocoumarins 4 ชนิด ที่แยกได้จากรากมะฮิก ได้แก่ Clausenidin, Nordentatin, Clausarin และ Xanthoxyletin พบว่า Clausenidin และ Nordentatin สามารถไปขัดขวางการทำงานของ Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) บนผิวเซลล์ HepA2 ได้ นอกจากนี้แล้ว Clausenidin, Nordentatin และ Clausarin ยังแสดงฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในมนุษย์ 4 ชนิด คือ A549 (เซลล์มะเร็งปอด) MCF-7 (เซลล์มะเร็งเต้านม) KB (เซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก) และ KB-VIN (เซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกที่ทนต่อยา Vincristine)

Zain, Rahmat, Othman, and Yap (2009) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งของสาร Clausine-B ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์จำพวก Carbazole alkaloid ที่แยกได้จากเปลือกต้นมะฮิกในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในมนุษย์ 5 ชนิด ได้แก่ HepD2 (เซลล์มะเร็งตับ) MCF-7

(เซลล์มะเร็งเต้านมชนิดขึ้นอยู่กับฮอร์โมน) MDA-MB-231 (เซลล์มะเร็งเต้านมชนิดไม่ขึ้นอยู่กับฮอร์โมน) HeLa (เซลล์มะเร็งปากมดลูก) และ CAO3 (เซลล์มะเร็งรังไข่) พบว่า Clausine-B มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งที่ทดสอบ 4 ชนิด ($IC_{50} < 30$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) คือ HepG2, MDA-MB 231, HeLa และ CAO3 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 28.94, 21.50, 22.90 และ 27.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Kunanusorn, Panthong, Nuntasaeen, Pittayanurak, and Reutrakul (2011) ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเมทานอลจากต้นมะฮิก (สัน โศก) ในหนูทดลอง จากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันโดยการป้อนสารสกัดขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม พบว่าสารสกัดไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือความผิดปกติทางพยาธิสภาพใด ๆ ในหนูทดลอง ดังนั้นค่า LD_{50} (ระดับความเป็นพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตายไป 50 เปอร์เซ็นต์) ของปริมาณสารที่ได้รับมีแนวโน้มจะสูงกว่า 5,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และการทดสอบความเป็นพิษระยะยาว โดยการป้อนสารสกัดขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 90 วัน พบว่าสารสกัดไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือความผิดปกติทางพยาธิสภาพใด ๆ ในหนูทดลอง เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ผลทางโลหิตวิทยาและผลทางเคมีคลินิกรวมทั้งอวัยวะภายในบางส่วนมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่อยู่ในช่วงปกติสำหรับหนูทดลองสายพันธุ์ Sprague-Dawley ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมทานอลจากต้นมะฮิกไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ เมื่อได้รับในขนาด 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นระยะเวลา 90 วัน

Kumar et al. (2012) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดที่แยกได้จากใบมะฮิกในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในมนุษย์และพืช โดยนำส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากใบมะฮิกมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยวิธี Bioassay guided fractionation จากการศึกษารับสารบริสุทธิ์คือ Excavarin-A จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่ได้มาตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา โดยวิธี Bioautography และ Micro-dilution จากการศึกษารับสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี Bioautography พบว่าสารบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราอยู่ที่ค่า R_f 0.34 และทำการศึกษารับสารบริสุทธิ์ต้านเชื้อราของสาร Excavarin-A ด้วยวิธี Microboth dilution พบว่าสาร Excavarin-A สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคในมนุษย์ได้ 8 สายพันธุ์ได้แก่ *Aspergillus fumigatus* (MTCC 6594), *Aspergillus niger* (MTCC 2425), *Candida albicans* (MTCC 183), *Candida tropicalis* (MTCC 184), *Cryptococcus curvatus* (MTCC 2698), *Filobasidiella neoformans* (MTCC 1431), *Mucor circinelloides* (MTCC 3944) และ *Trichosporon cutaneum* (MTCC 1963) โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 39-625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคพืชได้ 7 สายพันธุ์ได้แก่ *Curvularia eragrostidis* (ITCC 4150.2K), *Fusarium*

oxysporum (ITCC 6246), *Lasiodiplodia theobromae* (ITCC 5446.02), *Rhizoctonia solani* (ITCC 5995.05), *Rhizopus stolonifer* (ITCC 6283), *Sclerotinia sclerotiorum* (ITCC 6094) และ *Colletotrichum gloeosporioides* (ITCC 5446.02) โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 19-312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารบริสุทธิ์ Excavarin-A มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อราก่อโรคทั้งในมนุษย์และพืชได้ดีกว่ายา Nystatin จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารบริสุทธิ์ Excavarin-A ที่แยกได้จากไบโม่เอซิกสามารถนำมาพัฒนาเป็นสารต้านเชื้อราก่อโรคทั้งในมนุษย์และพืชได้

Sripisut, Cheenpracha, Ritthiwigrom, Prawat, and Laphookhieo (2012) ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารบริสุทธิ์ในกลุ่ม Coumarins 6 ชนิด ที่แยกได้จากรากมะฮ็อกไก ได้แก่ (1) Binoeponcitrin, (2) Xanthoxyletin, (3) Dentatin, (4) Nordentatin, (5) Ckausenidin, (6) Scopoletin และสารในกลุ่ม Alkaloids 12 ชนิด ได้แก่ (7) Dictamine, (8) Clausine D, (9) Clausine F, (10) Murrayafoline, (11) Murrayanine, (12) Clauszoline I, (13) 2-hydroxy-3-formyl-7-methoxycarbazole, (14) 3-formyl-2,7-dimethoxycarbazole, (15) Clauszoline J, (16) Clausine H, (17) Murrayacine, (18) Heptaphylline และพบว่าสาร (4) Nordentatin, (11) Murrayanine และ (18) Heptaphylline แสดงฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB (มะเร็งหลังโพรงจมูก) MCF-7 (เซลล์มะเร็งเต้านม) และ NCI-H187 (เซลล์มะเร็งปอด) สูงที่สุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.95, 3.76 และ 5.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Guntupalli et al. (2012) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลและสารสกัดน้ำจากไบโม่เอซิกโดยใช้รูปแบบการออกซิเดชันของไขมัน พบว่าสารสกัดเมทานอลจากไบโม่เอซิกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดน้ำจากไบโม่เอซิก โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 201.3 และ 450.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Peng, Zeng, Song, and Tan (2013) ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารบริสุทธิ์ 3 ชนิด ที่แยกได้จากส่วนก้านและใบของมะฮ็อกไก ได้แก่ Excavatine A, Excavatine B และ Excavatine C ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในมนุษย์ 3 ชนิด คือ A549 (เซลล์มะเร็งปอด) HeLa (เซลล์มะเร็งปากมดลูก) และ BGC-823 (เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร) พบว่าสาร Excavatine A แสดงฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง A549 และ HeLa โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.25 และ 1.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Guntupalli, Ramaiah, and Kumar (2013) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดเอทานอลจากไบโม่เอซิกในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Propionibacterium acne*, *S. aureus* และ *Streptococcus pyogens* โดยวิธี Microboth dilution พบว่าสารสกัดเอทานอลจากไบโม่เอซิกสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่นำมาทดสอบได้ทุกชนิด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1,000, 1,000 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัด

เอทานอลจากไบโमะสึในการยับยั้งเชื้อรา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Epidermatophyton floccusum*, *C. albican*, *Trichophyton rubrum* และ *T. mentagrophytes* พบว่าสารสกัดเอทานอลจากไบโमะสึสามารถยับยั้งเชื้อราที่นำมาทดสอบได้ทุกชนิด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 500, 500, <500 และ <500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Panda (2014) ทำการตรวจกรองฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดน้ำและสารสกัดเมทานอลจากไบโमะสึโดยวิธี Agar well diffusion พบว่าสารสกัดน้ำจากไบโमะสึความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อหลุม แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus licheniformis* และ *Salmonella Typhimurium* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 12 และ 14 มิลลิเมตร ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดเมทานอลจากไบโमะสึที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อหลุม แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *B. licheniformis* และ *S. Typhimurium* โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อเท่ากับ 14, 17 และ 12 มิลลิเมตร ตามลำดับ

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องแก้ว

- 3.1.1 งานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Sterile Petri Dishes) ขนาด 90 มิลลิเมตร
- 3.1.2 ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ (Duran) ปริมาตร 250 และ 500 มิลลิลิตร
- 3.1.3 หลอดทดลองปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร
- 3.1.4 หลอดทดลองฝาเกลียว (Centrifuge tube) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- 3.1.5 หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 150 × 16 ลิตร
- 3.1.6 Pipette Tip ปริมาตร 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- 3.1.7 Cellulose Acetate Filter ขนาด 0.2 ไมโครลิตร
- 3.1.8 Antibiotic Assay Disc (AA disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
- 3.1.9 TLC Aluminum Sheets Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA, Germany)
- 3.1.10 ลูปเขี่ยเชื้อ (Inoculated Loop)
- 3.1.11 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.12 กระบอกตวง (Cylinder) ปริมาตร 10 และ 500 มิลลิลิตร
- 3.1.13 หลอดฉีดยา (Plastic syringe) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร
- 3.1.14 ไม้พันปลายสำลีเบอร์ M ปราศจากเชื้อ (Sterile cotton swab)
- 3.1.15 บีกเกอร์ (Beaker) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร
- 3.1.16 หลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ปราศจากเชื้อ (Sterile micro centrifuge tube)
- 3.1.17 ขวดแก้วเล็ก (Vials)
- 3.1.18 Micropipette P20 P200 และ P1,000 (GILSON, France)
- 3.1.19 ตู้บ่ม (Incubator) (TERMARK, Norway)
- 3.1.20 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) (MEMMERT, 700, Germany)
- 3.1.21 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow) (SUPER CLEAN, 150VC, Thailand)
- 3.1.22 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance) (METTLER, PM6100)
- 3.1.23 เครื่องไมโครเวฟ (ELECTROLUX, EMM 2005, China)
- 3.1.24 ตู้เย็น (Refrigerator)
- 3.1.25 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) (TOMY, SS-325, Japan)

- 3.1.26 เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)
- 3.1.27 เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dryer)
- 3.1.28 โถดูโคความชื้น (Desiccator)
- 3.1.29 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) (VORTEX-GENIE 2, G-560E, Switzerland)

3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.2.1 Ethanol 95 %
- 3.2.2 Ethyl acetate (European Community)
- 3.2.3 Hexane
- 3.2.4 Sodium Chloride (NaCl) (Univar, New Zealand)
- 3.2.5 Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 3.2.6 Cefoxitin (FOX-30) ขนาดบรรจุ 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (Oxoid, England)
- 3.2.7 Oxacillin (Sigma Chemical, USA)
- 3.2.8 Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco, United State of America)
- 3.2.9 Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco, United State of America)
- 3.2.10 Mueller Hinton Agar (MHA) (Difco, United State of America)
- 3.2.11 Mueller Hinton Broth (MHB) (Difco, United State of America)

3.3 อุปกรณ์ภาคสนาม

- 3.3.1 เครื่องบอกพิกัดภูมิศาสตร์
- 3.3.2 กล้องบันทึกภาพ
- 3.3.3 ตะลัดเมตร
- 3.3.4 Lux meter (เวอร์ชัน 1.1.1 บนอุปกรณ์ iPhone)

3.4 ตัวอย่างพืชและการเตรียมตัวอย่างพืช

ใบมะฮึก *Clausena excavata* Burm. f. เก็บจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) ตำบลตกรวม อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี จำแนกโดย นายคำณ เลียดประดม หัวหน้ากลุ่มวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ กรมป่าไม้ การเตรียมตัวอย่างพืชโดยเก็บใบเพศลาของ

มะฮิกนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาดและเค็ดเอาเฉพาะใบ นำใบไปอบแห้งด้วยอุณหภูมิต่ำ ร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บดให้ละเอียดและชั่งน้ำหนักแห้ง

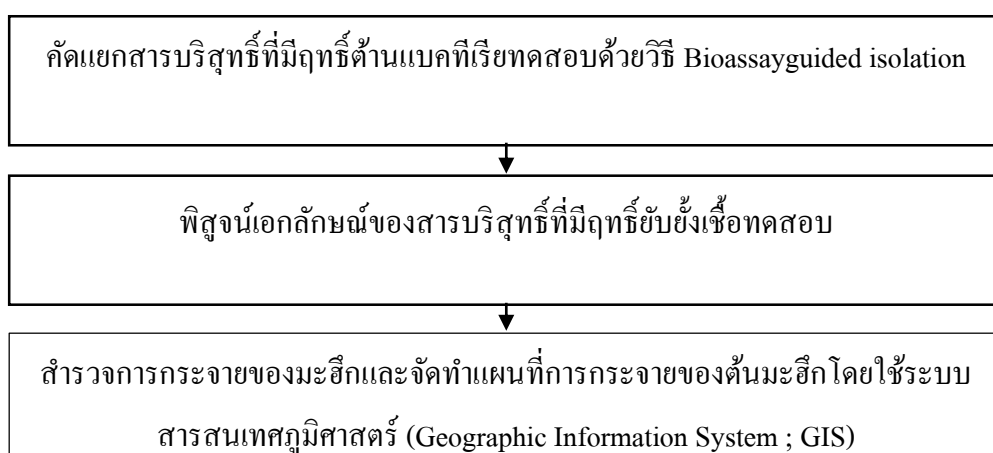
3.5 ตัวอย่างแบคทีเรียทดสอบและการเก็บรักษา

3.5.1 ตัวอย่างแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. กาญจนา หิริมเพ็ง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา นำแบคทีเรียทดสอบเพาะเลี้ยงลงบนจานอาหาร TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.5.2 ทำการถ่ายโอนเชื้อทดสอบ เพาะเลี้ยงลงในหลอดอาหาร TSA Slant สำหรับเป็น Stock culture บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากเชื้อเจริญนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.3 การเก็บรักษาเชื้อทดสอบ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบแต่ละชนิดลงในหลอดอาหาร TSB บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จากนั้นใช้ปิเปตถ่ายเชื้อ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ปราศจากเชื้อ และเติมกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 400 ไมโครลิตร ผสมให้อยู่ในรูปของเซลล์แขวนลอย นำไปเก็บเป็น Stock ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การวิจัยจะออกแบบการทดลองออกเป็น 3 ส่วน ดังแสดงภาพที่ 3-1



ภาพที่ 3-1 แผนภูมิออกแบบการทดลอง

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 คัดแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี *Bioassayguided isolation* คัดแปลงมาจาก (Sawhney & Singh, 2005; Yang et al., 2011; Buranakit, 2014)

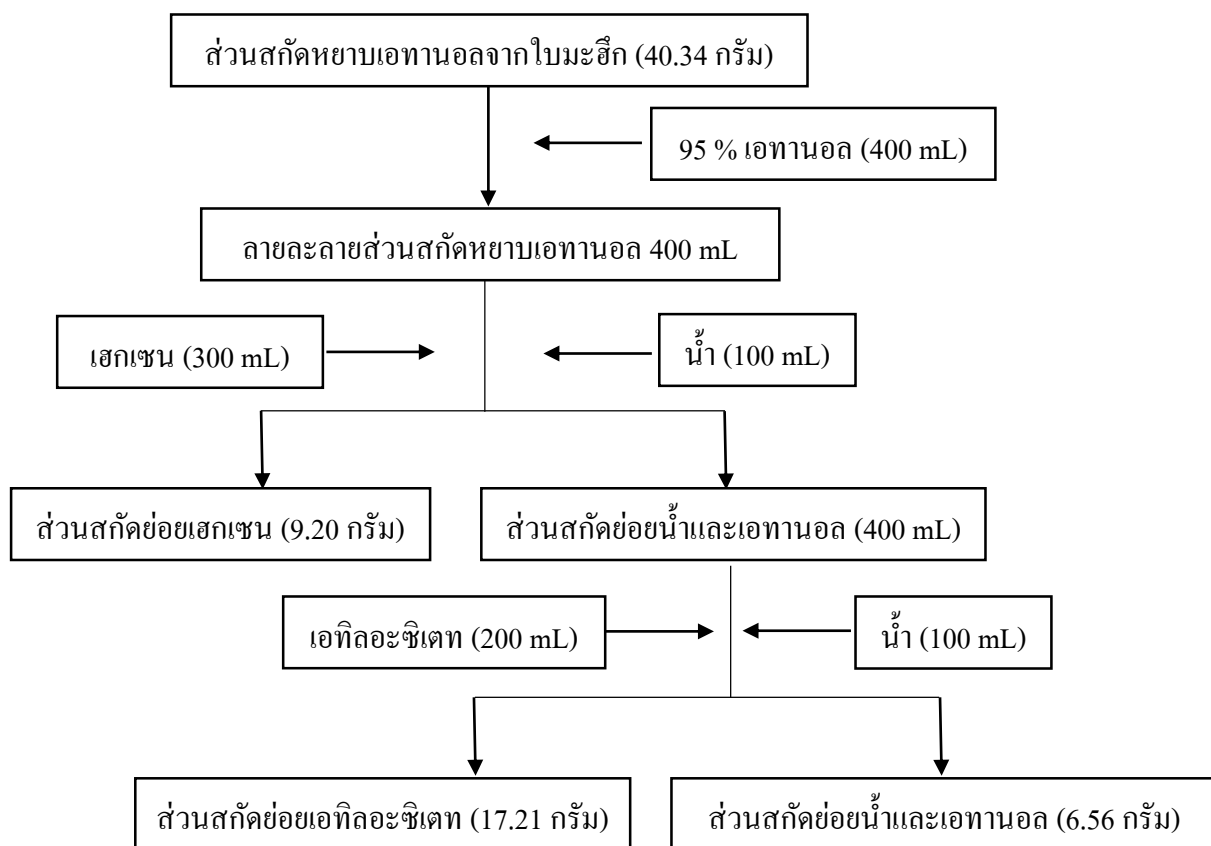
3.6.1.1 คัดแยกส่วนสกัดย่อยจากส่วนสกัดหยาบเอทานอลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ดีที่สุด

1. การเตรียมส่วนสกัดเอทานอลจากใบมะฮีก (คัดแปลงมาจาก Saedi et al., 2012)

นำมะฮีกมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาดและเด็ดเอาเฉพาะใบ นำใบไปอบแห้งด้วยตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นบดให้ละเอียดใส่ถุงผ้าขาวบางแช่หมักในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:15 เป็นเวลา 7 วัน ทำซ้ำ 3 ครั้งทำการเขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นนำส่วนสกัดเอทานอลที่ได้มารวมกัน แล้วกรองด้วย Cellulose Acetate Filter ขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Vacuum Freeze Dryer) นำไปใส่ในโถดูดความชื้นซึ่งจนได้น้ำหนักแห้งคงที่และบันทึกน้ำหนักแห้งของส่วนสกัดเอทานอลจากใบมะฮีก ทำการคำนวณหาปริมาณของส่วนสกัด (% Yield) เก็บรักษาส่วนสกัดเอทานอลจากใบมะฮีกที่ได้ไว้ที่มีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตทจากส่วนสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะฮีกด้วยเทคนิค sequential extraction (Buranakit, 2014)

นำส่วนสกัดหยาบเอทานอลของใบมะฮีกมา 40.34 กรัม ละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 400 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และเติมตัวทำละลายเฮกเซน 300 มิลลิลิตร ใส่ในกรวยแยก แยกส่วนสกัดย่อยน้ำซึ่งอยู่ชั้นล่างสุดออกจากส่วนสกัดเฮกเซนที่อยู่ชั้นบนทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำส่วนสกัดย่อยน้ำและเอทานอล (400 มิลลิลิตร) มาสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท 200 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ใส่ในกรวยแยก แยกส่วนสกัดย่อยน้ำซึ่งอยู่ชั้นล่างสุดออกจากส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทที่อยู่ชั้นบนทำซ้ำ 3 ครั้ง นำส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Vacuum Freeze Dryer) แล้วนำส่วนสกัดย่อยทั้ง 2 ส่วนไปใส่ในโถดูดความชื้นจนส่วนสกัดย่อยที่ได้มีน้ำหนักแห้งคงที่ บันทึกน้ำหนักและเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แผนภูมิการเตรียมส่วนสกัดชนิดต่าง ๆ จากใบมะฮีกแสดงดังภาพที่ 3-2



ภาพที่ 3-2 แผนภูมิการเตรียมส่วนสกัดย่อยชนิดต่าง ๆ จากไผมะฮีกด้วยเทคนิค sequential

Extraction

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของส่วนสกัดต่าง ๆ จากไผมะฮีกในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยวิธี Disk diffusion (Kirby-Bauer method) ตามมาตรฐานของ (Hanan, 2006 citing CLSI (M100-S9), 1999)

3.1 เตรียมกล้าเชื้อของเชื้อทดสอบ ถ่ายเชื้อทดสอบจาก stock culture (3.5.2) ลงบนจานอาหาร TSA แล้วนำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเชื้อจากจาน TSA ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับความขุ่นของสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อแขวนลอยเริ่มต้น 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.2 การเตรียมดิस्कบรรจุส่วนสกัดต่าง ๆ จากไผมะฮีก เตรียมส่วนสกัดหยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากไผมะฮีกความเข้มข้น 100

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วย DMSO (Dimethyl sulfoxide) 100 เปอร์เซ็นต์ เตรียมดิสก์บรรจุส่วนสกัด
 หยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท โดยปีเปิดสารสกัดที่ความ
 เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบน Antibiotic assay (AA) disc ที่
 ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จะได้ดิสก์บรรจุส่วนสกัดแต่ละชนิดขนาด
 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ เตรียมดิสก์บรรจุ DMSO โดยปีเปิดสารละลาย DMSO 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร
 20 ไมโครลิตร หยดลงบน AA disc ที่ปราศจากเชื้อ

3.3 การทดสอบใช้ไม้ปั่นสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในแขวนลอยกล้าเชื้อทดสอบ
 ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 บิดพอหมาด ๆ และนำไปป้ายบนผิวหน้าอาหาร MHA (Mueller Hinton Agar)
 และอาหาร MHA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (MHA-NaCl) เป็นแนว 3 ระบาย ปล่อยให้
 ไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง (ไม่เกิน 15 นาที) ใช้ปากคีบ (Forceps) ที่ปราศจาก
 เชื้อ คีบแผ่นดิสก์ทดสอบ (ข้อ 3.2) วางบนผิวหน้าอาหารที่เพาะเชื้อทดสอบไว้ในข้อ 3.1 นำไปบ่มที่
 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการตรวจวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง
 ของบริเวณยับยั้งเชื้อ (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

3.4. การควบคุมคุณภาพ

ชุดควบคุมคุณภาพของระบบทดสอบ (Quality control of system) ใช้แบคทีเรีย
 สายพันธุ์มาตรฐานคือ *S. aureus* ATCC 25923 โดยยาปฏิชีวนะ Cefoxitin (30 ไมโครกรัมต่อดิสก์)
 จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ต้องอยู่ในเกณฑ์ตามที่ CLSI
 M100-S23 (2013) กำหนด คือ 23-29 มิลลิเมตร จึงจะอ่านผลการทดสอบส่วนสกัดที่นำมาทดสอบ

ชุดควบคุมผลลบ (Negative control) สำหรับการทดสอบใช้ดิสก์บรรจุ DMSO
 (20 ไมโครลิตรต่อดิสก์)

4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ (Minimal inhibitory
 concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรียทดสอบ (Minimal Bactericidal
 Concentration, MBC) ของส่วนสกัดหยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อย
 เอทิลอะซิเตท จากใบมะฮิ็ก

การหาค่า MIC ของส่วนสกัดหยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัด
 ย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮิ็ก ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ โดยใช้วิธี broth macrodilution ตาม
 วิธีมาตรฐานของ (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012) มีขั้นตอนดังนี้

4.1. การเตรียมกล้าเชื้อทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 3.1 นำแขวนลอยกล้าเชื้อ
 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาปรับให้ได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 1:200 ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะได้สาร
 แขวนลอยเชื้อเท่ากับ 0.75×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

4.2 การเตรียมสารละลายของส่วนสกัดต่าง ๆ จากโบรมะฮ์ โดยการเตรียมสารละลายแต่ละชนิดของส่วนสกัดหยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของโบรมะฮ์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 51.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งน้ำหนักแต่ละส่วนสกัดมา 51.2 มิลลิกรัม ละลายใน DMSO และปรับปริมาตรให้ครบ 1 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายของส่วนสกัดแต่ละชนิด โดยวิธี two fold dilution ให้ได้ระดับความเข้มข้นของส่วนสกัดเท่ากับ 51.2, 25.6, 12.8, 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4.3 การทดสอบ โดยการเปิดส่วนสกัดต่าง ๆ ของโบรมะฮ์ที่แต่ละระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดแก้วปราศจากเชื้อ หลอดที่ 1-10 เติมกล้าเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 ปริมาตร 990 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดสอบหลอดที่ 1-10 (ความเข้มข้นสุดท้ายของส่วนสกัดเท่ากับ 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.4 ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยเติม resazurin ความเข้มข้น 1.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่ม 3-4 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของส่วนสกัดที่สีของ resazurin ในหลอดทดสอบยังคงเป็นสีน้ำเงินอมม่วงเป็นค่า MIC

4.5 ตรวจหาค่า MBC ของส่วนสกัดจากโบรมะฮ์ที่ใช้ทดสอบ โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อจากหลอดทดสอบที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเพาะลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MHA ด้วยวิธีการ drop plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหาร โดยบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของส่วนสกัดจากพีชที่ไม่มีการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร เป็นค่า MBC

3.6.1.2 คัดแยกสารกึ่งบริสุทธิ์จากส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* การคัดแยกสารกึ่งบริสุทธิ์จากส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 3 ขั้นตอน ได้แก่ 1. การแยกส่วนแยก (fraction) ย่อยจากส่วนสกัดที่ได้รับคัดเลือก โดยใช้ flash column chromatography 2. วิเคราะห์ความแตกต่างของสารที่เป็นองค์ประกอบในแต่ละส่วนแยก โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง และ 3. ตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 43300 ของสารที่เป็นองค์ประกอบในแต่ละส่วนแยกบนแผ่น TLC ด้วยวิธี Bioautography assay โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

หมายเหตุ* ส่วนสกัดจากโบรมะฮ์ที่นำมาแยกและวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์สำคัญในการต้านแบคทีเรียทดสอบในงานวิจัยนี้คือส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากโบรมะฮ์เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการต้านเชื้อทดสอบ

1. การแยกส่วนแยกย่อยของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮึกด้วย flash column chromatography

เตรียมส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮึกให้อยู่ในรูปของสารละลายโดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท จากนั้นเติมซิลิกาเจล (No. 1.07734.1000, 0.063-0.200 มิลลิเมตร, Merck Germany) ลงในสารละลายส่วนสกัดที่ได้ในอัตราส่วน 2 เท่าของน้ำหนักส่วนสกัด (w/w) และกำจัดตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทออกจากตัวอย่างโดยนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศแบบหมุน บรรจุตัวอย่างส่วนสกัดลงในคอลัมน์ที่มีซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคหนึ่ง และใช้ระบบของวัฏภาคเคลื่อนที่แบบ Gradient elution โดยใช้ตัวทำละลายเรียงลำดับความเข้มข้นน้อยไปหามาก ได้แก่ สารผสมระหว่าง เอทิลอะซิเตทกับเฮกเซนอัตราส่วน 30:70, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40 70:30, 90:10 และ 100 เป็นระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ และเก็บส่วนแยกของสารตัวอย่างที่ถูกชะออกมาส่วนแยกละ 50 มิลลิลิตร

2. การวิเคราะห์ความแตกต่างของสารที่เป็นองค์ประกอบในแต่ละส่วนแยกย่อยของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทด้วยเทคนิค โครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง

นำตัวอย่างสารในแต่ละส่วนแยกที่เก็บได้จาก flash column silica gel chromatography มาตรวจสอบองค์ประกอบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้แผ่น TLC Alumina Silica Gel F₂₅₄ ขนาด 3 × 4 เซนติเมตร เป็นวัฏภาคหนึ่ง และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ผสมระหว่างเอทิลอะซิเตทกับเฮกเซนอัตราส่วน 40:60 เป็นระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบรูปแบบการเคลื่อนที่ของสารที่เป็นองค์ประกอบในแต่ละส่วนแยก ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร นำสารตัวอย่างในแต่ละส่วนแยกที่มีรูปแบบการเคลื่อนที่เฉพาะของสารองค์ประกอบเหมือนกันมารวมเป็นส่วนแยกเดียวกัน นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศแบบหมุน และทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง บันทึกน้ำหนักรวม และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. ตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 ของสารที่เป็นองค์ประกอบในแต่ละส่วนแยกของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับ Bioautography assay

3.1 แยกสารที่เป็นองค์ประกอบในแต่ละส่วนแยกด้วย TLC

เตรียมตัวอย่างสารในแต่ละส่วนแยกให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท 1 มิลลิลิตร และทำการแยกสารบนแผ่น TLC Alumina Silica Gel F₂₅₄ ขนาด 3 × 4 เซนติเมตร เป็นวัฏภาคหนึ่ง และใช้เอทิลอะซิเตทผสมต่อเฮกเซนอัตราส่วน 40 : 60 เป็นระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ เก็บแผ่น TLC ที่ได้ใส่ในจานแก้วปราศจากเชื้อ และตรวจสอบรูปแบบการ

เคลื่อนที่ของสารที่เป็นองค์ประกอบในแต่ละส่วนแยกภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลทความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

3.2 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารบนแผ่น TLC ด้วยวิธี Agar diffusion bioautography

เตรียมจานเพาะเชื้อแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธีเช่นเดียวกับการทดสอบ disk diffusion โดยการนำแขวนลอยกล้าเชื้อ (1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร MHA ให้ทั่วเป็นแนว 3 ระบาย วางทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง นำแผ่น TLC ที่ได้ในข้อ 3.1 วางประกบลงบนผิวหน้าอาหารทิ้งไว้ประมาณ 60 นาที (พร้อมทำเครื่องหมายระบุตำแหน่งของแผ่น TLC และตำแหน่งของสารองค์ประกอบในแต่ละส่วนแยกที่แยกได้ไว้บนจานอาหารทดสอบ) หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ออกจากผิวหน้าอาหาร ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบฤทธิ์ของสารที่เป็นองค์ประกอบของแต่ละ ส่วนแยกที่พบบน TLC ตามตำแหน่งที่ทำเครื่องหมายไว้บนจานอาหารทดสอบ

3.6.1.3 คัดแยกสารบริสุทธิ์จากสารกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* การคัดแยกสารบริสุทธิ์จากสารกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีที่สุด ทำการแยกส่วนแยกย่อยจากสารกึ่งบริสุทธิ์ ใช้ flash column chromatography และวิเคราะห์ความแตกต่างของสารที่เป็นองค์ประกอบในแต่ละส่วนแยก โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบางเช่นเดียวกับข้อ 3.1 และตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 2539 และ *S. aureus* ATCC 43300 ของสารบริสุทธิ์ที่ได้ด้วยวิธี Macroboth dilution เช่นเดียวกับข้อ 4 โดยเตรียมสารละลายของสาร 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin และ Clauslactone A ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 6.4 และ 102.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยชั่งน้ำหนักแต่ละสารบริสุทธิ์มา 6.4 และ 102.4 มิลลิกรัม ตามลำดับ ละลายใน DMSO และปรับปริมาตรให้ครบ 1 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายของสารบริสุทธิ์แต่ละชนิด โดยวิธี two fold dilution ให้ได้ระดับความเข้มข้นของสาร 5- Geranyloxy-7-hydroxycoumarin เท่ากับ 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 และ 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับและระดับความเข้มข้นของสาร Clauslactone A เท่ากับ 102.4, 51.2, 25.6, 12.8, 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

หมายเหตุ* สารกึ่งบริสุทธิ์ที่นำมาแยกและวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์สำคัญในการต้านแบคทีเรียทดสอบในส่วนนี้คือ F3 และ F6 เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการต้านเชื้อทดสอบทั้งสองชนิด

3.6.1.4 การตรวจสอบกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮึก

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียทดสอบเมื่อสัมผัสกับสารบริสุทธิ์จากใบมะฮึก 2 ชนิด ได้แก่ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin และ Clauslactone A ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) เตรียมตัวอย่างสำหรับดูโดยกล้อง SEM นำน้ำเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองจากการทดสอบหาค่า MIC โดยมีชุด Control คือเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม DMSO และหลอดทดลองที่มีเชื้อสัมผัสกับสารบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่า 1/2MIC และ 1/4MIC ตามลำดับ นำตัวอย่างหลอดทดลองส่งไปยังศูนย์กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เพื่อทำการเตรียมตัวอย่างและตรวจสอบและบันทึกภาพจุลสัณฐานของแบคทีเรียทดสอบที่เปลี่ยนแปลงไปภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

3.6.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบ

3.6.2.1 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเทคนิค เอ็นเอ็มอาร์ สเปกโทรสโคปี (NMR Spectroscopy)

การวิเคราะห์สเปกตรัมเพื่อให้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของสารอินทรีย์ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮึก โดยเทคนิคทางเอ็นเอ็มอาร์ สเปกโทรสโคปี (NMR Spectroscopy) ใช้ความถี่ 400 เมกกะเฮิร์ต โดยใช้คลอโรฟอร์มดี (Chloroform-D, CDCl₃) เป็นตัวทำละลาย ซึ่งจะทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H NMR เพื่อทราบจำนวนของสัญญาณ ตำแหน่งของสัญญาณ และ splitting ของสัญญาณ ซึ่งบอกถึงจำนวนโปรตอนที่อยู่ติดกับโปรตอนที่พิจารณา และวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค ¹³C NMR เพื่อทราบจำนวนคาร์บอนเป็นอย่างน้อย โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

3.6.2.2 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรสโคปี (Liquid Chromatography - Mass Spectroscopy ; LC-MS)

การวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้บอกถึงน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนของสารแต่ละชนิดที่ทำการวิเคราะห์ ซึ่งจะนำไปหาสูตรโมเลกุลที่แน่นอนได้ โดยเตรียมตัวอย่างสารความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเมทานอล HPLC grade ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

3.6.3 การสำรวจการกระจายของมะฮิกและจัดทำแผนที่การกระจายของต้นมะฮิกโดยใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (Geographic Information System ; GIS)

การสำรวจภาคสนามด้วยวิธี Forest Inventory Method (Brassel & Lischke, 2001) ทำการกำหนดขอบเขตของพื้นที่ศึกษา และทำการสำรวจแปลงถาวรของโครงการ ซึ่งนับจำนวนแปลงตัวอย่างถาวรในกรอบพื้นที่ศึกษาได้ทั้งหมด 39 แปลง สำรวจในพื้นที่ที่กำหนดและบันทึกพิกัดที่พบต้นมะฮิกด้วยเครื่องบอกตำแหน่งพิกัดทางภูมิศาสตร์ (Global Positioning System : GPS) รวมทั้งบันทึกข้อมูลทางกายภาพ ของระบบนิเวศที่พบต้นมะฮิก เช่น ความเข้มแสง และความสูง นำข้อมูลตำแหน่งพิกัดทางภูมิศาสตร์มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Arc GIS 9.3 เพื่อเป็นฐานข้อมูลทางภูมิศาสตร์ (Geodatabase) ของการกระจายเชิงพื้นที่ของต้นมะฮิก และเก็บตัวอย่างดินในแปลงสำรวจไปวิเคราะห์หาอินทรีย์วัตถุในดิน และธาตุอาหารบางชนิดของพืชที่ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตร วิทยาเขตกำแพงแสน

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การสกัดไบโमะฮีกด้วยตัวทำละลายเอทานอลและการแยกลำดับส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิลอะซิเตทจากส่วนสกัดหยาบเอทานอลจากไบโमะฮีก

เมื่อนำไบโमะฮีกน้ำหนัก 334.52 กรัม มาสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วระเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศแบบหมุน ทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำไปใส่ใน โถดูดความชื้นจนได้น้ำหนักแห้งที่คงที่ของสารสกัดเท่ากับ 40.34 กรัม คำนวณปริมาณของสารสกัดได้ 12.06 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของพืชตัวอย่าง นำส่วนสกัดเอทานอลของไบโमะฮีก มาสกัดแยกลำดับส่วนด้วยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ซึ่ง ได้เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งเท่ากับ 22.81 และ 42.66 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-1)

ตารางที่ 4-1 ปริมาณร้อยละ (% Yield) ของไบโमะฮีกที่สกัดด้วยเอทานอล ของส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทที่สกัดได้จากส่วนสกัดหยาบเอทานอล

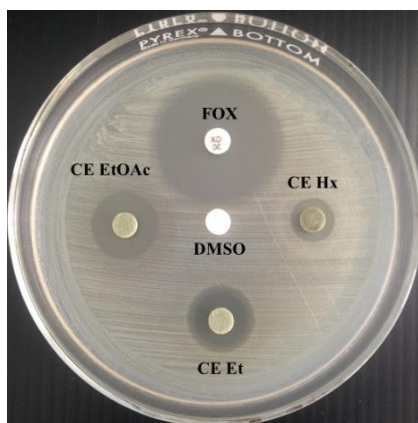
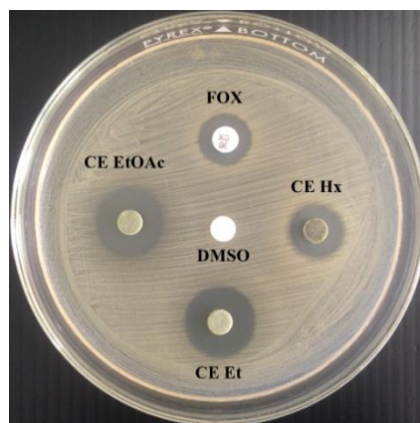
ตัวอย่างวัตถุดิบ	ตัวทำละลาย	น้ำหนักส่วนสกัดหลัง ระเหยแห้ง (g)	เปอร์เซ็นต์ (Yield)
ไบโमะฮีก	เอทานอล	40.34	12.06
ส่วนสกัดหยาบเอทานอล	เฮกเซน	9.20	22.81
ส่วนสกัดหยาบเอทานอล	เอทิลอะซิเตท	17.21	42.66

4.2 การคัดเลือกส่วนสกัดย่อยต่าง ๆ จากไบโमะฮีกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด

4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดจากไบโमะฮีกด้วยวิธี Disk diffusion

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของส่วนสกัดเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของไบโमะฮีกในการต้านแบคทีเรียทดสอบ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 ด้วยวิธี Disk diffusion โดยใช้ Cefoxitin Disk (FOX) 30 ไมโครกรัมต่อ

ดิสก์ เป็นชุดควบคุมผลบวก และ 100 % Dimethyl sulfoxide (DMSO) 20 ไมโครลิตรต่อดิสก์ เป็นชุดควบคุมผลลบ ดังรูปภาพ 1 จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ของส่วนสกัดเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบมะฮิอกที่ขนาดบรรจุ 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ พบว่าส่วนสกัดเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 12.33 ± 0.58 , 9.33 ± 0.58 และ 14.33 ± 0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ และส่วนสกัดเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 43300 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 12.67 ± 0.58 , 11.33 ± 0.58 และ 14.67 ± 0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-1) และ (ตารางที่ 4-2) ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าขนาดบริเวณยับยั้งของ Cefoxitin Disk ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 มีค่าเท่ากับ 26.67 ± 1.53 และ 11.67 ± 1.15 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนแผ่นดิสก์ที่บรรจุตัวทำละลาย 100% DMSO ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้งสองสายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบเกิดจากส่วนสกัดต่าง ๆ ของใบมะฮิอก

(ก) *S. aureus* ATCC 25923(ข) *S. aureus* ATCC 43300

ภาพที่ 4-1 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 (ภาพที่ 4-1ก.) และ *S. aureus* ATCC 43300 (ภาพที่ 4-1 ข.) ของส่วนสกัดหยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจากใบมะฮิอกเมื่อทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion, FOX, ดิสก์บรรจุ Cefoxitin 30 มิลลิกรัม; CE Et, ดิสก์บรรจุส่วนสกัดหยาบเอทานอล 1 มิลลิกรัม; CE Hx, ดิสก์บรรจุส่วนสกัดย่อยเฮกเซน 1 มิลลิกรัม; CE EtOAc, ดิสก์บรรจุส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท 1 มิลลิกรัม; DMSO, ดิสก์บรรจุ 100 % Dimethyl sulfoxide 20 ไมโครลิตร

ตารางที่ 4-2 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 ของส่วนสกัดชนิดต่าง ๆ จากไบโม่สี

แบคทีเรียทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของส่วนสกัดต่าง ๆ				
	ค่าเฉลี่ย \pm SD (มิลลิเมตร)				
	CE Et (1 mg)	CE Hx (1 mg)	CE EtOAt (1 mg)	FOX (30 μ g)	DMSO (20 μ l)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	12.33 \pm 0.58	9.33 \pm 0.58	14.33 \pm 0.58	26.67 \pm 1.53	No Zone
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	12.67 \pm 0.58	11.33 \pm 0.58	14.67 \pm 0.58	11.67 \pm 1.15	No Zone

หมายเหตุ : CE Et, ดิสก์บรรจุส่วนสกัดเหานอล 1 มิลลิกรัม; CE Hx, ดิสก์บรรจุส่วนสกัดย่อยเฮกเซน 1 มิลลิกรัม; CE EtOAt, ดิสก์บรรจุส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท 1 มิลลิกรัม; FOX, ดิสก์บรรจุ Cefoxitin 30 มิลลิกรัม; DMSO, ดิสก์บรรจุ 100 % Dimethyl sulfoxide 20 ไมโครลิตร

4.2.2 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (Minimal inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียทดสอบ (Minimum bactericidal concentration, MBC) ของส่วนสกัดเหานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากไบโม่สี

จากการนำส่วนสกัดเหานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของไบโม่สีมาตรวจหาค่า MIC ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 ด้วยวิธี broth macrodilution โดยมีชุดควบคุมดังนี้ Growth control คือเชื้อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sterility control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมตัวทำละลาย DMSO 100%, Solvent control คือ เชื้อทดสอบที่เติม DMSO 100% และยาปฏิชีวนะ Oxacillin เป็นชุดควบคุมระบบทุกครั้งที่ทำกรทดสอบ โดยพบว่าค่า MIC ของ Oxacillin ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 ตลอดการศึกษามีค่าเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าผลการตรวจหาค่า MIC ด้วยวิธี broth macrodilution ที่ใช้ในการศึกษานี้ อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2005) ในการทดสอบนี้ได้ทำการเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียทดสอบกับตัวทำละลาย DMSO 100 %

พบว่าเชื้อทดสอบเจริญได้ดีเทียบเท่ากับการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากตัวทำละลายแสดงให้เห็นว่าตัวทำละลาย DMSO 100% ไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งหมายความว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่พบในการศึกษานี้เป็นฤทธิ์ของส่วนสกัดเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮิอก ซึ่งการตรวจหาค่า MIC ของส่วนสกัดเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท ที่มีความเข้มข้นของส่วนสกัดอยู่ในช่วง 8 - 1024 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าส่วนสกัดทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากับ 128-256, 256 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อเท่ากับ 256, 1024 และ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 43300 เท่ากับ 64-128, 128 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อเท่ากับ 256, 256-512 และ 128-256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 ค่า MIC และ MBC ของส่วนสกัดหยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และยาปฏิชีวนะ Oxacillin ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300

แบคทีเรียทดสอบ	ส่วนสกัด	MIC (มก./มล.)	MBC (มก./มล.)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Ethanol	128-256	256
	Hexane	256	1024
	Ethyl acetate	64	128
	Oxacillin	0.5	2
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	Ethanol	64-128	256
	Hexane	128	256-512
	Ethyl acetate	32	128-256
	Oxacillin	64-128	128

4.3 การคัดแยกสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากส่วนสกัดย่อยที่คัดเลือกได้ (ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท)

4.3.1 การคัดแยกและวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮิก

จากผลการทดสอบในตารางที่ 4-2 และ 4-3 พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮิกแสดงฤทธิ์ยับยั้ง MSSA และ MRSA ได้ดีที่สุด จึงทำการแยกสารประกอบจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮิกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีและวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค TLC พบรูปแบบบนแผ่น TLC ที่แตกต่างกัน 8 fraction (F1- F8) จากการแยกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทโดยใช้ระบบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันของเอทิลอะซิเตทในเฮกเซน 30 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.4

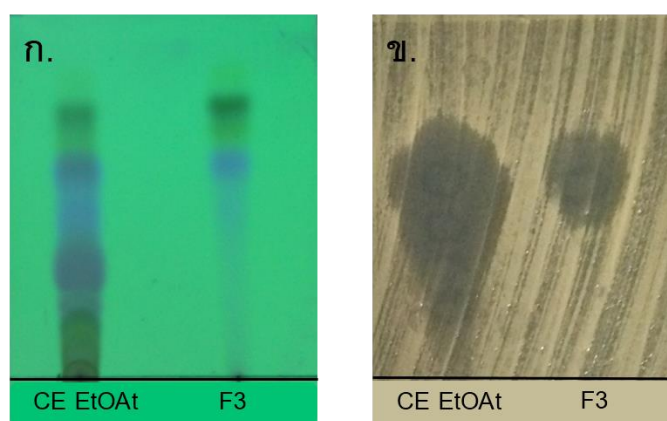
เมื่อนำส่วนสกัดย่อยทั้ง 8 fraction ที่ได้มาทดสอบหาสารออกฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 43300 ด้วยวิธี Bioassay guided isolation พบว่าส่วนสกัดย่อย F3 และ F6 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีที่สุด ดังตารางที่ 4-5 และภาพที่ 4-2 และ ภาพที่ 4-3 ดังนั้นจึงนำ F3 และ F6 มาทำการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีเพื่อหาสารบริสุทธิ์ แสดงแผนภาพการทำบริสุทธิ์สารในภาพที่ 4.4

ตารางที่ 4-4 ระบบของตัวทำละลายของแต่ละ fractions ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท

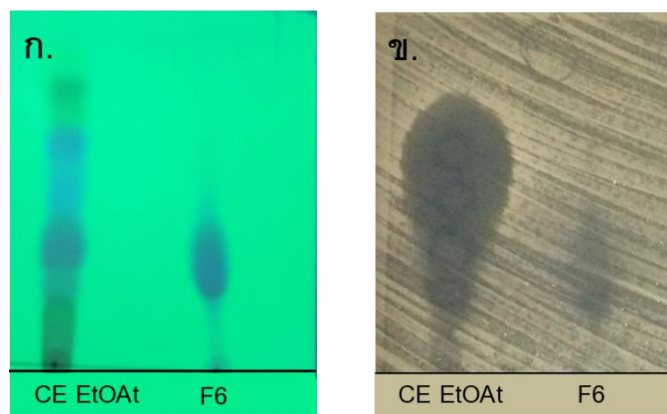
ตัวอย่าง	ระบบของตัวทำละลาย	อัตราส่วนของสารละลายเคลื่อนที่	Fractions
ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท	Ethyl acetate : Hexane	30 : 70	F1
		30 : 70	F2
		40 : 60	F3
		50 : 50	F4
		60 : 40	F5
		70 : 30	F6
		90 : 10	F7
		100	F8

ตารางที่ 4-5 แสดงน้ำหนัก และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย
เอทิลอะซิเตทจากไบโมาส

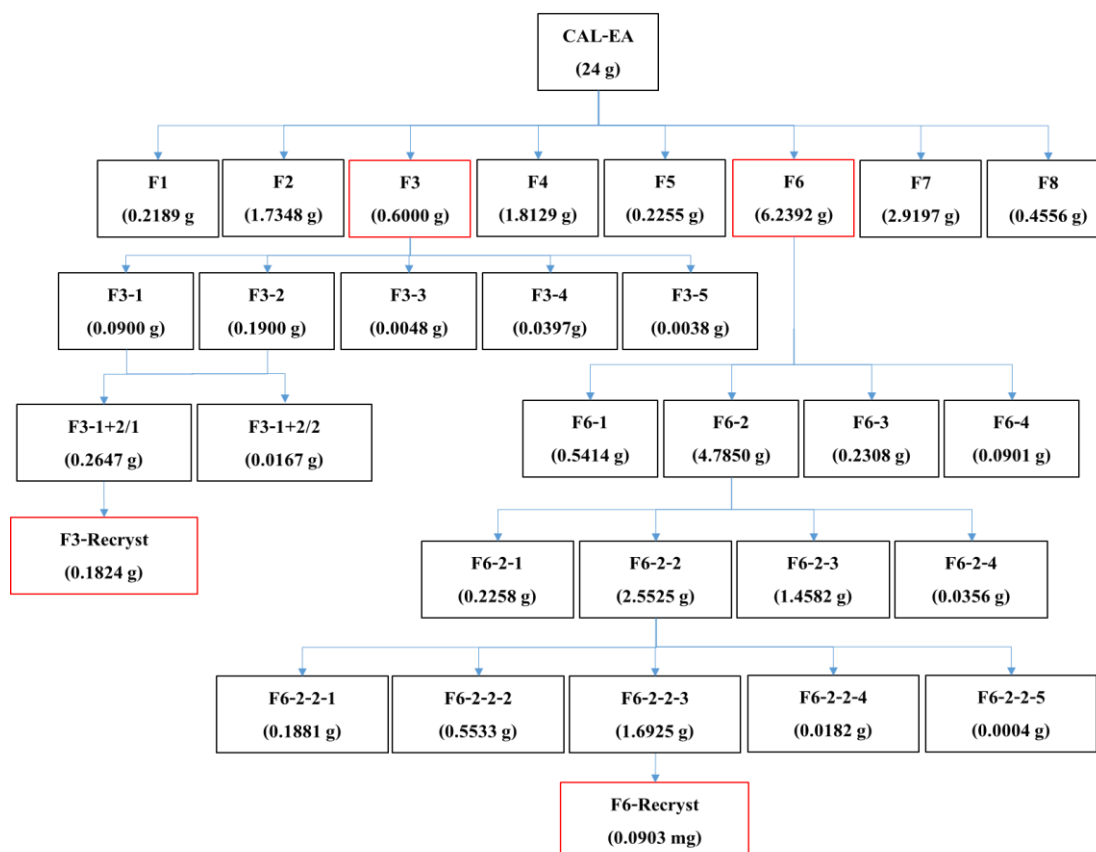
ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	เปอร์เซ็นต์น้ำหนัก แห้ง	ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย
F1	0.22	0.92	inactive
F2	1.73	7.21	inactive
F3	0.60	2.50	active
F4	1.81	7.54	inactive
F5	0.23	0.96	inactive
F6	6.24	26.00	active
F7	2.92	12.17	inactive
F8	0.46	1.92	inactive



ภาพที่ 4-2 TLC pattern ที่แยกโดยใช้ Ethyl acetate : Hexane 40 : 60 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (ภาพที่ 4-2ก.) และ Bioautograph แสดงฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ATCC 43300 (ภาพที่ 4-2ข.) ของ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (CE EtOat) และ CE EtOat subfraction ลำดับที่ 3 (F3)



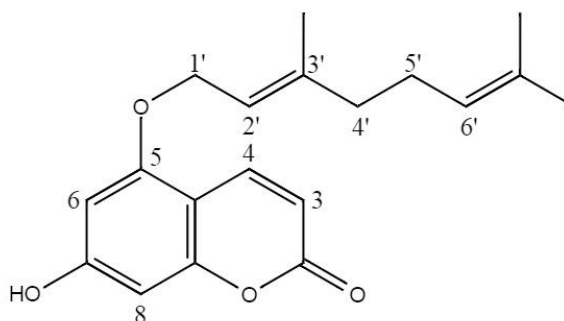
ภาพที่ 4-3 TLC pattern ที่แยกโดยใช้ Ethyl acetate : Hexane 40 : 60 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (ภาพที่ 4-3ก.) และ Bioautograph แสดงฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ATCC 43300 (ภาพที่ 4-3ข.) ของ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (CE EtOat) และ CE EtOat subfraction ลำดับที่ 6 (F6)



ภาพที่ 4-4 แผนภาพการทำบริสุทธิ์สารจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะอึ๊ก

เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างสารของ F3 ด้วย ^1H NMR, ^{13}C NMR และ LC-MS และนำสเปกตรัม NMR เปรียบเทียบกับรายงานของ Ito, Ohta, Tan, and Furukawa (1996) ดังตารางที่ 4-6 และ ตารางที่ 4-7 พบว่าสาร F3-Recryst คือ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin (ภาพที่ 4-5) สารนี้มีลักษณะเป็นเกล็ดสีขาวอมเขียวอ่อน สูตรโครงสร้างคือ $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 314.78 กรัมต่อโมล

HR-MS ของ $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$: 314.1516 พบว่า 315.1632



ภาพที่ 4-5 โครงสร้างทางเคมีของสาร 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin

ตารางที่ 4-6 ตารางเปรียบเทียบสเปกตรัม ^1H NMR ของสาร 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin

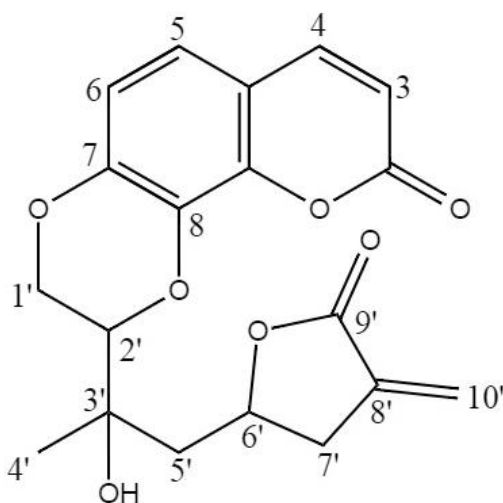
ตำแหน่ง	Ito, Ohta, Tan, and Furukawa (1996)	F3-Recryst
		8.37 (1H, br, s)
H-4	8.06 (1H, d, J=9.5 Hz)	8.07 (1H, d, J=9.6 Hz)
H-6	6.62 (1H, d, J=2.2 Hz)	6.69 (1H, d, J=1.6 Hz)
H-8	6.32 (1H, d, J=2.2 Hz)	6.35 (1H, d, J=1.2 Hz)
H-3	6.15 (1H, d, J=9.5 Hz)	6.14 (1H, d, J= 9.6 Hz)
H-2'	5.48 (1H, t, J=6.6 Hz)	5.48 (1H, t, J= 6.4 Hz)
H-6'	5.09 (1H, m)	5.09 (1H, t, J=4.8 Hz)
H-1'	4.61 (2H, d, J=6.6 Hz)	4.60 (2H, d, J=6.4Hz)
H-4', 5'	2.11 (4H, m)	2.11 (4H, m)
	1.75, 1.68, 1.61 (each 3H, s)	1.74, 1.68, 1.61 (each 3H, s)

ตารางที่ 4-7 ตารางเปรียบเทียบสเปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin

Ito, Ohta, Tan, and Furukawa (1996)	F3-Recryst
162.6	163.2
160.9	161.6
156.8	156.8
156.5	156.4
142.2	142.2
139.9	140.4
131.9	131.4
123.6	123.6
118.4	118.4
109.9	109.4
104.0	103.9
96.3	96.5
95.7	95.7
65.8	65.8
39.5	39.5
26.2	26.2
25.6	25.6
17.7	17.7
16.7	16.7

เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างสารของ F6 ด้วย $^1\text{H NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$ และ LC-MS และนำสเปกตรัม NMR เปรียบเทียบกับรายงานของ Ito et al. (2000) ดังตารางที่ 4-8 และตารางที่ 4-9 พบว่าสาร F6-Recryst คือ Clauslactone A (ภาพที่ 4-6) สารนี้มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว สูตรโครงสร้างคือ $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_7$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 358.346 กรัมต่อโมล

HR-MS ของ $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_7$: 358.105 พบว่า 359.108



ภาพที่ 4-6 โครงสร้างทางเคมีของสาร Clauslactone A

ตารางที่ 4-8 ตารางเปรียบเทียบสเปกตรัม ^1H NMR ของสาร Clauslactone A

ตำแหน่ง	Ito et al., (2000)	F6-Recryst
H-3	6.28 (d, J=9.5)	6.29 (d, J=9.6)
H-4	7.64 (d, J=9.5)	7.65 (d, J=9.2)
H-5	6.98 (d, J=8.8)	7.00 (d, J=8.4)
H-6	6.85 (d, J=8.8)	6.87 (d, J=8.8)
H-1'	4.10 (dd, J= 11.0, 9.2)	4.13 (dd, J=10.9, J=9.0)
	4.64 (dd, J= 11.0, 2.2)	4.65 (dd, J=10.8, J=1.4)
H-2'	4.18 (dd, J=9.2, 2.2)	4.20 (dd, J=10.3, J=1.9)
H-4'	1.42 (3H)	1.43 (3H)
H-5'	2.32 (dd, J=15.0, 3.3)	2.36 (dd, J=14.8, J=2.8)
	1.91 (dd, J=15.0, 9.9)	1.93 (dd, J=14.8, J=10)
H-6'	4.93 (m)	4.94 (m)
H-7'	3.22 (ddt, J=17.2, 7.3, 2.6)	3.23 (dd, J=16, J=7.4)
	2.69 (ddt, J=17.2, 7.0, 2.6)	2.71 (m)
H-10'	6.28 (t, J=2.6)	6.29 (t, J=3.2)
	5.70 (t, J= 2.6)	5.72 (s)
	2.93 (br, OH)	2.96 (s, OH)

ตารางที่ 4-9 ตารางเปรียบเทียบสเปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร Clauslactone A

ตำแหน่ง	Ito et al., (2000)	F6-Recryst
C-2	160.7	160.7
C-3	113.5	113.6
C-4a	143.9	143.9
C-4	113.4	113.4
C-5	119.8	119.8
C-6	113.7	113.8
C-7	146.6	146.6
C-8	131.3	131.3
C-8a	143.8	143.8
C-1'	65.0	65.0
C-2'	77.6	77.6
C-3'	72.0	72.0
C-4'	23.2	23.2
C-5'	44.1	44.1
C-6'	74.2	74.2
C-7'	34.7	34.7
C-8'	133.5	133.6
C-9'	169.5	169.6
C-10'	122.9	122.8

4.3.2 ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียทดสอบ (MBC) ของสาร 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin และ Clauslactone A

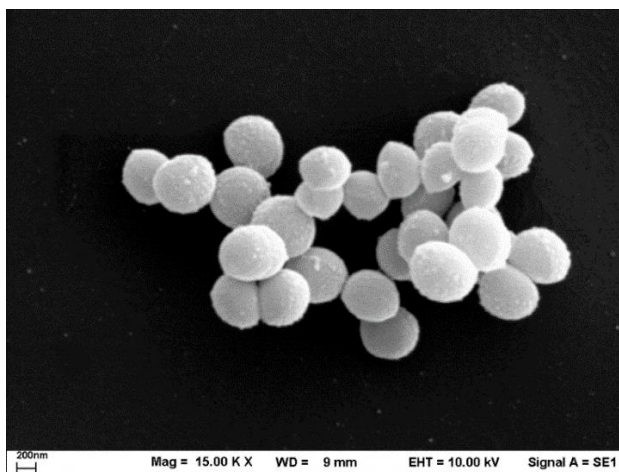
เมื่อนำสาร 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin และ Clauslactone A มาตรวจหาค่า MIC ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 พบว่า 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 ได้ดีที่สุดใน โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 เท่ากับ 2-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อเท่ากับ 2-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัด Clauslactone A มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 อยู่ในช่วง 256-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อเท่ากับ 1024 และมากกว่า 1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังตารางที่ 4-10

ตารางที่ 4-10 ค่า MIC และ MBC ของสาร 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin, Clauslactone A และยาปฏิชีวนะ Oxacillin ต่อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300

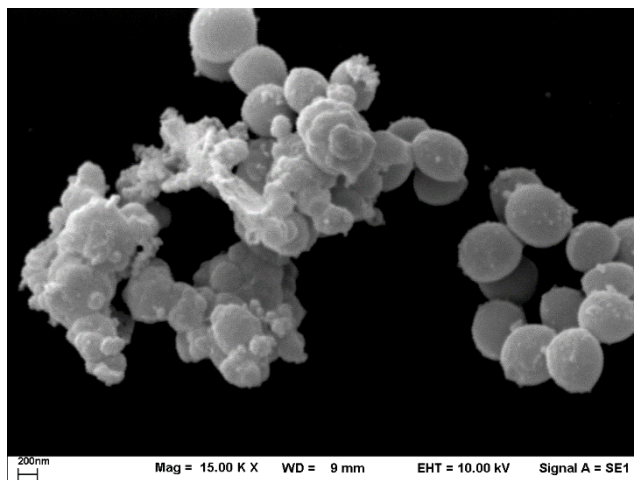
แบคทีเรียทดสอบ	สารสกัด	MIC (มก./มล.)	MBC (มก./มล.)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin	2-4	2-4
	Clauslactone A	512	1024
	Oxacillin	0.5	2
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin	2	2-4
	Clauslactone A	256	>1024
	Oxacillin	64-128	128

4.4 การตรวจสอบกลไกการยับยั้งแบคทีเรียเบื้องต้นของสารบริสุทธิ์จากไบโม่ฮิกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

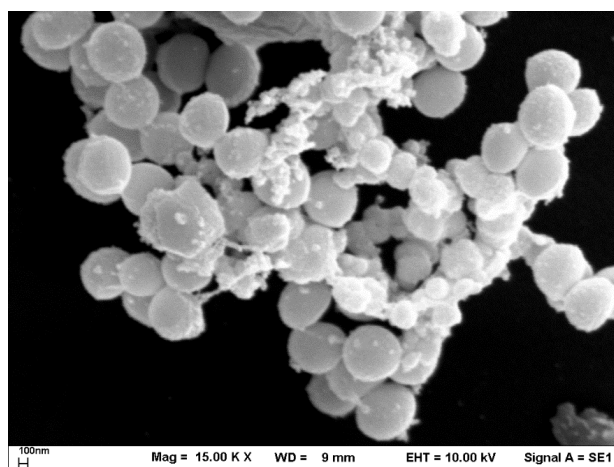
จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ของสาร 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin และ Clauslactone A จากไบโม่ฮิก พบว่าสารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดที่ได้จากไบโม่ฮิกมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำสารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดมาศึกษา กลไกการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้น โดยทำการทดสอบกับ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะจุลสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ของแบคทีเรียทดสอบภายหลังการสัมผัสกับสารบริสุทธิ์ ผลการทดสอบพบว่าเซลล์ปกติของ *S. aureus* ATCC 25923 ที่บ่มในอาหาร MHB และ *S. aureus* ATCC 43300 ที่บ่มในอาหาร MHB เติม โซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากสารต้านจุลินทรีย์ และเติม DMSO 10 ไมโครลิตร (ชุดควบคุม) มีลักษณะกลม จัดเรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายรวงงุ่น ผิวเซลล์ค่อนข้างเรียบ (ภาพที่ 4-7) (ภาพที่ 4-12) แต่เซลล์ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 ที่สัมผัสกับสาร 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin และ Clauslactone A จากไบโม่ฮิกที่ระดับความเข้มข้น 1/2MIC และ 1/4MIC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีลักษณะเซลล์ที่ผิดปกติแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นและฤทธิ์ของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ



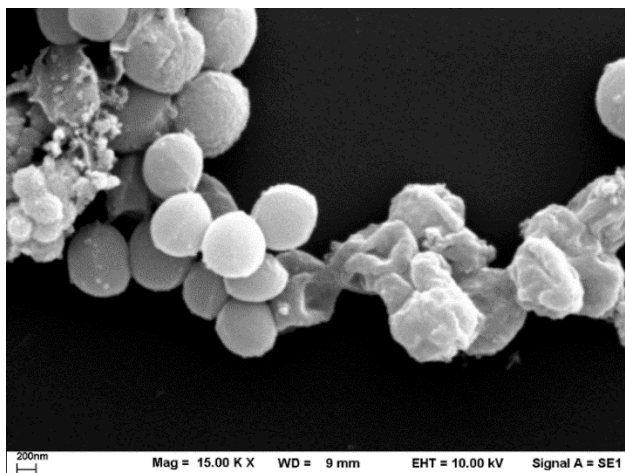
ภาพที่ 4-7 ลักษณะจุลสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ของ *S. aureus* ATCC 25923 เมื่อบ่มในอาหาร MHB ที่ปราศจากสารต้านจุลินทรีย์ ที่เติม DMSO 10 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ชุดควบคุม)



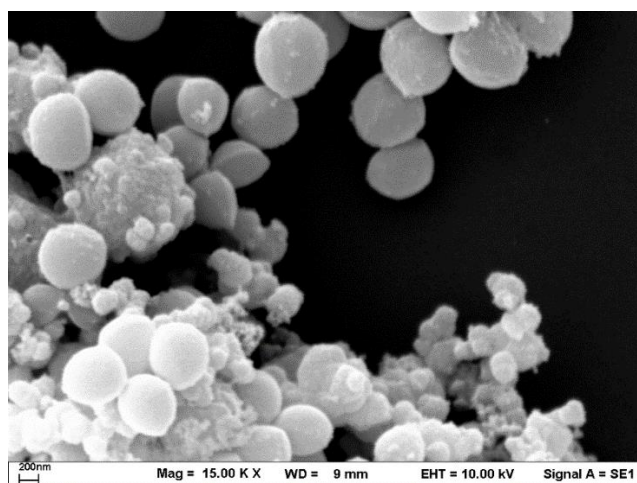
ภาพที่ 4-8 ลักษณะจุลทรรศน์ภายใต้กล้อง SEM ของ *S. aureus* ATCC 25923 ที่สัมผัสกับสารสกัด 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin ที่ความเข้มข้น 1/2MIC ในอาหาร MHB บ่มที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง พบว่าลักษณะเซลล์ของ *S. aureus* ATCC 25923 แตกสลายเป็นเศษซากเซลล์เล็ก ๆ



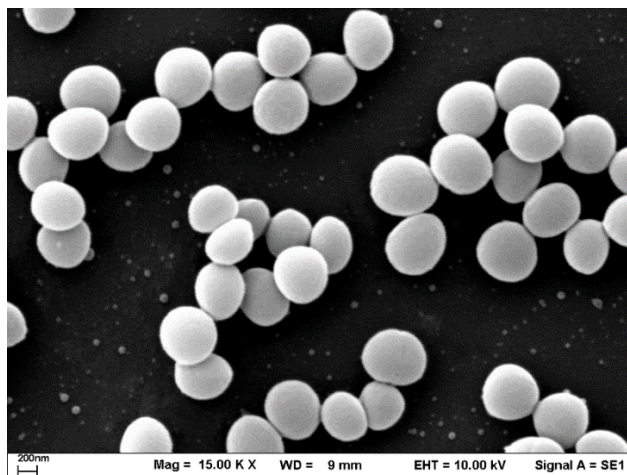
ภาพที่ 4-9 ลักษณะจุลทรรศน์ภายใต้กล้อง SEM ของ *S. aureus* ATCC 25923 ที่สัมผัสกับสารสกัด 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin ที่ความเข้มข้น 1/4MIC ในอาหาร MHB บ่มที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง พบว่าลักษณะเซลล์บางส่วนของ *S. aureus* ATCC 25923 เรียบเล็กไม่เจริญและมีซากเซลล์ที่ตายแล้ว



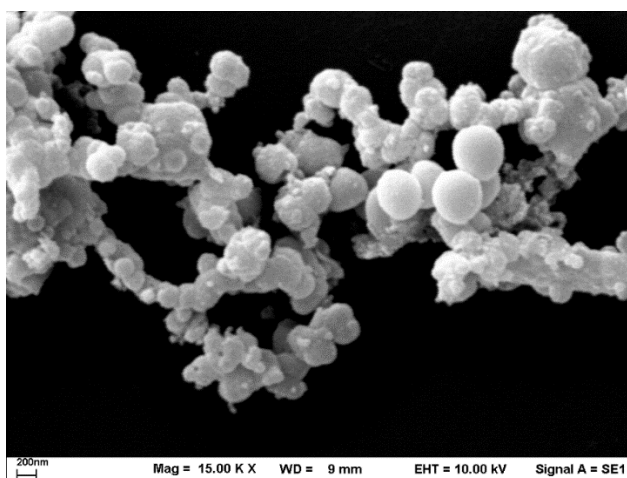
ภาพที่ 4-10 ลักษณะจุลทัศน์ฐานภายใต้กล้อง SEM ของ *S. aureus* ATCC 25923 ที่สัมผัสกับสาร Clauslactone A ที่ความเข้มข้น 1/2MIC ในอาหาร MHB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง พบว่าลักษณะเซลล์บางส่วนของ *S. aureus* ATCC 25923 เหี่ยวและผิวเซลล์ไม่เรียบและมีซากเซลล์ที่ตายแล้ว



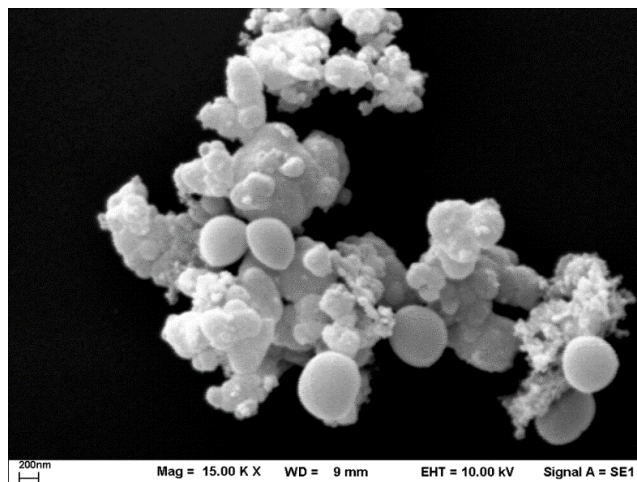
ภาพที่ 4-11 ลักษณะจุลทัศน์ฐานภายใต้กล้อง SEM ของ *S. aureus* ATCC 25923 ที่สัมผัสกับสาร Clauslactone A ที่ความเข้มข้น 1/4 MIC ในอาหาร MHB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงพบว่าลักษณะเซลล์บางส่วนของ *S. aureus* ATCC 25923



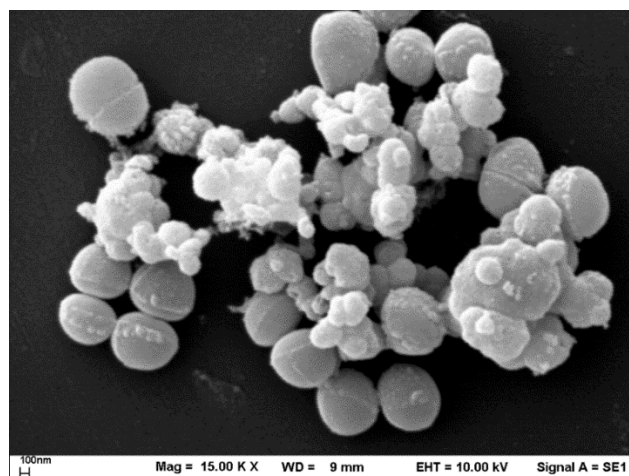
ภาพที่ 4-12 ลักษณะจุลทัศน์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ของ *S. aureus* ATCC 43300 เมื่อบ่มในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากสารต้านจุลินทรีย์ ที่เติม DMSO 10 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (ชุดควบคุม)



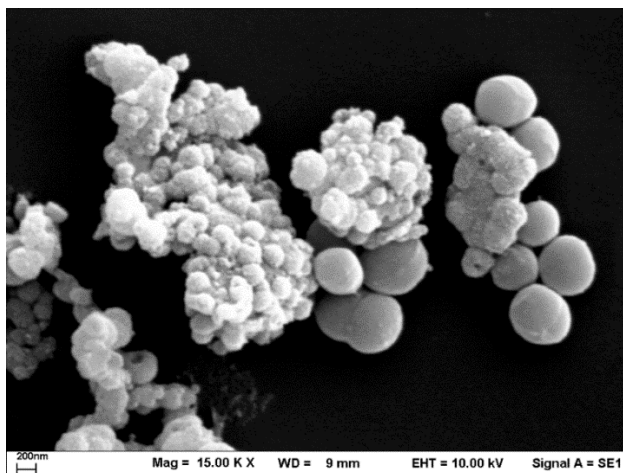
ภาพที่ 4-13 ลักษณะจุลทัศน์ภายใต้กล้อง SEM ของ *S. aureus* ATCC 43300 ที่สัมผัสกับ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin ที่ความเข้มข้น 1/2MIC ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง พบว่าลักษณะเซลล์ของ *S. aureus* ATCC 43300 ผิวเซลล์ไม่เรียบและริบเล็กไม่เจริญ เมื่อเทียบกับลักษณะเซลล์ของชุดควบคุม



ภาพที่ 4-14 ลักษณะจุลทัศน์ฐานภายใต้กล้อง SEM ของ *S. aureus* ATCC 43300 ที่สัมผัสกับสาร 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin ที่ความเข้มข้น 1/4MIC ในอาหาร MHB ที่เติม โซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง พบว่าลักษณะเซลล์ของ *S. aureus* ATCC 43300 ผิวเซลล์ไม่เรียบและเรียบเล็กไม่เจริญเมื่อเทียบกับลักษณะเซลล์ของชุดควบคุม



ภาพที่ 4-15 ลักษณะจุลทัศน์ฐานภายใต้กล้อง SEM ของ *S. aureus* ATCC 43300 ที่สัมผัสกับสาร Clauslactone A ที่ความเข้มข้น 1/2MIC ในอาหาร MHB ที่เติม โซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง พบว่าลักษณะเซลล์ของ *S. aureus* ATCC 43300 เซลล์มีการแบ่งตัว เซลล์มีรูปร่างเหี่ยว และเล็กลง

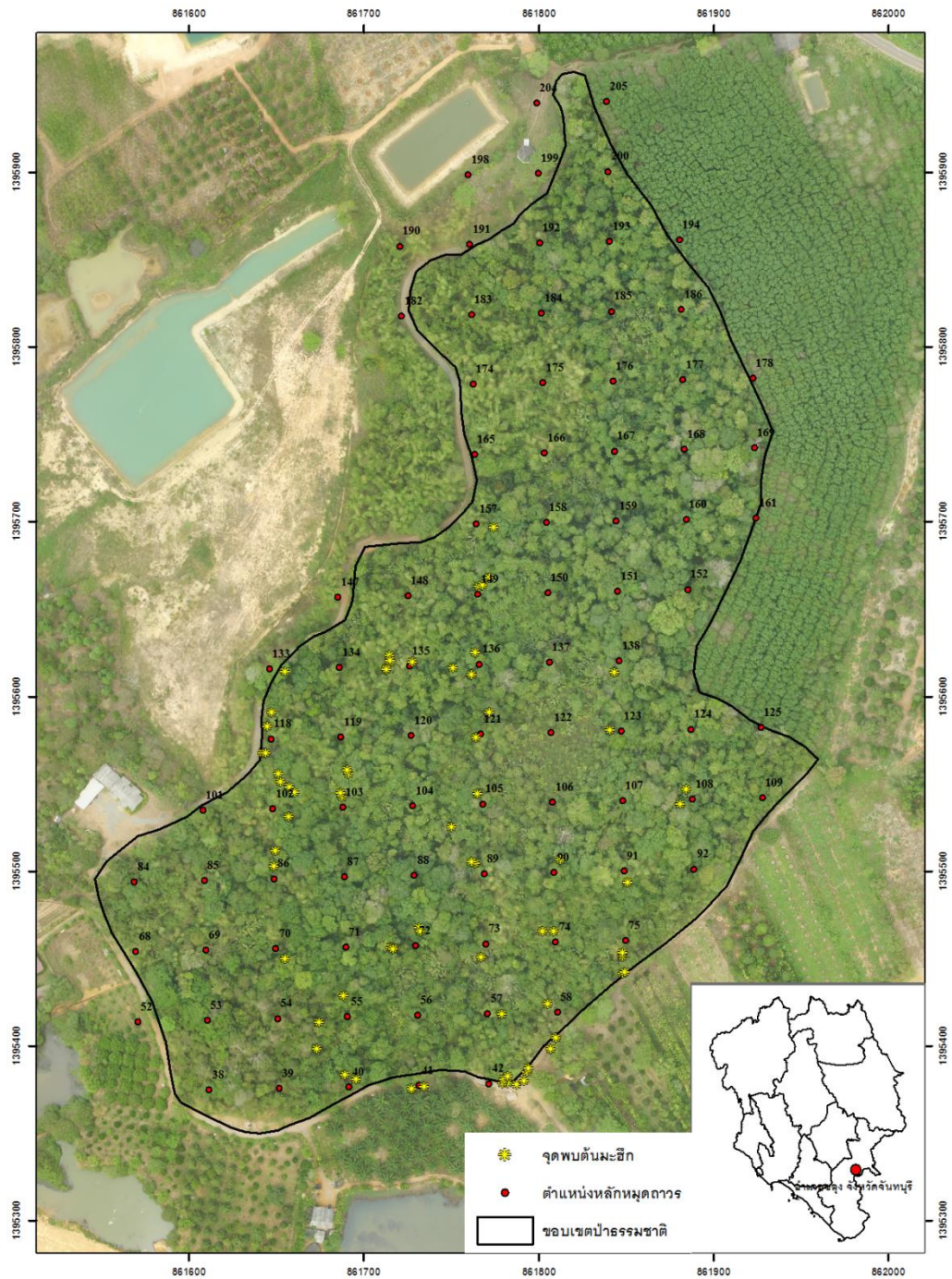


ภาพที่ 4-16 ลักษณะจุลทัศน์ฐานภายใต้กล้อง SEM ของ *S. aureus* ATCC 43300 ที่สัมผัสกับสาร Clauslactone A ที่ความเข้มข้น 1/4MIC ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง พบว่าลักษณะเซลล์ของ *S. aureus* ATCC 43300 เซลล์มีการแบ่งตัว เซลล์มีรูปร่างเหี่ยว เล็กกลง มีซากเซลล์มากมาย

4.5 ตำรวจการกระจายของมะฮิกและจัดทำแผนที่การกระจายของต้นมะฮิกโดยใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (Geographic Information System ; GIS)

จากการสำรวจภาคสนาม โดยกำหนดตำแหน่งและขอบเขตของพื้นที่ศึกษาจากแปลงถาวรทั้งหมด 39 แปลง ทำการเก็บพิกัดจุดที่พบต้นมะฮิกด้วยเครื่องบอกตำแหน่งพิกัดทางภูมิศาสตร์ (Global Positioning System : GPS) และนำข้อมูลตำแหน่งพิกัดทางภูมิศาสตร์มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Arc GIS 9.3 จากภาพที่ 4.17 จะเห็นได้ว่ามะฮิกกระจายทั่วพื้นที่ป่า แต่ขอบป่าจะพบมะฮิกจำนวนมากและมีความสมบูรณ์กว่าในพื้นที่ป่า นอกจากนี้ยังทำการเก็บดินเพื่อวิเคราะห์ปัจจัยสิ่งแวดล้อม โดยแบ่งเก็บดินทั้งหมด 3 จุดในแปลง จุดที่ 1 เป็นตัวแทนพื้นที่ที่พบมะฮิกต้นสมบูรณ์บริเวณขอบป่า จุดที่ 2 ตัวแทนพื้นที่ระหว่างที่พบมะฮิกต้นสมบูรณ์กับพบมะฮิกต้นไม่สมบูรณ์ และจุดที่ 3 พื้นที่ที่พบมะฮิกไม่สมบูรณ์ จากการวิเคราะห์ดินพบว่า ดินทั้ง 3 จุดแตกต่างกัน จากตารางที่ 4.11 จะเห็นได้ว่าดินในจุดที่ 1 มีอินทรีย์วัตถุ (OM) และธาตุอาหารพืชสูงกว่าจุดที่ 2 และ 3 เมื่อทำการวัดความเข้มแสงของทั้ง 3 จุดพบว่าจุดที่ 1 บริเวณขอบป่าที่พบมะฮิกต้นสมบูรณ์มีความเข้มแสงเท่ากับ 531 Lax จุดที่ 2 ความเข้มแสงเท่ากับ 5 Lax จุดที่ 3 ความเข้มแสงเท่ากับ 5 Lax ดังแสดงใน

ตารางที่ 4.11 ดังนั้นถึงอธิบายได้ว่าปัจจัยที่ทำให้พบต้นมะฮิกแตกต่างกันระหว่างพื้นที่ขอบป่าและในป่าขึ้นอยู่กับปัจจัยของแสง



ภาพที่ 4-17 แผนที่การกระจายของต้นมะฮิกในพื้นที่ป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี

ตารางที่ 4.11 ลักษณะดินและความเข้มแสงในแต่ละแปลงตัวอย่าง

ตัวอย่าง	OM (%)	N(mg/kg)	P(mg/kg)	K (mg/kg)	Texture	Lux mister
จุดที่ 1	4.45	21.32	0.88	37.40	Clay	531
จุดที่ 2	4.12	21.32	0.59	33.14	Clay	5
จุดที่ 3	4.10	21.32	0.70	35.72	Clay	5

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

ปัจจุบันปัญหาการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นเนื่องจากกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ ได้แก่ การใช้ยาปฏิชีวนะในโรงพยาบาล ชุมชน มากเกินความจำเป็น อย่างไม่เหมาะสม ขาดมาตรการควบคุม และการนำยาปฏิชีวนะไปใช้ในอุตสาหกรรมปศุสัตว์ ประมง กสิกรรม เป็นปัญหาที่ทั่วโลกให้ความสำคัญและต้องการที่จะแก้ไข ทั้งนี้เนื่องจากการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อมเป็นการเพิ่มโอกาสให้แบคทีเรียในระบบนิเวศต่าง ๆ ได้รับสัมผัสกับยาปฏิชีวนะได้บ่อยขึ้น อย่างไรก็ตามการสัมผัสกับยาปฏิชีวนะในระดับที่ต่ำเกินกว่าจะฆ่าแบคทีเรียได้เป็นระยะเวลาสั้น ๆ เป็นปัจจัยสำคัญที่กระตุ้นให้แบคทีเรียเกิดการพัฒนากลไกการดื้อยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ทั้งในกลุ่มของแบคทีเรียสกุลเดียวกันและ/หรือต่างสกุลทำให้มีอุบัติการณ์ของแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อยาเพิ่มมากขึ้น โดยในปี ค.ศ. 2013 ศูนย์ป้องกันและควบคุมโรค (CDC, 2013) ได้รายงานการปรากฏของแบคทีเรียดื้อยาหลายชนิดที่สามารถทำให้เกิดโรคติดเชื้อในมนุษย์ซึ่งเป็นอันตรายและยากต่อการรักษาให้หายได้ด้วยยาปฏิชีวนะที่มีอยู่ในปัจจุบัน เช่น *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ที่ดื้อยา carbapenems หรือเรียกย่อ ๆ ว่า KPC และ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อยา methicillin หรือมีชื่อเรียกย่อ ๆ ว่า MRSA ซึ่งนอกจากจะดื้อยาในกลุ่ม methicillin แล้วยังมีรายงานว่า MRSA ส่วนใหญ่ มักจะดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนาน (Abdulgader, Shittu, Nicol, & Kaba, 2015)

ถึงแม้ว่าจะมีการพัฒนายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ ขึ้นมาเพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียดื้อยาเหล่านี้ แต่เมื่อมีการนำมาใช้กันมากขึ้น ไซคลิกวิท หรือใช้โดยไม่จำเป็น ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ก็จะเกิดตามมาอย่างรวดเร็ว (Carlet et al., 2012) แนวทางหนึ่งที่จะช่วยชะลอปัญหาการพัฒนาการดื้อยาชนิดใหม่ ๆ ของแบคทีเรียให้เกิดขึ้นช้าลง คือการใช้ยาปฏิชีวนะในยามที่จำเป็นจริง ๆ เท่านั้น ดังนั้นการใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคหรืออาการเจ็บป่วยที่ไม่รุนแรงมากนักจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะโดยไม่จำเป็นได้

มะฮิก เป็นพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่พบในพื้นที่โครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดฯ มีชื่อเรียกพื้นเมืองอื่น ๆ สันโศก ขี้ผึ้ง ชะมัด เพี้ยพาน มะหลุย ยมรุษ สมัดใบใหญ่ สามเสื่อ สามโศก ลำปะหลุย ตำรุษ สิลม แสน โศก หมอน้อย หวดหมอน หล้าสาบอื่น หมี่ หัสคุณ โศก อ้อยช้าง เป็นต้น มะฮิกเป็นพืชในวงศ์ส้ม มีสรรพคุณใช้ในการขับเลือดและหนอง แก้โรคผิวหนัง แก้ผื่นคัน

แก้อาการอักเสบวม และรักษาบาดแผล เป็นต้น โดยมีรายงานจาก พิชญพงษ์ ศรีเดช (2557) พบว่า สารสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะฮึกที่พบในพื้นที่ดังกล่าวมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ MSSA และ MRSA แสดงให้เห็นว่าใบมะฮึกน่าจะมีองค์ประกอบของสารพฤษเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูง ดังนั้นเพื่อแยกและวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากใบมะฮึก โดยใช้เทคนิค Bioassay guide isolation เพราะต้องการนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านจุลชีพชนิดใหม่มาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะได้ในอนาคต

1. การสกัดใบมะฮึกด้วยตัวทำละลายเอทานอล

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ทำการเก็บใบมะฮึกมาจากพื้นที่ในโครงการป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยนำใบมะฮึกมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าได้ส่วนสกัดสีเขียวเข้ม มีกลิ่นฉุน และได้ปริมาณสารสกัดเท่ากับ 12.06 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักใบมะฮึกแห้ง แสดงให้เห็นว่าใบมะฮึกมีองค์ประกอบของสารพฤษเคมีที่มีคุณสมบัติละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณส่วนสกัดเอทานอลที่ได้จากใบพืชชนิดอื่นในวงศ์เดียวกัน เช่น ส่วนสกัดเอทานอลของใบช่อฟ้า *Clausena harmandiana* มีปริมาณสารเท่ากับ 2.02 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักใบช่อฟ้าแห้ง (วิทวัส ศาสวัตสุวรรณ, อนันตชิน อินทรักษา, ธเนศ ศรีสุวรรณวัฒน์, วรศักดิ์ ชัยวิภาส และอาริยา รัตนทองคำ, 2014)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณส่วนสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะฮึกที่สกัดได้จากงานวิจัยนี้กับรายงานของกล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ (2556) ที่ทำการสกัดใบมะฮึกด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และได้ปริมาณส่วนสกัดเอทานอลจากใบมะฮึกเท่ากับ 12.26 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักใบมะฮึกแห้ง พบว่าปริมาณส่วนสกัดที่ได้สอดคล้องกัน แต่แตกต่างจากรายงานของพิชญพงษ์ ศรีเดช (2557) ที่พบว่าส่วนสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะฮึกเท่ากับ 16.81 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักใบมะฮึกแห้ง แสดงให้เห็นว่าปริมาณส่วนสกัดที่ได้จากส่วนของพืชชนิดเดียวกันอาจมีความผันแปรแตกต่างกันขึ้นอยู่กับช่วงเวลาและอายุของการเก็บเกี่ยว เป็นต้น (จิราอนุช นิ่งเมือง, 2556)

2. การแยกสารพฤษเคมีที่เป็นองค์ประกอบของส่วนสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะฮึกด้วยวิธีการสกัดลำดับส่วน (sequential extraction) ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

การแยกสารพฤษเคมีที่เป็นองค์ประกอบของส่วนสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะฮึกด้วยวิธีการสกัดลำดับส่วน (sequential extraction) ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เอทิลอะซิเตท ตามลำดับ ได้ปริมาณของส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทเท่ากับ 22.81 และ 42.66 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักส่วนสกัดหยาบเอทานอลหลังระเหยแห้ง ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าส่วน

สกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบมะฮิกมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งสูงสุด รองลงมาคือส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ซึ่งมากกว่าส่วนสกัดหยาบเอทานอล ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Albaayit et al. (2014) ที่พบว่าเอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถสกัดสารจากใบมะฮิกได้สูงสุด แสดงให้เห็นว่า ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณส่วนสกัดที่ได้ คือชนิดของตัวทำละลาย สอดคล้องกับรายงานของ Kongkathip et al. (2005) ได้นำเหง้าและรากของต้นมะฮิกมาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเอทานอลตามลำดับ พบว่าได้ปริมาณของสารสกัดส่วนของเหง้าเท่ากับ 0.16 0.84 และ 1.28 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของพืชตัวอย่างตามลำดับ และปริมาณของสารสกัดจากรากเท่ากับ 0.26 0.73 และ 1.27 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของพืชตัวอย่างตามลำดับ และงานวิจัยของ Manosroi, Saraphanchotiwitthaya, and Manosroi (2003) ได้ทำการสกัดเนื้อไม้ของต้นมะฮิกด้วยน้ำและอะซิโตนพบว่าได้ปริมาณสารสกัดเท่ากับ 1.63 และ 0.37 ตามลำดับ เนื่องจากส่วนของพืชที่นำมาสกัดมีความแตกต่างกันจึงได้ปริมาณสารสกัดแตกต่างกัน และปริมาณสารสกัดที่ได้ยังแตกต่างจากงานวิจัยของ Ito et al. (1996) ได้ทำการสกัดเปลือกลำต้นของต้นมะฮิกด้วยตัวทำละลายอะซิโตน พบว่าได้ปริมาณสารสกัดเท่ากับ 1.35 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของพืชตัวอย่าง

จากข้อมูลข้างต้นพบว่าปริมาณสารสกัด (% Yield) ที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ส่วนของพืชที่นำมาสกัด ตัวทำละลาย และปริมาณสารพฤษเคมีในพืชที่สามารถละลายในตัวทำละลายที่ใช้ เนื่องจากการสกัดสมุนไพรเป็นการดึงหรือชะส่วนที่ละลายออกมาจากส่วนที่ไม่ละลายด้วยการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยทั่วไปแล้วการเลือกตัวทำละลายจะพิจารณาจากคุณสมบัติของสารที่คล้ายคลึงกันย่อมจะละลายด้วยกันได้ (Like dissolves like) คือสารจะละลายในตัวทำละลายที่มีโครงสร้างหรือหมู่ฟังก์ชันคล้ายกัน เช่น ตัวทำละลายที่มีขั้ว (Polar solvent) จะละลายโมเลกุลมีขั้ว (Polar molecule) ส่วนตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (Nonpolar solvent) จะละลายโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว (Nonpolar molecule) (พรสวรรค์ ดิษยบุตร, จักรพงษ์ ลิ้มปนุสสรณ์, ธัญวรรณ์ กาจสงคราม, พงศธร หลิมศิริวงษ์ และลักขณา พงศ์พงัน, 2543) ในกรณีที่ไม่ทราบว่ามีสารอะไรนิยมใช้ตัวทำละลายที่สกัดได้มากกลุ่ม แต่ถ้าหากทราบแน่นอนแล้วสามารถเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการสกัดใบมะฮิกโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายเริ่มต้น เนื่องจากเป็นตัวทำละลายชนิดเลือกได้ทั่วไป มีความสามารถในการละลายได้กว้าง ทำละลายได้ทั้งสารมีขั้วและไม่มีขั้ว แยกตัวทำละลายออกจากสารสกัดได้ง่าย สามารถลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในสารสกัดได้ และสามารถใช้ละลายเอโนไซม์ในพืชได้ (อนุชิต พลบูรณ์การ, 2545 และ

ปนัดดา พัฒนาวิน, 2550) นอกจากนี้ยังพบว่าการสกัดสารจากใบมะฮิเก้ที่เก็บในเวลา ฤดูกลาง หรือ สถานที่ต่างกัน ปริมาณสารสกัดที่ได้อาจเท่ากันหรือแตกต่างกันได้โดยจิราณูช มิ่งเมือง (2556) อธิบายไว้ว่าสมุนไพรจะมีความแปรปรวนสูง ถึงแม้ว่าจะสกัดสารออกมาด้วยตัวทำละลายและวิธี เดียวกันสารที่ออกมาอาจจะแตกต่างกัน เนื่องจากสารพฤกษเคมีในพืชนั้นจะแปรเปลี่ยนไปตาม ปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ชนิดของพืช ส่วนของพืช สภาพแวดล้อม การเพาะปลูก ช่วงเวลาและอายุในการ เก็บเกี่ยวที่เหมาะสม เป็นต้น

3. การคัดเลือกส่วนสกัดย่อยต่าง ๆ จากใบมะฮิเก้ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย ทดสอบได้ดีที่สุด

เมื่อทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 ของส่วนสกัดหยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท ที่ขนาดบรรจุ 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ด้วยวิธี disk diffusion โดยมีดิสก์บรรจุ DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ และดิสก์ยา ปฏิชีวนะ cefoxitin เป็นชุดควบคุมคุณภาพการทดสอบ ผลการทดสอบพบว่าส่วนสกัดทั้ง 3 ส่วน แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้งสองสายพันธุ์ โดยพบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิล อะซิเตทจากใบมะฮิเก้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) การเจริญของ แบคทีเรียทดสอบทั้งสองสายพันธุ์กว้างมากที่สุด รองลงมาคือส่วนสกัดหยาบเอทานอล และส่วน สกัดย่อยเฮกเซน ตามลำดับ

ในการทดสอบนี้จะทดสอบโดยใช้ดิสก์ยา cefoxitin (30 ไมโครกรัมต่อดิสก์) ในชุด ควบคุมคุณภาพของระบบการทดสอบ พบว่าดิสก์ยา cefoxitin (30 ไมโครกรัมต่อดิสก์) แสดงฤทธิ์ ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 26.67 ± 1.53 มิลลิเมตร บนอาหาร MHA ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานตามที่ CLSI, (2005) กำหนด คือ อยู่ในช่วง 23-29 มิลลิเมตร บนอาหาร MHA (มาลิน จุลศิริ, 2532) จึงอ่านผลการ ทดสอบส่วนสกัดที่นำมาทดสอบได้ อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้ยา cefoxitin ในชุดควบคุมคุณภาพ ของระบบการทดลอง ยังสามารถใช้จำแนกชนิดของ MSSA และ MRSA ได้โดยขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อมาตรฐานตามที่ CLSI, (2013) กำหนดคือ มากกว่าหรือเท่ากับ 22 มิลลิเมตร จัดเป็น MSSA และน้อยกว่าหรือเท่ากับ 21 มิลลิเมตรจัดเป็น MRSA สำหรับชุด ควบคุมผลลบ พบว่าดิสก์บรรจุ DMSO ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้งสอง สายพันธุ์ แสดงว่าฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบเกิดจากสารสกัด ไม่ได้เกิดจาก ตัวทำละลาย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Jacob and Torre (2015) ที่รายงานว่า DMSO ที่ความ เข้มข้นร้อยละ 10 ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*

จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นทำให้ทราบได้ว่าส่วนสกัดหยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท จากใบมะฮิกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ MSSA และ MRSA ได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากการทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion นี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ ดังนั้นจึงต้องตรวจสอบยืนยันผลด้วยการหาค่า MIC ของส่วนสกัดทั้งสามส่วนจากใบมะฮิก

ในการทดสอบหาค่า MIC ของส่วนสกัดหยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮิกด้วยวิธี Macrobroth dilution ในการทดสอบนี้จะทดสอบโดยใช้ยา oxacillin เป็นชุดควบคุมคุณภาพของระบบการทดลองในอาหาร MHB และ MHB ที่เติม NaCl 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายาปฏิชีวนะ oxacillin แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานตามที่ CLSI (2005) กำหนดคือ 0.25-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อทดสอบเป็นเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ที่มีปริมาณเชื้อทดสอบเท่ากับ 0.5×10^8 CFU/ml สำหรับชุดควบคุม Solvent control คือเชื้อทดสอบที่เติม DMSO 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแบคทีเรียทดสอบทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารละลาย DMSO 1 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า DMSO 1 เปอร์เซ็นต์ ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งมีรายงานว่า *S. aureus* ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อ DMSO ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ใน DMSO ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (Wadhvani et al., 2009; Júnior, Bezerra, Porto, Herculano, & Marques, 2015) นอกจากนี้ในการทดสอบพบว่าแบคทีเรียทดสอบสามารถเจริญได้ในอาหาร MHB และ MHB ที่เติม NaCl แสดงว่าในการทดสอบสามารถใช้อาหารสองชนิดนี้ในการทดสอบได้

ผลการทดสอบหาค่า MIC ของส่วนสกัดหยาบเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮิกพบว่า ส่วนสกัดทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 โดยพบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮิกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 64 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสกัดหยาบเอทานอล มีค่า MIC อยู่ในช่วง 128-256 และ 64-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และส่วนสกัดย่อยเฮกเซนมีค่า MIC เท่ากับ 256 และ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งผล MIC สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี Disk diffusion ที่พบว่าส่วนสกัดย่อยที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด คือ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท รองลงมา คือ

ส่วนสกัดหยาบเอทานอล และส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อทดสอบมีความไวต่อส่วนสกัดต่าง ๆ จากใบมะฮิ็ก นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮิ็กมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 43300 ได้ดีกว่า *S. aureus* ATCC 25923 แล้วยังมีค่า MIC ใกล้เคียงกับค่า MIC ของ oxacillin แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮิ็กน่าจะมีความศักยภาพในการที่จะนำมาพัฒนาเป็นสารต้านจุลชีพเพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียได้

4. การแยกสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากส่วนสกัดย่อยที่คัดเลือกได้ (ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท)

จากการนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮิ็กมาแยกหาสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้งสองชนิด ด้วยเทคนิค Bioassay guide isolation ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการแยกสารให้เป็นส่วนแยก (fraction) ย่อย ๆ ด้วย Flash column chromatography และนำสารที่แยกได้แต่ละส่วนแยกมาวิเคราะห์เปรียบเทียบองค์ประกอบด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง และทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียขององค์ประกอบที่พบด้วยวิธี bioautography พบว่าส่วนแยกย่อยของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทที่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทดสอบจำนวน 2 ส่วนแยก คือ F3 และ F6 จากส่วนแยกย่อยทั้งหมดจำนวน 8 ส่วนแยก ซึ่งจะนำไปแยกเป็นสารบริสุทธิ์และพิสูจน์เอกลักษณ์ต่อไป การแยกสารที่มีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพควบคู่ไปด้วย (bioassay-guided fractionation) จะช่วยให้ สามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจได้รวดเร็วมากยิ่งขึ้น โดยแบ่งส่วนสกัดเพียงเล็กน้อย ประมาณ 5-10 มิลลิกรัม ที่ได้จากการแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีในขั้นตอนต่าง ๆ ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Buranakit, 2014) ส่วนสกัดใดที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีจะถูกนำไปแยกต่อด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป ฤทธิ์ทางชีวภาพที่คาดว่า จะติดตามจากสารมะฮิ็ก ในระหว่างทำการแยกสารได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เพราะจากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะฮิ็กมีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว

เมื่อนำส่วนแยกย่อย F3 และ F6 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย Flash column chromatography และตกผลึก จะได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด ซึ่งมีลักษณะเป็นเกล็ดสีขาวอมเขียวอ่อนและผงละเอียดสีขาว ตามลำดับ เมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก F3 และ F6 มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิค NMR และ GC-MS และเปรียบเทียบกับรายงานของ Ito et al. (1996) และ Ito et al. (2000) พบว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้คือ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin และ Clauslactone A

5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin

จากการศึกษา 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวอมเขียวอ่อน แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮึก พืชสมุนไพรถิ่นไทย โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค NMR และ GS-MS เปรียบเทียบค่า Chemical shift และ โครงสร้างที่เคยมีรายงานของ Ito et al. (1996) ให้ค่า Chemical shift ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮึก ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) ของ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 เท่ากับ 2-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า (MBC) เชื้อเท่ากับ 2-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบของ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin มีค่าใกล้เคียงกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบของ Oxacillin จากข้อมูลดังกล่าวจึงอธิบายได้ว่าสารพฤษเคมีส่วนใหญ่ของส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮึกที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบคือ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin

Clauslactone A

จากการศึกษาพบ Clauslactone A เป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม Furanone-Coumarins มีลักษณะเป็นผลึกผงเล็กๆ สีขาว แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮึก พืชสมุนไพรถิ่นไทย โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค NMR และ GS-MS เปรียบเทียบค่า Chemical shift และ โครงสร้างที่เคยมีรายงานของ Ito et al. (2000) ให้ค่า Chemical shift ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ Clauslactone A ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮึกมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 อยู่ในช่วง 256-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อเท่ากับ 1024 และมากกว่า 1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

การที่ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮึกสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ MSSR และ MRSA ได้ เกิดจากฤทธิ์ของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของพืช ดังรายงานของ Bindulem (2010) กล่าวว่าสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของมะฮึกแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) Carbazole alkaloids เช่น Clausine A, Mukonal, Lasine, Glycozolidal, 3-Methycarbazole

2) Coumarins เช่น Clausenin, Clausenidin, Clausenidinaric acid, Nordentatin Xanthoxylatin Kinocoumarin 3) Flavonoids เช่น Liquiritigenin 4) Limonoids เช่น *O*-Methylclausinolide, Zapotarin เป็นต้น

5. การตรวจสอบกลไกการยับยั้งแบคทีเรียเบื้องต้นของสารบริสุทธิ์จากใบมะฮิกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

หลังจากการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบด้วยสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิด ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิดจากใบมะฮิกต่อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเพื่อศึกษาสัญญาณวิทยาของแบคทีเรียทดสอบหลังได้รับสัมผัสกับสาร 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin และ Clauslactone A ที่สกัดได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮิก ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นได้ชัดเจนว่าสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทางสัญญาณวิทยานบนพื้นผิวของเซลล์ *S. aureus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับกลไกการทำงานของยาปฏิชีวนะที่ไปรบกวนการสังเคราะห์เพปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) (Allen, Hobbs, & Albom, 1987) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิดทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์แบคทีเรียทดสอบมีความคล้ายคลึงกับ MSSA และ MRSA ที่สัมผัสกับเดปโทไมซิน (Daptomycin) ข้ามคืน (Wale, Shelton, & Greenwood, 1989) การที่เชื้อทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์สัมผัสกับสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิดข้ามคืนก่อให้เกิดการความผิดปกติของผิวเซลล์แบคทีเรียทดสอบทั้งหมด ซึ่งเป็นการลดจำนวนเซลล์แบคทีเรียทำให้มีรูปร่างผิดปกติ แต่ในทางตรงกันข้ามยังคงหลงเหลือเซลล์แบคทีเรียที่ยังไม่ถูกทำลายด้วยสารบริสุทธิ์ เนื่องจากระดับความเข้มข้นของสารที่นำมาทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดอยู่ในค่า MIC/2 และ MIC/4 นอกจากนี้ผลการศึกษาก็จะเห็นได้ว่าผิวของเซลล์ MSSA เมื่อสัมผัสกับสาร 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin จะเกิดตุ่มเล็ก ๆ บนผิวเซลล์แบคทีเรียทดสอบ (ภาพที่ 4.8) คล้ายคลึงกับ staphylococci ที่สัมผัสกับเพนิซิลลิน (penicillin) (Greenwood & O'Grady, 1969) จากที่สัมผัสของ MSSA กับสาร Clauslactone A ทำให้เกิดเซลล์ของแบคทีเรียทดสอบบางส่วนเกิดหลุมและเหี่ยวคล้ายกับ *S. aureus* ที่สัมผัสกับ Fusidic acid, Lincomycin, Erythromycin (Greenwood & O'Grady, 1972)

6. การสำรวจการกระจายของมะฮิกและจัดทำแผนที่การกระจายของต้นมะฮิกโดยใช้ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (Geographic Information System ; GIS)

จากการสำรวจต้นมะฮิกในพื้นที่โครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) และการจัดทำแผนที่การกระจายของมะฮิกด้วยเครื่องมือทางภูมิสารสนเทศ (GIS) พบว่าต้นมะฮิก

เจริญเติบโตอยู่ทั่วป่าชุมชน โดยต้นที่พบบริเวณชายป่าด้านนอกส่วนใหญ่จะมีขนาดลำต้นสูงและสมบูรณ์มากกว่าบริเวณด้านในของป่า เนื่องจากบริเวณชายป่าเป็นบริเวณที่พืชสามารถรับแสงได้อย่างเพียงพอทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดี ดังนั้นแสงแดดมีผลต่อการเจริญเติบโตของมะฮิกสอคคก้องกับการศึกษาของ Vieira, Socolowski, and Takaki (2009) ที่พบว่าไม่ว่าจะเป็นอัตราการงอก อัตราการเจริญเติบโต ความหนาของใบ ได้รับอิทธิพลมาจากแสงและนอกจากนี้จากการสำรวจจะเห็นได้ว่าบริเวณขอบป่าชุมชนมีการทำสวนชาอาหารจากการใส่ปุ๋ยพืชสวนอาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตได้ดีของมะฮิกที่เจริญอยู่บริเวณขอบป่า การทำแผนที่การกระจายของมะฮิกในป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด โดยใช้เครื่องมือทางภูมิสารสนเทศ (GIS) ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเข้าถึงแหล่งของพืชสมุนไพร (มะฮิก) จากการสำรวจยังพบว่ามะฮิกในป่าธรรมชาติจะพบเฉพาะไม้ขนาดเล็กเนื่องจากถูกบดบังแสงและถูกแก่งแย่งโดยไม้ใหญ่

5.2 สรุปผลการทดลอง

1. ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮิกมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300
2. พบสารบริสุทธิ์ 2 ชนิดในส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท ได้แก่ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin และ Clauslactone A ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300
3. การศึกษาฤทธิ์ต้าน MSSA และ MRSA ของสารบริสุทธิ์ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin และ Clauslactone A เป็นครั้งแรก
4. มะฮิกมีการกระจายอยู่ทั่วป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด แต่จะนำมาใช้ประโยชน์ได้เฉพาะต้นที่อยู่ขอบป่า
5. มะฮิกเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีศักยภาพที่สำคัญในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. aureus* ATCC 43300 และสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคติดเชื้อ ทั้งเป็นการส่งเสริมให้มีการนำพืชสมุนไพรไทยมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้น

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำส่วนสกัดขยายเอทานอล ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมาทำการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์
2. นอกเหนือจากการศึกษาฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของส่วนสกัดต่าง ๆ จากใบมะฮิวกแล้ว สิ่งหนึ่งที่น่าสนใจคือฤทธิ์ในการใช้ต้านศัตรูพืชเพื่อหาวิธีการลดการใช้ยาฆ่าแมลง เนื่องจากมะฮิวกเป็นพืชที่มีกลิ่นฉุน มีสรรพคุณนำมาใช้ไล่ไร้ไก่ได้
3. เพื่อเพิ่มปริมาณในการนำมะฮิวกไปใช้ประโยชน์ ควรทำการเพาะพันธุ์มะฮิวกขยายพันธุ์ในรูปของแปลงเพาะพันธุ์ เพื่อนำไปปลูกเป็นสวนสมุนไพรต่อไป

บรรณานุกรม

- กิตติศักดิ์ ศรีภา, คณาภรณ์ พจนาคม, จิรภาณ อังวิทยาธร, เฉลิมเกียรติ สงคราม, ชนกพรหัม
สุคนธ์พันธุ์, พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์, พรรณรัตน์ อกนิษฐาภิชาติ, ภูธร แคนยุกต์,
เรืองวิทย์ กิจบรรณเดช, วีระศักดิ์ สามิ, สรชัย จูมพระบุตร และโอภา วัชรคุปต์. (2551).
เคมีของยา. นนทบุรี: พี.เอส.พรีนซ์.
- กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม. (ม.ป.ป.). *ทรัพยากรป่าไม้*. เข้าถึงได้จาก <https://web.ku.ac.th/schoolnet/snet6/envi2/forest/forestm.htm>
- กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข. (2556). *การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา)*. ชลบุรี: ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวิณี สิมำพันธ์, ปริญญา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, เอกรัฐ ศรีสุข,
กาญจนา หิรัญเพ็ญ, เบญจวรรณ ชิวปรีชา และคำรณ เลียดประดม. (2557). *ฤทธิ์ด้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี*. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 6, 304-311.
- จิรานุช มิ่งเมือง. (2556). *แนวทางการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร*, ใน *การเสวนาเรื่องการพัฒนาผู้ผลิตและผลิตภัณฑ์สมุนไพรระดับชุมชนสู่สากล* (หน้า 1-10). นนทบุรี: สถาบันวิจัยสมุนไพร, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.
- ฉลาดชาย รมิตานนท์. (2548). *ป่าชุมชน ความหมายของ “ป่า” และ “ชุมชน”*. เข้าถึงได้จาก http://www.seub.or.th/index.php?option=com_content&view=article&id=201:libery&catid=64:2009-11-12-08-42-42&Itemid=79
- เต็ม สมิตินันท์. (2544). *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย : ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้*. กรุงเทพมหานคร: กรมป่าไม้.
- ธีรยุทธ วิไลวัลย์, ศุภสร วณิชชารุ่งเรือง, วรพรรณ พันธุมนาวิน และวิภาวี โสเว่น. (2546). *ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ 1*. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเคมี. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2544). *แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพมหานคร: โนเบิล พรีนซ์.
- นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2544). *ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: แสงเทียนการพิมพ์.

- ปนัดดา พัฒนาศิน. (2550). การจำแนกและหาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ต้านวัชพืชจากรา *Aspergillus fischeri* TISTR 3272. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- พงษ์ศักดิ์ พลเสนา. (2550). *พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน* (ฉบับสมบูรณ์).
ปราจีนบุรี: เจตนารมณัฏกัณฑ์.
- พรสวรรค์ ดิษยบุตร, จักรพงษ์ ลิ้มปณฺสสรณ์, ธัญวรัตน์ กาจสงคราม, พงศธร หลิมศิริวงษ์ และ
ลักขณา พงศ์พจน์. (2543). *สมุนไพร: การใช้อย่างถูกวิธี*. กรุงเทพมหานคร: สถาบันวิจัย
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.
- พิชญพงศ์ ศิริเดช. (2557). *ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดเอทานอลจากใบสันโศกในการยับยั้งการ
เจริญของ Staphylococcus aureus*. โครงการงานทางจุลชีววิทยาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต,
สาขาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พรรณพิศ สุวรรณกุล, ชุมน สวนกระต่าย และธีรพงษ์ ตัฒทวีเชียร. (2549). *An Update on
Infectious Diseases*. กรุงเทพมหานคร: สทริท พรินติ้ง.
- เพิ่มศักดิ์ มกรากริมย์. (2540). *ข่าวสารป่ากับชุมชน*. เข้าถึงได้จาก [http://www.sc.chula.ac.th
/courseware/2305103/add_topics/add2.htm](http://www.sc.chula.ac.th/courseware/2305103/add_topics/add2.htm)
- ภัทรชัย กิรติสิน. (2549). *ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์*. กรุงเทพมหานคร: คณะแพทยศาสตร์
ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.
- มาลิน จุลศิริ. (2540). *ยาต้านจุลชีพ : ความรู้พื้นฐานและประยุกต์*. กรุงเทพมหานคร:
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- มูลนิธิชัยพัฒนา. (2554). *ป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด ก้าวแรกของคนรักป่า*. *วารสารมูลนิธิชัยพัฒนา*,
22-25.
- วันดี กฤษณพันธ์. (2544). *พฤษเคมีเบื้องต้น*. ในนพมาศ สุมทรเจริญนนท์ (บรรณาธิการ), *เภสัช
วินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่มที่ 1* (หน้า 34-102). กรุงเทพฯ: แสงเทียน
การพิมพ์.
- วิทวัส ศาสวัตสุวรรณ, อนันตชิน อินทรักษา, ธเนศ ตรีสุวรรณวัฒน์, วรศักดิ์ ชัยวิภาส และอาริยา
รัตนทองคำ. (2014). *ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากสันโศก ส่องฟ้าและ
มะไฟจีนต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์*. *Khon Kaen University Dental Journal*,
17(1), 1-8.
- วีรชัย พุทธวงศ์ และวैया เสี่ยงประชา. (2550). *เคมีทางยา (Medicinal Chemistry)*. กรุงเทพมหานคร:
โกลิสดิก พับลิชชิง.

- ศศิธร ลิขิตนุกุลม, ชัยณู พันธุ์เจริญ, สถาพร ธิติวิเชียรเลิศ, นลินี อัสวโกที และยุพิน ศุภุททมนกค.
- (2543). โรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นใหม่และโรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นอีก. กรุงเทพฯ: โสภิตติกพับลิชชิง.
- สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน). (2553). *Clausena excavata* Burm. f.: โครงการเผยแพร่ข้อมูลทรัพยากรชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่นบนพื้นที่สูง. เข้าถึงได้จาก http://eherb.hrdi.or.th/search_result_details.php?herbariumID=311&name
- สมหญิง สุนทรวงษ์. (2557). ป่าชุมชนกับสังคมไทย. เข้าถึงได้จาก <https://www.recoftc.org/country/thailand/basic-page/ป่าชุมชนกับสังคมไทย>
- สุภารัตน์ หอมหวล. (2555). *Clausena excavata* : ฐานข้อมูลพืชสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. เข้าถึงได้จาก <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=113>
- สุธรรม อารีกุล, จำรัส อินทร, สุวรรณ ทาเขียว และอ่องเต็ง นันทแก้ว. (2551). องค์ความรู้เรื่องพืชป่าที่ใช้ประโยชน์ทางภาคเหนือของไทย เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิง.
- สำนักงานพัฒนาเทคโนโลยีอวกาศและภูมิสารสนเทศ (องค์การมหาชน). (2552). ตำราเทคโนโลยีอวกาศและภูมิศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิง.
- สำนักงานส่งเสริมการปลูกป่า กรมป่าไม้. (2538). *ป่าชุมชนในประเทศไทย*. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานส่งเสริมการปลูกป่า.
- อนุชิต พลับฐ์การ. (2545). *การพัฒนาคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพร*. พิมพ์ครั้งที่ 1. สงขลา: ภาควิชาเคมีอินทรีย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อรุณรัตน์ สันฐิติกวินสกุล. (2548). *การแยกสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคยับยั้งเชื้อราและยับยั้งเชื้อเอช ไอ วี 1 จากต้นสน โศก*. คุษฎีนิพนธ์ ปรัชญาคุษฎีบัณฑิต, สาขาเคมีอินทรีย์ ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Abdulgader, S. M., Shittu, R. O., Nicol, M. P., & Kaba, M. (2015). Molecular epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Africa: a systematic review. *A systematic review on MRSA in Africa*, 6(348), 1-21.
- Albaayit, S. F. A., Abba, Y., Abdullah, R., & Abdullah, N. (2014). Evaluation of antioxidant activity and acute toxicity of *Clausena excavata* leaves extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1-10.

- Allen, N. E., Hobbs, J. N., & Alborn, W. E. (1987). Inhibition of peptidoglycan biosynthesis in gram-positive bacteria by LY 146032. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *31*, 1093-1099.
- Ainsworth, E. A., & Bush, D. R. (2011). Carbohydrate export from the leaf: A highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiology*, *155*, 64-69.
- Arbab, I. A., Abdul, A. B., Aspollah, M., Abdullah, R., Abdelwahab, S. I., Mohan, S., & Abdelmageed, A. H. A. (2011). *Clausena excavata* Burm. f. (Rutaceae): A review of It's traditional uses, pharmacological and phytochemical properties. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(33), 7177-7184.
- Bindulem, N. (2010). *Chemical constituents from the roots of Clausena excavate* Burm. f. Master' thesis, Chemistry, Faculty of science, Songkla University.
- Boxall, B. A. A. (2004). The environmental side effects of medication. *European Molecular Biology Organization*, *5*, 1110-1116.
- Brassel, P. & Lischke, H. (2001). Swiss National Forest Inventory: Methods and Models of the Second Assessment. *WSL Swiss Federal Research Institute*, 1-311.
- Brown, D. F. J., Edwards, D. I., Hawkey, P. M., Morriso, D., Ridgway, G. L., Towner K. J., & Wren, M. W. D. (2005). Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *56*, 1000-1018.
- Buranakit, P. (2014). Bioassay-guide isolation and antibacterial activity of isolated compounds from *Zingiber mekongense* rhizome. Master' thesis, Biological science, Faculty of science, Burapha University.
- Camporese, A., Balick, M. J., Arvigo, R., Esposito, R. G., Morsellino, N., De Simon, F., & Tubaro, A. (2003). Screening of Anti-Bacterial Activity of Medicinal Plants from Belize (Central America). *Journal of Ethnopharmacology*, *87*, 103-107.
- Carlet, J., Jarlier, V., Harbarth, S., Voss, A., Goossens, H., & Pittet, D. (2012). The Participants of the 3rd World Healthcare-Associated Infections Forum. Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action. *Antimicrob*, *1*(1), 1-11.

- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). *Antibiotic resistance threats in the United States 2013*. Retrieved April 2, 2015, from <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
- Cheng, D., Liu, X., Wang, L., Gong, W., Liu, G., Fu, W., & Cheng, M. (2014). Seasonal variation and sediment–water exchange of antibiotics in a Shallower large lake in North China. *Science of the Total Environment*, 266-275.
- Cheng, S. S., Chang, H. T., Lin, C. Y., Chen, P. S., Huang, C. G., Chen, W. J., & Chang, S. T. (2009). Insecticidal activities of leaf and twig essential oils from *Clausena excavate* against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. *Pest Management Science*, 65, 339-343.
- Chomnawang, M., Surassmo, S., Wongsariya, K., & Bunyapraphatsara, N. (2009). Antibacterial activity of Thai medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Fitoterapia*, 80, 102-104.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2005). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Fifteenth Informational Supplement M100-S15. *Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute*, 25(1), 44-51.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility. Testing: Twenty-Third Informational Supplement. *USA: Wayne, PA*.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-ninth edition. *CLSI M7-A9*, 32(2), 1-68.
- Costa, A. R., Batistão, D. W. F., Ribas, R. M., Sousa A. M., Pereira, M. O., & Botelho, C. M. (2013). *Staphylococcus aureus* virulence factors and disease. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating them: Science, Technology and Education*, 702-710.
- Crossley, K. B., Jefferson, K. K., Archer, G. L., & Fowler Jr, V. G. (2009). *Staphylococci in Human Disease* (2nd ed.). United States of America: John Wiley & Sons.

- Farnoosh, G. (2014). Antibacterial activity of ethyl acetate and aqueous extracts of *Mentha longifolia* L. and hydroalcoholic extract of *Zataria multiflora* Boiss. plants against important human pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(Suppl 1), S186-S189.
- Greenwood, D., & O'Grady, F. (1969a). Antibiotic-induced surface changes in micro-organisms demonstrated by scanning electron microscopy. *Science, New York*, 163, 1076-1078.
- Greenwood, D., & O'Grady, F. (1972). Scanning electron microscopy of *Staphylococcus aureus* exposed to some common anti-staphylococcal agents. *Journal of General Microbiology*, 70, 263-270.
- Guntupalli, C., Kumar, G. S., Kumar, A. S., & Tubati, T. (2012). Evaluation of antioxidant activity of the methanolic leaf extract of *Clausena excavata* Burm. f. (Rutaceae) using the lipid peroxidation model. *Pharmacognosy Journal*, 4, 22-25.
- Guntupalli, C., Ramaiah, M., & Kumar, G. S. (2013). RP-HPLC Analysis and antimicrobial screening of *Clausena excavata* Burm. F. (Rutaceae). *International Journal of Phytotherapy*, 3(2), 91-97.
- Hanan, A. H. B. (2006). Comparison of susceptibility testing methods for the detection of methicillin/ oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Kuwait Medical*, 38(3), 198-202.
- Harris, L. G., Foster, S. J., & Richards, R. G. (2002). An introduction to *staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *s. aureus* adhesions in relation to relation to adhesion to biomaterials: review. *European Cells and Materials*, 4, 39-60.
- Ito, C., Ohta, H., Tan, H. T. W., & Furukawa, H. (1996). Constituents of *Clausena excavata*. isolation and structural seven new carbazole alkaloids and a new coumarin elucidation. *Pharmaceutical Society of Japan*, 44(12), 2231-22.
- Ito, C., Itoigawa, M., Katsuno, S., Omura, M., Tokuda, H., Nishino, H., & Furukawa, H. (2000). Chemical constituents of *Clausena excavata*: isolation and structure elucidation of novel furanone-coumarins with inhibitory effects for tumor-promotion. *Journal of Natural Products*, 63(9), 1218-1224.

- Iwatsuki K, Yamasaki O, Morizane S, & Oono T. (2006). Staphylococcal cutaneous infection: invasion, evasion and aggression. *Journal of Dermatological Science*, 42, 203-214.
- Jacob, S. W., & Torre, J. C. D. L. (2015). *Dimethyl Sulfoxide (DMSO) in Trauma and Disease* (4th ed.). CRC Press.
- Jiang, Y., Li, M., Guo, C., An, D., Xu, J., Zhang, Y., & Xi, B. (2014). Distribution and ecological risk of antibiotics in a typical effluent-receiving river (Wangyang River) in North China. *Chemosphere*, 112, 267–274.
- Júnior, J. N. S. D., Bezerra, R. P., Porto, A. L. F., Herculano, P. N., & Marques, D. A. V. (2015). Effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) in bacterial strains growth in MIC determination. *Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)*, 44,
- Kongkathip, B., Kongkathip, N., Sunthitikawinsakul, A., Napaswat, C., & Yoosook, C. (2005). Anti-HIV-1 constituents from *Clausena excavata*: Part II. carbazoles and a pyranocoumarin. *Phytotherapy Research*, 19(8), 728-731.
- Kongkathip, B., Sutthiprabha, S., Yoosook, C., Mongkolsook, Y., & Kongkathip, N. (2010). Determination of a pyranocoumarin and three carbazole compounds in *Clausena excavata* by RP-HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 48, 445-449.
- Kongkathip, N., & Kongkathip, B. (2009). Constituents and bioactivities of *Clausena excavata*, *Heterocycles*, 79, 121-144.
- Kumar, R., Saha, A., & Saha, D. (2012). A new antifungal coumarin from *Clausena excavata*. *Fitoterapia*, 83, 230-233.
- Kunanusorn, P., Panthong, A., Nuntasaeen, N., Pittayanurak, P., & Reutrakul, V. (2011). Acute and Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Studies of *Clausena excavata* Extract in Rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 12(12), 1-7.
- Manosroi, A., Saraphanchotiwitthaya, A., & Manosroi, J. (2003). Immunomodulatory activities of *Clausena excavata* Burm. f. wood extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 155-160.
- Manosroi, A., Saraphanchotiwitthaya, A., & Manosroi, J. (2005). In vivo immunomodulating activity of wood extracts from *Clausena excavata* Burm. f.. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 5-9.

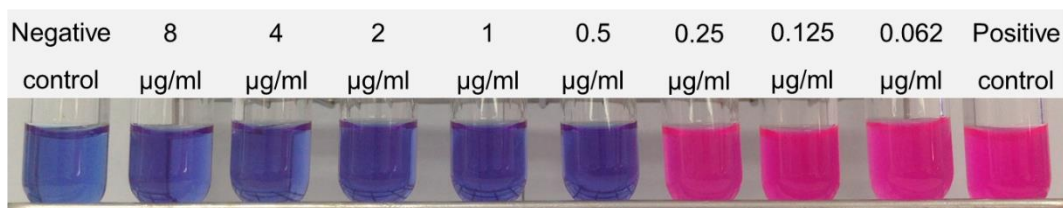
- Martinez, L. J. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance Determinants. *Environmental Pollution*, 157, 2893-2902.
- Moutinho, P., & Schwartzman, S. (2005). Tropical deforestation and climate change. *Amazon Institute for Environmental Research All rights reserved*, 1-123.
- Mu, J., Luo, N., Chang, W., Huang K., & Shi, M. (2013). Predicting and mapping the spatial distribution of *Chamaecyparis formosensis* in central Taiwan in a GIS with species distribution models. *Acta Ecologica Sinica*, 33, 325-331.
- Panda, S. K. (2014). Ethno-medicinal uses and screening of plants for antibacterial activity from Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(2014), 158-175.
- Peng, W. W., Zeng, G. Z., Song, W. W., & Tan, N. H. (2013). A new cytotoxic carbazole alkaloid and two new other alkaloids from *Clausena excavata*. *Chem Biodivers*, 10(7), 1317-1321.
- Rahman, M. T., Alimuzzaman, M., Shilpi, J. A., & Hossain, M. F. (2002). Antinociceptive activity of *Clausena excavata* leaves. *Fitoterapia*, 73(7-8), 701-703.
- Rungprom, W., & Krawkrajang S. (2007). Weed germination inhibitor from rhizomes of *Coix aquatica* Roxb. *Agricultural science*, 38(6), 299-302.
- Rath, S., & Padhy, N. R. (2014). Monitoring in vitro efficacy of *Holarrhena antidysenterica* against multidrug resistant enteropathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(Suppl 1), S54-S63.
- Saeidi, S., Hassanpour, K., Ghamgosha, M., Heiat, M., Taheri, R. A., li Mirhosseini, A., Sahu, M. C., Debata, N. K., & Padhy, R. N. (2012) Antibacterial activity of *Argemone mexicana* L. against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from clinical samples. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S800-S807.
- Salvuccia, M. E., Bartaa, C., Byersa, J. A., & Canarinib, A. (2010). Photosynthesis and assimilate partitioning between carbohydrates and isoprenoid products in vegetatively active and dormant guayule: physiological and environmental constraints on rubber accumulation in a semiarid shrub. *Physiologia Plantarum*, 140, 368-379.
- Sawhney, S. K., & Singh, R. (2005). *Introductory Practical Biochemistry*. India: Alpha Science International Printing.

- Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., & Gupta, A. (2013). Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1, 168 -182.
- Stark, L. (2013). *Staphylococcus aureus* aspects of pathogenesis and molecular epidemiology. *Linköping University Medical Dissertations*, 1371.
- Sripisut, T., Cheenpracha, S., Ritthiwigrom, T., Prawat, U., & Laphookhieo, S. (2012). Chemical Constituents from the Roots of *Clausena excavata* and Their Cytotoxicity. *Records of Natural Products*, 6(4), 386-389.
- Su, C. -R., Yeh, S. F., Liu, C. M., Damu, A. G., Kuo, T. -H., Chiang, P. -C., Bastow, K. F., Lee, K. -H., Wu, T. -S. (2009). Anti-HBV and cytotoxic activities of pyranocoumarin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(16), 6137-6143.
- Sunthitikawinsakul, A., Kongkathip, N., Kongkathip, B., Phonnakhu, S., Daly, J. W., Spande, T. F., Nimit, Y., Napaswat, C., Kasisit, J., & Yoosook, C. (2003). Anti-HIV-1 limonoid: first isolation from *Clausena excavata*. *Phytotherapy Research*, 17(9), 1101-1103.
- Sunthitikawinsakul, A., Kongkathip, N., Kongkathip, B., Phonnakhu, S., Daly, J. W., Nimit, Y., & Rochanaruangrai, S. (2003). Coumarins and carbazoles from *Clausena excavata* exhibited antimycobacterial and antifungal activities. *Planta Medica*, 69(2), 155-157.
- Thatoi, H. N., Panda, S. K., Rath, S. K., & Dutta, S. K. (2008). Antimicrobial activity and ethnomedicinal uses of some medicinal plants from Similipal Biosphere Reserve, Orissa. *Asian Journal of Plant Sciences*, 7(3), 260-267.
- Vieira, DCM., Socolowski, F., & Takaki, M. (2009). Seed germination and seedling emergence of the invasive exotic species, *Clausena excavata*. *Brazilian Journal of Biology*, 70(4), 1015-1020.
- Wadood, A., Ghufraan, M., Jamall, S. B., Naeem, M., Khan, A., Ghaffar, R., & Asnad (2013). Phytochemical analysis of medicinal plants occurring in local area of Mardan. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 2, 144.
- Wadhvani, T., Desai, K., Patel, D., Lawani, D., Bahale, P., Joshi, P., & Kothari V. (2009). Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. *The Internet Journal of Microbiology*, 7,

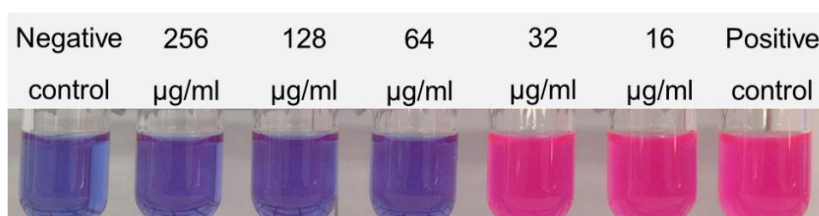
- Wale, L. J., Shelton, A. P., & Greenwood, D. (1989). Scanning electron microscopy of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* exposed to daptomycin. *Journal of Medical Microbiology*, 30, 45-49.
- Wiat, C., Mogana, S., Khalifah, S., Mahan, M., Ismail, S., Buckle, M., Narayana, A. K., & Sulaiman, M. (2004). Antimicrobial screening of plants used for traditional medicine in the state of Perak, Peninsular Malaysia. *Fitoterapia*, 75(1), 68-73.
- Wu, C. -C., Ko, F. -N., Wu, T. -S., & Teng, C. -M. (1994). Antiplatelet effects of clausine-D isolated from *Clausena excavata*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1201(6), 1-6.
- Wu, T. -S., Huang, S. -C., Wu, P. -L., & Lee, K. -H. (1994). Structure and synthesis of clausenaquinone-a. A novel carbazolequinone alkaloid and bioactive principle from *Clausena excavata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 4(20), 2395-2398.
- Yang, S. Z., Peng, L. T., Su, X. J., Chen, F., Cheng, Y. J., Fan, G., & Pan, S. Y. (2011). Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Chemistry*, 127, 210-215.
- Zhang, A., & Lin, G. (2003). The first synthesis of clausenamine-A and cytotoxic activities of three biscarbazole analogues against cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10(10), 1021-1023.
- Zain, W. M., Rahmat, A., Othman, F., & Yap, T. Y. H. (2009). Antiproliferative Properties of Clausine-B against Cancer Cell Lines. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 16(3), 29-34.
- Zuo, G.Y., Wang, G.C., Zhao, Y.B., Xu, G.L., Hao, X.Y., Han, J., & Zhao, Q. (2008). Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 287-290.

ภาคผนวก

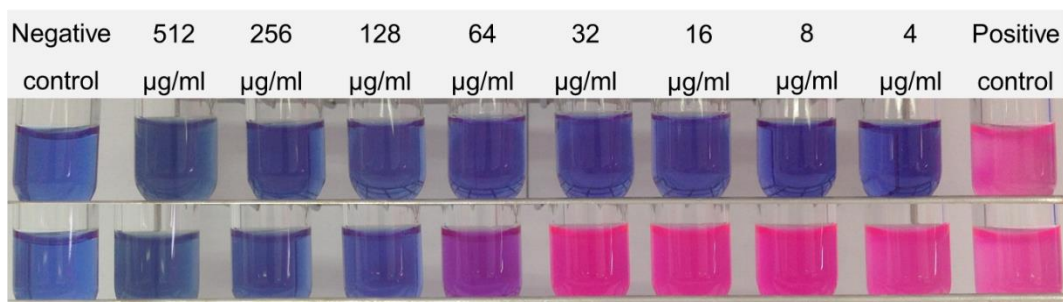
ภาคผนวก ก
ผลการวิจัยเพิ่มเติม



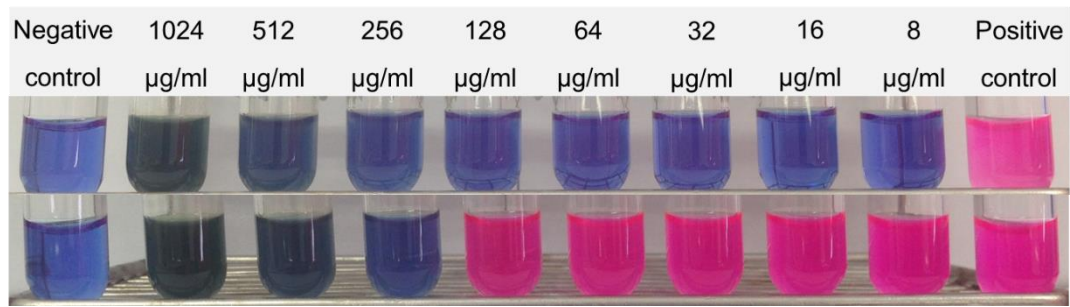
ภาพที่ ก-1 ผลการทดสอบหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ Oxacillin ต่อ *S. aureus* ATCC 25923 ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB พบว่าค่า MIC เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ชุดควบคุมคุณภาพของระบบทดสอบ)



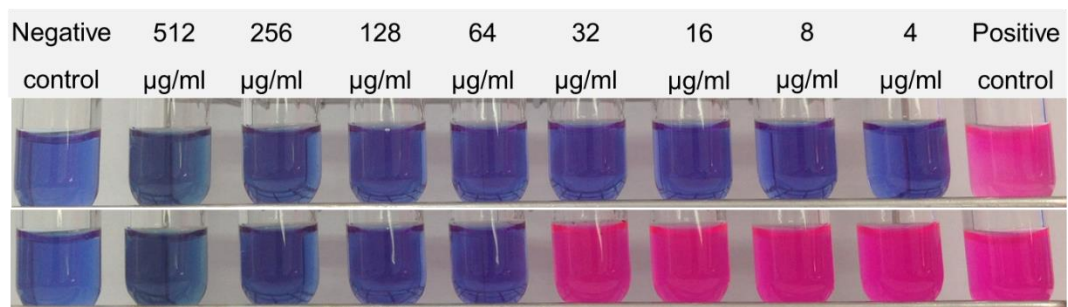
ภาพที่ ก-2 ผลการทดสอบหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ Oxacillin ต่อ *S. aureus* ATCC 43300 ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่า MIC เท่ากับ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ชุดควบคุมคุณภาพของระบบทดสอบ)



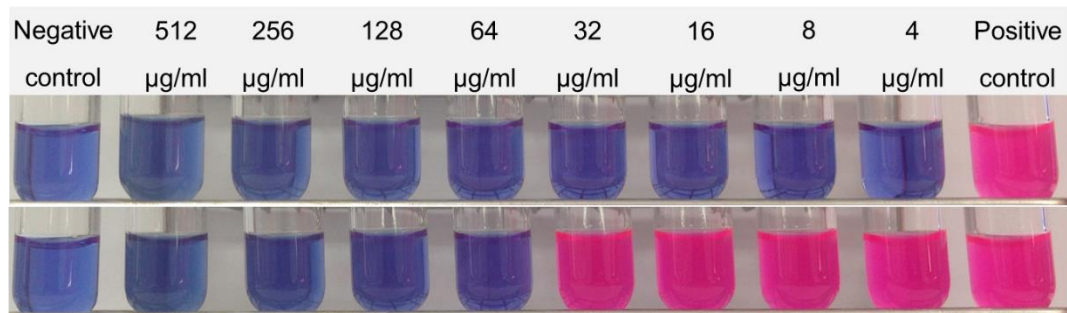
ภาพที่ ก-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ของส่วนสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะฮึกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 -512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB (ค่า MIC ของของส่วนสกัดหยาบเอทานอลจากใบมะฮึกในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากับ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



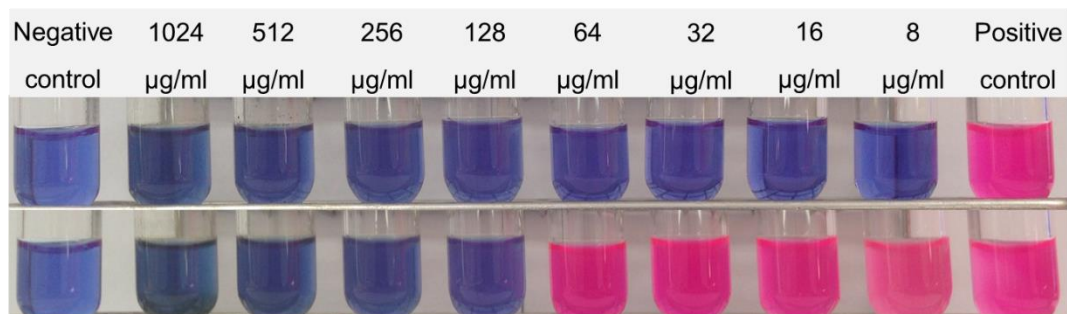
ภาพที่ ก-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ของส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจากใบมะฮิที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 8-1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB (ค่า MIC ของของส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจากใบมะฮิในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากับ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



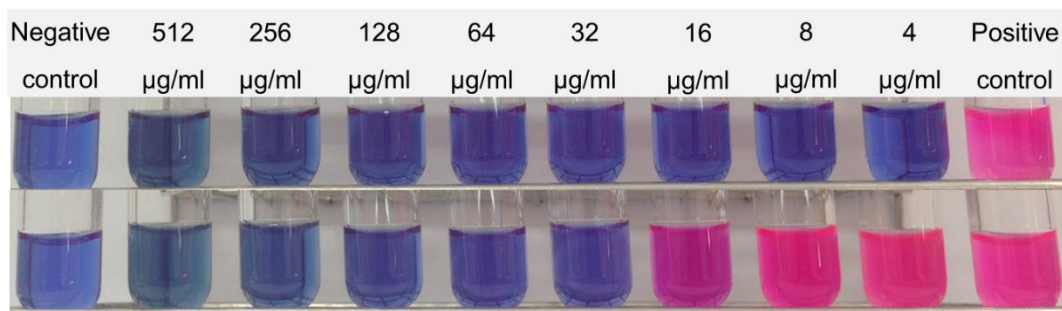
ภาพที่ ก-5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮิที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 -512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB (ค่า MIC ของของส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากใบมะฮิในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากับ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



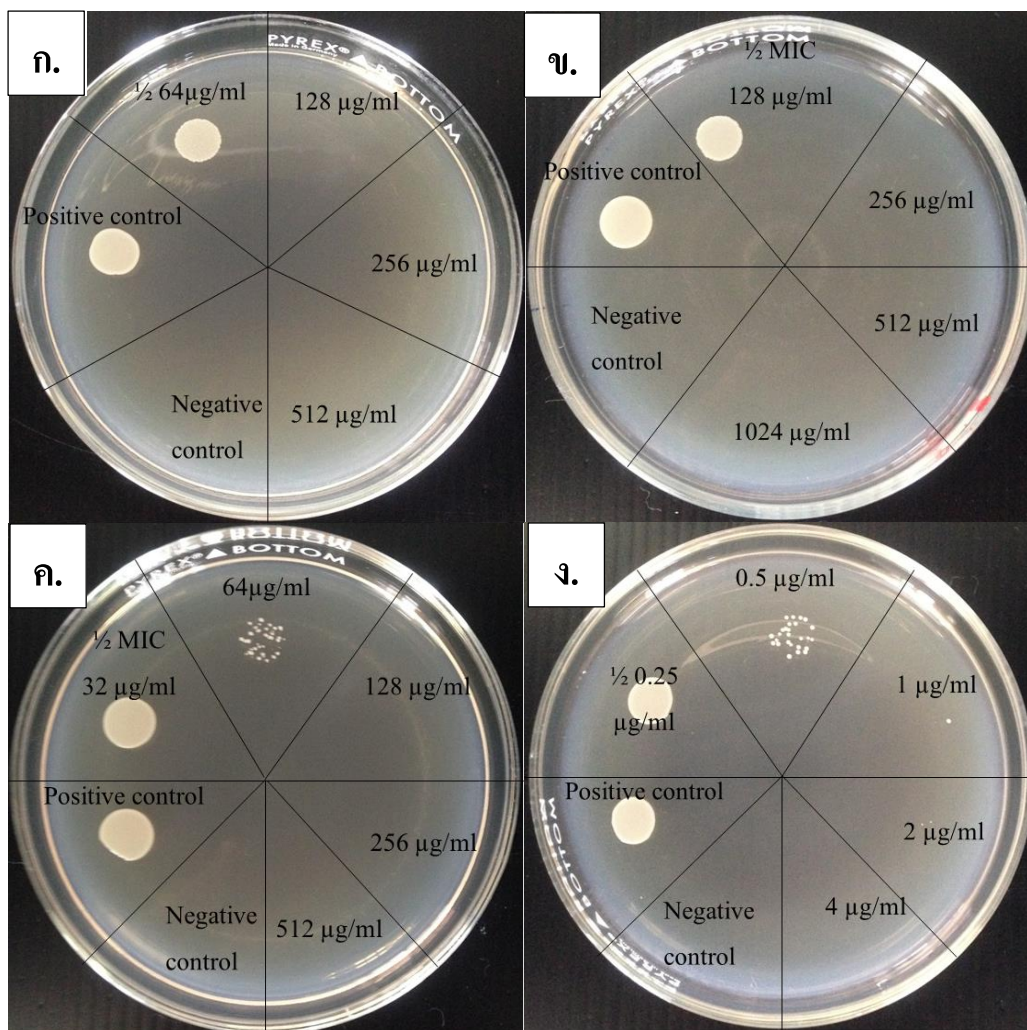
ภาพที่ ก-6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 43300 ของส่วนสกัดหยาบเอทานอลจาก ไบมะฮ็อกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (ค่า MIC ของ ส่วนสกัดหยาบเอทานอลจากไบมะฮ็อกในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 43300 เท่ากับ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



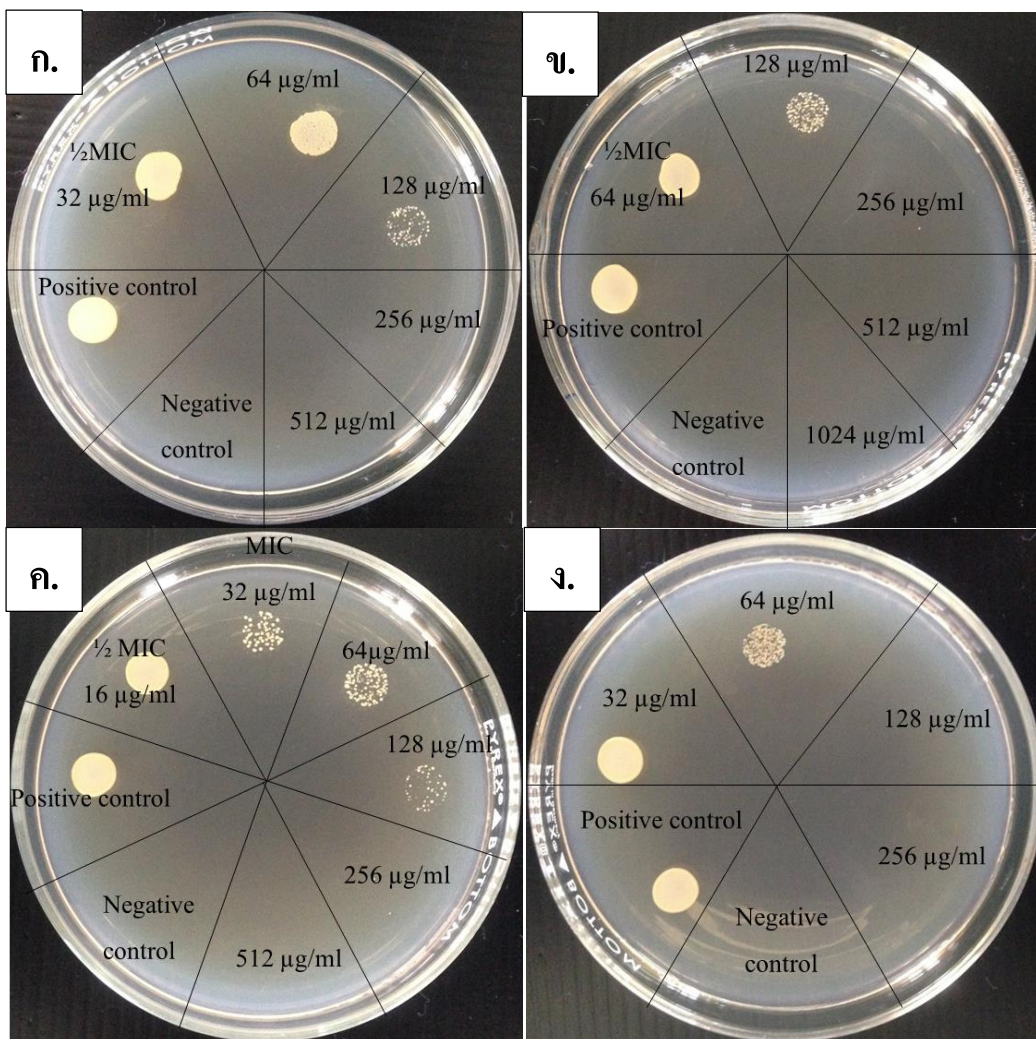
ภาพที่ ก-7 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 43300 ของส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจาก ไบมะฮ็อกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 8-1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (ค่า MIC ของ ส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจากไบมะฮ็อกในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 43300 เท่ากับ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



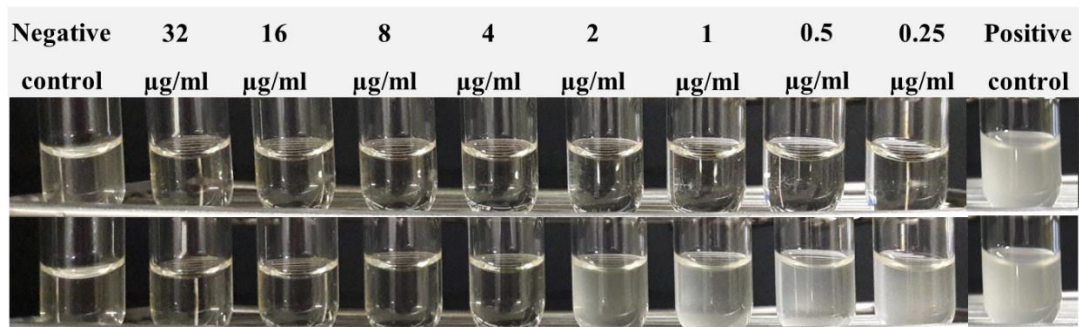
ภาพที่ ก-8 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 43300 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจาก ไบโมะซีคที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (ค่า MIC ของ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากไบโมะซีคในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 43300 เท่ากับ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



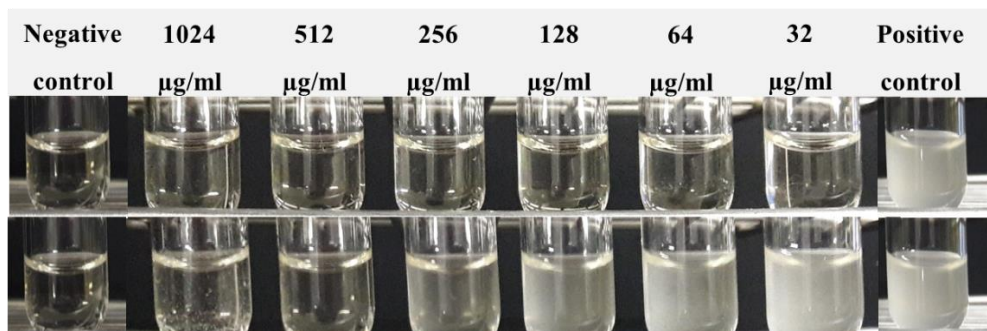
ภาพที่ ก-9 ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่า *S. aureus* ATCC 25923 ของส่วนสกัดหยาบเอทานอล (ก.) ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน (ข.) ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (ค.) จากโสมมะฮาก และ ยาปฏิชีวนะ Oxacillin (ง.) โดยใช้เทคนิค Drop plate ในอาหาร MHA



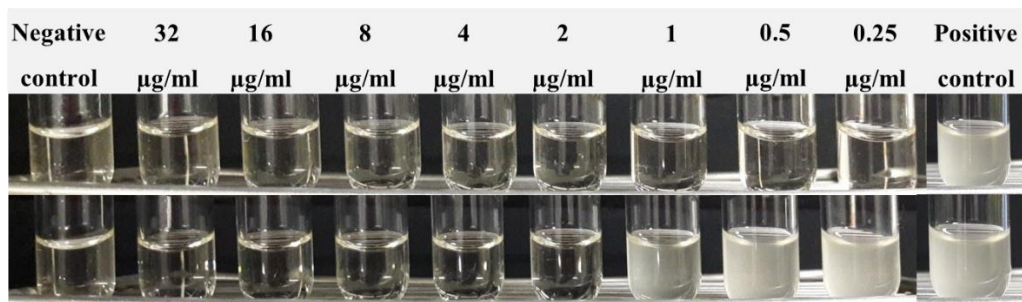
ภาพที่ ก-10 ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่า *S. aureus* ATCC 43300 ของส่วนสกัดหยาบเอทานอล (ก.) ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน (ข.) ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (ค.) จากใบมะฮึก และ ยาปฏิชีวนะ Oxacillin (ง.) โดยใช้เทคนิค Drop plate ในอาหาร MHA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์



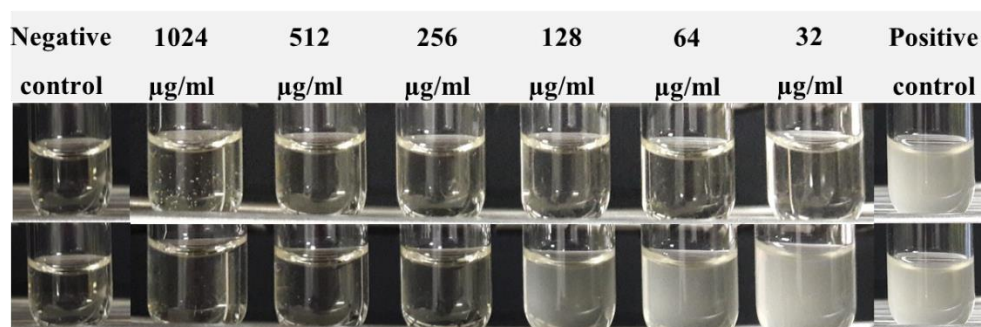
ภาพที่ ก-11 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ของสารบริสุทธิ์ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin จากใบมะฮิเก้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25-32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB (ค่า MIC ของสารบริสุทธิ์ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin จากใบมะฮิเก้ในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



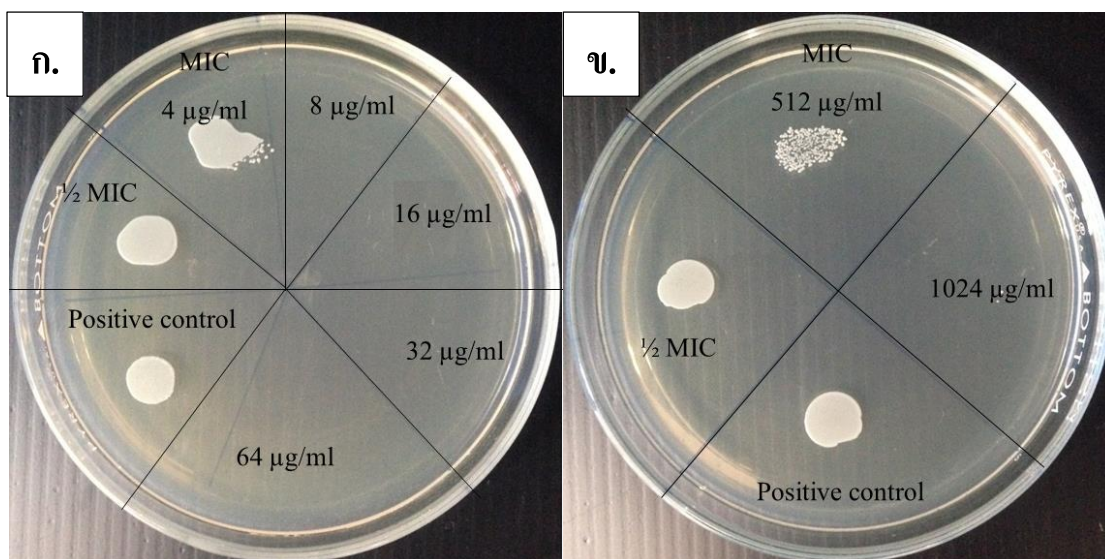
ภาพที่ ก-12 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ของสารบริสุทธิ์ Clauslactone A จากใบมะฮิเก้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 32-1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB (ค่า MIC ของสารบริสุทธิ์ Clauslactone A จากใบมะฮิเก้ในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากับ 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



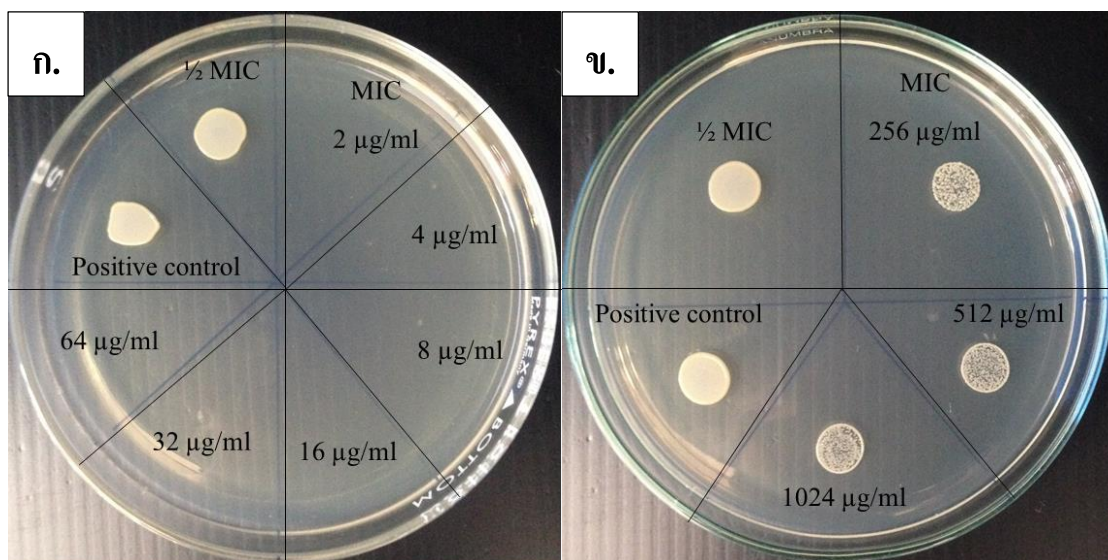
ภาพที่ ก-13 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 43300 ของสารบริสุทธิ์ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin จากใบมะฮิเก้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25-32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (ค่า MIC ของสารบริสุทธิ์ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin จากใบมะฮิเก้ในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพที่ ก-14 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 43300 ของสารบริสุทธิ์ Clauslactone A จากใบมะฮิเก้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 32-1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Broth macrodilution ในอาหาร MHB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (ค่า MIC ของสารบริสุทธิ์ Clauslactone A จากใบมะฮิเก้ในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากับ 256 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพที่ ก-15 ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่า *S. aureus* ATCC 25923 ของสารบริสุทธิ์ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin (ก.) สารบริสุทธิ์ Clauslactone A (ข.) จากไบโมะฮีสึก โดยใช้เทคนิค Drop plate ในอาหาร MHA



ภาพที่ ก-16 ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่า *S. aureus* ATCC 43300 ของสารบริสุทธิ์ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin (ก.) สารบริสุทธิ์ Clauslactone A (ข.) จากไบโมะฮีสึก โดยใช้เทคนิค Drop plate ในอาหาร MHA ที่เติม โซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์

ตรวจสอบขนาดของกล้าเชื้อ (Inoculum size) โดยการนำหลอดกล้าเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (ข้อ 1.2) มาเจือจางแบบ Ten-fold dilution ที่ $10^{-1} - 10^{-6}$ จากนั้นไปเปิดกล้าเชื้อที่ระดับความเจือจาง $10^{-4} - 10^{-6}$ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหาร TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารและคำนวณปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย (Cfu/ml)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร X ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลงในจานอาหาร}} \quad (1)$$

ตารางที่ ก-1 ระบบของตัวทำละลายในอัตราส่วนต่าง ๆ ของวัฏภาคเคลื่อนที่ ของตัวอย่างที่ F3

ตัวอย่าง	ระบบของตัวทำละลาย	อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่	Fractions
F3	MeOH : DCM	2 :8	F3-1
		4:6	F3-2
		6:4	F3-3
		7:3	F3-4
		8:2	F3-5

ตารางที่ ก-2 ระบบของตัวทำละลายในอัตราส่วนต่าง ๆ ของวัฏภาคเคลื่อนที่ ของตัวอย่างที่ F3-1+F3-2

ตัวอย่าง	ระบบของตัวทำละลาย	อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่	Fractions
F3-1+F3-2	Ethyl acetate : Hexane	30 :70	F3-1+2/1
		80:20	F3-1+2/2

ตารางที่ ก-3 ระบบของตัวทำละลายในอัตราส่วนต่าง ๆ ของวัฏภาคเคลื่อนที่ ของตัวอย่างที่ F6

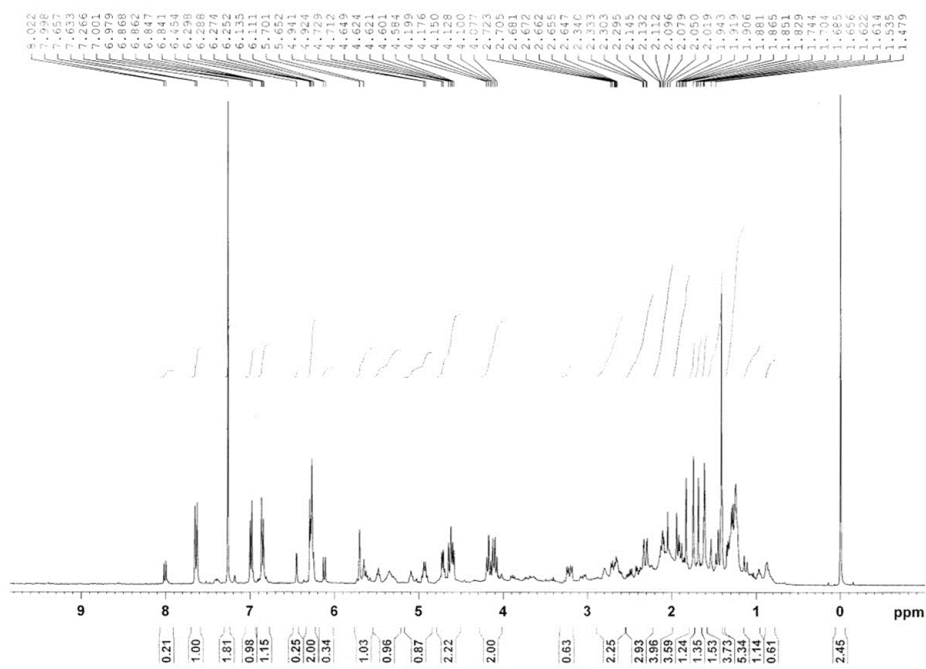
ตัวอย่าง	ระบบของตัวทำละลาย	อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่	Fractions
F6	MeOH : DCM	2:8	F6-1
		2:8	F6-2
		3:7	F6-3
		4:6	F6-4

ตารางที่ ก-4 ระบบของตัวทำละลายในอัตราส่วนต่าง ๆ ของวัฏภาคเคลื่อนที่ ของตัวอย่างที่ F6-2

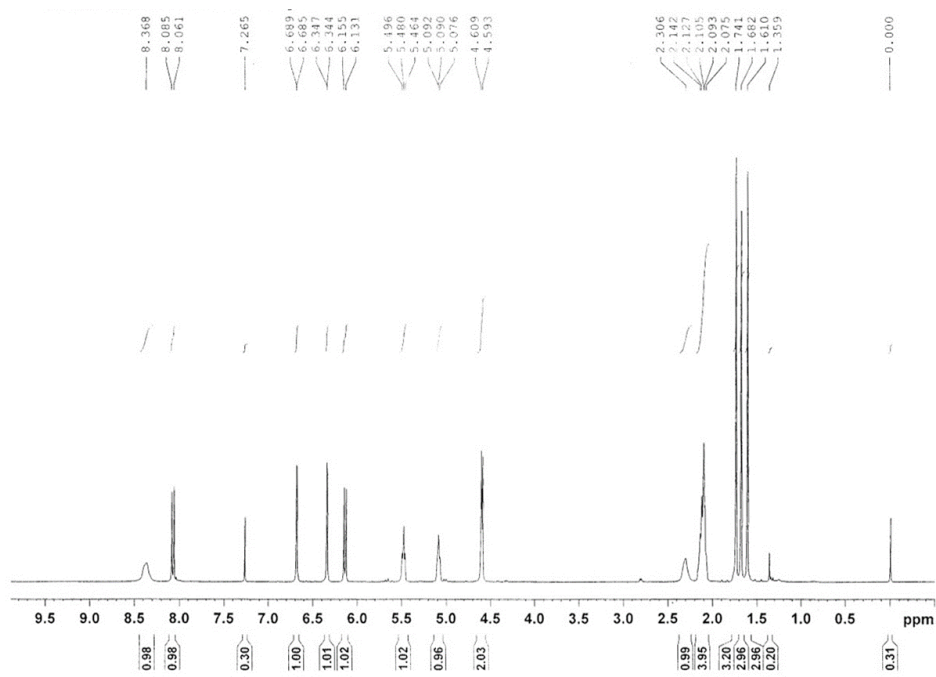
ตัวอย่าง	ระบบของตัวทำละลาย	อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่	Fractions
F6-2	MeOH : DCM	2:8	F6-2-1
		2:8	F6-2-2
		3:7	F6-2-3
		4:6	F6-2-4

ตารางที่ ก-5 ระบบของตัวทำละลายในอัตราส่วนต่าง ๆ ของวัฏภาคเคลื่อนที่ ของตัวอย่างที่ F6-2-2

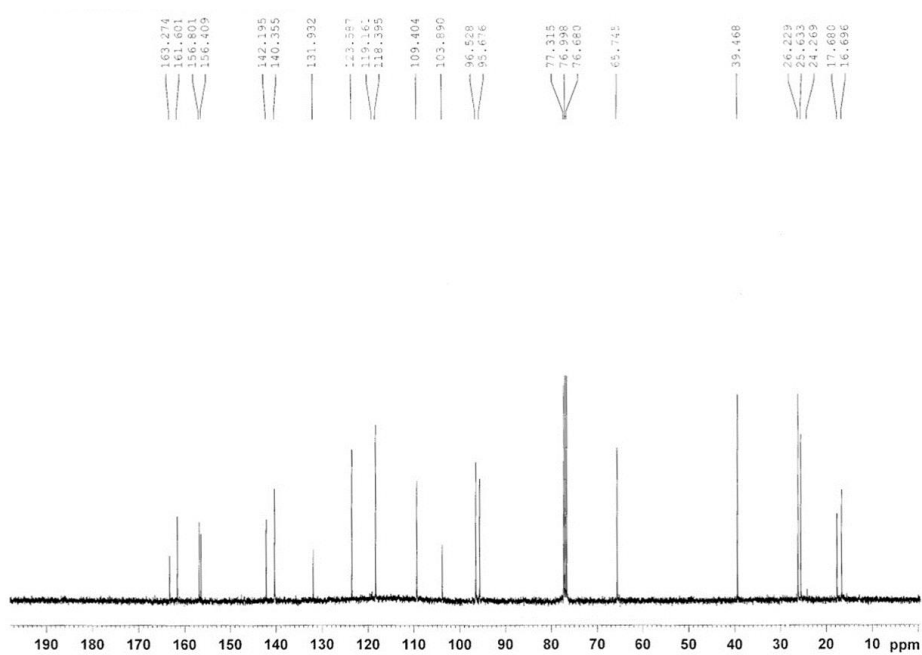
ตัวอย่าง	ระบบของตัวทำละลาย	อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่	Fractions
F6-2-2	MeOH : DCM	2:8	F6-2-2-1
		2:8	F6-2-2-2
		3:7	F6-2-3-3
		4:6	F6-2-2-4
		4:6	F6-2-2-5



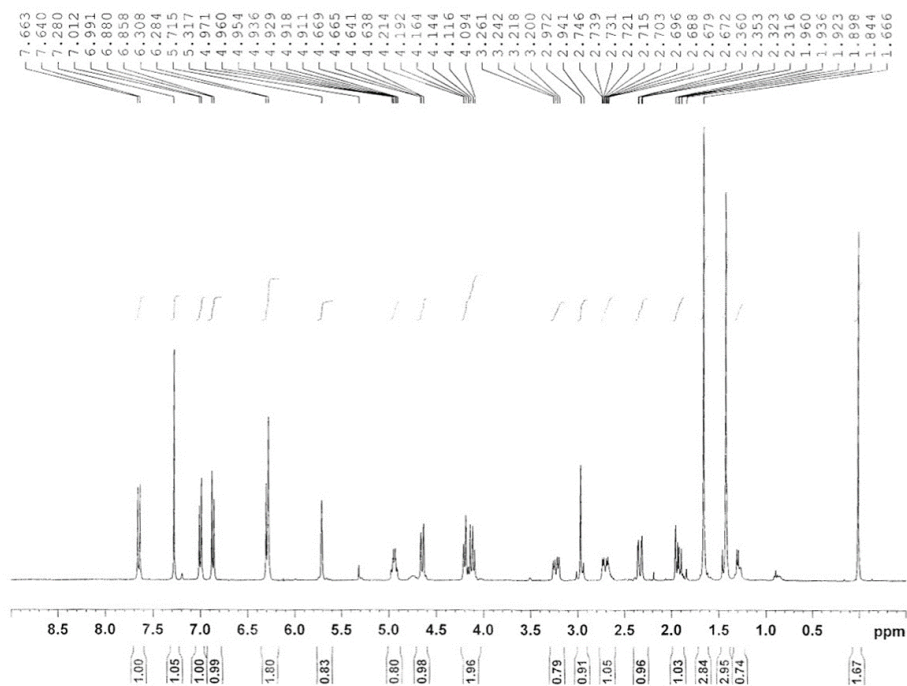
ภาพที่ ก-17 สเปกตรัม ^1H NMR ของส่วนสกัดเอทีอะซีเตทจากใบมะฮึก



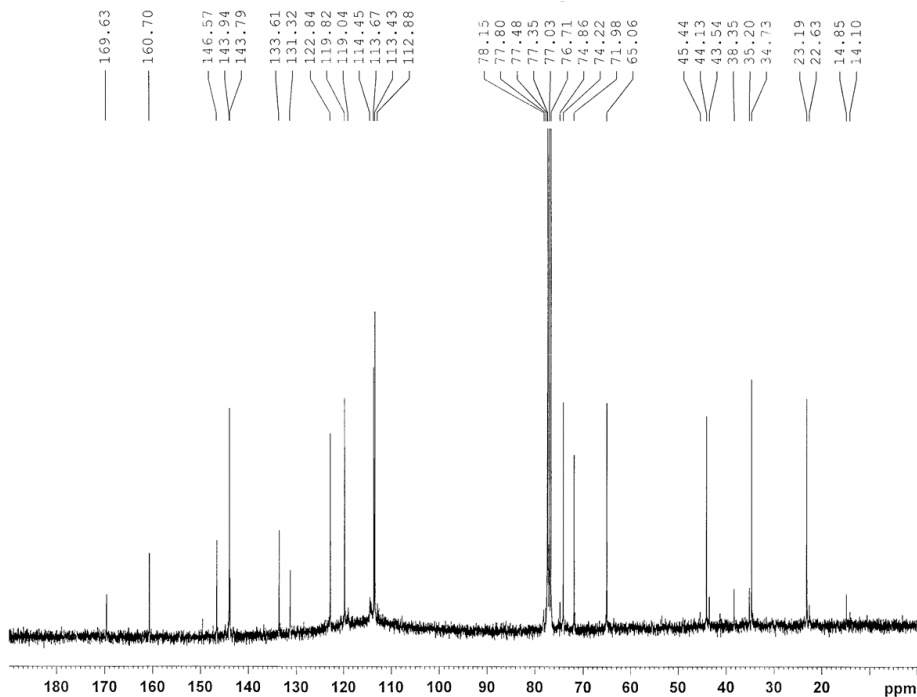
ภาพที่ ก-18 สเปกตรัม ^1H NMR ของ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin



ภาพที่ ก-19 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin



ภาพที่ ก-20 สเปกตรัม ^1H NMR ของ Clauslactone A



ภาพที่ ก-21 สเปกตรัม ¹³C NMR ของ Clauslactone A



รายงานผลการวิเคราะห์
 หน่วยวิเคราะห์ดินพืชและวัสดุเกษตร ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โทร. 0 3435 1399 ต่อ 481,464,458

รายงานเลขที่ SF2560/50
 ชื่อ : คุณวัชรพร ธรรมโชติ

ที่อยู่ : 89/43 ม.5 ต.ห้วยกระปี อ.เมือง จ.ชลบุรี 20130

วันที่ 18 เดือน เมษายน พ.ศ.2560

ชื่อตัวอย่าง	Lab Code	pH (1:1)	OM ¹ (%)	ECe ² (dS/m)	ปริมาณธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ (mg/kg)					D _v ⁶ (g/cm ³)	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	Texture ⁷
					N ³	P ⁴	K ⁵	Ca ⁵	Mg ⁵					
หมู่ที่ 40	60-3-6-10	4.34	4.45	0.11	21.32	0.88	37.40	68.80	13.80	2.51	24.51	31.02	44.47	Clay
หมู่ที่ 88	60-3-6-11	4.14	4.12	0.09	21.32	0.59	33.14	49.89	17.54	2.57	17.24	32.67	50.09	Clay
หมู่ที่ 136	60-3-6-12	4.10	4.86	0.09	21.32	0.70	35.72	59.59	17.75	2.56	20.74	27.05	52.21	Clay

เทียบกับน้ำหนักแห้ง
 1 = Walkley and Black 2 = Saturated soil extract 3 = KCl extraction, Distillation 4 = Bray II extraction, Spectroscopy 5 = NH₄OAc extraction, Atomic spectroscopy
 6 = Ratio of soil mass to volume 7 = Pipette method

(นายอนันท์กร ปัสสัมพวง)
 ผู้ตรวจสอบผล

(นางจันทร์จรัส วีรสสาร)
 หัวหน้าหน่วยวิเคราะห์ดินพืชและวัสดุเกษตร

หมายเหตุ : - ผลการวิเคราะห์นี้ใช้ได้เฉพาะตัวอย่างที่ส่งมาและตัวอย่างนี้จะเก็บรักษาไว้ภายใน 3 เดือนเท่านั้น
 - ถ้ามีรอยขีด ข้ำ ซีด และลบ หน่วยฯ ไม่รับรองรายงาน

ภาพที่ ก-22 ผลการวิเคราะห์ดิน