ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษของสารสกัดจากใบและผลกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) และการประยุกต์ใช้กับน้ำสลัด

Effect of *Rhodomyrtus tomentosa* Leaf and Fruit Extracts on Food Poisoning *Staphylococcus aureus* and its Application as Salad Dressing

กวินศักดิ์ จัตุฑะศรี

Kawinsak Jatutasri

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
การแพทย์แผนไทยมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Thai Traditional Medicine Prince of Songkla University

2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษของสารสกัดจากใบและผลกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) และการประยุกต์ใช้กับน้ำสลัด

Effect of *Rhodomyrtus tomentosa* Leaf and Fruit Extracts on Food Poisoning *Staphylococcus aureus* and its Application as Salad Dressing

กวินศักดิ์ จัตุฑะศรี

Kawinsak Jatutasri

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
การแพทย์แผนไทยมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Thai Traditional Medicine Prince of Songkla University

2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษของสารสกัดจากใบและผลกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) และการประยุกต์ใช้กับน้ำสลัด

ผู้เขียน นายกวินศักดิ์ จัตุฑะศรี

สาขาวิชา การแพทย์แผนไทย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ดร. สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ดร. อัจฉราภรณ์ อิสสุริยะ)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สืบตระกูล วิเศษสมบัติ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศศิธร ชูศรี)

.....กรรมการ

(ดร. สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ)

.....กรรมการ

(ดร. อัจฉราภรณ์ อิสสุริยะ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาการแพทย์แผนไทยมหาบัณฑิต

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ดร. สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....
(ดร. อัจฉราภรณ์ อิสสุริยะ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....
(นายกวินศักดิ์ จัตุฑะศรี)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นายกวินศักดิ์ จัตุฑะศรี)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษของสารสกัดจากใบและผลกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) และการประยุกต์ใช้กับน้ำสลัด

ผู้เขียน นายกวินศักดิ์ จัตุฑะศรี

สาขาวิชา การแพทย์แผนไทย

ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดอะซีโตน เอทานอลและน้ำจากใบและผลกะทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากอาหาร (11 สายพันธุ์) และสายพันธุ์มาตรฐาน (2 สายพันธุ์) ทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อด้วยวิธี Disc diffusion พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ โดยมี Inhibition zone อยู่ในช่วง 8.5-15 mm และมีค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) อยู่ในช่วง 7.8125 - >1000 µg/ml และ Minimum bactericidal concentration (MBC) อยู่ในช่วง 15.625 - >1000 µg/ml การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี Time-kill study พบว่าสามารถฆ่าเชื้อได้ที่ความเข้มข้น 8MIC, 4MIC และ 2MIC ในเวลา 8, 10 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยเชื้อลดลงมากกว่า 3 log CFU/ml (ลดลงมากกว่า 99.9%) เมื่อเทียบกับเชื้อกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบและผลกระทุมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธีด้วยวิธี DPPH assay (IC_{50} 4.6 และ 17.99 mg/ml), FRAP assay (Fe_2SO_4 equivalent 2.86 และ 2.36 µM Fe_2SO_4/mg sample), Total phenolic content (1512.43 และ 1958.1 mg of gallic acid/mg of extract) และ Total flavonoid content (19.2 และ 61.2 mg of catachin/mg of extract) ตรวจสอบโลหะหนักในสารสกัดเอทานอลใบและผลกระทุ (สารหนู, ตะกั่ว และ ทองแดง) ในสารสกัดจากใบและผลมีทองแดงปนเปื้อนอยู่ 17.57 และ 3.44 mg/kg การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเอทานอลจากใบและผลกระทุในหนู

ขาวใหญ่ (Wistar rat) พบว่าสารสกัดไม่มีผลต่อพฤติกรรม น้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ ค่าโลหิตวิทยา และ ค่าเคมีคลินิกของสัตว์ทดลอง การนำสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุมาประยุกต์ใช้กับน้ำสลัดและการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส (คะแนนเต็ม 9) พบว่าน้ำสลัดชนิดใสที่มีความเข้มข้นของสารสกัด 12.5 mg/ml มีคะแนนการยอมรับของผู้บริโภคในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ ความขม และความชอบโดยรวมสูงที่สุดที่เท่ากับ 7.13, 7.20, 7.07, 7.03, 6.97 และ 7.10 ตามลำดับ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 23235 และ *S. aureus* W68 ของน้ำสลัดที่ผสมสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วันพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ โดยที่ความเข้มข้น 25 และ 50 mg/ml อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส พบว่าจำนวนเชื้อลดลงเรื่อยๆ จนถึงมากกว่า 99.9% ภายในระยะเวลา 3 วัน และบันทึกผลจนครบ 21 วัน

Thesis Title	Effect of *Rhodomyrtus tomentosa* leaf and fruit extracts on food poisoning *Staphylococcus aureus* and its application as salad dressing
Author	Mister Kawinsak Jatutasri
Major Program	Master of Traditional Thai Medicine
Academic Year	2016

Abstract

The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of the ethanol, acetone, and water extracts of *Rhodomyrtus tomentosa* leaf and fruit on *Staphylococcus aureus* isolated from foods. By disc diffusion method, all extracts demonstrated antibacterial activity against all bacterial strains with the zone of inhibition ranging from 8.5-15 mm. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the extracts were ranging from 7.8125 - >1000 and 15.625 - >1000 µg/ml, respectively. The result of time-kill study showed that the ethanol extract of leaf produced killing activity at concentration of 8MIC, 4MIC, and 2MIC within 8, 10, and 10 h, respectively. The viable cells were decreased more than 3 log CFU/ml (>99.9%) when compared with the untreated cells at the beginning. Both leaf and fruit ethanol extracts exhibited antioxidant by DPPH assay (IC_{50} 4.6 and 17.99 mg/ml), FRAP assay (Fe_2SO_4 equivalent 2.86 and 2.36 µM Fe_2SO_4/mg sample), total phenolic content assay (1512.43 and 1958.1 mg of gallic acid/mg of extract), and total flavonoid content assay (19.2 and 61.2 mg of catachin/mg of extract). In the sub-chronic toxicity study of leaf and fruit ethanol extracts, there were no significant adverse effects on food consumption, body weight, organ weights, mortality, clinical chemistry, and hematology of rats at 5, 50, and 300 mg/kg body weight. The leaf ethanol extract was incorporated into homemade salad dressing and examined for its sensory properties. The results indicated that the salad dressing contained 12.5 mg/ml of the extract showed the best

results by 9-point hedonic scaling with appearance, color, odor, flavor, bitterness, and overall acceptance scales of 7.13, 7.20, 7.07, 7.03, 6.97, and 7.10, respectively. The salad dressings contained the extract were investigated for their anti-*S. aureus* activity during storage at 4 and 10 ºC for 21 days. The result revealed that the salad dressings contained 25 and 50 mg/ml of the extract displayed bactericidal activity within the first day of storage at 4 and 10 ºC. Meanwhile, at concentration of 12.5 mg/ml, a reduction in *S. aureus* were decreased more than 3 log CFU/ml (>99.9%) at day 3 and the bactericidal activity was detected at day 21.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจในการศึกษาค้นคว้าวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ ดร. อัจฉราภรณ์ อิสสุริยะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาในการค้นคว้าวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สืบตระกูล วิเศษสมบัติ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศศิธร ชูศรี คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ธรรมรัตน์ แก้วมณี สำหรับคำแนะนำและที่ได้มาเป็นกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ และครอบครัวสำหรับการสนับสนุนและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา ขอขอบคุณ รุ่นพี่ เพื่อน และรุ่นน้อง นักศึกษาปริญญาโททุกท่าน สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจที่ดีตลอดมา

ขอขอบคุณการสนับสนุนทุนจากสถาบันฮาลาล มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้กรุณาสนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์ และงบประมาณจำนวน 15,000 บาท ในการทำวิทยานิพนธ์

กวินศักดิ์ จัตุฑะศรี

สารบัญ

เนื้อหา **หน้า**

สารบัญตาราง (11)

สารบัญรูป (13)

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (15)

บทที่

1. บทนำ 1
    - บทนำต้นเรื่อง 1
    - บทตรวจเอกสาร 3
    - วัตถุประสงค์ 17
2. วัสดุ อุปกรณ์ วิธีการ 18
    - วัสดุ 18
    - อุปกรณ์ 18
    - วิธีการ 22
3. ผลการทดลอง 34
4. วิจารณ์ 58
5. สรุป 62

บรรณานุกรม 63

ภาคผนวก 67

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษและอาการแสดง	9
2	แหล่งที่มาของเชื้อ *Staphylococcus aureus* การดื้อยา และ Enterotoxin ที่ผลิตโดยเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ	21
3	ส่วนประกอบของน้ำสลัดชนิดครีม	32
4	ส่วนประกอบของน้ำสลัดชนิดใส	32
5	ร้อยละของสารสกัด (Extraction yield) ที่สกัดด้วยอะซีโตน เอทานอล (95%) และน้ำจากใบและผลของต้นกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*)	34
6	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากสารสกัดใบและผลกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) ที่สกัดด้วยอะซีโตน เอทานอล และน้ำ ด้วยวิธี Disc diffusion method (2 mg/disc)	36
7	Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC) จากสารสกัดใบและผลกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) ที่สกัดด้วยอะซีโตน เอทานอล และน้ำ ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากอาหาร	37
8	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากสกัดสารเอทานอลใบและผลกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) ด้วยวิธี DPPH assay, FRAP assay, Total phenolic content และ Total flavonoid content	41
9	ปริมาณโลหะหนักตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.) มายองเนสและน้ำสลัดครีม	42
10	ปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสารสกัด	42
11	ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (Hematology) ของสัตว์ทดลอง ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบกระทุ ขนาด 5, 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน	47
12	ค่าพารามิเตอร์ทางชีวเคมีคลินิก (Blood chemistry) ของสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบกระทุ ขนาด 5, 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน	48

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (Hematology) ของสัตว์ทดลอง ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากผลกระทุ ขนาด 5, 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน	52
14	ค่าพารามิเตอร์ทางชีวเคมีคลินิก (Blood chemistry) ของสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากผลกระทุ ขนาด 5, 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน	53
15	การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสต่อน้ำสลัดใบกระทุ แสดงคะแนนตามความชอบแบบ 9 ระดับคะแนนความชอบ (9- point hedonic scales)	54

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	ต้นกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)	4
2	อัตราป่วยตายในรอบ 10 ปี (พ.ศ. 2548-2557)	6
3	จำนวนผู้ป่วยในแต่ละปี (พ.ศ. 2553-2557)	7
4	กลุ่มอายุที่พบโรคอาหารเป็นพิษ	7
5	การกระจายตามภาคของโรคอาหารเป็นพิษ	8
6	ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 23235 ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) ด้วยวิธี Time-kill study	37
7	ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* W68 ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) ด้วยวิธี Time-kill study	38
8	ร้อยละของน้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (Percentage of weight gain) ของสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมและ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบกระทุ ขนาด 5 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวเฉลี่ยก่อนทำการป้อนสารสกัด	44
9	ร้อยละของน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของสัตว์ทดลอง ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ สารสกัดจากใบกระทุ ขนาด 5, 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน	45
10	ร้อยละของน้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (Percentage of weight gain) ของสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากผลกระทุ ขนาด 5 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวเฉลี่ยก่อนทำการป้อนสารสกัด	50
11	ร้อยละของน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของสัตว์ทดลอง ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากผลกระทุ ขนาด 5 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน	51
12	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC23235 ของสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุในน้ำสลัดที่ความเข้มข้น 12.5 25 และ 50 mg/ml ที่อุณหภูมิ 4°C	56

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
13	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 23235 ของสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุในน้ำสลัดที่ความเข้มข้น 12.5 25 และ 50 mg/ml ที่อุณหภูมิ 10°C	56
14	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* W68 ของสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุในน้ำสลัดที่ความเข้มข้น 12.5 25 และ 50 mg/ml ที่อุณหภูมิ 4°C	57
15	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* W68 ของสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุในน้ำสลัดที่ความเข้มข้น 12.5 25 และ 50 mg/ml ที่อุณหภูมิ 10°C	57

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

CFU	=	colony forming unit
°C	=	degree celsius
cm	=	centimeter
µm	=	micrometers
µM	=	micromolar
µl	=	microliters
g	=	gram
mg	=	milligram
ml	=	milliliters
mm	=	milmeters
nm	=	nanometer
nM	=	nanomolar
%	=	percent

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ระบบทางเดินอาหารเป็นระบบที่สำคัญระบบหนึ่งในร่างกายมนุษย์เมื่อมีความผิดปกติเกิดขึ้นจะแสดงพยาธิสภาพในหลายด้านโดยเฉพาะอาการปวดท้องและท้องเสีย โรคในระบบทางเดินอาหารที่พบได้บ่อยคือโรคอาหารเป็นพิษ ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคนี้คือการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษและเชื้อก่อโรค สารพิษที่ปนเปื้อนในอาหารมีได้หลายอย่าง เช่น สารเคมีที่เป็นพิษ หรือสารพิษที่เชื้อก่อโรคสร้างขึ้น ในประเทศที่กำลังพัฒนาพบว่ามีความชุกของโรคอาหารเป็นพิษสูงเนื่องจากระบบสุขาภิบาลยังไม่ดีเท่าที่ควรซึ่งนำไปสู่ความเจ็บป่วยและเสียชีวิตได้ (Joob and Wiwanitkit, 2015) โดยสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษมักเกิดจากเชื้อก่อโรคมากถึง 2 ใน 3 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด พยาธิสภาพและอาการของโรคขึ้นอยู่กับความสามารถในการก่อโรคของเชื้อโรค การบุกรุกทำลายเซลล์ และการผลิตสารพิษของเชื้อก่อโรคหลังจากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อก่อโรคเข้าไป

มีเชื้อก่อโรคหลายชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ อาการแสดงและระยะเวลาการเกิดโรคก็จะแตกต่างกันออกไป เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่สามารถสร้าง Enterotoxin ได้ในอาหารเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคอาหารเป็นพิษและทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษมากเป็นอันดับสองรองจากเชื้อ *Salmonella* (Martin et al., 2004) ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตอาหารมีการนำสารเคมีชนิดต่างๆ มาใช้ ปรุงแต่งอาหาร และสารกันบูดก็เป็นสารเคมีอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใส่ในอาหารเพื่อช่วยป้องกัน หรือช่วยทำลายเชื้อจุลินทรีย์ไม่ให้เจริญเติบโตและทำให้อาหารนั้นอยู่ได้นาน ปริมาณของสารกันบูดที่ใช้จะแตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดของอาหาร ซึ่งกระทรวงสาธารณสุขกำหนดปริมาณสาร กันบูดที่อนุญาตให้ใส่ในอาหาร สารกันบูดเหล่านี้หากใช้ตามที่กฎหมายกำหนด หรือใช้ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขจะไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค แต่หากใช้ในปริมาณมากเกินไป หรือนำไปใช้ไม่เหมาะสมก็จะก่อให้เกิดอันตรายได้

ในบางประเทศมีการใช้พืชสมุนไพรในท้องถิ่นเป็นวัตถุดิบในการประกอบอาหารเพื่อเป็นการป้องกันและรักษาโรคของคนในชุมชน (Kimondo et al., 2015) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า พืชสมุนไพรไทยจำนวนมากมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีและมีศักยภาพที่จะพัฒนาต่อไปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อดูแลสุขภาพหรือยารักษาโรคได้ (Siriwatanametanon et al., 2010) ในตำรับยาสมุนไพรไทยมีการใช้กระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk) เป็นส่วนประกอบของตำรับยารักษาโรคในระบบทางเดินอาหาร จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดจากใบ

กระทุมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี (Limsuwan et al., 2012) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบกระทุต่อเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหารซึ่งก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบและผลกระทุต่อเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหารและนำสารสกัดจากใบและผลกระทุมาใช้เป็นส่วนประกอบของน้ำสลัดเพื่อป้องกันโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus*

บทตรวจเอกสาร

1. กระทุ (Santisuk et al., 2002)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.

ชื่อวงศ์: Myrtaceae

ชื่อสามัญ: Downy rose myrtle, Hill gooseberry และ Hill guava

ลักษณะทางพฤษศาสตร์: เป็นไม้พุ่มขนาดเล็กมีความสูงได้ประมาณ 1-4 เมตร เปลือกต้นสีน้ำตาลอ่อนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มเมื่อโตเต็มที่ ใบเดี่ยวเรียงตัวตรงข้ามรูปไข่ขนาด 4.5-8 × 2.3-4 เซนติเมตร ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม ฐานใบมีขนสั้นๆ ปกคลุมมีลักษณะอ่อนนุ่ม ดอกเกิดที่บริเวณปลายกิ่งหรือซอกใบ ก้านช่อดอกยาว 1-2 เซนติเมตร กลีบดอกสีชมพูยาว 1.5-2 เซนติเมตร เกสรตัวผู้จำนวนมาก ก้านชูอับเรณูยาว 10 มิลลิเมตร ผลมีเนื้ออ่อนนุ่มยาว 9-10 มิลลิเมตร สีม่วง (รูปที่ 1)

รูปที่ 1 ต้นกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.)

การกระจายพันธุ์: พบบริเวณทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยพบได้ในหลายจังหวัด เช่น ชุมพร พังงา ภูเก็ต กระบี่ สงขลา และนราธิวาส

สรรพคุณทางยา: ในทางการแพทย์พื้นบ้านของไทยมีการนำมาใช้ในการรักษาโรคในระบบทางเดินอาหาร ใบสดสามารถนำมาล้างแผลได้

ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย: จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดจากใบกระทุมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี (Limsuwan et al., 2012) พบว่า สารที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีคือ สาร Rhodomyrtone ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Acylphloroglucinol ซึ่งแยกได้จากสารสกัดอะซีโตนจากใบกระทุ (Hiranrat et al., 2008) สาร Rhodomyrtone มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 โดยพบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับยา Vancomycin (Saising et al., 2008) สาร Rhodomyrtone ที่แยกออกมาจากใบกระทุสามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ที่ความเข้มข้น 0.39 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีผลต่อ Metabolic pathways ที่สำคัญของเชื้อ *S. pyogenes* ที่ใช้ในการเจริญเติบโตเช่น Phosphate dehydrogenase และการผลิต exotoxin C ของเชื้อ (Limsuwan et al., 2011) สารสกัดจากใบกระทุมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *S. aureus, Staphylococcus epidermidis* และ *Streptococcus mutans* อยู่ในช่วง 0.03-0.25 และ 0.03-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Limsuwan et al., 2009)

สารสกัดเอทานอลจากใบกระทุมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อในกลุ่ม Staphylococci จำนวน 44 สายพันธุ์ เท่ากับ 16-64 และ 64->128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Mordmuang and Voravuthikunchai, 2015) ฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes* ของสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุและสาร Rhodomyrtone ที่แยกได้จากใบกระทุมีค่า MIC_{90} เท่ากับ 32 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบความเป็นพิษใน Human normal fibroblast มีค่า IC_{50} เท่ากับ 476 และ >200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งมีความเป็นพิษที่ต่ำ (Saising et al., 2012)

การศึกษาองค์ประกอบของสารเคมีจากใบกระทุพบว่า มีสารกลุ่ม Triterpenoid และ Steroids ได้แก่ Lupeol, Beta-amylin, Beta-amyrenonol, Botulin, Friedelin Alpha-amyrin และ Taraxerol (Hui et al., 1975) ส่วนสารในกลุ่ม Tripenoids มีสาร 2 ชนิด ได้แก่ Hopenediol และ Oleananolides (Hui and Li et al., 1976) นอกจากนี้ยังสามารถแยกสารจากใบและผลกระทุ เช่น Acylphloroglucinol Flavonoids Tannins Piceatannol และ Triterpenes (Lai et al., 2014) จากการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสัตว์ทดลองของสารสกัดอะซีโตนจากใบกระทุพบว่า ค่า thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และค่า glutathione, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase ลดลงอย่างมีนัยสำคัญซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Lavanya et al., 2012) สาร Anthocyanins จากสารสกัดเมทานอลจากผลกระทุมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีจากการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging capacity, ABTS radical scavenging capacity, Ferric reducing antioxidant

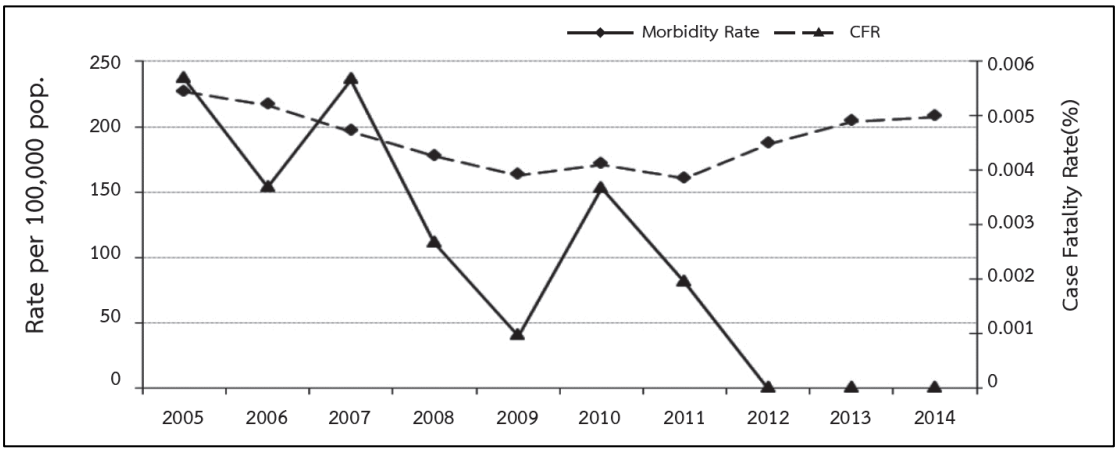
power และ Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) (Cui et al., 2013) ทดสอบการดื้อของเชื้อ *S. aureus* และ MRSA (Methicillin-resistant *S. aureus*) ต่อสาร Rhodomyrtone ไม่พบการดื้อของเชื้อต่อสาร Rhodomyrtone นอกจากนี้ไม่พบความเป็นพิษของสาร Rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น 128 MIC (64 µg/ml) ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ (Leejae et al., 2013) จากการศึกษาต้านการอักเสบของสารสกัดเมทานอลจากใบกระทุพบว่า ช่วยลด Nitric oxide และ Prostaglandin E2 (Jeong et al., 2013)

2. โรคอาหารเป็นพิษ

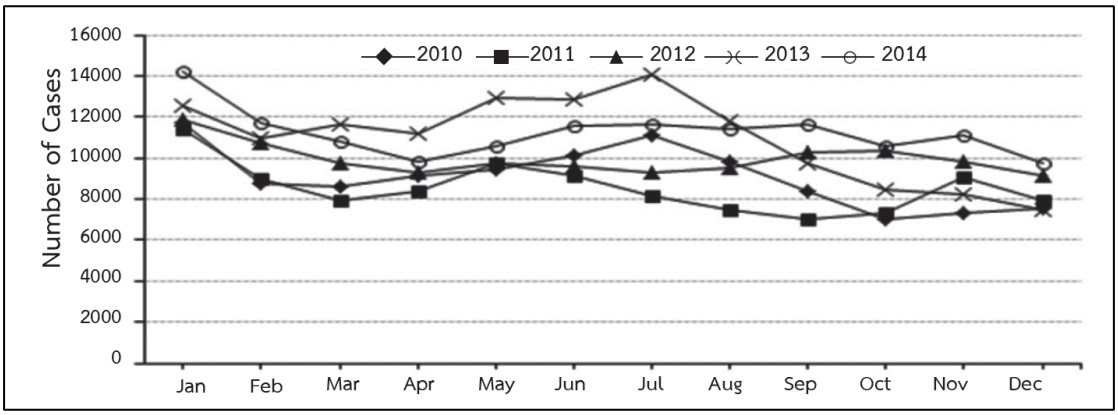
โรคอาหารเป็นพิษเป็นโรคที่พบได้บ่อยในระบบทางเดินอาหารหากไม่ระมัดระวังในการเลือกรับประทาน โดยมีสาเหตุมาจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารเคมี สารพิษตามธรรมชาติ โลหะหนัก เชื้อแบคทีเรีย ไวรัส ปรสิต หรือสารพิษที่เชื้อก่อโรคสร้างขึ้น (Joob et al., 2015) การบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคจะทำให้เชื้อไปเจริญเติบโตภายในลำไส้เป็นสาเหตุให้เกิดความเจ็บป่วย หรือเกิดจากการบริโภคสารพิษที่เชื้อเหล่านี้สร้างขึ้นไว้ในอาหารอยู่แล้ว เมื่อรับประทานอาหารที่มีสารพิษนี้เข้าไปก็จะก่อให้เกิดอาการเจ็บป่วยขึ้น โดยสาเหตุหนึ่งที่พบได้บ่อยมาจากเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งมีหลายชนิดที่สามารถสร้างสารพิษที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้

ในปี พ.ศ. 2557 สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ได้รายงานผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษจำนวน 134,797 ราย (ไม่รวมพิษจากเห็ดและมันสำปะหลัง) อัตราป่วย 207.52 คนต่อประชากรหนึ่งแสนคน อัตราป่วยตายในรอบ 10 ปีที่ผ่านมามีแนวโน้มลดลงอย่างชัดเจน (รูปที่ 2) ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา (ปี พ.ศ. 2553 - 2557) โรคอาหารเป็นพิษพบได้ตลอดปี แต่มักพบผู้ป่วยจำนวนมากในเดือนมกราคม และเดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม ซึ่งเป็นช่วงเปิดภาคเรียน ในปี พ.ศ. 2557 พบผู้ป่วยสูงสุดในเดือนมกราคมจำนวน 14,209 ราย จากนั้นค่อย ๆ ลดลง และเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงกันยายน เดือนธันวาคมพบผู้ป่วยน้อยที่สุดจำนวน 9,755 ราย (รูปที่ 3) โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเพศหญิงจำนวน 81,111 ราย เพศชายจำนวน 53,686 ราย อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิง เท่ากับ 1:1.5 กลุ่มอายุที่พบสูงสุด คือ กลุ่มอายุ 0-4 ปี อัตราป่วย 491.12 คนต่อประชากรหนึ่งแสนคน รองลงมา คือ กลุ่มอายุ 5-9 ปี และ 10-14 ปี (รูปที่ 4) การกระจายของโรคอาหารเป็นพิษตามภาคพบว่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอัตราป่วยสูงสุด 327.51 คนต่อประชากรหนึ่งแสนคน รองลงมาคือภาคเหนือ (255.5) ภาคกลาง (127.56) และภาคใต้ (53.15) จังหวัดที่มีอัตราป่วยสูงสุด

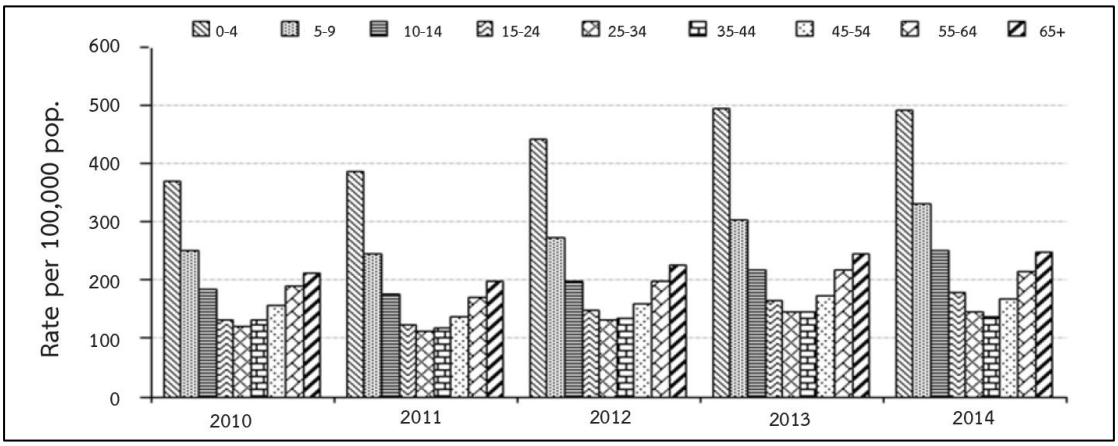
10 ลำดับแรกคือ หนองบัวลำภู อัตราป่วยเท่ากับ 645.67 คนต่อประชากรหนึ่งแสนคน รองลงมาคือ หนองคาย (632.05) อุดรธานี (585.72) อำนาจเจริญ (572.21) แม่ฮ่องสอน (468.14) ลำพูน (467.23) นครพนม (461.59) บุรีรัมย์ (429.67) ปราจีนบุรี (419.26) และขอนแก่น (417.62) (รูปที่ 5)



รูปที่ 2 อัตราป่วยตายจากโรคอาหารเป็นพิษในรอบ 10 ปี (พ.ศ. 2548-2557)
แหล่งข้อมูล: ระบบเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2557

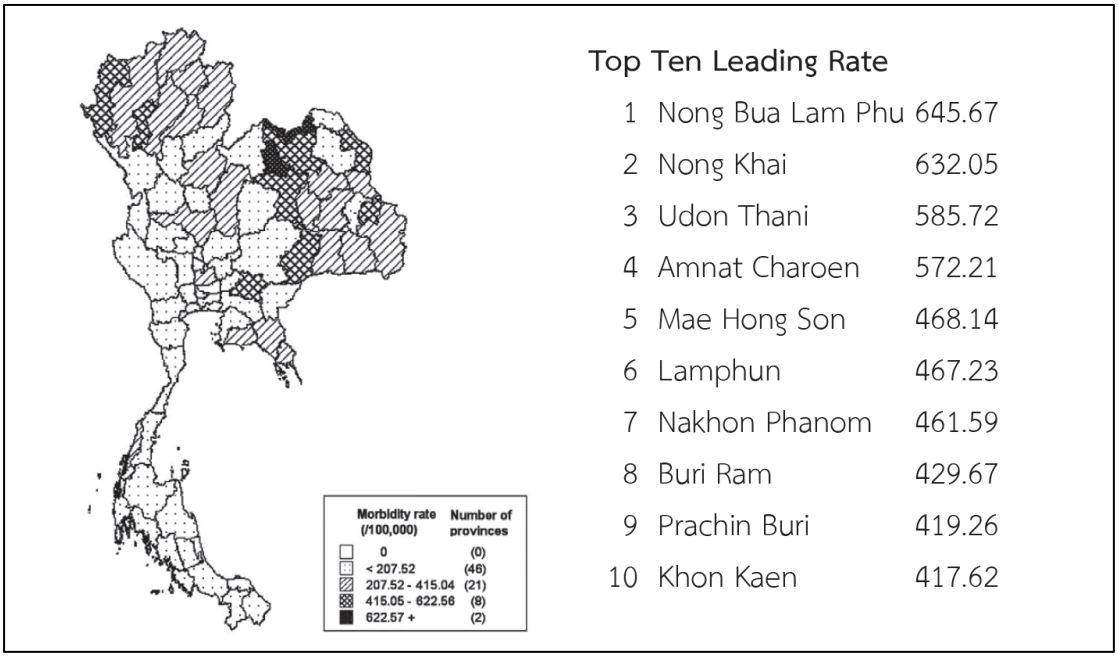


รูปที่ 3 จำนวนผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษในแต่ละปี (พ.ศ. 2553-2557)
แหล่งข้อมูล: ระบบเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2557



รูปที่ 4 กลุ่มอายุที่พบโรคอาหารเป็นพิษ

แหล่งข้อมูล: ระบบเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2557



รูปที่ 5 การกระจายตามภาคของโรคอาหารเป็นพิษ

แหล่งข้อมูล: ระบบเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2557

สาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษมักเกิดจากเชื้อก่อโรคมากถึง 2 ใน 3 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด เชื้อก่อโรคเหล่านี้มีความสามารถในการอยู่รอดในเซลล์โฮสต์ได้ พยาธิสภาพและอาการของโรคขึ้นอยู่กับความสามารถในการก่อโรค เช่น การผลิตสารพิษของเชื้อก่อโรคหลังจากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อก่อโรคเข้าไป มีเชื้อก่อโรคหลายชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ อาการแสดงและระยะเวลาการเกิดโรคก็จะแตกต่างกันออกไป (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษและอาการแสดง

Organisms	**Infective dose**	**Incubation time**	**Symptoms**[a]	**Reference (s)**
Aeromonas spp.	10^6-10^8	6-48 h	D, A, DH	Kirov, 1993
Bacillus cereus (diarrhoeal)	10^5-10^7	6-12 h	D, A, DH	Kramer and Gilbert, 1989
Bacillus cereus (emetic)	$\geq 10^5$	1-6 h	V, A	Kramer and Gilbert, 1989
Campylobacter spp.	10^3-10^5	2-5 day	F, BD	Butzle and Oosterom, 1991
Clostridium botulinum	Toxins	12-36 h	V, A, D, ND	Hauschild, 1989
Clostridium perfringens	10^8	6-16 h	D, A, DH	Granum, 1990
Escherichia coli (LT)[b]	10^5-10^8	16-18 h	BD, A, DH	Doyle and Padhye, 1989
Escherichia coli (ST)[c]	10^5-10^8	4-6 h	D, F	Doyle and Padhye, 1989
Listeria monocytogenes	10^7-10^8	1-90 day	I, M	Schuchat et al., 1991
Salmonella spp.	10-10^6	7 h-21 day	V, D, F, A, DH	D'Aoust, 1989
Shigella spp.	10^2-10^5	1-7 day	D, F, A, BD, DH	Wachsmuth and Morris, 1989
Staphylococcus aureus	Toxins	1-6 h	V, A, D	Bergdoll, 1989
Vibrio cholera	10^8	2-5 day	D, A, DH	Wachsmuth et al., 1994
Vibrio parahaemolyticus	10^3-10^4	9-24 h	A, V, F,	Adams and Moses, 1995
Yersinia enterocolitica	10^7	2-7 day	V, D, A, DH	Kapperud, 1991

[a]A: Abdominal pain, BD: Bloody diarrhoea, DH: Dehydration, D: Diarrhoea, F: Fever, I: Influenza-like, M: Meningitis, ND: Neurological disturbances; V: Vomiting.

[b]LT: Heat-labile toxin, [c]ST: Heat-stable toxin

กลไกที่ทำให้เกิดภาวะท้องร่วงนั้น เกิดจากการเสียสมดุลของการดูดซึม และการหลั่งสารในระบบทางเดินอาหาร แบ่งออกเป็น 4 กลไกหลัก (สมบัติ ตรีประเสริฐสุข, 2549)

1. Osmotic diarrhea เกิดจากการมี Active solute หรือ Osmolyte ที่ไม่สามารถดูดซึมได้ หรือดูดซึมได้น้อยในท่อทางเดินอาหาร จึงนำไปสู่การกระตุ้นให้เกิดการขับน้ำออกมา สาร Osmolyte มักเป็นสารที่ได้จากอาหารโดยเฉพาะกลุ่มคาร์โบไฮเดรต หรือเกิดจากภาวะ Malabsorption ลักษณะเด่นทางคลินิก คือ เมื่อให้ผู้ป่วยอดอาหาร อาการถ่ายเหลวจะหยุดหรือลดน้อยลง

2. Secretory diarrhea มีสาเหตุมาจากการหลั่งสารน้ำมากกว่าปกติเข้าไปในลำไส้ ซึ่งมักมีสาเหตุจาก Bacterial enterotoxins โรคของลำไส้เล็กที่เป็น Diffuse mucosal disease ลำไส้ถูกตัด หรือการมีภาวะ Iron transport ผิดปกติตั้งแต่แรกเกิด

3. Inflammatory/ exudative diarrhea เมื่อมีการทำลายชั้น Intestinal mucosa โดยเชื้อก่อโรคหรือจากสาเหตุอื่นๆ จะทำให้เกิดการขับสารเยื่อเมือก หนอง น้ำเลือด มายัง Gut lumen ทำให้มีเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงปนในอุจจาระ ซึ่งการอักเสบจะทำให้การดูดซึมสารน้ำเกลือแร่ลดลงโดยเฉพาะที่ลำไส้ใหญ่ และการที่มี Inflammatory mediators หลั่งออกมามากจะกระตุ้นให้เกิด Secretory diarrhea ลักษณะเด่นทางคลินิก คือ ถ่ายเหลวมีมูกเลือดปน

4. Dysmotility diarrhea ภาวะที่เกิดจากการบีบตัวของลำไส้ผิดปกติ ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เกิดอาการท้องเสีย อาจเกิดจากมีแบคทีเรียมากเกินไปในลำไส้เล็ก ส่วนกรณีที่ลำไส้มีการบีบตัวมากเกินไป ก็จะทำให้เกิดการลดโอกาสสัมผัสของ Chime กับ Intestinal epithelium

โรคอาหารเป็นพิษส่วนใหญ่มักเกิดจากติดเชื้อแบคทีเรียรองลงมาคือ ไวรัส นอกจากนั้นที่พบได้บ้าง คือ การติดเชื้อปรสิต (Parasite) เช่น บิดมีตัว (Amoeba) ส่วนการปนเปื้อนสารพิษที่พบบ่อยคือ เห็ดพิษ สารพิษปนเปื้อนในอาหารทะเล สารหนู และสารโลหะหนัก แบคทีเรียที่พบก่อโรคอาหารเป็นพิษ มีหลายชนิด ที่พบบ่อย คือ *Staphylococcus, E. coli, Shigella* และ *Salmonella* จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า เชื้อ *S. aureus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษมากเป็นอันดับสองรองจากเชื้อ *Salmonella* (Martin et al., 2004) โดยเชื้อ *S. aureus* สามารถสร้าง Enterotoxin ที่มีคุณสมบัติทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส นานถึง 30 นาที และทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร เมื่อบริโภคเข้าไปจะทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียนรุนแรง ปวดท้อง ท้องเสีย หลังจากรับประทานประมาณ 1-8 ชั่วโมง (Kérouanton et al., 2007) มักพบว่าคนเป็นพาหะ

ของ *S. aureus* จับต้องอาหารด้วยมือ จะทำให้เชื้อปนเปื้อนลงไปและอาจก่อให้เกิดอาการของอาหารเป็นพิษได้

3. *Staphylococcus aureus*

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก จัดอยู่ในวงศ์ Micrococcaceae มีรูปร่างกลม มักพบเป็นคู่หรือเรียงตัวเป็นสายสั้นๆ หรือเป็นลักษณะพวงองุ่น สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ อุณหภูมิที่สามารถเจริญเติบโตได้คือ 15-45 องศาเซลเซียส และเจริญได้ในระดับความเข้มข้นของเกลือสูงถึงร้อยละ 15 ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เช่น การติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อ และโรคอาหารเป็นพิษ (Todar, 2005) มีการสร้างเม็ดสีเหลืองในโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* แต่บางครั้งอาจพบเป็นสีครีมได้ โดยเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลายๆ ครั้ง สีในโคโลนีเกิดจากสารประกอบพวกคาโรตีนอยด์ (Carotenoid) แต่การเกิดสีของโคโลนีจะมีความแตกต่างกันสูงมากในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ เชื้อ *S. aureus* สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส (Catalase) ใช้กลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ การจำแนกเชื้อ *S. aureus* จากเชื้อชนิดอื่นๆ ของกลุ่ม *Staphylococcus* ใช้ความสามารถในการทำให้พลาสมาแข็งตัวเนื่องจากการสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลส (Coagulase) (Easmon and Goodfellow, 1990)

มักพบเชื้อ *Staphylococcus* ในคนและสัตว์เลือดอุ่นชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะในคนที่มีผิวหนังผิดปกติ เช่น เป็นฝี แผลผ่าตัด แผลอักเสบ เป็นต้น เชื้อนี้ยังแยกได้จากสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข เป็ด ไก่ โค กระบือ สุกร ห่าน และในอาหารสัตว์ เชื้อ *S. aureus* ก่อให้เกิดโรค Mastitis ในสัตว์โดยเฉพาะโค กระบือ แพะ และแกะ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้าง Enterotoxin ที่พบในสัตว์จะมีน้อยกว่าสายพันธุ์ที่พบในคน (Alberton et al. 2001) *S. aureus* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคที่สำคัญที่ผิวหนัง คนที่เป็นพาหะของเชื้อนี้ไม่ได้พบเฉพาะคนที่กำลังเป็นโรคเนื่องจากติดเชื้อนี้เท่านั้น แต่พบในคนที่มีสุขภาพดีด้วย นอกจากนี้ *S. aureus* ยังพบตามส่วนอื่นๆ ของร่างกายได้อีก เช่น ผิวหนัง จมูก คอ และผม บางครั้งพบในอุจจาระด้วย จมูกเป็นอวัยวะที่พบเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด (ร้อยละ 10-40) และพบว่าในโพรงจมูกมีปริมาณเชื้อมากกว่า 10^3 CFU/swab ทำให้เกิดการปนเปื้อนในอาหารได้ง่าย (Varnam and Evan, 1991) *S. aureus* มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอกได้ดีมากทำให้สามารถมีชีวิตอยู่ภายนอกร่างกายได้ดี มักพบว่า เมื่อคนเป็นพาหะของ *S. aureus* จับต้องอาหารด้วยมือจะทำให้เชื้อปนเปื้อนลงไปและอาจก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษเมื่อบริโภคอาหารได้ (วันทนา, 2538)

S. aureus สามารถสร้างสารพิษ Enterotoxin แบ่งออกเป็น 8 ชนิด ได้แก่ A, B, C1, C2, C3, D, E และ H ชนิดที่พบบ่อยซึ่งเป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษคือ A กับ D สารพิษนี้มีคุณสมบัติพิเศษ คือ ทนความร้อน ไม่ถูกทำลายแม้ต้มในน้ำเดือดครึ่งชั่วโมง และทนความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที สารพิษนี้ละลายได้ในน้ำและสารละลายเกลือ เชื้อ *S. aureus* จะสร้างสารพิษดังกล่าวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าที่ 25 และ 10 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และสามารถทนต่อรังสีแกมมาในปริมาณที่อนุญาตให้ใช้กับอาหารได้อีกด้วย การได้รับสารพิษจะทำให้ผู้ป่วยมีอาการอาเจียนและท้องร่วงอย่างรุนแรง บางสายพันธุ์ทำให้เกิดกลุ่มอาการ Toxic shock syndrome โดยการสร้าง Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) ทำให้มีไข้สูง คลื่นไส้อาเจียน มีความดันต่ำ มีผื่นแดงตามตัว การทำงานของไตมักจะล้มเหลว และเกิดอาการช็อก (Siriwong and Chukeatirote, 2009)

การระบาดของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยาถูกพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2483 โดยการตรวจพบเชื้อจากแผลติดเชื้อไฟไหม้ของผู้ป่วยในประเทศอังกฤษ โดยพบว่าเชื้อดื้อต่อยาซัลโฟนาไมด์ (Sulphonamide) ดังนั้นจึงเปลี่ยนการรักษาจากการใช้ยาซัลโฟนาไมด์เป็นการใช้ยาเพนนิซิลิน (Penicillin) และพบว่า การใช้ยาเพนนิซิลินสามารถยับยั้งการติดเชื้อได้ผลดี หลังจากนั้นจึงมีการผลิตยาเพนนิซิลินเพิ่มมากขึ้นและมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่จากการใช้ยาเพนนิซิลินอย่างไม่ถูกวิธีทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาอันเนื่องมาจากเชื้อที่กลายพันธุ์และสามารถสร้างเอนไซม์บีตาแลคทาเมส (bata-Lactamase) ซึ่งเกิดจากการควบคุมของยีนบนพลาสมิดและโครโมโซม โดยเอนไซม์ทำหน้าที่ทำลายวงแหวนบีตา-แลคแตม (bata-Lactam ring) ที่เป็นโครงสร้างหลักของยาเพนนิซิลินทำให้ยาไม่สามารถทำงานได้ จากปัญหาการดื้อยาเพนนิซิลินที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทำให้มีการพัฒนายาชนิดใหม่ โดยในระยะแรกยาสามารถใช้รักษาอาการติดเชื้ออย่างได้ผล แต่ต่อมาพบว่า เชื้อสามารถเกิดการดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว เชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะที่สำคัญมี 3 ชนิด คือ Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), Vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA) และ Vancomycin resistant *S. aureus* (VRSA) (Siriwong and Chukeatirote, 2009)

4. สารกันบูด (Preservatives) (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข)

สารกันบูด (Preservatives) คือ สารเคมีหรือของผสม ของสารเคมีที่ใช้ในการถนอมอาหาร โดยอาจจะใส่ลงในอาหาร พ่น หรือฉาบรอบๆ ผิวของอาหารหรือภาชนะบรรจุ ซึ่งสารดังกล่าวจะทำหน้าที่ยับยั้ง หรือทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียโดยอาจจะไปออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ รบกวนการทำงานของเอนไซม์ หรือกลไกทางพันธุกรรม (Genetic mechanism) ในเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้หรือตาย สารกันบูดที่ดีควรจะออกฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสียมากกว่าที่จะออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เพื่อป้องกันการเกิดสายพันธุ์ต้านทาน (Resistant strain) นอกจากนี้สารกันบูดไม่ควรจะเสื่อมคุณภาพเมื่อใส่ลงในอาหาร ยกเว้นสารกันบูดประเภทที่ฆ่าเชื้อได้ ควรจะถูกเปลี่ยนสภาพให้เป็นสารไม่มีพิษหรือถูกทำลายได้ด้วยการหุงต้ม

สารกันบูดที่นิยมกันมาก คือ พวกกรดอ่อนต่างๆ เช่น กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอท เพราะมีราคาถูกและไม่ทำให้รสชาติอาหารเปลี่ยน มักเติมลงในเครื่องดื่มต่างๆ เช่น น้ำผลไม้ ซอส ผักดอง แยม เยลลี่ ผลไม้แช่อิ่ม และเครื่องแกงสำเร็จรูป สำหรับกรดโปรปิโอนิก (Propionic Acid) และเกลือโปรปิโอเนต เหมาะสำหรับใช้ป้องกันการเจริญของเชื้อรา และเกิดเมือกหรือยางเหนียวในโด (Dough) หรือแป้งขนมปังที่ผ่านการนวดแล้ว จึงเหมาะที่จะใช้ในอาหารประเภทขนมปัง เค้ก และเนยแข็งชนิดต่างๆ ส่วนกรดซิตริก (Citric acid) เป็นส่วนประกอบของผลไม้สามารถป้องกันแบคทีเรียและยีสต์ได้ดี เหมาะสำหรับใส่ในเครื่องดื่ม น้ำหวาน น้ำอัดลม เยลลี่ แยม เป็นต้น

ชนิดของสารกันบูด

1. กรดและเกลือของกรดบางชนิด เช่น กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก กรดโปรปิโอนิก และเกลือของกรดเหล่านี้ส่วนใหญ่นิยมใช้ในรูปเกลือของกรดเพราะละลายน้ำได้ง่ายเมื่อใส่ในอาหาร เกลือเหล่านี้จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของกรด หากอาหารนั้นมีความเป็นกรดสูง กรดจะคงอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว ซึ่งเป็นรูปที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายหรือยับยั้งเชื้อ ดังนั้นอาหารที่จะใช้สารกันบูดชนิดนี้ควรจะเป็นอาหารที่มีความเป็นกรด (pH 4-6) ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของกรด เช่น น้ำผลไม้ เครื่องดื่ม แยม ผักดองชนิดต่างๆ และขนมปัง เป็นต้น สารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะให้ผลยับยั้ง

ราและยีสต์มากกว่าแบคทีเรีย ข้อดีของสารกลุ่มนี้ คือ มีความเป็นพิษต่ำเพราะร่างกายคนสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นสารอื่นที่ไม่มีพิษและขับถ่ายออกจากร่างกายได้

2. พาราเบนส์ (Parabens) เป็นสารกันบูดที่มีประสิทธิภาพยับยั้ง หรือทำลายราและยีสต์ได้ดีกว่าแบคทีเรีย และจะมีประสิทธิภาพสูงในช่วงความเป็นกรดด่าง (pH) กว้างกว่าสารกลุ่มแรก คือประมาณ pH 2-9 อาหารที่นิยมใส่พาราเบนส์ ได้แก่ น้ำหวานผลไม้ น้ำผลไม้ แยม ขนมหวานต่างๆ และสารปรุงแต่งกลิ่นรส โดยร่างกายมนุษย์จะมีกระบวนการขจัดพิษของพาราเบนส์ได้โดยปฏิกิริยาไฮโดรลีซิส (Hydrolysis)

3. ซัลเฟอร์ไดออกไซด์และซัลไฟต์ กลไกในการทำลายเชื้อของสารกันบูดชนิดนี้จะคล้ายคลึงกับสารกันบูดกลุ่มแรกและจะมีประสิทธิภาพสูงในอาหารที่มีความเป็นกรดด่างปริมาณน้อยกว่า 4 (pH 4) นิยมใส่ในไวน์ น้ำผลไม้ต่างๆ ผัก และผลไม้แห้ง เป็นต้น สำหรับความปลอดภัยต่อผู้บริโภคนั้นพบว่าแม้สารนี้จะถูกขับออกมาจากร่างกายได้ แต่หากร่างกายได้รับสารนี้มากเกินไปสารดังกล่าวจะไปลดการใช้โปรตีนและไขมันในร่างกายได้ นอกจากนี้สารกันบูดกลุ่มนี้ยังทำลายไธอามีน (Thiamine) หรือวิตามิน B1 ในอาหารด้วย

4. สารปฏิชีวนะ ข้อดีของสารปฏิชีวนะ คือ ความเป็นกรดด่างของอาหารไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ ซึ่งอาหารที่นิยมใส่สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่จะเป็นพวกเนื้อสัตว์ต่างๆ อาจจะพบว่าใช้กับผักและผลไม้สดด้วย สารปฏิชีวนะจะทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดขึ้นกับชนิดที่ใช้ ข้อเสียของสารกันบูดชนิดนี้คือมักจะก่อให้เกิดสายพันธุ์ต้านทานขึ้น

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตอาหารมีการนำสารเคมีชนิดต่างๆ มาใช้ปรุงแต่งอาหาร และสารกันบูดก็เป็นสารเคมีอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใส่ในอาหารเพื่อช่วยป้องกันหรือช่วยทำลายเชื้อจุลินทรีย์ไม่ให้เจริญเติบโตและทำให้อาหารนั้นอยู่ได้นาน ปริมาณของสารกันบูดที่ใช้จะแตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดของอาหาร ซึ่งกระทรวงสาธารณสุขจะเป็นผู้กำหนดปริมาณที่อนุญาตให้ใส่ในอาหารได้ สารกันบูดเหล่านี้หากใช้ตามที่กฎหมายกำหนด หรือใช้ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขจะไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค แต่หากใช้ในปริมาณมากเกินไป หรือนำไปใช้ไม่เหมาะสมก็จะก่อให้เกิดอันตรายได้ ในแต่ละวันหากได้รับสารกันบูดในปริมาณน้อยร่างกายจะสามารถกำจัดออกทางปัสสาวะได้ตามปกติ แต่หากได้รับในปริมาณมากทุกวัน ตับและไตจะต้องทำงานหนักขึ้น และหากกำจัดออกไปไม่หมดก็จะเกิดการสะสมในร่างกาย ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพของตับและไตในการกำจัดสารเคมีเหล่านี้ลดลง และอาจทำให้เกิดอาการ

เจ็บป่วยต่อตับและไตได้ ดังนั้นทางเลือกหนึ่งที่สามารถลดปัญหาเหล่านี้ได้ คือ การหาสารจากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในอาหารเพื่อลดหรือทดแทนการใช้

5. น้ำสลัด (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2540)

น้ำสลัด หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากน้ำส้มสายชูกับเครื่องปรุงแต่งกลิ่นรส เช่น น้ำตาล เกลือ น้ำมะนาว ตีผสมให้เข้ากันดี อาจเติมน้ำมันสลัด น้ำมันพืช แป้งสาลี ผลิตภัณฑ์จากนม เช่น นมสด นมข้นหวาน และอาจเติมผัก ผลไม้ ไข่ไก่ สมุนไพร เครื่องเทศ เช่น พริกไทย กระเทียม

น้ำสลัดสุก หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากไข่ไก่ที่อาจทำให้สุกก่อนหรือหลังการผสมกับน้ำส้มสายชู เครื่องปรุงแต่งกลิ่นรส เช่น น้ำตาล เกลือ น้ำมะนาว ตีผสมให้เข้ากันดี เติมน้ำมันสลัด น้ำมันพืช อาจเติมแป้งสาลี ผลิตภัณฑ์จากนม เช่น นมสด นมข้นหวาน และอาจเติมผัก ผลไม้ สมุนไพร เครื่องเทศ เช่นพริกไทย กระเทียม

น้ำสลัดข้น หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากไข่ไก่ดิบ น้ำส้มสายชู เครื่องปรุงแต่งกลิ่นรส เช่น น้ำตาล เกลือน้ำมะนาว ตีผสมให้เข้ากันดี เติมน้ำมันสลัด น้ำมันพืช อาจเติมแป้งสาลี ผลิตภัณฑ์จากนม เช่น นมสด นมข้นหวาน และอาจเติมผัก ผลไม้ สมุนไพร เครื่องเทศ เช่น พริกไทย กระเทียม

น้ำสลัดใส หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากน้ำส้มสายชู เครื่องปรุงแต่งกลิ่นรส เช่น น้ำตาล เกลือ น้ำมะนาว ตีผสมให้เข้ากันดี อาจเติมน้ำมันสลัด น้ำมันพืช และอาจเติมผัก ผลไม้ สมุนไพร เครื่องเทศ เช่น พริกไทย กระเทียม

ลักษณะทั่วไป

1. น้ำสลัดสุกต้องเป็นของเหลวข้นกึ่งแข็ง เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่แยกตัว ถ้ามีการเติมส่วนประกอบอื่นต้องกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ
2. น้ำสลัดข้นต้องเป็นของเหลวข้น เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่แยกตัว ถ้ามีการเติมส่วนประกอบอื่นต้องกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ
3. น้ำสลัดใสต้องเป็นของเหลวใส อาจมีการแยกชั้น และอาจมีผัก ผลไม้ สมุนไพร หรือเครื่องเทศลอยตัวอยู่
4. สีต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้
5. กลิ่นต้องมีกลิ่นที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้ ปราศจากกลิ่นอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นอับ กลิ่นหืน

6. กลิ่นรส ต้องมีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้ ปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์เมื่อตรวจสอบ
7. สิ่งแปลกปลอม ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ดิน ทราย กรวด ชิ้นส่วน หรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์
8. ค่าเพอร์ออกไซด์ (Peroxide value) (กรณีมีน้ำมันเป็นส่วนประกอบ) เป็นค่าที่ใช้การวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดกลิ่นหืน (Rancidity) เป็นค่าที่บ่งชี้ถึงการเสื่อมเสียของน้ำมันและไขมันรวมทั้งอาหารที่มีไขมันสูง ต้องไม่เกิน 30 มิลลิกรัมสมมูลเพอร์ออกไซด์ออกซิเจนต่อกิโลกรัม
9. วัตถุเจือปนอาหาร หากมีการใช้วัตถุกันเสีย ให้ใช้ได้ตามชนิดและปริมาณที่กฎหมายกำหนด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดจากใบและผลกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk) โดยทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหาร
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบและผลกระทุ
3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบและผลกระทุในสัตว์ทดลอง
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ของน้ำสลัดที่มีส่วนประกอบของสารสกัดจากใบกระทุ

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

1.1 แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

Staphylococcus aureus ATCC 23235

Staphylococcus aureus ATCC 27664

1.2 แบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหาร 11 สายพันธุ์

แบคทีเรียทั้ง 11 สายพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จากสถานวิจัยความเป็นเลิศด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ตารางที่ 2)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Mueller hinton broth (MHB) (Difco)

2.2 Muller hinton agar (MHA) (Difco)

2.3 Tryptic soy agar (TSA) (Difco)

2.4 Tryptic soy broth (TSB) (Difco)

3. ยาปฏิชีวนะ

3.1 Vancomycin (Oxoid)

4. สารเคมี

4.1 Absolute Ethanol (Merck)

4.2 Acetone (Merck)

4.3 Acetic acid

4.4 Aluminium chloride

4. สารเคมี (ต่อ)

4.5 Catechin (Sigma-Aldrich)

4.6 Dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich)

4.7 Folin-Ciocalteu 's Phenol reagent

4.8 Gallic acid (Sigma-Aldrich)

4.9 Hydrochloric acid

4.10 Iron(III) chloride hexahydrate

4.11 Methanol

4.12 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich)

4.13 Sodium carbonate (Univar)

4.14 Sodium nitrite

4.15 Sodium hydroxide

4.16 Sodium acetate

4.17 Trolox (Sigma-Aldrich)

4.18 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ)

4.19 Tween 20

5. อุปกรณ์

5.1 Autocave (Tomy, ES 315)

5.2 Balance (Satorius, BP 210S)

5.3 Beaker (Pyrex)

5.4 Duran bottle (Duran)

5.5 Freeze drying (Scanvac)

5.6 Incubator (Froilabo, AC series 240)

5.7 Laminar air flow cabinet (Heal Fore, HFsafe-1200)

5.8 Micropipette ขนาด 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร

5.9 Multichannel micropipette 20-200 ไมโครลิตร (Finnpipette)

5.10 Multifunctional microplate reader (Varioskan Flash)

5. อุปกรณ์ (ต่อ)

5.11 Petri dish (Anumbra)

5.12 Pipet tip ขนด 250 และ 1000 ไมโครลิตร

5.13 Rotary evaporator (Heidolph)

5.14 Test tube (Pyrex)

5.15 Vortex mixer (Vortex Genie 2,G 560E)

5.17 96-Well polystyrene microtiter plate (Nunclon™)

ตารางที่ 2 แหล่งที่มาของเชื้อ *Staphylococcus aureus* การดื้อยา และ Enterotoxin ที่ผลิตโดยเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ

Organisms	**Food**	**Resistance**	**Toxin produced**
S. aureus ATCC 23235	-	-	D
S. aureus ATCC 27664	-	-	-
S. aureus W21	fried pork	OX,P,GM,E,TE,SXT	-
S. aureus W54	papaya salad	OX,P,GM,E,TE,SXT	-
S. aureus W57	pork soup	P	A,C
S. aureus W59	fried chicken	OX,P,GM,E,TE,SXT	-
S. aureus W65	boiled chicken	P	A
S. aureus W68	fried chicken	P,TE	A,B,C
S. aureus W79	banana cake	P	A
S. aureus W81	banana cake	OX,P,GM,E,TE,SXT	-
S. aureus W88	boiled chicken	OX,P,GM,E,TE,SXT	-
S. aureus W93	chicken sausage	P	B
S. aureus W97	fried pork	-	-

TE - tetracycline, E - erythromycin, GM - gentamicin, P - penicillin, OX - oxacillin, SXT - co-trimoxazole

A,B,C,D : Staphylococcal enterotoxin

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดจากใบและผลของต้นกระทุ

1.1 เก็บรวบรวมใบและผลกระทุจาก อ.สิงหนคร จ.สงขลา เมื่อวันที่ 10 มกราคม พ.ศ. 2558 ต้นกระทุมีการกระจายพันธุ์บริเวณป่าดินทรายโดยเก็บใบกระทุจากหลายๆต้น และเลือกเก็บผลที่สุกสีม่วง

1.2 สารสกัดเอทานอลและอะซีโตน นำใบและผลกระทุที่ได้มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นและไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน บดเป็นผง ชั่งน้ำหนัก สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 หรือ อะซีโตน ในอัตราส่วนของสมุนไพรต่อตัวทำละลาย 1:2 เขย่า ทิ้งไว้ 7 วัน คนทุกวัน จากนั้นระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้ Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้ชั่งน้ำหนัก และคำนวณหาร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้จากสูตรดังแสดง

ร้อยละของสารสกัดหยาบ = (น้ำหนักของสารสกัด × 100) / น้ำหนักของสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด

1.3 สารสกัดน้ำ นำใบและผลกระทุที่ได้มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นและไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน บดเป็นผง ชั่งน้ำหนัก ห่อด้วยผ้าขาวบางแล้วนำไปต้ม สัดส่วนของน้ำต่อสมุนไพร 600 มิลลิลิตร : 200 กรัม ต้มเดือดนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองหยาบด้วยผ้าขาวบาง และกรองละเอียดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้ Lyophilizer นำสารสกัดที่ได้ชั่งน้ำหนัก และคำนวณหาร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้จากสูตรดังแสดง

ร้อยละของสารสกัดหยาบ = (น้ำหนักของสารสกัด × 100) / น้ำหนักของสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดหยาบโดยวิธี Disc diffusion method (CLSI, 2006a)

2.1 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบประกอบด้วย *S. aureus* จำนวน 11 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากอาหารและสายพันธุ์มาตรฐาน ได้แก่ ATCC 23235 และ ATCC 27664

2.2 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน Tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงต่อในอาหาร Mueller-Hinton broth (MHB) 3 มิลลิลิตร บ่มในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 ด้วย MHB (มีเชื้อประมาณ 1.5 x 10^8 CFU/ml)

2.3 การเตรียมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ ละลายสารสกัดใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมแผ่นสารสกัดจากสมุนไพรโดยหยดสารสกัด 10 ไมโครลิตร ลงกลางแผ่น Paper disc ทิ้งไว้ให้แห้งจะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 2 mg/disc

2.4 การทดสอบกับแผ่นยามาตรฐานและแผ่นสารสกัดจากใบและผลของต้นกระทุ จุ่มเชื้อโดยใช้ Cotton swab เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton Agar 3 แนว ทำมุม 60 องศา วางแผ่นสารสกัดจากใบและผลของต้นกระทุโดยแต่ละแผ่นห่างกันประมาณ 15-20 มิลลิเมตร วางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง การอ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (Inhibition zone) โดยใช้ Vernier caliper

3. การทดสอบหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC) โดยวิธี Broth microdilution (CLSI, 2006b)

3.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 ด้วยสารละลาย NaCl 0.85% แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ 1.0 x 10^6 CFU/ml ด้วย MHB

3.2 การเตรียมสารสกัด เตรียมสารสกัดจากใบและผลของต้นกระทุให้มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ (1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ด้วยตัวทำละลาย 10% DMSO

3.3 การทดสอบหาค่า MIC ทำการเจือจางสารสกัดแบบลำดับสองให้มีความเข้มข้น 1.95-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน Microtiter plate แบบ 96 หลุมให้มีปริมาตรหลุมละ 20 ไมโครลิตร ดูด MHB ใส่ลงใน Microtiter plate หลุมละ 80 ไมโครลิตร ดูดเชื้อใส่ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-20 ชั่วโมง การอ่านผล บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MIC

3.4 การทดสอบหาค่า MBC นำแต่ละหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากการทดสอบหาค่า MIC เพาะเลี้ยงบนอาหาร MHA บ่มในตู้ Incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง การอ่านผล บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MBC

นอกจากนี้ทำการหาค่า MIC และ MBC ของยาปฏิชีวนะ Vancomycin ด้วยวิธีการเดียวกัน

นำมาหาค่า MIC_{50} และ MIC_{90} ของสารสกัดหยาบและยาปฏิชีวนะ ซึ่ง MIC_{50} คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ร้อยละ 50 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ ส่วน MIC_{90} คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ร้อยละ 90 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ

4. การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของสารสกัดสมุนไพรโดยวิธี Time-kill study

(Ifesan and Voravuthikunchai, 2009)

4.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน TSA บ่มในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยว เลือกเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 ด้วยสารละลาย NaCl 0.85% แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ 1.0×10^6 CFU/ml ด้วย MHB

4.2 การเตรียมสารสกัด เตรียมสารสกัดเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 8MIC, 4MIC, 2MIC และ MIC ของเชื้อที่ใช้ทดสอบ

4.3 การทดสอบสารสกัด ดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร เติม MHB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมเชื้อปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มในตู้ Incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นับโคโลนีที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง โดยเมื่อครบเวลาที่กำหนดให้ทำ Dilution นำแต่ละ Dilution มาทำการหยดลงบนอาหาร MHA 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในช่วง 30-300 โคโลนี เขียนกราฟระหว่าง log จำนวนโคโลนีกับเวลา

5. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity (Wetchakul and Chusri, 2015)

5.1 เตรียมสารสกัด ชั่งสารสกัด 40 มิลลิกรัม ละลายด้วย DMSO 1000 ไมโครลิตร (ได้ความเข้มข้น เท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เก็บไว้เป็น Stock solution เตรียมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น เท่ากับ 63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย ละลาย DPPH ในเมทานอลให้มีความเข้มข้น 80 ไมโครโมลาร์ โดยชั่ง DPPH น้ำหนัก 3.154 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox โดยชั่ง Trolox 0.01 กรัม ละลายด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 100, 90, 25, 12.5 และ 6.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.4 การวิเคราะห์ ปิเปตสารสกัดที่ความเข้มข้น 63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม Microplate เติมสารละลาย DPPH ในเมทานอล 180 ไมโครลิตร โดย Blank sample ของสารละลายตัวอย่างเตรียมโดยปิเปตสารละลายที่ความเข้มข้น 63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และเมทานอล 180 ไมโครลิตร ลงในหลุม Microplate เตรียม Control โดยปิเปต DMSO 20 ไมโครลิตร เติมด้วยสารละลาย DPPH ในเมทานอล 180 ไมโครลิตร ลงในหลุม Microplate เตรียม Blank control โดยปิเปต DMSO 20 ไมโครลิตร เติมด้วยเมทานอล 180 ไมโครลิตร ลงในหลุม Microplate จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader คำนวณเป็นร้อยละการยับยั้ง (% Inhibition) โดยใช้สูตร

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{[\,(OD_{control} - OD_{blank\ control}) - (OD_{sample} - OD_{blank\ sample})\,] \times 100}{(OD_{control} - OD_{blank\ control})}$$

6. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total phenolic content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's reagent (T-angbuchakiat, 2015)

6.1 ชั่งสารสกัด 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอล 1000 ไมโครลิตร (ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เจือจางสารสกัดด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้นที่ 2.5 และ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6.2 เตรียม Folin-Ciocalteu's reagent solution โดยการปิเปต Folin-Ciocalteu's reagent 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บให้พ้นแสง

6.3 เตรียม Na_2CO_3 solution โดยการชั่ง Na_2CO_3 20 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

6.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ชั่งสารมาตรฐานกรดแกลลิก 1 มิลลิกรัม ปรับปริมาณด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร (ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเจือจางสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 2.5, 1.25, 0.66, 0.31 และ 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6.5 การวิเคราะห์ ปิเปตสารสกัด 360 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงใน Volumetric flask เติม Folin-Ciocalteu's reagent solution 3000 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม Na_2CO_3 solution 3000 ไมโครลิตร เตรียม Blank ของสารสกัดโดยปิเปตเมทานอล 360 ไมโครลิตร และ Folin-Ciocalteu's reagent solution 3000 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม Na_2CO_3 solution 3000 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด นาน 90 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก โดยนำสารละลายกรดแกลลิกแต่ละความเข้มข้นมาทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกัน คำนวณปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบค่าที่ได้กับสารมาตรฐานของกรดแกลลิก รายงานค่าที่วัดได้ในรูปแบบมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mg of Gallic acid equivalence (GAE)/mg of extract) โดยคำนวณค่าต่างๆ แทนในสมการ $y = mx + c$

เมื่อ x คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

y คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ

โดย $y = OD_{sample} - OD_{blank}$ เมื่อ m และ c คือ ค่าคงที่

7. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content) โดยวิธี Aluminium chloride colorimetry hexahydrate (Wang, 2016)

7.1 ชั่งสารสกัด 10 มิลลิกรัม ละลายตัวด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร (ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เจือจางสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการด้วยการปิเปตสารสกัด และเติมด้วยเมทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 100 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7.2 เตรียมอลูมิเนียมคลอไรด์ 10 % โดยการชั่งอลูมิเนียมคลอไรด์ 10 กรัม ละลาย และปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

7.3 เตรียมโซเดียมไนไตรท์ 5 % โดยการชั่งโซเดียมไนไตรท์ 5 กรัม ละลาย และปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

7.4 เตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ โดยการชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม ละลายและปรับปริมาตร 200 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

7.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานคาเทชิน (Catechin) ชั่งสารละลายมาตรฐานคาเทชิน 10 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร (ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเจือจางสารละลายมาตรฐานคาเทชินให้มีความเข้มข้น 100, 80, 60, 40 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

7.6 การวิเคราะห์ ปิเปตน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงใน Volumetric flask ปิเปตโซเดียมไนไตรท์ 0.3 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric flask ทิ้งไว้ 5 นาที ปิเปตอลูมิเนียมคลอไรด์ 0.3 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric flask ทิ้งไว้ 6 นาที ปิเปตโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2.4 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric flask เขย่าให้เข้ากัน Blank ของสารสกัด คือ น้ำกลั่น ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายคาเทชิน โดยนำสารละลายคาเทชินแต่ละความเข้มข้นทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกัน คำนวณปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบค่าที่ได้กับสารมาตรฐานของคาเทชิน รายงานค่าที่วัดได้ในรูปมิลลิกรัมของคาเทชินต่อกรัมของสารสกัด (mg of Catechin equivalence (CE)/mg of extract) โดยคำนวณค่าต่างๆ แทนในสมการ

$$y = mx + c$$

เมื่อ x คือ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

y คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

โดย $y = OD_{sample} - OD_{blank}$ เมื่อ m และ c คือ ค่าคงที่

8. ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric ion reducing antioxidant power ; FRAP) (Katalinic, 2005)

8.1 เตรียมสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 3.6 ชั่งโซเดียมอะซิเตท ($CH_3COOHNa$) 2.3 กรัม ละลายในสารละลายกรดอะซิติก ($C_2H_4O_2$) ปริมาตร 7.6 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้น 0.28 นาโนโมลาร์ และปรับให้มีค่า pH เท่ากับ 3.6 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8.2 เตรียมสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine) ชั่งสาร 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine 0.031 กรัม ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCL) เจือจางความเข้มข้น 40 นาโนโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปละลายในอ่างที่ควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

8.3 การเตรียมสารเฟอริกไตรคลอไรด์ ($FeCl_36H_2O$) น้ำหนัก 0.054 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

8.4 การเตรียมสารละลาย FRAP นำสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 3.6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย TPTZ 10 มิลลิลิตร และสารละลาย $FeCl_36H_2O$ 10 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด

8.5 วิธีการทดสอบ เตรียมกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต ชั่งเฟอร์รัสซัลเฟต 0.3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟตด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.5, 3, 6, 12 และ 24 ไมโครโมลาร์ ดูดสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต แต่ละความเข้มข้น 300 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลาย FRAP ปริมาตร 2700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งในที่มืด 30 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 596 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟตแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) กับความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต (แกน X) การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่ต้องการทดสอบ (สารสกัดเอทานอลจากใบและผลกระทุ) ดูดสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 300 ไมโครลิตร ผสมลงในสารละลาย FRAP ปริมาตร 2700 ไมโครลิตร ตั้งทิ้ง

ไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 596 นาโนเมตร เปรียบเทียบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต

9. การวิเคราะห์โลหะหนัก

เพื่อควบคุมคุณภาพของน้ำสลัด ก่อนที่จะนำสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุไปพัฒนาเป็นส่วนผสมในน้ำสลัดจะต้องทำการตรวจสอบโลหะหนักเพื่อให้ได้ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.) มายองเนสและน้ำสลัดครีม (ตารางที่ 9) โดยการส่งตรวจสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุ วิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), Optima 8000, Perkin Elmer Instruments, USA ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ (ภาคผนวก)

10. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบและผลกระทุในสัตว์ทดลอง

10.1 สัตว์ทดลอง ใช้หนูขาวใหญ่สายพันธุ์ Wistar เพศผู้และเพศเมีย น้ำหนักประมาณ 200-300 กรัม จากเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ระหว่างการทดลอง สัตว์ทดลองได้รับอาหารและน้ำไม่จำกัด ได้รับแสงสว่างเพียงพอ 12 ชั่วโมงต่อวัน โดยการกำหนดเปิด-ปิด ไฟทุก 12 ชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิห้องที่ 24 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 55 ± 10 มีระบบไฟฟ้าสำรอง เลี้ยงในกรงขนาด 23 × 45 × 21 เซนติเมตร จำนวน 5-6 ตัวต่อกรง วัสดุรองนอนใช้เป็นขี้กบ (เศษไม้) ซึ่งจะทำการเปลี่ยนทุกๆ 2 วันต่อ 1 ครั้ง สัตว์ทดลองได้รับอาหารอัดเม็ดสำเร็จรูปจากโรงงานโภคภัณฑ์อาหารสัตว์จำกัด ใส่ภาชนะไม่เป็นสนิม น้ำดื่มเป็นน้ำประปาผ่านเครื่องกรองชนิด Reverse osmosis ใส่ขวดแก้วมีจุกยางและแกนส่งน้ำสำหรับให้สัตว์ดูด ทั้งอาหารและน้ำดื่มมีเพียงพอตลอดวัน

10.2 การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดจากกระทุ อ้างอิงจาก OECD Guideline 407 และ 425 รายละเอียดดังนี้

สัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมประกอบด้วย เพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว ได้น้ำและอาหารในปริมาณเท่ากัน โดยจะทำการป้อนตัวทำละลาย (Tween 20 : น้ำกลั่น, 3:1) ให้สัตว์ทดลองในกลุ่มนี้ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 28 วัน หลังจากนั้น สังเกตอาการหลังจากป้อน (การเดิน ทรงตัว ลักษณะของอุจจาระ ขนที่ปกคลุม สั่น ชัก ซึม และอาเจียน)

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบและผลกระทุ ป้อนสารสกัดจากใบและผลกระทุ ความเข้มข้นขนาด 5, 50 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ให้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มมีสัตว์ทดลอง 10 ตัว ประกอบด้วย เพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว สัตว์ทดลองทุกกลุ่มให้ปริมาณน้ำและอาหารเท่ากัน โดยจะทำการป้อนสารสกัดให้สัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มต่อเนื่องกันเป็นเวลา 28 วัน หลังจากนั้น สังเกตอาการหลังจากป้อน (การเดิน ทรงตัว ลักษณะของอุจจาระ ขนที่ปกคลุม สั่น ชัก ซึม และอาเจียน)

10.3 การตรวจวิเคราะห์ผลทางโลหิตวิทยาโดยใช้เครื่อง Hematology analyzer นำตัวอย่างเลือดจากหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็ง (EDTA) มาวิเคราะห์หาค่าเลือด โดยทำการผสมเลือดให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไป-มา ประมาณ 10 ครั้ง ก่อนทำการทดสอบตั้งค่าโปรแกรมของเครื่องและบันทึกข้อมูลให้ตรงกับสิ่งส่งตรวจ และเลือกชนิดสัตว์ก่อนทำการทดสอบ นำหลอดที่มีตัวอย่างใส่เข้าเครื่องทดสอบโดยให้ Probe สำหรับดูดเลือดจุ่มลงในตัวอย่างเลือดและกดบันทึกให้เครื่องทำงาน เมื่อเครื่องทำงานเสร็จ เครื่องจะรายงานผลการวิเคราะห์โดยการพิมพ์ข้อมูลออกมาจากตัวเครื่อง เก็บผลการวิเคราะห์

10.4 การตรวจวิเคราะห์ค่าเคมีคลินิกบนแถบทดสอบสำเร็จรูป (Strip) ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ เลือกแถบ Strip ให้ตรงตามการตรวจวัดใช้ Micropipette ดูดซีรั่ม ปริมาตร 32 ไมโครลิตร หยดลงบน Strip ในชั้นตาข่ายสีแดง ทิ้งไว้ประมาณ 10 วินาที นำ Strip เสียบเข้าช่องเครื่องตรวจวัดอัตโนมัติ ปิดฝาเครื่อง รอให้เครื่องวิเคราะห์ผลแล้วบันทึกผล

10.5 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ใช้ซอฟท์แวร์สถิติโปรแกรม SigmaPlot 11.0 คำนวณผลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน หรือ Mean ± Standard deviation ($\bar{x}$ ± S.D.) โดยค่าความแตกต่างของผลการทดลองระหว่างกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุมใช้สถิติ One-way analysis of variance (ANOVA) และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

10.6 การพิจารณาจริยธรรมการวิจัย

การทดลองนี้ได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หนังสือรับรองเลขที่ MOE 0521.11/103 (ภาคผนวก)

11. การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำสลัดใบกระทุ

11.1 การเตรียมน้ำสลัด ศึกษาการผลิตน้ำสลัดต้นแบบโดยแบ่งน้ำสลัดออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ น้ำสลัดชนิดครีม (ตารางที่ 3) และชนิดใส (ตารางที่ 4)

น้ำสลัดชนิดครีม โดยการเตรียมน้ำสลัดให้มีสารสกัดใบกระทุที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายสารสกัดด้วยน้ำส้มสายชู ปั่นนมข้นหวาน ไข่ และมัสตาร์ด ให้เข้ากันนาน 30 วินาที เติมน้ำตาลทราย เกลือป่น พริกไทยป่น ปั่นให้เข้ากันนาน 1 นาที ค่อยๆ เติมน้ำมันพร้อมปั่นให้ลงเป็นสายจนกว่าน้ำมันหมด ปั่นต่อไปนาน 2 นาที (ภาคผนวก)

น้ำสลัดแบบใส โดยการเตรียมน้ำสลัดให้มีสารสกัดใบกระทุที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายสารสกัดด้วยน้ำส้มสายชู เติมมัสตาร์ด และน้ำมะนาว ปั่นให้เข้ากันนาน 30 วินาที เติมน้ำตาลทราย หอมแดงสับหยาบ เกลือป่น และพริกไทยป่น ปั่นให้เข้ากันนาน 1 นาที ค่อยๆ เติมน้ำมันพร้อมปั่นให้ลงเป็นสายจนกว่าน้ำมันหมด ปั่นต่อไปนาน 2 นาที (ภาคผนวก)

11.2 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้วยวิธีการให้คะแนนตามความชอบแบบ 9 ระดับคะแนนความชอบ (9- point hedonic scales) สุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี 30 คนทดสอบชิมน้ำสลัดทั้ง 2 สูตรที่มีสารสกัดใบกระทุที่ความเข้มข้นความเข้มข้นสุดท้าย 12.5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพิจารณาคุณลักษณะด้าน สี กลิ่น รสชาติ ความขมและคุณลักษณะโดยรวม (ภาคผนวก)

11.3 การศึกษาการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หนังสือรับรองเลขที่ EC.59/B 06-012 (ภาคผนวก)

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของน้ำสลัดชนิดครีม (ทัศนีย์ ปิ่นแก้ว และคณะ, 2553)

วัตถุดิบ	ร้อยละของน้ำสลัด 100 กรัม
น้ำมันคาโนล่า	40
น้ำตาลทราย	23
นมข้นหวาน	12
ไข่ไก่ทั้งฟอง	12
น้ำส้มสายชู	10
เกลือป่น	1.4
มัสตาร์ด	0.8
พริกไทยป่น	0.2

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของน้ำสลัดชนิดใส (วไลภรณ์ สุทธา และคณะ, 2554)

วัตถุดิบ	ร้อยละของน้ำสลัด 100 กรัม
น้ำมันคาโนล่า	43.5
น้ำส้มสายชู	26.1
มัสตาร์ด	17.4
น้ำมะนาว	8.7
เกลือป่น	1.7
น้ำตาลทราย	0.9
หอมแดงสับหยาบ	0.9
พริกไทยป่น	0.4

11.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดในน้ำสลัด (Ifesan and Voravuthikunchai, 2009) โดยเลือกสลัดชนิดครีมและสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุ ทุกความเข้มข้น (12.5, 25 และ 50 mg/ml) มาอย่างละ 25 กรัม ผสมกับเชื้อ *S. aureus* ATCC 23235 และ *S. aureus* W68 ใช้น้ำสลัดที่ไม่ได้ผสมสารสกัดจากใบกระทุผสมกับเชื้อ (มีเชื้อประมาณ 1.25×10^8 CFU/ml) เป็น Control นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียสนำมา Drop plate ทุกวันที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 เพื่อเปรียบเทียบจำนวนเชื้อที่เหลือรอดในน้ำสลัดตัวอย่าง

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การสกัดสารจากใบและผลของต้นกระทุ

ร้อยละของสารสกัดหยาบ แสดงดังตารางที่ 5 สารสกัดด้วยน้ำจากใบกระทุมีร้อยละของสารสกัดหยาบมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบ ส่วนสารสกัดด้วยเอทานอลจากผลมีร้อยละของสารสกัดหยาบน้อยที่สุด

ตารางที่ 5 ร้อยละของสารสกัด (Extraction yield) ที่สกัดด้วยอะซีโตน เอทานอล (95%) และน้ำจากใบและผลของต้นกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	ร้อยละของสารสกัดหยาบ		
		อะซีโตน	น้ำ	เอทานอล
Rhodomyrtus tomentosa	ใบ	4.60	14.0	10.3
	ผล	4.00	9.10	3.90

2. การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยวิธีการ Disc diffusion method และการหาค่า MIC และ MBC

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดด้วยอะซีโตน เอทานอล และน้ำ (2 mg/disc) โดยวิธี Disc diffusion method ต่อเชื้อ *S. aureus* ทั้ง 13 สายพันธุ์ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยอะซีโตน เอทานอล และน้ำจากใบและผลกระทุมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ โดยมีค่า Inhibition zones อยู่ระหว่าง 0.8-1.5 เซนติเมตร พบว่าสารสกัดอะซีโตนจากใบกระทุมี Inhibition zones เฉลี่ยมากที่สุด (1.4 เซนติเมตร) รองลงมาคือสารสกัดน้ำจากใบกระทุ (1.2 เซนติเมตร) สารสกัดอะซีโตนจากผลกระทุ (1.2 เซนติเมตร) สารสกัดเอทานอลจากใบและผลกระทุ (1.1 เซนติเมตร) และสารสกัดน้ำจากผลกระทุ (0.9 เซนติเมตร) แสดงดังตารางที่ 6 จากนั้นนำสารสกัดทั้ง 3 ชนิดไปทดสอบหาค่า MIC และ MBC ด้วยวิธี Broth microdilution method ผลการทดลองพบว่า สารสกัดทั้ง 3 ชนิดให้ค่า MIC และ MBC อยู่

ในช่วง 7.81-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นสารสกัดด้วยน้ำจากผลกระทุที่มีค่า MIC และ MBC มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาจากค่า MIC และ MBC พบว่าสารสกัดจากใบและผลกระทุด้วยเอทานอลและอะซีโตนมีแนวโน้มการออกฤทธิ์ที่ดีกับเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *S. aureus* แสดงดังตารางที่ 7 โดยสารสกัดจากใบมีฤทธิ์ต้านเชื้อได้ดีกว่าสารสกัดจากผล

ตารางที่ 6 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากสารสกัดใบและผลกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) ที่สกัดด้วย อะซีโตน เอทานอล และน้ำ ด้วยวิธี Disc diffusion method (2 mg/disc)

	การเกิด Inhibition zones ของสารสกัดใบกระทุ (cm)			การเกิด Inhibition zones ของสารสกัดผลกระทุ (cm)		
เชื้อแบคทีเรีย	อะซีโตน	เอทานอล	น้ำ	อะซีโตน	เอทานอล	น้ำ
S. aureus ATCC23235	1.3	1.05	1.25	1.25	1	0.95
S. aureus ATCC27664	1.5	1.05	1.05	1.35	1	0.95
S. aureus W21	1.5	1.05	1.15	1.2	1	0.95
S. aureus W54	1.5	1.25	1.35	1.1	1.1	0.9
S. aureus W57	1.2	1.05	0.95	1.2	1.05	0.8
S. aureus W59	1.4	1.15	1.15	1.3	1.15	0.9
S. aureus W65	1.4	1.25	1.35	1.35	1.05	0.95
S. aureus W68	1.35	1.1	1.35	1.15	1	0.95
S. aureus W79	1.3	1.05	0.85	1.15	1	0.95
S. aureus W81	1.55	1.4	1.25	1.15	1.2	0.9
S. aureus W88	1.5	1.25	1.35	1.15	1.35	0.95
S. aureus W93	1.3	1.1	1.35	1.35	0.95	0.9
S. aureus W97	1.3	1	1.35	1.25	0.95	0.9

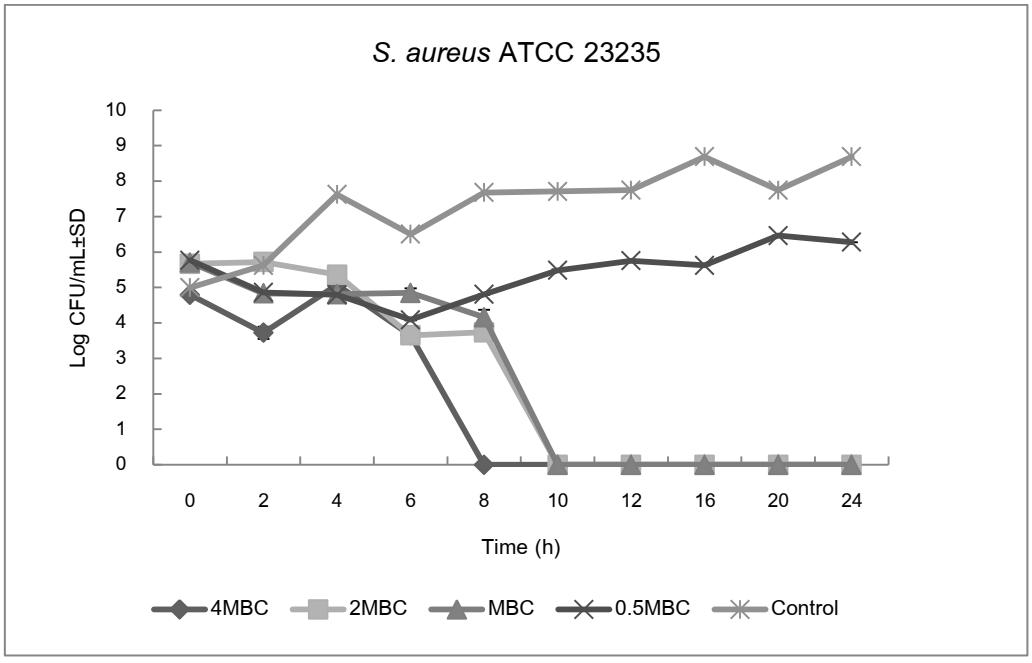
ตารางที่ 7 Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC) จากสารสกัดใบและผลกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) ที่สกัดด้วยอะซีโตน เอทานอล และน้ำ ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากอาหาร

เชื้อแบคทีเรีย	MIC/MBC (µg/ml)						
	สารกสัดจากใบ			สารสกัดจากผล			Vancomycin
	อะซีโตน	เอทานอล	น้ำ	อะซีโตน	เอทานอล	น้ำ	
S. aureus ATCC23235	15.62/31.25	7.81/31.25	15.62/500	15.62/125	31.25/125	>1000/>1000	S
S. aureus ATCC27664	31.25/62.5	31.25/125	31.25/500	15.62/125	62.5/125	>1000/>1000	S
S. aureus W21	15.62/62.5	15.62/125	125/1000	125/1000	31.25/62.5	>1000/>1000	S
S. aureus W54	15.62/62.5	15.62/62.5	250/1000	125/1000	31.25/62.5	>1000/>1000	S
S. aureus W57	15.62/62.5	15.62/250	250/1000	62.5/500	31.25/250	>1000/>1000	S
S. aureus W59	31.25/125	15.62/250	250/1000	125/1000	31.25/125	>1000/>1000	S
S. aureus W65	31.25/125	15.62/125	500/1000	500/1000	125/250	>1000/>1000	S
S. aureus W68	15.62/500	15.62/250	500/1000	250/500	62.5/250	>1000/>1000	S
S. aureus W79	31.25/125	62.5/125	250/500	250/1000	125/500	>1000/>1000	S
S. aureus W81	31.25/62.5	62.5/250	250/500	125/250	125/500	>1000/>1000	S
S. aureus W88	31.25/62.5	62.5/125	250/1000	250/1000	125/500	>1000/>1000	S
S. aureus W93	250/1000	62.5/125	250/1000	125/500	500/>1000	>1000/>1000	S
S. aureus W97	31.25/250	62.5/500	250/1000	125/250	250/1000	>1000/>1000	S

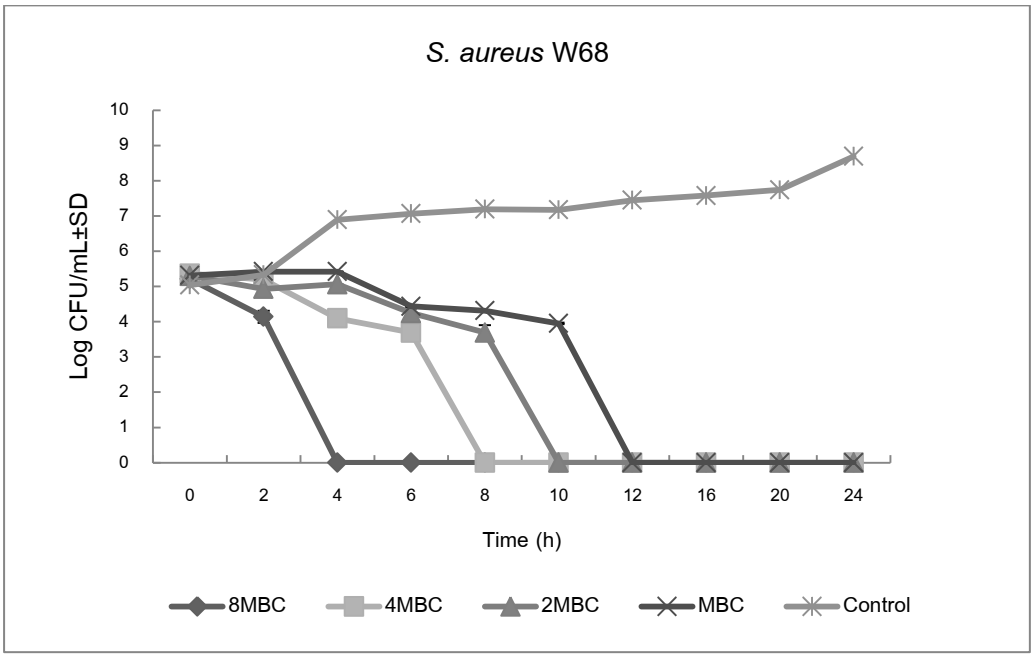
S: Susceptible, I: Intermediate, R: Resistant (CLSI, 2012)

3. การทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) โดยวิธี Time-kill study

จากค่า MIC และ MBC (ตารางที่ 7) สารสกัดเอทานอลจากใบกระทุให้ค่า MIC และ MBC ที่ดีจึงนำมาศึกษาฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Time-kill study ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 23235 และ *S. aureus* W68 พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. aureus* ATCC 23235 โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 8MBC, 4MBC และ 2MBC สามารถฆ่าเชื้อได้ทั้งหมดในชั่วโมงที่ 8, 10 และ 10 ตามลำดับ (รูปที่ 6) สารสกัดเอทานอลจากใบกระทุมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. aureus* W68 โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 4MBC, 2MBC, MBC และ 0.5MBC สามารถฆ่าเชื้อได้ทั้งหมดใน ชั่วโมงที่ 4, 8, 10 และ 12 ตามลำดับ (รูปที่ 7)



รูปที่ 6 ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 23235 ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) ด้วยวิธี Time-kill study ที่ความเข้มข้น 4MBC, 2MBC, MBC และ 0.5MBC (250, 125, 62.5 และ 31.25 µg/ml)



รูปที่ 7 ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* W68 ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) ด้วยวิธี Time-kill study ที่ความเข้มข้น 8MBC, 4MBC, 2MBC และ MBC (1000, 500, 250 และ 125 µg/ml)

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบและผลกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) โดยวิธี DPPH assay, FRAP assay, Total phenolic content และ Total flavonoid content

จากการหาค่า MIC และ MBC (ตารางที่ 7) พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลให้ค่า MIC และ MBC ที่ดี และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารได้ จึงนำสารสกัดด้วยเอทานอลมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการทดสอบพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบและผลกระทุมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุ ยกเว้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ที่สารสกัดเอทานอลจากใบกระทุมีฤทธิ์ที่ดีกว่าสารสกัดเอทานอลจากผลกระทุ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสกัดด้วยเอทานอลจากใบและผลกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*) ด้วยวิธี DPPH assay, FRAP assay, Total phenolic content และ Total flavonoid content

	Ethanol extracts	
	ใบกระทุ	ผลกระทุ
DPPH IC_{50}(mg/mL)	4.6	17.99
Ferric reducing antioxidant power $FeSO_{4\ equivalent}$(μM $FeSO_4$/mg sample)	2.86 ± 0.01	2.36 ± 0.31
Total phenolic content (mg of gallic acid/mg of extract)	0.143 ± 0.004	0.154 ± 0.009
Total flavonoid content (mg of catachin /mg of extract)	0.029 ± 0.002	0.101 ± 0.001

5. การวิเคราะห์โลหะหนักด้วยวิธี Inductivity couple plasma-Mass spectrometry

จากการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบและผลกระทุ พบว่าในสารสกัดจากใบมีทองแดงปนเปื้อนอยู่มากกว่าสารสกัดจากผล (ตารางที่ 10) ไม่พบสารหนู และตะกั่วปนเปื้อนในสารสกัดทั้ง 2 ชนิด

ตารางที่ 9 ปริมาณโลหะหนักตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.) มายองเนสและน้ำสลัดครีม

สารที่ตรวจ	**ค่ามาตรฐาน (mg/kg)**
สารหนู	ไม่เกิน 0.1
ตะกั่ว	ไม่เกิน 0.3
ทองแดง	ไม่เกิน 2

ตารางที่ 10 ปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบและผลกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*)

สารสกัดเอทานอล	**สารที่ตรวจ**	**ค่าที่ตรวจพบ (mg/kg)**
ใบกระทุ	สารหนู	ไม่พบ
	ตะกั่ว	ไม่พบ
	ทองแดง	17.573 ± 0.6191
ผลกระทุ	สารหนู	ไม่พบ
	ตะกั่ว	ไม่พบ
	ทองแดง	3.443± 0.1059

6. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุในสัตว์ทดลอง

6.1 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพและพฤติกรรมทั่วไปของสัตว์ทดลอง

ผลการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุในสัตว์ทดลอง พบว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับการป้อนตัวทำละลายที่ประกอบด้วยน้ำ และ Tween 20 ในอัตราส่วน 1:3 และสัตว์ทดลองที่ได้รับการป้อนสารสกัดจากใบกระทุที่ความเข้มข้น 5, 50 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 28 วัน ไม่ปรากฏลักษณะทางกายภาพและพฤติกรรมที่ผิดปกติของสัตว์ทดลองทุกกลุ่ม โดยพบว่าอุจจาระของสัตว์ทดลองมีลักษณะเป็นก้อน ขนที่ปกคลุมตัวไม่มีการหลุดร่วง ไม่พบอาการสั่น ชัก ซึมเศร้า และอาเจียน ส่วนลักษณะการกินอาหารและน้ำ จากการประเมินอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วันของการทดสอบความเป็นพิษ พบว่าสัตว์ทดลองมีการกินน้ำและอาหารปกติไม่พบลักษณะพฤติกรรมที่บ่งชี้ว่าสัตว์ทดลองเบื่ออาหาร

6.2 ผลการประเมินการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลอง

การป้อนสารสกัดจากใบกระทุให้สัตว์ทดลองต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน พบว่าน้ำหนักตัวเฉลี่ยของสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบกระทุที่ความเข้มข้น 5 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพิ่มขึ้นตามปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบกระทุ ขนาด 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าจากการประเมินน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองในวันที่ 21 และ 28 ของการทดสอบน้ำหนักตัวเฉลี่ยของสัตว์ทดลองเพิ่มขึ้นน้อยกว่าสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ดังแสดงในรูปที่ 8)

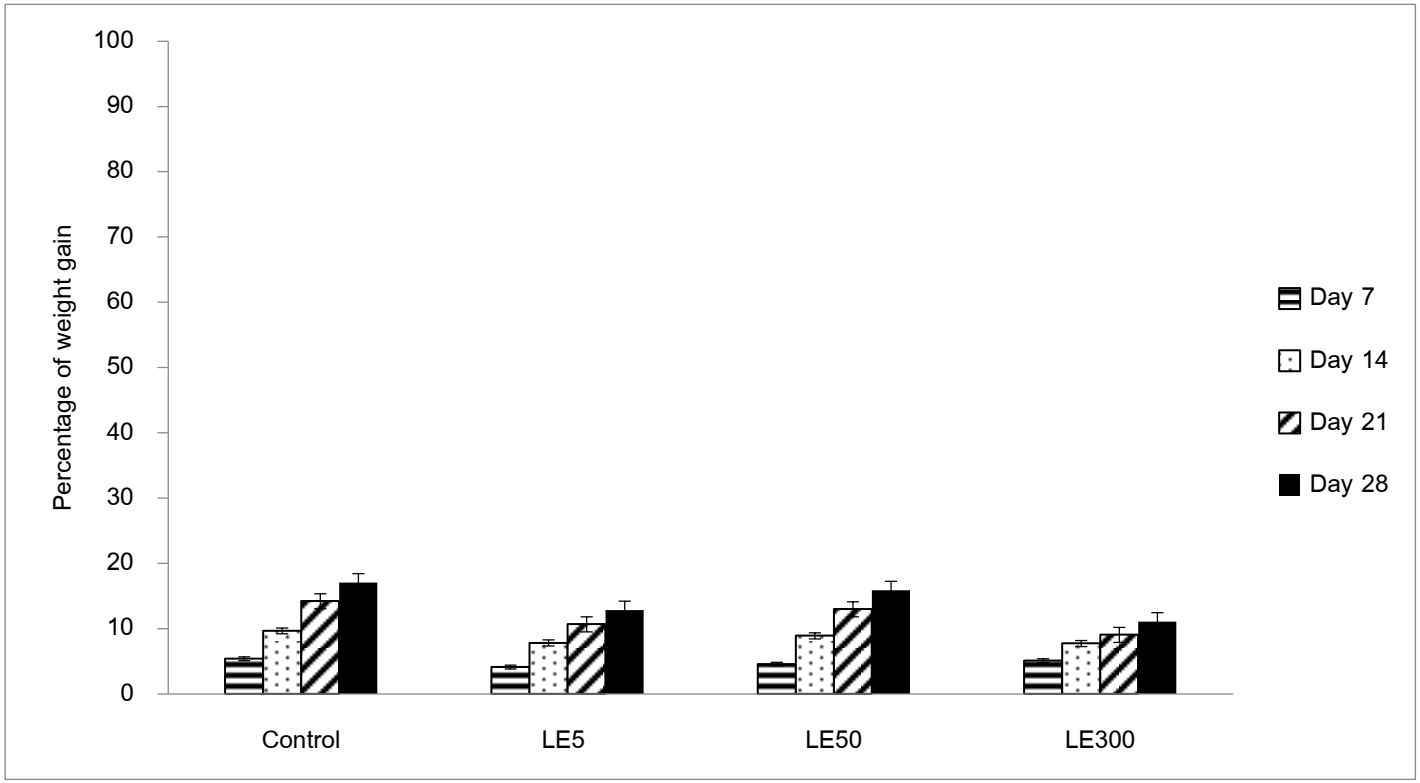
6.3 ผลการประเมินน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดจากใบกระทุขนาด 5, 50 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะ ได้แก่ ปอด ตับ ไต และม้าม ไม่มีความแตกต่างกับน้ำหนักสัมพัทธ์ของสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ดังแสดงในรูปที่ 9)

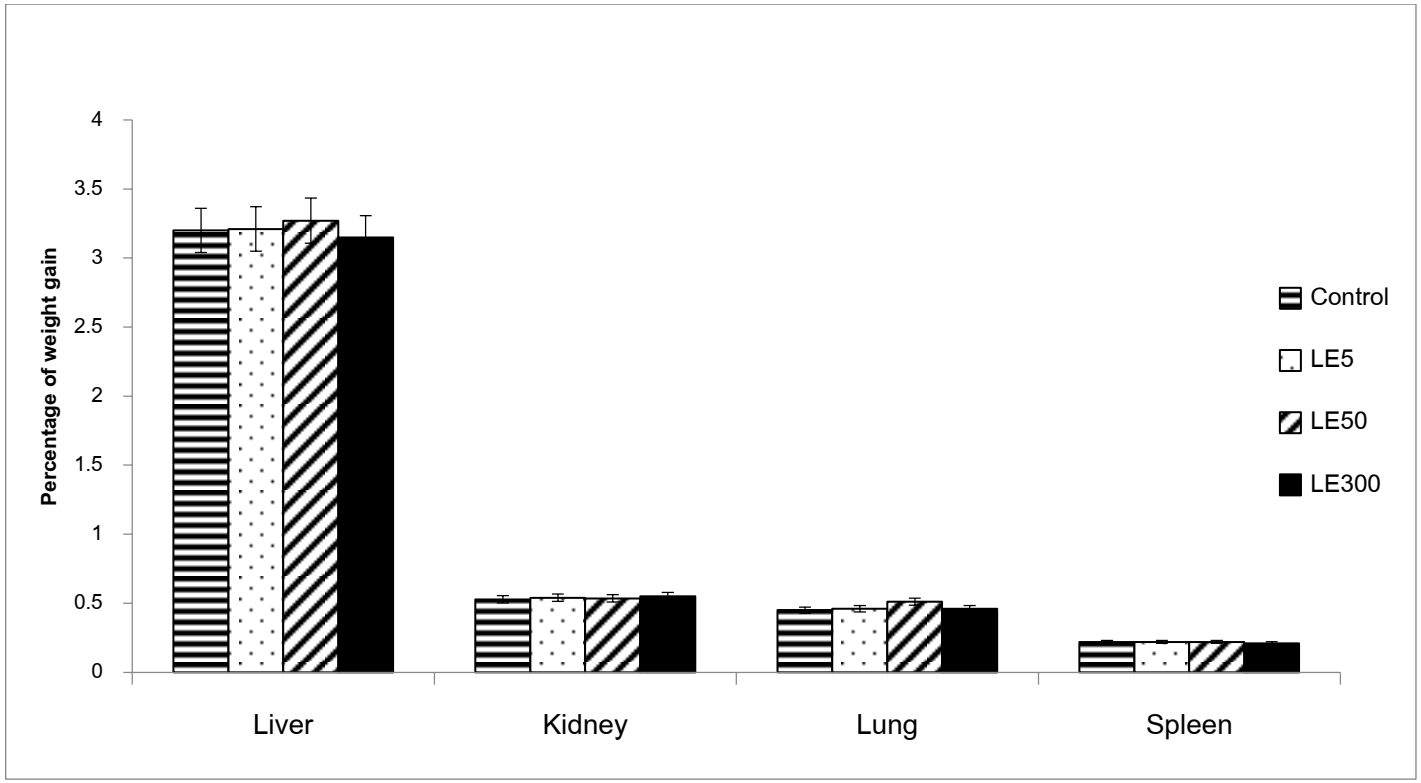
6.4 ผลการประเมินค่าโลหิตวิทยา

สัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดจากใบกระทุขนาด 5, 50 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน มีค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาว (WBC) ค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) ค่าเฉลี่ยปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (HCT) ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (HGB) ค่าเฉลี่ยดัชนีทางโลหิต ค่าเฉลี่ยค่าดัชนีทางโลหิต ได้แก่ ค่าเฉลี่ยปริมาตรของเซลล์เม็ดเลือดแดงหนึ่งเซลล์ (MCV) ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักฮีโมโกลบินต่อเม็ดเลือดแดงหนึ่งเซลล์ (MCH)

ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮีโมโกลบินภายในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ (MCHC) และ ค่าทางเคมีโลหิต ได้แก่ Blood urea nitrogen, Alanine aminotransferase, Creatinine มีผลการประเมินค่าโลหิตวิทยาไม่มีความแตกต่างกับค่าโลหิตวิทยาของสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ดังแสดงในตารางที่ 11 และ12)



รูปที่ 8 ร้อยละของน้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (Percentage of weight gain) ของสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบกระทุ ขนาด 5, 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวเฉลี่ยก่อนทำการป้อนสารสกัด (Control: กลุ่มควบคุม, LE5: กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบกระทุขนาด 5 mg/kg, LE50: กลุ่มที่ได้รับสารกัดจากใบกระทุขนาด 50 mg/kg และ LE300: กลุ่มที่ได้รับสารกัดจากใบกระทุขนาด 300 mg/kg) (p<0.05);One-way analysis of variance (ANOVA)



รูปที่ 9 ร้อยละของน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบกระทุ ขนาด 5, 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน (Control: กลุ่มควบคุม, LE5: กลุ่มที่ได้รับสารกัดจากใบกระทุขนาด 5 mg/kg, LE50: กลุ่มที่ได้รับสารกัดจากใบกระทุขนาด 50 mg/kg และ LE300: กลุ่มที่ได้รับสารกัดจากใบกระทุขนาด 300 mg/kg) (p<0.05);One-way analysis of variance (ANOVA)

ตารางที่ 11 ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (Hematology) ของสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบกระทุ ขนาด 5, 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน

พารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา	กลุ่มควบคุม (Vehicle)	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบกระทุ 5 mg/kg	50 mg/kg	300 mg/kg
WBC (10^3/µL)	2.61±0.85	3.23±1.29	3.09±1.75	3.29±1.46
Lymp# (10^3/µL)	2.04±0.65	2.43±1.09	1.83±0.87	2.63±1.12
Mono# (10^3/µL)	0.05±0.05	0.08±0.04	0.04±0.05	0.09±0.06
Gran# (10^3/µL)	0.49±0.19	0.65±0.31	0.58±0.28	0.72±0.58
RBC (10^6/µL)	7.239±0.34	7.411±0.43	7.254±0.40	7.345±0.21
HGB g/dL	14.38±0.40	14.57±0.66	14.34±0.76	14.57±0.32
HCT %	40.26±1.69	41.69±3.03	40.4±2.38	40.47±0.76
PCV %	45.53±4.75	46.8±1.69	45.85±2.98	45.75±0.63
MCV (fL)	55.74±2.26	55.54±2.11	55.78±1.23	55.2±1.53
MCH (pg)	19.84±0.76	19.71±0.59	19.72±0.52	19.8±0.59
MCHC g/dL	35.68±0.91	35.56±0.63	35.47±0.59	35.96±0.70
RDW %	13.65±0.89	13.31±1.28	13.58±1.24	12.99±1.10
PLT (10^3/µL)	870.9±169.21	964.5±124.76	911.5±97.22	970.6±130.65

WBC = White Blood Cell, Lymp# = Lymphocyte, Mono# = Monocyte, Gran# = Granulocyte, RBC = Red blood cell, HGB = Hemoglobin Concentration, HCT = Hematocrit, PCV = Pack Cell Volume, MCV = Mean Corpuscular Volume, MCH = Mean Corpuscular Hemoglobin, MCHC = Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, RDW = Red cell Distribution Width, PLT = Platelet

หมายเหตุ : * p <0.05 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ;One-way analysis of variance (ANOVA)

ตารางที่ 12 ค่าพารามิเตอร์ทางชีวเคมีคลินิก (Blood chemistry) ของสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบกระทุขนาด 5, 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน

กลุ่มทดลอง	พารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก		
	BUN	ALT	Crea
กลุ่มควบคุม	46.95±6.63	26.97±4.57	<0.05
กลุ่มสารสกัดใบกระทุ (Ethanol extract) 5 mg/kg	50.89±13.52	24.42±1.64	<0.05
กลุ่มสารสกัดใบกระทุ (Ethanol extract) 50 mg/kg	42.12±8.70	26.17±2.48	<0.05
กลุ่มสารสกัดใบกระทุ (Ethanol extract) 300 mg/kg	41.08±8.80	23.3±1.44	<0.05

BUN: Blood urea nitrogen ; ALT: Alanine aminotransferase ; Crea: Creatinine

7. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเอทานอลจากผลกระทุในสัตว์ทดลอง

7.1 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพและพฤติกรรมทั่วไปของสัตว์ทดลอง

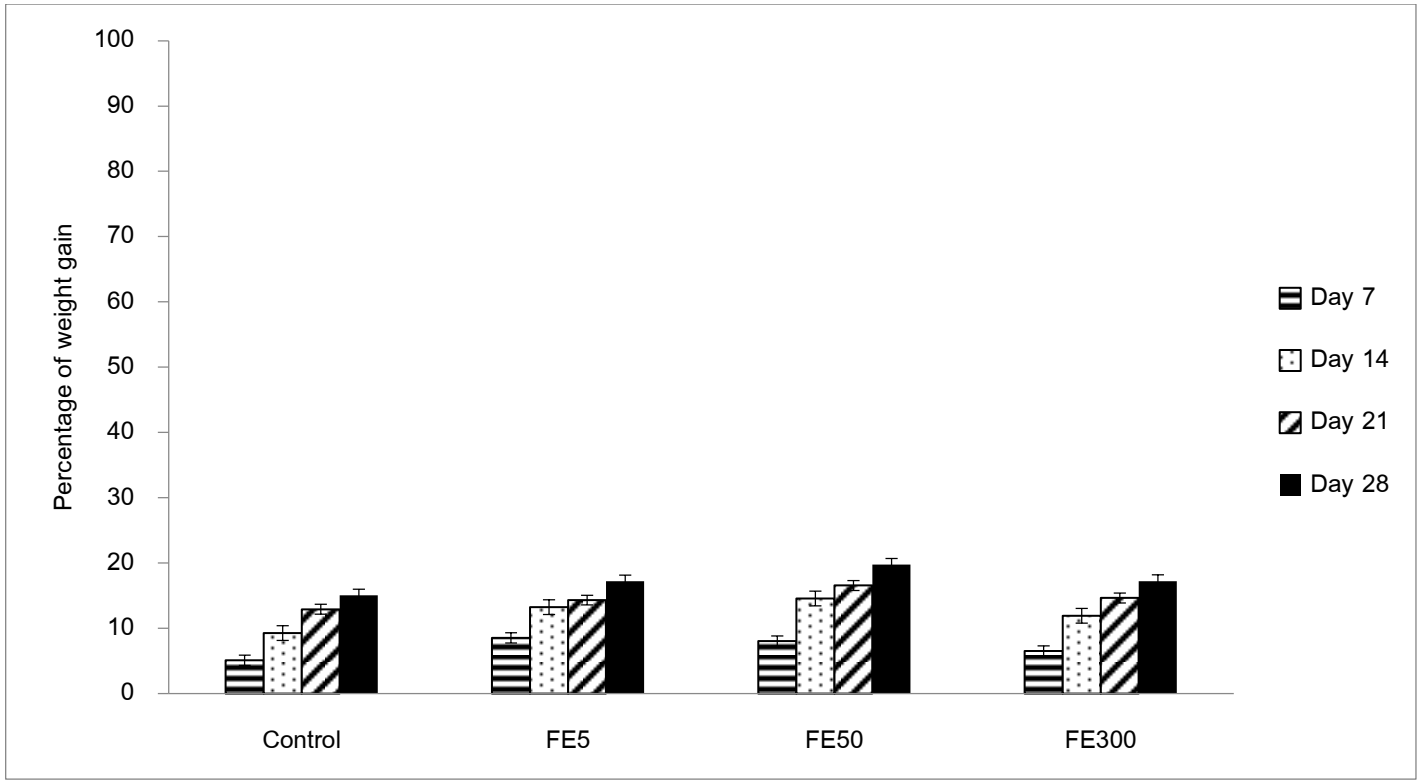
ผลการทดสอบความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเอทานอลจากผลในสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมที่ได้รับการป้อนตัวทำละลาย ประกอบด้วยน้ำ และ Tween20 ในอัตราส่วน 1:3 และสัตว์ทดลองที่ได้รับการป้อนสารสกัดจากผลกระทุ ขนาด 5, 50 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อเนื่องกันเป็นเวลา 28 วัน ไม่ปรากฏลักษณะทางกายภาพและพฤติกรรมที่ผิดปกติของสัตว์ทดลองทุกกลุ่ม โดยพบว่าอุจาระของสัตว์ทดลองมีลักษณะเป็นก้อน ขนที่ปกคลุมตัวไม่มีการหลุดร่วง ไม่พบอาการสั่น ชัก ซึมเศร้า และอาเจียน ส่วนลักษณะการกินอาหารและน้ำ จากการประเมินอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วันของการทดสอบความเป็นพิษ พบว่า สัตว์ทดลองมีการกินน้ำและอาหารปกติไม่พบลักษณะพฤติกรรมที่บ่งชี้ว่าสัตว์ทดลองเบื่ออาหาร

7.2 ผลการประเมินการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลอง

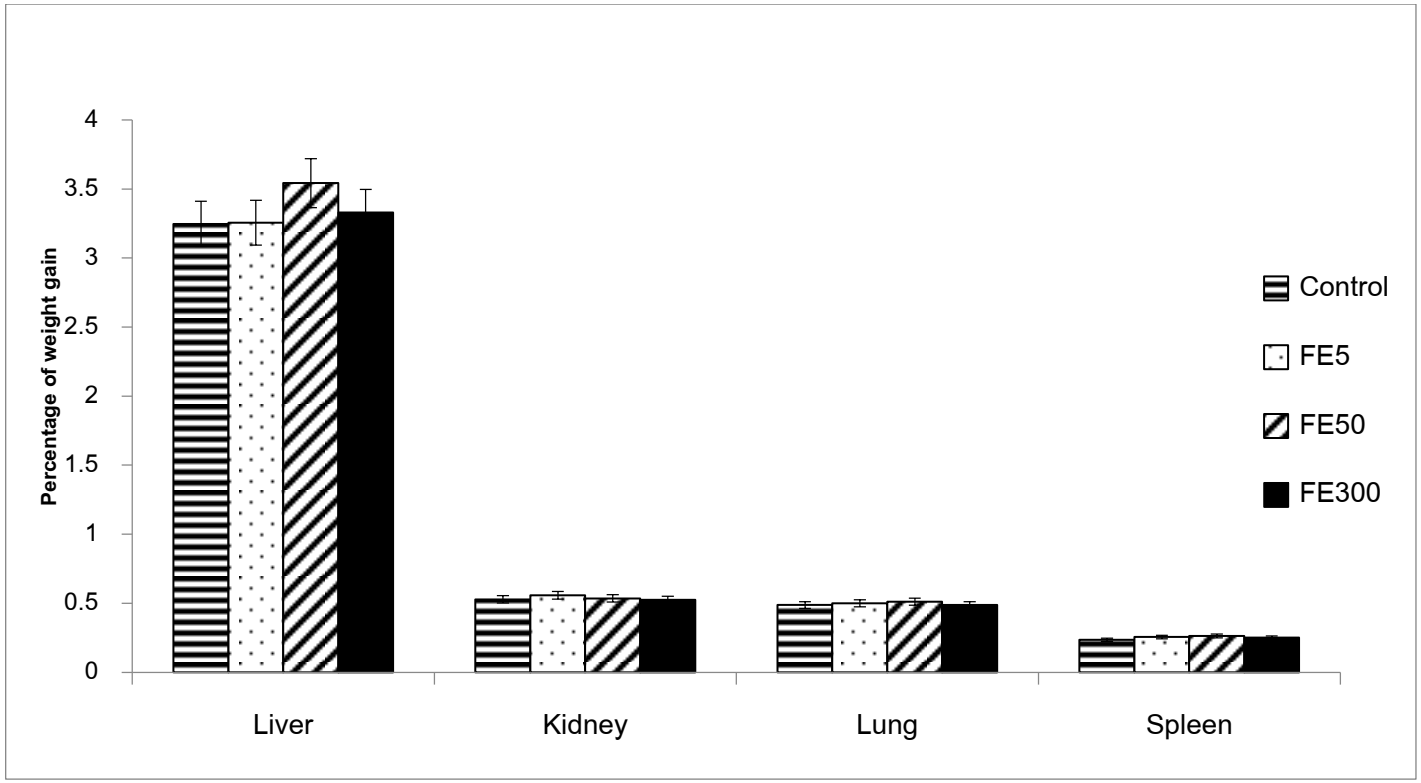
การป้อนสารสกัดจากผลกระทุให้สัตว์ทดลองต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน พบว่าน้ำหนักตัวเฉลี่ยของสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากผลกระทุ ขนาด 5, 50 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพิ่มขึ้นตามปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ดังแสดงในรูปที่ 10)

7.3 ผลการประเมินน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดจากผลกระทุขนาด 5, 50 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน มีค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดขาว (WBC) ค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC) ค่าเฉลี่ยปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (HCT) ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (HGB) ค่าเฉลี่ยดัชนีทางโลหิต ค่าเฉลี่ยค่าดัชนีทางโลหิต ได้แก่ ค่าเฉลี่ยปริมาตรของเซลล์เม็ดเลือดแดงหนึ่งเซลล์ (MCV) ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักฮีโมโกลบินต่อเม็ดเลือดแดงหนึ่งเซลล์ (MCH) ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮีโมโกลบินภายในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ (MCHC) และ ค่าทางเคมีโลหิต ได้แก่ Blood urea nitrogen, Alanine aminotransferase, Creatinine มีผลการประเมินค่าโลหิตวิทยาไม่มีความแตกต่างกับค่าโลหิตวิทยาของสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ดังแสดงในตารางที่ 13 และ14)



รูปที่ 10 ร้อยละของน้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (Percentage of weight gain) ของสัตว์ทดลอง ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากผลกระทุ ขนาด 5, 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวเฉลี่ยก่อนทำการป้อนสารสกัด (Control: กลุ่มควบคุม, FE5: กลุ่มที่ได้รับสารกัดจากผลกระทุขนาด 5 mg/kg, FE50: กลุ่มที่ได้รับสารกัดจากใบกระทุขนาด 50 mg/kg และ FE300: กลุ่มที่ได้รับสารกัดจากใบกระทุขนาด 300 mg/kg) (p<0.05);One-way analysis of variance (ANOVA)



รูปที่ 11 ร้อยละของน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของสัตว์ทดลอง ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากผลกระทุ ขนาด 5, 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน (Control: กลุ่มควบคุม, FE5: กลุ่มที่ได้รับสารกัดจากผลกระทุขนาด 5 mg/kg, FE50: กลุ่มที่ได้รับสารกัดจากผลกระทุขนาด 50 mg/kg และ FE300: กลุ่มที่ได้รับสารกัดจากผลกระทุขนาด 300 mg/kg) (p<0.05);One-way analysis of variance (ANOVA)

ตารางที่ 13 ค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (Hematology) ของสัตว์ทดลอง ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากผลกระทุ ขนาด 5, 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน

พารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากผลกระทุ		
	(Vehicle)	5 mg/kg	50 mg/kg	300 mg/kg
WBC (10^3/µL)	2.61±0.85	3.34±1.25	3.18±1.83	3.25±1.39
Lymp # (10^3/µL)	2.04±0.65	2.42±0.82	2.3±1.36	2.54±1.05
Mono # (10^3/µL)	0.05±0.05	0.07±0.07	0.06±0.05	0.04±0.05
Gran # (10^3/µL)	0.49±0.19	0.85±0.40	0.82±0.47	0.67±0.32
RBC (10^6/µL)	7.239±0.34	7.12±0.36	7.255±0.45	7.09±0.51
HGB g/dL	14.38±0.40	14.35±0.97	14.32±0.84	14.23±0.99
HCT %	40.26±1.69	42.2±2.80	42.13±2.13	41.14±2.61
PCV %	45.53±4.75	48.05±2.24	48.6±2.67	47.72±2.41
MCV (fL)	57.94±2.26	58.16±1.34	58.19±1.39	58.1±1.09
MCH (pg)	19.84±0.76	20.11±0.83	19.7±0.56	20.03±0.51
MCHC g/dL	34.18±0.91	34.62±1.12	33.92±0.63	34.77±0.72
RDW %	15.25±0.89	15.71±0.63	15.87±0.98	15.42±0.44
PLT (10^3/µL)	870.9±169.21	866.8±66.13	865.8±128.06	761.67±49.58

WBC = White Blood Cell, Lymp# = Lymphocyte, Mono# = Monocyte,
Gran# = Granulocyte, RBC = Red blood cell, HGB = Hemoglobin Concentration,
HCT = Hematocrit, PCV = Pack Cell Volume, MCV = Mean Corpuscular Volume,
MCH = Mean Corpuscular Hemoglobin, MCHC = Mean Corpuscular Hemoglobin
Concentration, RDW = Red cell Distribution Width, PLT = Platelet

หมายเหตุ : * p <0.05 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ;One-way analysis of variance (ANOVA)

ตารางที่ 14 ค่าพารามิเตอร์ทางชีวเคมีคลินิก (Blood chemistry) ของสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากผลกระทุขนาด 5, 50 และ 300 mg/kg ต่อเนื่องเป็นเวลา 28 วัน

กลุ่มทดลอง	พารามิเตอร์ทางเคมีคลินิก		
	BUN	ALT	Crea
กลุ่มควบคุม	46.95±6.63	26.97±4.57	<0.05
กลุ่มสารสกัดผลกระทุ (ethanol extract) 5 mg/kg	42.19±5.56	27.63±3.04	<0.05
กลุ่มสารสกัดผลกระทุ (ethanol extract) 50 mg/kg	43.4±7.90	26.98±2.74	<0.05
กลุ่มสารสกัดผลกระทุ (ethanol extract) 300 mg/kg	38.71±5.25	29.7±4.13	<0.05

BUN: Blood urea nitrogen ; ALT: Alanine aminotransferase ; Crea: Creatinine

8. การการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำสลัดใบกระทุ

8.1 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

จากการทำน้ำสลัดสูตรต้นแบบชนิดครีมและใสโดยให้น้ำสลัดมีความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุเท่ากับ 12.5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสูตร A เป็นน้ำสลัดแบบครีมที่เติมสารสกัด 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สูตร B เป็นน้ำลัดแบบครีมที่เติมสารสกัด 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสูตร C เป็นน้ำสลัดแบบครีมที่เติมสารสกัด 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สูตร D เป็นน้ำสลัดแบบใสที่เติมสารสกัด 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สูตร E เป็นน้ำสลัดแบบใสที่เติมสารสกัด 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสูตร F เป็นน้ำสลัดแบบใสที่เติมสารสกัด 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าน้ำสลัดชนิดใสที่มีความเข้มข้นของสารสกัดใบกระทุ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีคะแนนการยอมรับของผู้บริโภคในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ ความขม และความชอบโดยรวมสูงที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.13, 7.20, 7.07, 7.03, 6.97 และ 7.10 ตามลำดับ และมีค่าสูงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำสลัดสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสต่อน้ำสลัดใบกระทุ แสดงคะแนนตามความชอบแบบ 9 ระดับคะแนนความชอบ (9- point hedonic scales)

สูตร/คะแนนความชอบ	ลักษณะทางประสาทสัมผัส					
	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	ความขม	ความชอบโดยรวม
A	5.20±0.76^{c}	5.37±0.67^{c}	5.40±0.62^{c}	5.47±0.51^{b}	5.07±0.69^{c}	5.00±0.45^{c}
B	4.73±0.69^{d}	4.53±0.51^{d}	4.70±0.47^{d}	4.30±0.47^{c}	4.17±0.65^{d}	4.10±0.76^{d}
C	3.70±0.75^{e}	3.43±0.63^{f}	3.53±0.68^{f}	3.10±0.71^{e}	2.73±0.69^{f}	2.87±0.63^{f}
D	7.13±0.73^{a}	7.20±0.71^{a}	7.07±0.52^{a}	7.03±0.56^{a}	6.97±0.67^{a}	7.10±0.88^{a}
E	6.40±0.50^{b}	6.37±1.16^{b}	5.90±0.99^{b}	5.83±0.87^{b}	6.00±0.87^{b}	5.97±0.89^{b}
F	4.47±0.51^{d}	4.00±0.64^{e}	3.93±0.64^{e}	3.87±0.35^{d}	3.40±0.50^{e}	3.60±0.50^{e}

A = น้ำสลัดแบบครีมที่เติมสารสกัด 12.5 mg/ml, B = น้ำสลัดแบบครีมที่เติมสารสกัด 25 mg/ml

C = น้ำสลัดแบบครีมที่เติมสารสกัด 50 mg/ml, D = น้ำสลัดแบบใสที่เติมสารสกัด 12.5 mg/ml

E = น้ำสลัดแบบใสที่เติมสารสกัด 25 mg/ml, F = น้ำสลัดแบบใสที่เติมสารสกัด 50 mg/ml

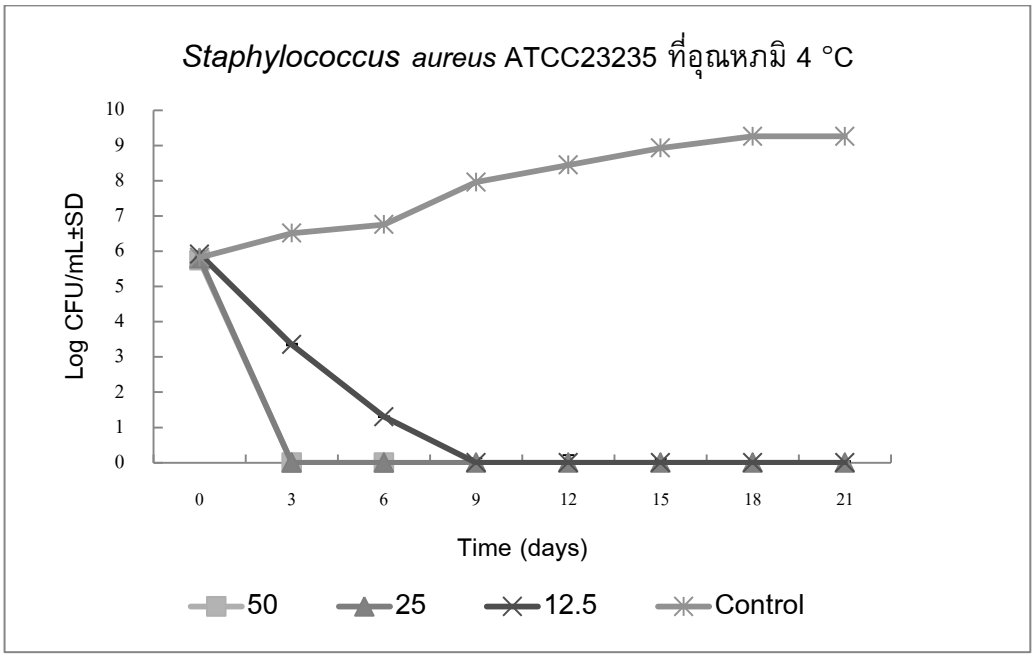
ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคจำนวน 30 คน

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

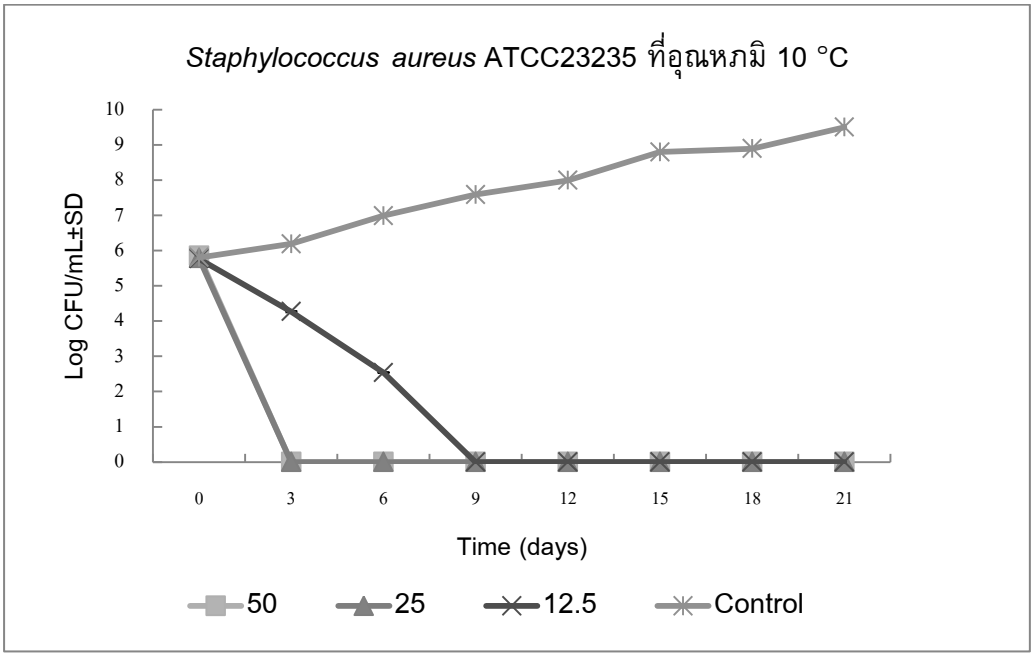
ชอบมากที่สุด (Like extremely)	มีคะแนนเป็น 9
ชอบมาก (Like very much)	มีคะแนนเป็น 8
ชอบปานกลาง (Like moderately)	มีคะแนนเป็น 7
ชอบเล็กน้อย (Like slightly)	มีคะแนนเป็น 6
เฉยๆ (Neither like nor dislike)	มีคะแนนเป็น 5
ไม่ชอบเล็กน้อย (Dislike slightly)	มีคะแนนเป็น 4
ไม่ชอบปานกลาง (Dislike moderately)	มีคะแนนเป็น 3
ไม่ชอบมาก (Dislike very much)	มีคะแนนเป็น 2
ไม่ชอบมากที่สุด (Dislike extremely)	มีคะแนนเป็น 1

8.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดในน้ำสลัด

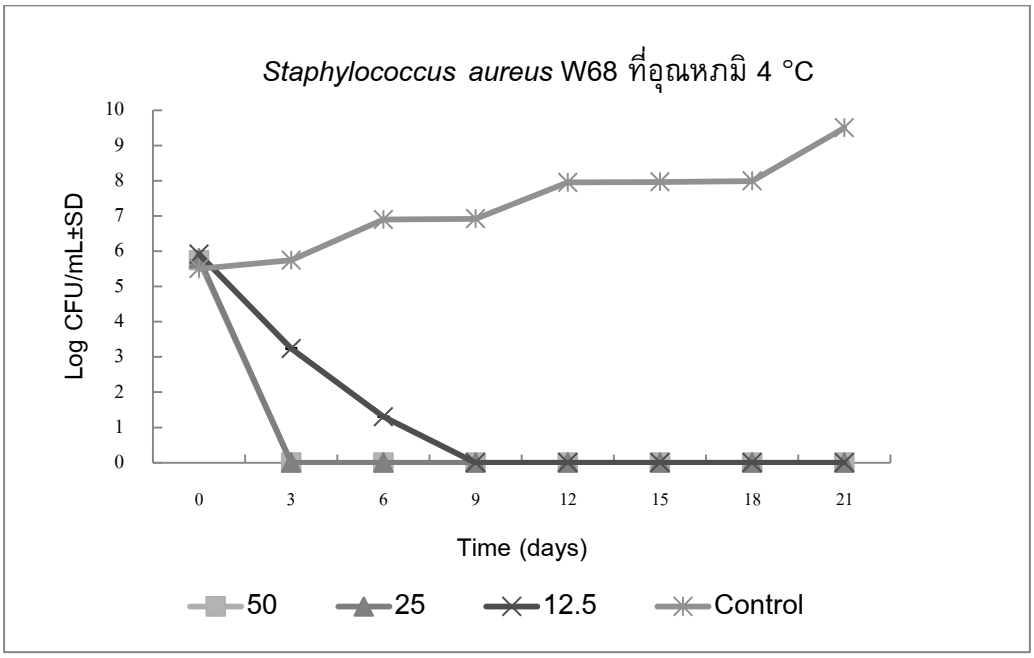
จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบและผลกระทุในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อได้ดี ในการทดลองนี้ได้เลือกสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุมาประยุกต์ใช้ในน้ำสลัด เนื่องจากสารสกัดด้วยเอทานอลสามารถใช้ในอาหารได้และสารสกัดจากใบให้ค่าร้อยละของสารสกัดมากกว่าสารสกัดจากผล ประกอบกับการเตรียมสารสกัดจากใบสามารถเก็บใบของกระทุได้ตลอดทั้งปีและหาได้ง่ายไม่ขึ้นกับฤดูกาล และจากผลการทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลองไม่พบความเป็นพิษที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบ การศึกษานี้ใช้น้ำสลัดชนิดใสที่มีสารสกัดความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ATCC 23235 และ *S. aureus* W68 ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุในน้ำสลัดโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยที่ความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส ไม่พบการมีชีวิตรอดของเชื้อตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดสอบ โดยจำนวนเชื้อลดลงมากกว่า 5 log CFU/ml (เชื้อลดลงมากกว่าร้อยละ 99.9) ส่วนที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าจำนวนเชื้อลดลงมากกว่า 5 log CFU/ml (เชื้อลดลงมากกว่าร้อยละ 99.9) ที่เวลา 9 วัน ยกเว้นเชื้อ *S. aureus* W68 ที่ 10 องศาเซลเซียส พบว่าจำนวนเชื้อลดลงมากกว่า 5 log CFU/ml (เชื้อลดลงมากกว่าร้อยละ 99.9) ที่เวลา 3 วัน (รูปที่ 12 13 14 และ 15)



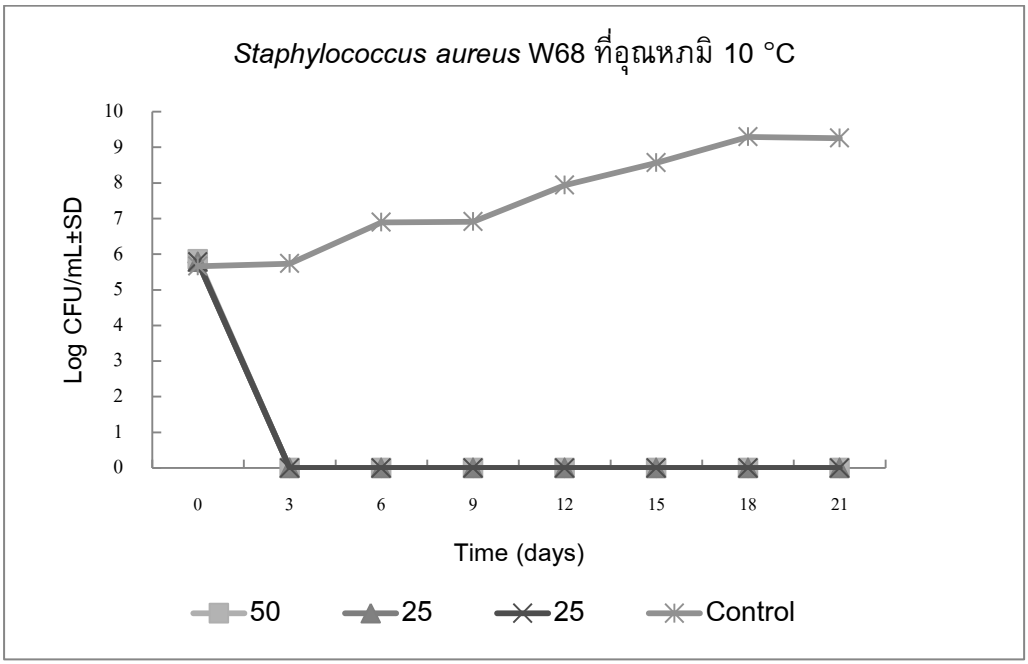
รูปที่ 12 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 23235 ของสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุในน้ำสลัดที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 mg/ml ที่อุณหภูมิ 4°C



รูปที่ 13 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 23235 ของสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุในน้ำสลัดที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 mg/ml ที่อุณหภูมิ 10°C



รูปที่ 14 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* W68 ของสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุในน้ำสลัดที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 mg/ml ที่อุณหภูมิ 4°C



รูปที่ 15 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* W68 ของสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุในน้ำสลัดที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 mg/ml ที่อุณหภูมิ 10°C

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

โรคอาหารเป็นพิษเป็นโรคที่พบบ่อยที่สุดในระบบทางเดินอาหาร โดยมีสาเหตุมาจากการบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคหรือสารเคมีที่เป็นพิษ (Joob and Wiwanitkit, 2015) ซึ่งรวมไปถึงสารพิษที่เชื้อโรคสร้างขึ้น (Park and Bahk, 2015) โดยสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษที่พบได้บ่อยมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย หรือเกิดจากสารพิษที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น เชื้อ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในอาหารและสามารถสร้าง Enterotoxin ได้ (Kérouanton et al., 2007) ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษมากเป็นอันดับสองรองจากเชื้อ *Salmonella* (Martin et al., 2004) ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตอาหารมีการนำสารเคมีชนิดต่างๆ มาใช้เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคและป้องกันการเน่าเสียของอาหาร แต่หากใช้ในปริมาณมากเกินไปหรือนำไปใช้ไม่เหมาะสมอาจก่อให้เกิดอันตรายได้ รวมทั้งการใช้สารเคมีอาจจะส่งผลให้เกิดทัศนคติที่ไม่ดีของผู้บริโภคต่ออาหารหรือเครื่องดื่ม ทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจคือสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติ ตั้งแต่ในอดีตถึงปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของพืชสมุนไพรพื้นบ้านเป็นจำนวนมากรวมไปถึงการแยกสารของสมุนไพรแต่ละชนิด (Rios and Recio., 2006) ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาหาสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคเพื่อใช้สารเติมแต่งในอาหารเพื่อป้องกันเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ ในตำรับยาสมุนไพรไทยมีการใช้กระทุเป็นยารักษาโรคท้องเสีย และจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากใบกระทุมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี (Limsuwan et al., 2012) โดยเฉพาะเชื้อในกลุ่ม Staphylococci (Saising et al., 2008; Limsuwan et al., 2009; Mordmuang and Voravuthikunchai, 2015) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้สารสกัดอะซีโตน เอทานอลและน้ำจากใบและผลกระทุมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหาร 11 สายพันธุ์ (ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ดื้อยา และสร้าง Enterotoxin) และ *S. aureus* สายพันธุ์มาตรฐาน 2 สายพันธุ์ (ATCC 23235 และ ATCC 27664) พบว่าเมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion พบว่าสารสกัดทุกชนิดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. aureus* มีค่า Inhibition zone อยู่ในช่วง 0.85-1.5 เซนติเมตร และเมื่อทดสอบด้วยวิธี Broth microdilution เพื่อหาค่า MIC และ MBC พบว่าสารสกัดจากใบและผลกระทุด้วย

เอทานอลและอะซีโตนมีแนวโน้มการออกฤทธิ์ที่ดีกับเชื้อ *S. aureus* โดยสารสกัดจากใบมีฤทธิ์ต้านเชื้อได้ดีกว่าสารสกัดจากผล ค่า MIC/MBC ของสารสกัดจากใบกระทุด้วยเอทานอลและอะซีโตนต่อเชื้อ *S. aureus* อยู่ในช่วง 7.81-625/31.25-500 และ 15.62-250/31.25-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดเอทานอลจากสมุนไพรท้องถิ่นในทวีปแอฟฟริกา (*Tulbaghia violacea*, *Hypoxis hemerocallidea*, *Merwilla plumbea*) ออกฤทธิ์ที่ดีกับเชื้อ *S. aureus* มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.8-12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Ncube et al., 2012)

จากนั้นนำสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุมาทดสอบต่อด้วยวิธี Time kill study เพื่อหาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อของสารสกัด จากการทดสอบพบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุสามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ATCC 23235 ได้ที่ความเข้มข้น 8MIC, 4MIC และ 2MIC ในเวลา 8, 10 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยสามารถฆ่าเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 99.9 (เชื้อลดลงมากกว่า 3 log CFU/ml เมื่อเทียบกับเชื้อในเวลาเริ่มต้น) Saising และคณะ (2008) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสาร Rhodomyrtone ที่แยกได้จากใบกระทุพบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับยา Vancomycin ดังนั้นสารที่ออกฤทธิ์จากใบกระทุต่อเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหารในงานวิจัยนี้จึงน่าจะเป็น Rhodomyrtone เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ยังพบว่าสาร Rhodomyrtone มีฤทธิ์ดีต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิดเช่น MRSA, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus gordonii, Streptococcus mutans* และ *Streptococcus pneumoniae* (Limsuwan et al., 2009) จากรายงานของ Visutthi และคณะ (2011) พบว่าสาร Rhodomyrtone ที่แยกได้จากใบกระทุมีผลไปยับยั้งการผลิตโปรตีนที่ผลิตออกมาภายนอกเซลล์ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ทำให้การผลิตโปรตีนที่ออกมานอกเซลล์ลดลง จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารจากใบและผลกระทุซึ่งเป็นพืชองค์ประกอบในตำรับยาแผนไทยที่ใช้รักษาโรคในระบบทางเดินอาหารมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหารและผลิต Enterotoxin ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบและผลกระทุโดยวิธี DPPH assay, FRAP assay, Total phenolic content และ Total flavonoid content พบว่าสารสกัดเอทานอลจากผลกระทุมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุยกเว้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP assay ที่สารสกัดเอทานอลจากใบกระทุมีฤทธิ์ที่ดีกว่าสาร

สกัดเอทานอลจากผลกระทุ การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าผลกระทุมีปริมาณวิตามิน E สูง (50% RDI of vitamin E/serving) และยังมีสารประกอบ Phenolic (5% DW) ในปริมาณสูงอีกด้วย ซึ่งส่งผลให้ผลกระทุมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีเมื่อทดสอบด้วยวิธี Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) (Lai et al., 2015) ซึ่งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระนี้อาจจะเป็นอีกกลไกหนึ่งที่ช่วยในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และช่วยสนับสนุนการนำไปประยุกต์ใช้ในน้ำสลัด

จากการทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบและผลกระทุในหนูทดลอง พบว่า สารสกัดไม่มีผลต่อพฤติกรรม น้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ ค่าโลหิตวิทยา และค่าเคมีคลินิกของสัตว์ทดลองที่บ่งชี้ถึงความเป็นพิษของสารสกัด ปัจจุบันยังไม่พบรายงานความเป็นเป็นพิษของสารสกัดจากกระทุในสัตว์ทดลอง มีเพียงการศึกษาความเป็นพิษของสาร Rhodomyrtone ที่แยกได้จากใบกระทุต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ ซึ่งไม่พบความเป็นพิษของสาร Rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น 128MIC (64 µg/ml) ต่อเซลล์เม็ดเลือด (Leejae et al ., 2013) ดังนั้นสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุมีแนวโน้มที่สามารถนำไปเป็นสารเติมแต่งในอาหารได้ และควรศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังต่อไปในอนาคต

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งผลการตรวจหาปริมาณโลหะหนักในสารสกัดและการศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง ผู้วิจัยจึงคัดเลือกสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบกระทุไปประยุกต์ใช้ในอาหาร โดยการนำไปเป็นส่วนประกอบของน้ำสลัด เนื่องจากการประกอบอาหารจำพวกสลัดจะใช้มือและเป็นอาหารประเภทที่ไม่ผ่านความร้อน ทำให้มีโอกาสในการปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* ได้สูง จากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยการสุ่มอาสาสมัคร 30 คน โดยทำการชิมน้ำสลัดสองสูตรที่มีสารสกัดจากใบกระทุเป็นส่วนผสมที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าน้ำสลัดชนิดใสที่มีความเข้มข้นของสารสกัดใบกระทุ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีคะแนนการยอมรับของผู้บริโภคในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ ความขม และความชอบโดยรวมสูงที่สุด แต่มีคะแนนความขมของน้ำสลัดต่ำกว่า 7 คะแนน (คะแนนการยอมรับของผู้บริโภคน้อยกว่า 7 คะแนน เป็นคะแนนที่ผู้บริโภคยอมรับได้แต่อยู่ในระดับที่น้อยกว่ามาตรฐานความชอบ) จากการทดลองพบว่าสีน้ำตาลคล้ำของสารสกัดมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำสลัดเป็นอย่างมาก และรสชาติของสารสกัดที่มีความขมมากจึงทำให้น้ำสลัดที่มีความเข้มข้นสารสกัดน้อยมีคะแนนความพึงพอใจที่สูงกว่า เมื่อนำน้ำสลัดชนิดใสที่มีสารสกัดความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 10

องศาเซลเซียส พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส ไม่พบการมีชีวิตรอดของเชื้อตั้งแต่วันแรกของการทดสอบ ส่วนที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าจำนวนเชื้อลดลงเรื่อยๆ จนถึงมากกว่าร้อยละ 99.9 ภายในระยะเวลา 6 วัน

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกระทุมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหารทั้งในหลอดทดลองและเมื่อประยุกต์ใช้ในอาหาร รวมทั้งยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและไม่พบความเป็นพิษในสัตว์ทดลองที่ความเข้มข้นสูงสุด (300 mg/ml) จึงมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาสารสกัดจากกระทุไปเป็นสารเติมแต่งในอาหารเพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ *S. aureus* ซึ่งหากจะใช้สารสกัดจากกระทุเป็นส่วนประกอบของอาหารควรพิจาณาเรื่องสีและรสขมของสารสกัด งานวิจัยในอนาคตอาจพิจารณาในการปรับปรุงการสกัดสารจากกระทุให้ได้สีที่เหมาะสมและลดความขมลง

บทที่ 5
สรุป

1. การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อด้วยวิธี Disc diffusion พบว่าสารสกัดทุกชนิดมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ โดยมี Inhibition zone อยู่ในช่วง 0.85-1.5 เซนติเมตร พบค่า MIC อยู่ในช่วง 7.81 - >1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MBC อยู่ในช่วง 15.62 - >1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. สารสกัดเอทานอลจากใบกระทุมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ATCC 23235 และ *S. aureus* W68 โดยพบว่าสามารถฆ่าเชื้อได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

3. สารสกัดเอทานอลจากใบและผลกระทุแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay, FRAP assay, Total phenolic content และ Total flavonoid content

4. ไม่พบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดเอทานอลจากใบและผลกระทุในสัตว์ทดลอง

5. น้ำสลัดชนิดใสที่มีความเข้มข้นของสารสกัดใบกระทุ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีคะแนนการยอมรับของผู้บริโภคในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ ความขม และความชอบโดยรวมสูงที่สุด

6. น้ำสลัดที่มีส่วนประกอบของสารสกัดเอทานอลจากใบกระทุมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ATCC 23235 และ *S. aureus* W68

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณสุข สำนักระบาดวิทยา. 2559. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรคอาหารเป็นพิษ. *รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา*: 271-274.

กระทรวงอุตสาหกรรม สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2540. *มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมมายองเนสและสลัดครีม.*

ปภัสสร ผลโพธิ์. 2555. อาหารเป็นพิษโรคเล็กๆ ที่กลายเป็นเรื่องใหญ่. *วารสารสุขภาพดีกับพรีม่า*: 6.

วไลภรณ์ สุทธา, สุดจิตร วรรณโชติ และ เชาวลิต อุปฐาก. 2554. *น้ำสลัดเพื่อสุขภาพ*.

วันทนา อ่อนภิรมย์, ชัยวัฒน์ กิตติกูล และ พัชรี สุนทรนันท์. 2538. การตรวจเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างอาหารโดยวิธี ELISA. *วิทยาศาสตร์ ม.ก.*13 (1-3) , 46-65.

สมบัติ ประเสริฐสุข. 2549. *โรคทางเดินอาหารและการรักษา3*. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. สาขาวิชาโรคทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Alberton JR, Ribeiro A, Sacramento LVS, Franco SL and Lima MAP. 2001. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzypiam cumini* (L.) Skeels. *Rev Bras Farmacogn* 11: 37-50.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006a. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standards 9th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9. Clinical and Laboratory Institute, 940, West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006b. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically; Approved Standards 7th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7. Clinical and Laboratory Institute, 940, West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Easmon CSF and Goodfellow M. 1990. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. 162-186. In: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 8th ed. (Parker, M.T. and Duerden, B. I. eds.)

Edward A, London G, P.E. 1990. *Clostridium perfringens* toxins involved in food poisoning. Int. *J. Food Microbiol*. 10: 101-112.

Hui WH and Li MM. 1976. Two new triterpenoids from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Phytochemistry*. 15: 1741-1743.

Hui WH, Li MM, and Luk K. 1975. Triterpenoids and steroids from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Phytochemistry*. 14: 833-834.

Ifesan BOT and Voravuthikunchai SP. 2009. Effect of *Eleutherine americana* Merr. Extract on Enzymatic Activity and Enterotoxin Production of *Staphylococcus aureus* in Broth and Cooked Pork. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6: 699-704.

Joob B and Wiwanitkit V. 2015. Food poisoning outbreak in Thailand: A review on situations. *Journal of Tropical Disease* 5(Suppl 1): S187-S189.

Katalinic V, Modun D, Music I and Boban M. 2005. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2′-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology Volume 140 Issue 1: 47-52.

Kerouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A and De Buyser ML. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology* 115(3): 369-375.

Kimondo J, Miaron J, Mutai P and Njogu P. 2015. Ethnobotanical survey of food and medicinal plants of the Ilkisonko Maasai community in Kenya. *Journal of Ethnopharmacology* 175: 463-469.

Limsuwan S, Kayser O and Voravuthikunchai SP. 2012. Antibacterial activity of *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. leaf extract against clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Article ID 697183, 6 pages.

Martin MC, Fueyo JM, Gonza´lez-Hevia MA and Mendoza MC. 2004. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. *Journal of Food Microbiology* 94: 279-286.

Mordmuang A and Voravuthikunchai SP. 2015. *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. leaf extract: An alternative approach for the treatment of staphylococcal bovine mastitis. *Research in Veterinary Science* 102: 242-246.

Ncube B, Finnie JF and Van Staden J. 2012. *In vitro* antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. *Journal of Ethnopharmacology* 139: 81-89

Park MS and Bahk GJ. 2015. Estimate of the prevalence and burden of food poisoning by natural toxic compounds in South Korea. *Food Research International* 78: 108-113.

Rios JL and Recio MC. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 80–84

Saising J, Hiranrat A, Mahabusarakam W, Ongsakul M and Voravuthikunchai SP. 2008. Rhodomyrtone from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton.) Hassk. as a natural antibiotic for *Staphylococcus cutaneous* infection. *Journal of Health Science* 54(5): 589-595.

Santisuk T, Larsen K and Nielsen I. 2002. Flora of Thailand 7(4): 807-801.

Siriwatanametanona N, Fiebich B, Efferth T, Prietoa J and Heinrich M. 2010. Traditionally used Thai medicinal plants: *In vitro* antiinflammatory, anticancer and antioxidant activities. *Journal of Ethnopharmacology* 130: 196-207.

Siriwong N and Chukeatirote E. 2009. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and *Songklanagarind medical journal* 27(4): 347-358.

Tangbuchakiat R. 2015. Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Active Herbal Ingredients in a Traditional Thai Anti-Diabetic and Anti-Hypertensive Formula. *The Proceedings of the 1st National Conference in Traditional Thai Medicine* 136-141.

Todar K. 2005. Todar's online textbook of bacteriology: the genus Bacillus. University of Wisconsin- Madison, Department of bacteriology.

Varnam AH and Evans MG. 1991. Foodborne pathogens: An illustrated Text. Wolfe Publishing Ltd, London: 557.

Wang Q, Jin J, Dai N, Han N, Han J and Bao B. 2016. Anti-inflammatory effects, nuclear magnetic resonance identification, and high-performance liquid chromatography isolation of the totalflavonoids from Artemisia frigida. *Journal of food and drug analysis* 24: 385-391.

Wetchakul P and Chusri S. 2015. Total Antioxidant Capacity of Jatu-Pha-La-Ti-Ga and Its Medicinal Plant ComponentsConsumed in Thailand Assessed by DPPH and ABTS Assays. *The Proceedings of the 1st National Conference in Traditional Thai medicine* 129-135.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก เอกสารประกอบการวิจัยทางคลินิก

ภาคผนวก ก - 1

ใบเชิญชวน

ขอเชิญเข้าร่วมการศึกษาความพึงพอใจของการบริโภคน้ำสลัดสมุนไพรจากสารสกัดใบกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk)

เรียน ท่านผู้อ่านที่นับถือ

ข้าพเจ้า นายกวินศักดิ์ จัตุฑะศรี นักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรการแพทย์แผนไทยมหาบัณฑิต คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยมี ดร. สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ใคร่ของกล่าวถึงที่มาของการศึกษาความพึงพอใจในการบริโภคน้ำสลัดสมุนไพรไทยต่ออาสาสมัครสุขภาพดี

เนื่องจากปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตอาหารมีการนำสารเคมีชนิดต่างๆ มาใช้ปรุงแต่งอาหาร และสารกันบูดก็เป็นสารเคมีอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใส่ในอาหารเพื่อช่วยป้องกันหรือช่วยทำลายเชื้อจุลินทรีย์ไม่ให้ เจริญเติบโตทำให้อาหารนั้นอยู่ได้นานปริมาณของสารกันบูดที่ใช้จะแตกต่างกันออกไป ขึ้นกับชนิดของอาหารซึ่งกระทรวงสาธารณสุขจะเป็นผู้กำหนดปริมาณ ที่อนุญาตให้ใส่ในอาหารได้ สารกันบูดเหล่านี้หากใช้ตามที่กฎหมายกำหนด หรือใช้ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข จะไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคแต่หากใช้ในปริมาณมากเกินไปหรือนำไปใช้ไม่เหมาะสม ก็จะก่อให้เกิดอันตรายได้ ในตำรับยาสมุนไพรไทยมีการใช้กระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk) เป็นส่วนประกอบของตำรับยารักษาโรคในระบบทางเดิน จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากใบกระทุมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีทางผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาต่อไปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อดูแลสุขภาพโดยนำมาประยุกต์ใช้กับน้ำสลัด

อาสาสมัครที่ตัดสินใจเข้าร่วมการวิจัยต้องมีคุณสมบัติ ดังนี้ อายุระหว่าง 18-25 ปี รับประทานสลัดอย่างน้อยอาทิตย์ละ 1 ครั้ง ไม่แพ้สมุนไพรหรือส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำสลัด

ถ้ามีข้อสงสัย ก่อนเข้าร่วมการวิจัยสามารถสอบถามผู้วิจัย นายกวินศักดิ์ จัตุฑะศรีได้ที่หมายเลขโทรศัพท์ 087-3859572 หรือติดต่อทาง e-mail: nong_roronoa@hotmail.com

ขอขอบพระคุณอย่างสูง

ผู้วิจัย

ภาคผนวก ก - 2

ใบยินยอมเข้าร่วมวิจัย
การศึกษาความพึงพอใจของการบริโภคน้ำสลัดสมุนไพรจากสารสกัดใบกระทุ

ข้าพเจ้า (นาย, นาง, นางสาว) ……..
อายุ……ปี อาศัยอยู่บ้านเลขที่ …… ถนน…… ตำบล…….
อำเภอ…….. จังหวัด…… ยินยอมเป็นตัวอย่างในการทำวิจัยเรื่อง
"การศึกษาความพึงพอใจของการบริโภคน้ำสลัดสมุนไพรจากสารสกัดใบกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk)" โดยก่อนที่ข้าพเจ้าจะลงนามในใบยินยอมในการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้อ่านเอกสารแนะนำงานวิจัยพร้อมคำอธิบายจากผู้วิจัยให้ทราบถึงวัตถุประสงค์และรายละเอียดต่าง ๆของการวิจัยอย่างเข้าใจแล้ว โดยผู้รับผิดชอบการวิจัย คือ นายกวินศักดิ์ จัตุฑะศรี การวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์เพื่อศึกษาความพึงพอใจของการบริโภคน้ำสลัดสมุนไพรจากสารสกัดใบกระทุ และเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยในอนาคตต่อไป

ข้าพเจ้าเข้าใจอย่างแท้จริงว่า

1. ข้าพเจ้าไม่ได้รับผลประโยชน์โดยตรงในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้
2. ข้าพเจ้าสามารถถอนตัวจากการเข้าร่วมการวิจัย และการถอนตัวนี้จะไม่มีผลต่อการรักษาที่ข้าพเจ้าพึงได้รับจากโรงพยาบาล
3. ข้อมูลต่าง ๆที่ข้าพเจ้าได้ให้ในการวิจัยเรื่องนี้ จะถูกนำเสนอในทางวิชาการได้โดยปกปิดแหล่งที่มาของข้อมูลอย่างเคร่งครัด
4. การเข้าร่วมโครงการวิจัยครั้งนี้ จะไม่มีอันตรายใด ๆ เกิดขึ้นกับข้าพเจ้า แต่ถ้าข้าพเจ้าสามารถพิสูจน์ได้อย่างชัดเจนว่า ได้รับอันตรายจากการเข้าร่วมการวิจัย ผู้วิจัยจะดูแลรักษาข้าพเจ้าจนกว่าจะได้รับความปลอดภัย

โดยผู้รับผิดชอบโครงการวิจัยนี้คือ นายกวินศักดิ์ จัตุฑะศรี สถานที่ติดต่อ คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เบอร์โทรศัพท์ 087-3859572 หรือเมื่อมีปัญหาใด ๆ เกิดขึ้นเนื่องจากการทำวิจัยในเรื่องนี้ข้าพเจ้าสามารถร้องเรียนไปที่คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110 โทรศัพท์ 074-28-2702

ข้าพเจ้าได้อ่านและได้รับการอธิบายข้อความข้างต้นแล้ว มีความเข้าใจดีทุกประการ จึงได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ โดยนักวิจัยได้ให้สำเนาแบบยินยอมที่ลงนามแล้วกับข้าพเจ้าเพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐาน จำนวน 1 ชุด

ลงชื่อ.....ผู้ยินยอม

ลงชื่อ.....หัวหน้าโครงการ

ลงชื่อ.....พยาน

ลงชื่อ.....พยาน

<u>หรือ</u> ในกรณีผู้ถูกทดลองยังไม่บรรลุนิติภาวะ จะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ปกครอง **<u>ให้ผู้เกี่ยวข้องเซ็นชื่อ ดังนี้</u>**

ลงชื่อ.....ผู้ยินยอม

ลงชื่อ.....บิดา/ ผู้ปกครอง

ลงชื่อ.....มารดา

ลงชื่อ.....หัวหน้าโครงการ

ลงชื่อ.....พยาน

ลงชื่อ.....พยาน

ภาคผนวก ก - 3

แบบคัดกรองอาสาสมัคร

การวิจัย “การศึกษาความพึงพอใจของการบริโภคน้ำสลัดสมุนไพรจากสารสกัดใบกระทุ”
คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

ชื่อ-สกุล……เพศ …….. อายุ……ปี
วัน เดือน ปีเกิด…… อาชีพ…… โทรศัพท์……...
ที่อยู่ปัจจุบัน (ที่ติดต่อได้) …….
สถานภาพ……..สัญชาติ…….. ศาสนา……..

ส่วนที่ 2 สัญญาณชีพ

อุณหภูมิ……..องศาเซลเซียส ความดันโลหิต…….mm Hg
อัตราการหายใจ……..ครั้ง/นาที ชีพจร……..ครั้ง/นาที
น้ำหนัก ……..kg ส่วนสูง……..เซนติเมตร
ค่า BMI …… kg/m^2

ส่วนที่ 3 ข้อมูลคัดกรองอาสาสมัครเบื้องต้น	**ใช่**	**ไม่ใช่**
1. รับประทานสลัดอาทิตย์ละ 1 ครั้ง	☐	☐
2. รับประทานสลัดอาทิตย์ละ 2 ครั้ง	☐	☐
3. รับประทานสลัดอาทิตย์ละ 3 ครั้ง	☐	☐
4. รับประทานสลัดเป็นประจำ (อาทิตย์ละ 3 ครั้งขึ้นไป)	☐	☐
5. ไม่รับประทานอาหารเสริมหรือสมุนไพรอื่นๆ (ใน 1 อาทิตย์)	☐	☐
6. ไม่สูบบุหรี่และไม่ดื่มแอลกอฮอล์เป็นประจำ	☐	☐
7. ไม่เป็นหญิงตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร	☐	☐
8. ไม่แพ้ยาสมุนไพร	☐	☐

☐ รับเป็นอาสาสมัคร
☐ ไม่รับเป็นอาสาสมัคร

ลงชื่อ……ผู้คัดกรอง
(……)
……/……/…….

ภาคผนวก ก - 4

แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสวิธีการให้คะแนนความชอบ 9 คะแนน

การวิจัย การศึกษาความพึงพอใจของการบริโภคน้ำสลัดสมุนไพรจากสารสกัดใบกระทุ

คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อผลิตภัณฑ์ : น้ำสลัดใบกระทุ

ลำดับที่.....ผู้ทดสอบ.....วันที่ทดสอบ…..... ตัวอย่างชุดที่.....

คำแนะนำ : กรุณาประเมินความชอบและความรู้สึกที่มีต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ตามลำดับตัวอย่างที่นำเสนอ พร้อมทั้งให้ระดับคะแนนความชอบและความรู้สึกที่มีต่อผลิตภัณฑ์ในแต่ละลักษณะคุณภาพตามความรู้สึกของท่าน และกรุณาบ้วนปากก่อนและระหว่างการทดสอบตัวอย่างโดยกำหนด

1 = ไม่ชอบมากที่สุด 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 7 = ชอบปานกลาง

2 = ไม่ชอบมาก 5 = บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ 8 = ชอบมาก

3 = ไม่ชอบปานกลาง 6 = ชอบเล็กน้อย 9 = ชอบมากที่สุด

ลักษณะทางประสาทสัมผัส	คะแนนความชอบ					
	รหัส …….	รหัส ……..	รหัส …….	รหัส …….	รหัส …….	รหัส …….
ลักษณะปรากฏ						
สี						
กลิ่น						
รสชาติ						
ความขม						
ความชอบโดยรวม						

ข้อเสนอแนะ……

……

ภาคผนวก ก – 5

ตารางแสดงค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC) จากสารสกัดใบและผล (*Rhodomyrtus tomentosa*) ด้วยอะซีโตน เอทานอลและน้ำ ต่อเชื้อเชื้อ *Staphylococcus* aureus ที่แยกได้จากอาหาร

เชื้อแบคทีเรีย	MIC/MBC (µg/ml)					
	ใบ			ผล		
	อะซีโตน	เอทานอล	น้ำ	อะซีโตน	เอทานอล	น้ำ
S. aureus ATCC 23235	15.625/31.25	7.8125/31.25	15.625/500	15.625/125	31.25/125	>1000/>1000
S. aureus ATCC 27664	31.25/62.5	31.25/125	31.25/500	15.625/125	62.5/125	>1000/>1000
S. aureus W21	15.625/62.5	15.625/125	125/1000	125/1000	31.25/62.5	>1000/>1000
S. aureus W54	15.625/62.5	15.625/62.5	250/1000	125/1000	31.25/62.5	>1000/>1000
S. aureus W57	15.625/62.5	15.625/250	250/1000	62.5/500	31.25/250	>1000/>1000
S. aureus W59	31.25/125	15.625/250	250/1000	125/1000	31.25/125	>1000/>1000
S. aureus W65	31.25/125	15.625/125	500/1000	500/1000	125/250	>1000/>1000
S. aureus W68	15.625/500	15.625/250	500/1000	250/500	62.5/250	>1000/>1000
S. aureus W79	31.25/125	62.5/125	250/500	250/1000	125/500	>1000/>1000
S. aureus W81	31.25/62.5	62.5/250	250/500	125/250	125/500	>1000/>1000
S. aureus W88	31.25/62.5	62.5/125	250/1000	250/1000	125/500	>1000/>1000
S. aureus W93	250/1000	62.5/125	250/1000	125/500	500/>1000	>1000/>1000
S. aureus W97	31.25/250	62.5/500	250/1000	125/250	250/1000	>1000/>1000

MIC_{90} คือ ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 90% (250 µg/ml)

ภาคผนวก ก – 6

การให้สารสกัดในสัตว์ทดลองที่ความเข้มข้น 300 mg/kg น้ำหนักตัวของหนู โดยเฉลี่ยอยู่ที่ 200 – 300 g ฉะนั้นแล้วปริมาณของสารสกัดที่หนูจะได้รับต่อวันอยู่ที่

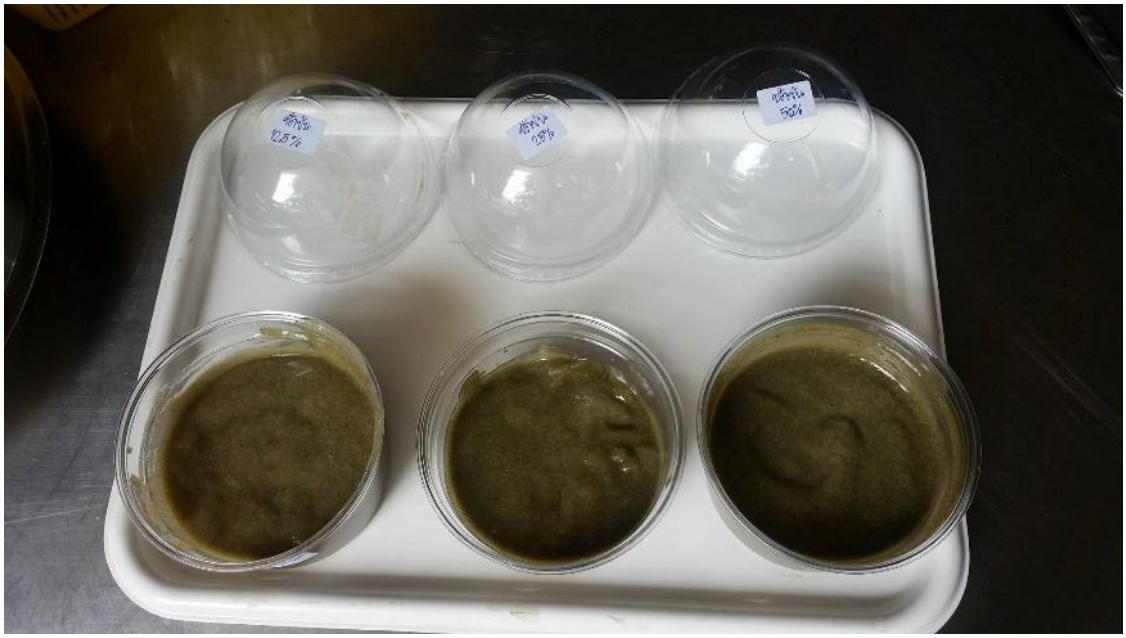
หนูหนัก 1,000 g ได้สารสกัด 300 mg

ถ้าหนูหนัก 300 g จะได้รับสารสกัด = $\frac{(300 \times 300)}{1,000}$

= 90

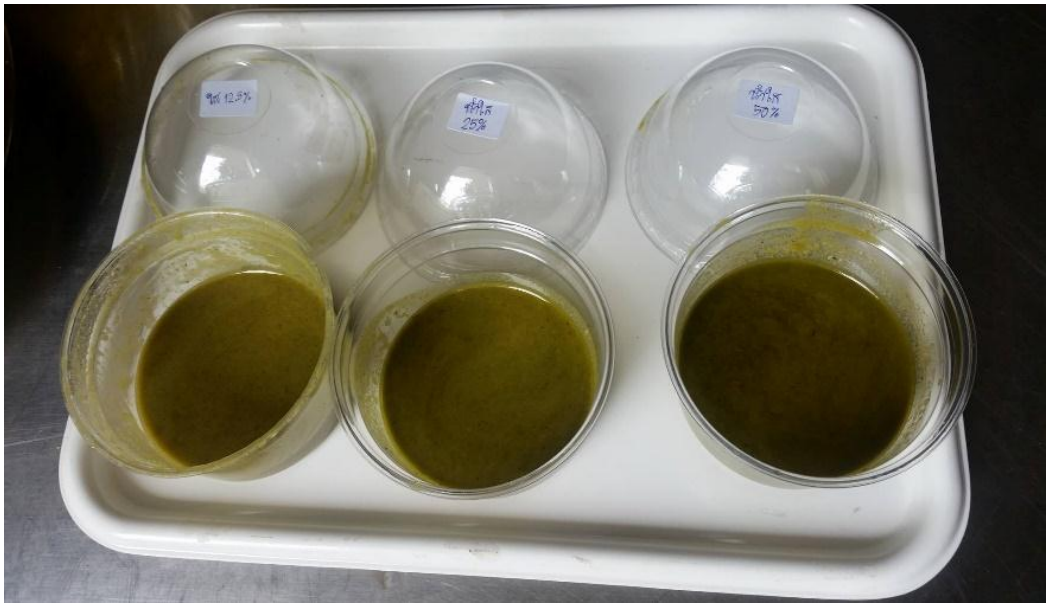
ฉะนั้นแล้วปริมาณของสารสกัดที่หนูจะได้รับต่อวันอยู่ที่ 60 – 90 mg

น้ำสลัดชนิดครีม



น้ำสลัดแบบใส

KBS
First
Naturel
canola oil
น้ำมันคาโนล่า
omega 3 6 9
100%
French's
Classic
YELLOW
ตรา พ่อไก่
The cock
Aro



ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ชั้น 1 อาคารบริหารวิชาการรวม อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110
โทรศัพท์ 074-286904-7 โทรสาร 074-212813 อีเมล sec-ali@group.psu.ac.th เว็บไซต์ http://www.sec.psu.ac.th

วิสัยทัศน์: เป็นองค์กรภาครัฐที่เติบโตด้วยความมุ่งมั่นสู่การเป็นองค์กรที่มีสมรรถนะสูง
และยั่งยืนจากการให้บริการทดสอบด้วยเครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์

F-RES-003 ฉบับที่ 9 บังคับใช้ 05/06/58

รายงานผลการทดสอบ

เลขที่รายงาน:	2616/58	หน้า:	1/1
เลขที่ใบขอใช้บริการฯ:	4326/58	วันที่รับตัวอย่าง:	10 พฤศจิกายน 2558
ชื่อและที่อยู่ลูกค้า:	นายกวินศักดิ์ จัตุฆะศรี คณะแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์		
ผู้ทดสอบ:	นายเวียงชัย จงศรีรัตนกุล และนายวรุตย์ คงกำเนิด		
วันที่ทำการทดสอบ:	11 พฤศจิกายน 2558		
วิธีการทดสอบ:	ICP-OES อ้างอิง WI-RES-ICP-OES-001		
เครื่องมือทดสอบ:	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer, Optima 4300 DV, Perkin Elmer Instruments, USA		
เทคนิคการทดสอบ:	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry		
สภาวะการทดสอบ:	ความยาวคลื่น Cu = 327.393 nm, Pb = 220.353 mm, As = 188.979 mm		
รายละเอียดตัวอย่าง:	Rhodomyrtus tomentosa	2 ตัวอย่าง	

ผลการทดสอบ:

ลำดับที่	ชื่อตัวอย่าง	รายการทดสอบ	เครื่องมือ/วิธี	หน่วย	ผลการทดสอบ ± SD
1	ETOH leaf	Cu	ICP-OES	mg/Kg	17.576 ± 0.6191
		Pb	ICP-OES	mg/Kg	< LOQ
		As	ICP-OES	mg/Kg	< LOQ
2	ETOH fruit	Cu	ICP-OES	mg/Kg	3.443 ± 0.1059
		Pb	ICP-OES	mg/Kg	< LOQ
		As	ICP-OES	mg/Kg	< LOQ

* จีดต่ำสุดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ): Cu = 0.002 mg/L, Pb = 0.022 mg/L, As = 0.036 mg/L
* ข้อมูลดิบ ICP-OES อุดจัดเก็บใน 4262-58 'MES+As
* SD = Standard Deviation

(นางรุสนี กุลวิจิตร)
หัวหน้าฝ่ายบริการเครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์
19 พฤศจิกายน 2558

- หมายเหตุ รายงานผลการทดสอบนี้มีผลเฉพาะกับตัวอย่างที่นำมาทดสอบเท่านั้น และรายงานผลการทดสอบนี้ต้องไม่ถูกทำสำเนาเพียงบางส่วน ยกเว้นทำทั้งฉบับ โดยไม่ได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากทางศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์

ที่ ศธ 0521.11/ 102

สำนักวิจัยและพัฒนา
เลขที่ 15 ถนนกาญจนวนิช
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

Ref. 01/59

หนังสือรับรอง

โครงการวิจัย การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากกระทุ่มในหนูขาวใหญ่

หัวหน้าโครงการ ดร.อัจฉราภรณ์ อิสสุริยะ

ได้ผ่านการพิจารณาและเห็นชอบจาก คณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ให้ไว้ ณ วันที่ 25 มกราคม 2559

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิจจา สว่างเจริญ)
ประธานคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY
15 Karnjanawanij Road, Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand
Tel (66-74) 286940 Fax (66-74) 286961
Website : www.psu.ac.th

MOE 0521.11/ 103 Ref.01/2016

January 25 , 2016

This is to certify that the research project entitled "Toxicity study of *Rhodomyruts tomentosa* extract in rats" which was conducted by Dr. Acharaporn Issuriyap, The establishment Project Faculty of Veterinary Science, Prince of Songkla University, has been approved by The Animal Ethic Committee, Prince of Songkla University.

Kitja Sawangjaroen

Kitja Sawangjaroen, Ph.D.
Chairman,
The Animal Ethic Committee, Prince of Songkla University

EC.59/B 06-012

คณะการแพทย์แผนไทย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
90110

หนังสือรับรองนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

วิทยานิพนธ์เรื่อง	:	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากอาหารของสารสกัดจากใบและผลกระทุ (*Rhodomyrtus tomenrosa*)
คณะผู้วิจัย	:	นายกวินศักดิ์ จัตุทะศรี
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	:	ดร.สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ
เอกสารที่รับรอง	:	1. แบบเสนอโครงการวิจัย 2. เอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย 3. หนังสือยินยอมตนให้ทำการวิจัย 4. แบบฟอร์มการเก็บรวบรวมข้อมูล
วันที่รับรอง	:	26 ตุลาคม 2559
วันที่หมดอายุ	:	31 พฤษภาคม 2560

ได้ผ่านการพิจารณาและเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์แล้ว

ให้ไว้ ณ วันที่ 26 ตุลาคม 2559

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สนั่น ศุภธีรสกุล)
คณบดีคณะการแพทย์แผนไทย

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายกวินศักดิ์ จัตุฑะศรี

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5811420002

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
การแพทย์แผนไทยบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2556

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2558

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Jatutasri K., Issuriya A and Limsuwan S. 2016. Antioxidant and antibacterial activities of *Rhodomyrtus tomentosa* leaf and fruit extracts on food poisioning *Staphylococcus aureus*: The International Conference on Natural Products for Health and Beauty. 2016, 282

กวินศักดิ์ จัตุฑะศรี., อัจฉราภรณ์ อิสสุริยะ และ สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ. 2558. ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษของสารสกัดจากใบกระทุ (*Rhodomyrtus tomentosa*): รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติการแพทย์แผนไทยครั้งที่1. 2558. 103