ภาคผนวก

1. การทดสอบกลุ่มสารบนแผ่น TLC

กลุ่มสาร Terpenoids

1. ทดสอบโดยวิธี Liebermann-Burchard test

1. ทดสอบส่วนสกัดย่อยด้วย TLC โดยใช้ Mobile phase ที่เหมาะสม
2. ผสม glacial acetic 2-3 หยด กับ conc.H_2SO_4 1หยด
3. พ่นสารละลายในข้อ 2 ถ้ามีสีน้ำตาลแสดงว่ามีสารในกลุ่ม terpenoids เป็นองค์ประกอบ

2. ทดสอบโดยวิธี Godin reagent

1. เตรียมสารละลาย 1% Vanilln ใน Ethanol 5 mL ผสมกับ 3% Perchloric acid ในอัตราส่วน 1:1
2. เตรียม 10% Sulphuric acid ใน Ethanol 5mL
3. ผสมสารในข้อ 1 และข้อ 2
4. ทดสอบส่วนสกัดย่อยด้วย TLC โดยใช้ Mobile phase ที่เหมาะสม
5. พ่นสารละลายที่ผสมบนแผ่น TLC อบที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 5-10 นาที ถ้าเกิดสีม่วงแสดงว่ามีสารในกลุ่ม terpenoids เป็นองค์ประกอบ

3. ทดสอบโดยวิธี Salkowski test

1. ผสม Chloroform 2 mL กับ conc.H_2SO_4 3 mL
2. ทดสอบส่วนสกัดย่อยด้วย TLC โดยใช้ Mobile phase ที่เหมาะสม
3. พ่นสารละลายในข้อ 1 ถ้ามีสีน้ำตาลแสดงว่ามีสารในกลุ่ม terpenoids เป็นองค์ประกอบ

4. ทดสอบโดยวิธี Vanillin test

1. เตรียม 1% vanillin solution (vanillin 1 g ใน conc.H_2SO_4 100 mL)
2. เจือจางสารละลายในข้อ 1 ด้วยน้ำกลั่น
3. ทดสอบส่วนสกัดย่อยด้วย TLC โดยใช้ Mobile phase ที่เหมาะสม
4. พ่นสารละลายในข้อ 2 ถ้ามีสีม่วงแสดงว่ามีสารในกลุ่ม terpenoids เป็นองค์ประกอบ

กลุ่มสาร Flavonoids

1. ทดสอบโดยวิธี DPPH solution

1. เตรียม 0.2 mM DPPH ใน methanol
2. ทดสอบส่วนสกัดย่อยด้วย TLC โดยใช้ Mobile phase ที่เหมาะสม
3. พ่นสารละลายในข้อ 1 ถ้ามีสีเหลืองแสดงว่ามีสารในกลุ่ม flavonoids เป็นองค์ประกอบ

2. ทดสอบโดยวิธี Ferric chloride solution

1. เตรียมสารละลาย 1% Ferric chloride
2. ทดสอบส่วนสกัดย่อยด้วย TLC โดยใช้ Mobile phase ที่เหมาะสม
3. พ่นสารละลายในข้อ 1 ถ้ามีสีม่วงแสดงว่ามีสารในกลุ่ม flavonoids เป็นองค์ประกอบ

3. ทดสอบโดยวิธี Sofowara test

1. เตรียมสารละลาย ammonia (ammonia 1 g ในน้ำ100 mL) ผสมกับ conc.H_2SO_4 0.1 mL
2. ทดสอบส่วนสกัดย่อยด้วย TLC โดยใช้ Mobile phase ที่เหมาะสม
3. พ่นสารละลายในข้อ 2 ถ้ามีสีน้ำตาลแสดงว่ามีสารในกลุ่ม flavonoids เป็นองค์ประกอบ

4. ทดสอบโดยวิธี Vanillin test

1. เตรียม 1% vanillin solution (vanillin 1 g ใน conc.H_2SO_4 100 mL)
2. เจือจางสารละลายในข้อ 1 ด้วยน้ำกลั่น
3. ทดสอบส่วนสกัดย่อยด้วย TLC โดยใช้ Mobile phase ที่เหมาะสม
4. พ่นสารละลายในข้อ 2 ถ้ามีสีม่วงแสดงว่ามีสารในกลุ่ม flavonoids เป็นองค์ประกอบ

2. การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ โดยวิธี disc diffusion

2.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ *Sarcina* sp.,*Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aeureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop เขี่ยเชื้อใส่ลงในหลอดอาหาร NB ปริมาตร 4 mL บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อที่กำลังเจริญในระยะ log phase จากนั้นปรับปริมาตรเชื้อด้วย 0.85% NaCl ไร้เชื้อ

2.2 วิธีการทดสอบ

ใช้ไม่พันสำลีไร้เชื้อจุ่มเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ จากข้อ 1 มาพอหมาดๆ แล้ว streak ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MHA โดย streak ในแนว 3 ระนาบ โดยหมุนจานเพาะเชื้อในแนว 60 องศา เพื่อให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอกัน วางทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง หลังจากนั้นใช้ forcep ลนไฟปล่อยให้เย็น คีบแผ่นยามาตรฐาน ได้แก่ Ciprofloxacin (5µg), Tetracycline (30µg), และ Penicillin G (10 Units) วางบนผิวหน้าอาหาร MHA โดยแต่ละแผ่นวางห่างกันประมาณ 15-20 mm และวางห่างจากขอบจานอาหารเพาะเชื้อประมาณ 15 mm นำจานเพาะเชื้อบ่มที่บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ โดยวิธี disc diffusion

3.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

ทำการเตรียมเชื้อเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2.1

3.2 วิธีการเตรียมสารสกัดเพื่อใช้ทดสอบ

ละลายสารสกัดที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้น 25 mg/mL โดยละลายสารสกัดด้วย dimethylsulfoxide (DMSO) และชุดควบคุมใช้ dimethylsulfoxide แทนสารสกัด

3.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์

ใช้ไม่พันสำลีไร้เชื้อจุ่มเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ จากข้อ 3.1 มาพอหมาดๆ แล้ว streak ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MHA โดย streak ในแนว 3 ระนาบ โดยหมุนจานเพาะเชื้อในแนว 60 องศา เพื่อให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอกัน วางทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง หลังจากนั้นใช้ forcep ลนไฟปล่อยให้เย็น คีบแผ่น disc ที่ชุบสารสกัด และแผ่น disc ที่เป็นชุดควบคุม วางบนผิวหน้าอาหาร MHA นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบสารสกัดซ้ำ 2 ครั้ง