

Material preparation

1. Part I Plant extract preparation

1.1 Distilled ethanol

Distilled ethanol for pure ethanol adequate
for whole experiment.

1.2 DMSO (MERCK®)

25% DMSO; water 3 parts: DMSO (pure) 1 part
50% DMSO; water 2 parts: DMSO (pure) 2 parts
Pass filter (Ministart®) diameter 0.45 μ m
for aseptic solution for experiment.

1.3 Metronidazole drug (SIGMA®)

Standard powder of metronidazole drug to dissolve by pure DMSO
and distilled water for beginning concentration of metronidazole = 8 μ g/ml,
pass filter (Ministart®) diameter 0.45 μ m
for aseptic solution for experiment.

2. Part II Antibacterial activity assay

Preparation of the Brain Heart Broth Agar (BHA)

Brain Heart Infusion (BHI) (MERCK®)	11.1 grams
Yeast extract	1.5 grams
Bacto agar	6 grams
Distilled water	300 ml
⇓	
Autoclave 121°C 15 min	
⇓	
Blood	30 ml
Vitamin K	6 ml

3. Part III Cytotoxic assay

MTT solution preparation

	30 ml	100ml
MTT	30 mg	100 mg
Distilled water	15 ml	50 ml
0.2 Tris 7.4	7.5 ml	25 ml
0.005 M MgCl ₂	3 ml	10 ml
0.05CoCl ₂	1.5 ml	5 ml
0.85 M Na ₂ succinate	3 ml	10 ml

Adjusted pH with 10N HCl To pH 7

4. Part IV Anti-inflammatory assay

Wash Buffer-Dilute 30 ml of wash buffer concentrate into deionized or distilled water to prepare 300 ml of wash buffer. Bring all reagents to room temperature before use.

PGE₂ standard-Pipette 950 µl of CCM into the 2,500 pg/ml tube. Pipette 500 µl of CCM into the remaining tubes. When pipetting standards, it is important to pre-rinse the pipette tips. Use the 50,000 pg/ml standard stock to produce a dilution series. Mix each tube thoroughly and change pipette tips between each transfer. The 2,500 pg/ml standard serves as the high standard and the CCM serves as the zero standard (B₀) (0 pg/ml). Use diluted standards within 60 minutes of preparation.

LPS from *E. Coli* serotype 0111:B4 (Sigma L2630-100mg, 043K4130)

Assay procedure

1. Bring all reagents and samples to room temperature before use. And all samples and standards to be assayed in duplicate. Total Activity (TA), Non-Specific Binding (NSB), Maximum Binding (B₀) and Substrate Blank wells run in the assay as a means of quality control for each assay.

2. Prepare all reagents, working standards, and samples as directed in the previous sections.

3. Remove excess microplate strips from the plate frame, return them to the foil pouch containing the desiccant pack and reseal.

4. Reserve wells for TA and Substrate Blank

Add 150 µl of CCM to the NSB wells.

Add 100 µl of CCM to the zero standard (B₀) wells.

Add 100 µl of standard or sample to the remaining wells.

Add 50 µl of PGE₂ conjugate to each well (excluding the TA and Substrate Blank wells).

Add 50 µl of PGE₂ antibody solution to each well (excluding the NSB, TA and Substrate Blank wells). Cover with the adhesive strip provided. Incubate for 2 hours at room temperature on a horizontal orbital microplate shaker.

Note: The TA and Substrate Blank wells are empty at this point. The NSB wells should be blue and all other wells should be green.

Aspirate or decant each well and wash, repeating the process twice for a total of three washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 μ l). Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.

Add 5 μ l of PGE₂ conjugate to the TA wells.

Add 200 μ l of pNPP Substrate to all wells. Incubate for 1 hour at room temperature on the benchtop.

Add 50 μ l of stop solution to each well.

Determinate the optical density of each well immediately using a microplate reader set to 405 nm with wavelength correction set between 570 nm and 590 nm.

Table

Table A-1 Raw data of Part II antibacterial activity of studied plant extracts

(Note; -, not active, *, showed brown stain, not clear)

Microorganism	Plant extracts	Screening (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Aa</i>	<i>Ao</i> leaves	2.5	0.78	25
		2	1.563	-
		2	3.125	-
			25	-
			25	-
Mean		2.166667	11.094	5
Median		2	3.125	-
Mode		2	25	-
SD		0.288675	12.723	*
<i>Aa</i>	<i>Rn</i> leaves	-	25	-
		-	25	-
		-	25	-
			25	-
			0	-
Mean		-	20	-
Median		-	25	-
Mode		-	25	-
SD		-	11.180	-

Table A-1 (continued)

Microorganism	Plant extracts	Screening (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Aa</i>	<i>Sc</i> leaves	3	3.125	-
		5	3.125	-
		4	3.125	25
			6.250	25
			6.250	12.5
Mean		4	4.375	12.5
Median			3.125	12.5
Mode			3.125	25
SD		1	1.712	12.5
<i>Aa</i>	<i>Sc</i> bark	*	3.125	-
		*	3.125	-
		*	6.250	-
			6.250	-
			6.250	-
Mean		*	5.000	-
Median			6.250	-
Mode			6.250	-
SD		*	1.712	-

Table A-1 (continued)

Microorganism	Plant extracts	Screening (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Aa</i>	<i>Pn</i> pericarp	*	3.125	25
		*	6.250	25
		*	12.500	-
			12.500	-
			12.500	-
Mean		*	9.375	10
Median			12.500	-
Mode			12.500	-
SD		*	4.419	13.693
<i>Aa</i>	<i>Ao</i> bark	5	0.485	0.485
		1.5	0.975	0.975
		5	0.975	0.975
			1.950	1.950
			3.900	3.900
Mean		3.833333	1.657	1.657
Median			0.975	0.975
Mode			0.975	0.975
SD		2.020726	1.362	1.362

Table A-1 (continued)

Microorganism	Plant extracts	Screening (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Aa</i>	Tb dried-fruit	*	1.950	1.950
		*	1.950	15.625
		*	3.900	7.810
			3.900	7.810
			3.900	7.810
Mean		*	3.120	8.201
Median			3.900	7.810
Mode			3.900	7.810
SD		*	1.068	4.864
<i>Aa</i>	Metronidzole	-	-	-
		-	-	-
		-	-	-
			-	-
			-	-
Mean		-	-	-
Median			-	-
Mode			-	-
SD		-	-	-

Table A-1 (continued)

Microorganism	Plant extracts	Screening (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Pg</i>	<i>Ao</i> leaves	3	0.390	1.563
		3	1.563	3.125
		2.5	1.563	3.125
			1.563	3.125
			1.563	3.125
Mean		2.833333	1.328	2.813
Median			1.563	3.125
Mode			1.563	3.125
SD		0.288675	0.524	0.699
<i>Pg</i>	<i>Rn</i> leaves	1	12.500	12.500
		1	12.500	12.500
		2	12.500	12.500
			12.500	12.500
			12.500	12.500
Mean		1.333333	12.500	12.500
Median		1	12.500	12.500
Mode		1	12.500	12.500
SD		0.57735	-	-

Table A-1 (continued)

Microorganism	Plant extracts	Screening (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Pg</i>	<i>Sc</i> leaves	5	1.563	6.250
		4	1.563	3.125
		2.5	3.125	3.125
			3.125	3.125
			3.125	1.563
Mean		3.833333	2.500	3.438
Median			3.125	3.125
Mode			3.125	3.125
SD		1.258306	0.856	1.712
<i>Pg</i>	<i>Sc</i> bark	*	1.563	6.250
		*	1.563	6.250
		*	3.125	12.500
			6.250	12.500
			6.250	12.500
Mean		*	3.750	10
Median			3.125	12.500
Mode			1.563	12.500
SD		*	2.370	3.423

Table A-1 (continued)

Microorganism	Plant extracts	Screening (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Pg</i>	<i>Pn</i> pericarp	*	0.780	0.780
		*	1.563	2.280
		*	3.125	1.563
			3.125	3.125
			3.125	3.125
Mean		*	2.344	2.175
Median			3.125	2.280
Mode			3.125	3.125
SD		*	1.105	1.017
<i>Pg</i>	<i>Ao</i> bark	5	0.240	0.240
		4	0.485	0.240
		3	0.485	0.975
			0.485	0.975
			0.975	1.950
Mean		4	0.534	0.876
Median			0.485	0.975
Mode			0.485	0.240
SD		1	0.268	0.704

Table A-1 (continued)

Microorganism	Plant extracts	Screening (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Pg</i>	<i>Tb</i> dried-fruit	*	0.240	1.950
		*	0.975	0.240
		*	1.950	0.240
			3.900	0.120
			7.810	0.120
Mean		*	2.975	0.534
Median			1.950	0.240
Mode			7.810	0.240
SD		*	3.032	0.794
<i>Pg</i>	Metronidazole	18	0.001	0.001
		17	0.001	0.001
		20	0.001	0.00150
			0.00150	0.00150
			0.003	0.003
Mean		18.33333	0.00150	0.00160
Median			0.001	0.00150
Mode			0.001	0.001
SD		1.527525	0.00087	0.00082

Table A-1 (continued)

Microorganism	Plant extracts	Screening (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Pi</i>	<i>Ao</i> leaves	2	0.780	25
		2	0.780	25
		3	1.563	25
			1.563	25
			1.563	25
Mean		2.333333	1.250	25
Median			1.563	25
Mode			1.563	25
SD		0.57735	0.429	-
<i>Pi</i>	<i>Rn</i> leaves	2	-	-
		2	-	-
		2	-	-
			-	-
			-	-
Mean		2	-	-
Median			-	-
Mode			-	-
SD		-	-	-

Table A-1 (continued)

Microorganism	Plant extracts	Screening (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Pi</i>	<i>Sc</i> leaves	2	0.780	25
		1.5	0.780	25
		1	0.780	25
			1.563	25
			1.563	25
Mean		1.5	1.093	25
Median			0.780	25
Mode			0.780	25
SD		0.5	0.429	-
<i>Pi</i>	<i>Sc</i> bark	*	0.780	-
		*	0.780	-
		*	0.780	-
			1.563	-
			1.563	-
Mean		*	1.093	-
Median			0.780	-
Mode			0.780	-
SD		*	0.429	-

Table A-1 (continued)

Microorganism	Plant extracts	Screening (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Pi</i>	<i>Pn</i> pericarp	*	0.390	-
		*	0.780	-
		*	0.780	25
			0.780	25
			1.563	12.500
Mean		*	0.859	12.500
Median			0.780	12.500
Mode			0.780	-
SD		*	0.428	12.500
<i>Pi</i>	<i>Ao</i> bark	3	0.120	31.250
		4	0.120	3.900
		3	0.120	0.975
			0.120	0.975
			0.120	0.485
Mean		3.333333	0.120	7.517
Median			0.120	0.975
Mode			0.120	0.975
SD		0.57735	-	13.336

Table A-1 (continued)

Microorganism	Plant extracts	Screening (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Pi</i>	<i>Tb</i> dried-fruit	*	0.120	3.900
		*	0.120	7.810
		*	0.120	15.625
			0.120	15.625
			0.975	15.625
Mean		*	0.291	11.717
Median			0.120	15.625
Mode			0.120	15.625
SD		*	-	5.527
<i>Pi</i>	Metronidazole	1	-	-
		1	-	-
		0.5	-	-
			-	-
			-	-
Mean		0.833333	-	-
Median			-	-
Mode			-	-
SD		0.288675	-	-

Table A-2 The optimal density (OD) value of MTT assay (Note; -, underestimate)*Ao* leaves 100 times

(156.25 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.253	0.473	0.494
	0.39	0.538	0.513
	0.446	0.567	0.531
	0.476	0.606	0.555
	0.493	0.628	0.614
	-	-	-
SD	0.097	0.061	0.046
Mean OD	0.412	0.562	0.541

Ao leaves 50 times

(78.1 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.226	0.335	0.369
	0.283	0.356	0.381
	0.328	0.361	0.446
	0.413	0.454	0.477
	0.423	-	0.497
	0.439	-	-
SD	0.087	0.053	0.057
Mean OD	0.352	0.377	0.434

Table A-2 (continued)*Ao* leaves 2 times

(3.125 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.234	-	0.287
	0.329	0.247	0.371
	0.421	0.257	0.385
	0.43	0.28	0.389
	0.477	0.307	-
	-	0.417	-
SD	0.097	0.069	0.097
Mean OD	0.378	0.302	0.319

Table A-2 (continued)*Ao bark 100 times*

(48.5 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.487	0.213	0.205
	0.495	0.248	0.231
	0.514	0.507	0.382
	0.53	0.370	0.407
	0.565	-	-
	0.608	-	-
SD	0.046	0.133	0.103
Mean OD	0.533	0.335	0.310

Ao bark 50 times

(24.25 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.5	0.626	0.719
	0.595	0.706	0.830
	0.68	1.004	0.470
	0.919	0.730	0.720
	1.051	0.627	0.464
	-	-	-
SD	0.230	0.155	0.165
Mean OD	0.749	0.739	0.640

Table A-2 (continued)*Ao* bark 2 times

(0.97 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.252	0.490	0.210
	0.304	0.252	0.530
	0.308	0.321	0.360
	0.33	0.387	0.192
	0.798	0.780	0.620
	0.480	-	0.480
SD	0.204	0.131	0.175
Mean OD	0.412	0.406	0.400

Table A-2 (continued)*Tb* dried-fruit

(148.75 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.520	0.328	0.498
	0.632	0.347	0.5
	0.656	0.394	0.581
	0.709	0.439	0.613
	0.621	0.630	0.620
	0.720	0.534	0.470
SD	0.070	0.117	0.065
Mean OD	0.643	0.445	0.547

Tb dried-fruit

(59.5 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.212	0.351	0.42
	0.293	0.586	0.445
	0.532	0.654	0.730
	0.656	0.650	0.720
	0.310	0.820	0.614
	0.305	0.750	-
SD	0.170	0.162	0.230
Mean OD	0.390	0.635	0.630

Table A-2 (continued)*Tb* dried-fruit

(5.95 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.117	0.680	-
	0.127	0.470	0.192
	0.14	0.590	0.231
	0.145	0.269	0.233
	0.158	0.719	0.455
	0.236	0.793	0.528
SD	0.043	0.191	0.153
Mean OD	0.154	0.587	0.328

Sc leaves 50 times

(156.25 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.173	-	0.314
	0.206	0.119	0.365
	0.259	0.268	0.175
	0.352	0.269	0.199
	0.374	0.390	0.440
	1.032	0.760	-
SD	0.320	0.243	0.110
Mean OD	0.399	0.361	0.300

Table A-2 (continued)*Sc* leaves 2 times

(6.25 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.283	0.274	0.280
	0.284	0.348	0.220
	0.362	0.47	0.610
	0.296	0.24	0.550
	0.398	0.56	0.530
	0.429	-	0.628
SD	0.053	0.134	0.047
Mean OD	0.250	0.378	0.579

Sc bark 10 times

(62.5 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.081	0.134	0.091
	0.083	0.146	0.146
	0.097	0.196	0.164
	0.121	0.205	0.199
	0.176	0.211	0.224
	0.252	0.233	0.127
SD	0.067	0.039	0.048
Mean OD	0.135	0.188	0.159

Table A-2 (continued)*Sc* bark 2 times

(6.25 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.17	0.188	0.310
	0.188	0.218	0.360
	0.191	0.229	0.377
	0.196	0.284	0.427
	0.237	0.428	-
	0.243	-	-
SD	0.029	0.097	0.050
Mean OD	0.204	0.290	0.370

Pn pericarp 100 times

(312.5 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	-	0.248	0.282
	0.211	0.252	0.423
	0.252	0.317	-
	0.371	0.317	0.348
	0.524	0.514	0.562
	-	0.53	-
SD	0.140	0.127	0.120
Mean OD	0.340	0.363	0.400

Table A-2 (continued)*Pn* pericarp 50 times

(156.25 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	-	-	0.32
	-	0.263	0.279
	0.279	0.266	0.396
	0.402	0.308	0.412
	0.474	0.344	0.472
	0.521	0.388	0.338
SD	0.105	0.053	0.070
Mean OD	0.419	0.314	0.370

Pn pericarp 2 times

(6.25 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	-	-	-
	0.114	0.281	-
	0.119	0.339	0.112
	0.128	0.407	0.115
	0.176	0.426	0.365
	0.262	-	0.477
SD	0.0622	0.066	0.180
Mean OD	0.1598	0.363	0.270

Table A-2 (continued)*Rn* leaves 2 times

(25 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	-	0.063	0.048
	-	0.067	0.042
	0.075	0.069	0.047
	0.184	0.076	0.061
	0.221	0.101	0.069
	0.254	0.127	0.089
SD	0.0770	0.025127	0.017648
Mean OD	0.1835	0.083833	0.059333

Control

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.321	0.288	0.303
	0.343	0.316	0.349
	0.366	0.39	0.363
	0.384	0.429	0.408
	0.702	0.552	0.479
	0.703	0.606	0.491
SD	0.1815	0.1270	0.0748
Mean OD	0.4698	0.4302	0.3988

Table A-2 (continued)

		Blank		
		12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
		0.001	0.001	0
		-0.001	-0.001	0
		0.004	-0.001	0
		-0.004	0.001	0
		0.001	0.001	0
		-0.001	-0.001	0
SD		0.00268	0.00110	0
Mean OD		0	0	0

Table A-2 (continued)

Metronidazole 100 times

(0.08 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.254	0.251	0.28
	0.264	0.316	-
	0.235	0.248	0.232
	0.394	0.556	0.382
	0.356	0.215	-
	0.238	0.353	0.331
SD	0.070	0.125	0.065
Mean OD	0.290	0.323	0.310

Metronidazole 50 times

(0.04 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.268	0.336	0.386
	0.363	0.251	0.331
	0.128	0.167	0.325
	0.329	0.336	0.254
	0.296	0.339	0.171
	0.278	0.348	0.344
SD	0.040	0.073	0.077
Mean OD	0.300	0.296	0.302

Table A-2 (continued)

Metronidazole 20 times

(0.016 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.24	0.322	0.356
	0.297	0.329	0.374
	0.333	0.275	0.387
	0.348	0.256	0.215
	0.375	0.326	0.503
	0.308	0.36	0.363
SD	0.047	0.038	0.091
Mean OD	0.317	0.311	0.367

Metronidazole 2 times

(0.0016 mg/ml)

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.338	0.373	0.402
	0.425	0.458	0.389
	0.215	0.352	0.413
	0.359	0.346	0.352
	0.205	0.382	0.336
	0.242	0.387	0.339
SD	0.0896	0.0402	0.0336
Mean OD	0.2973	0.3830	0.3718

Table A-2 (continued)

DMSO
600 μ l/ml

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.084	0.341	0.439
	0.026	0.362	0.355
	0.025	0.300	0.127
	0.064	0.320	0.13
	-	0.166	-
	-	-	-
SD	0.030	0.080	0.159
Mean OD	0.050	0.290	0.263

DMSO
300 μ l/ml

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.585	0.322	0.438
	-	0.301	0.428
	0.149	0.241	0.236
	0.391	0.215	0.206
	0.177	0.264	-
	0.198	-	-
SD	0.186	0.030	0.123
Mean OD	0.300	0.280	0.327

Table A-2 (continued)

DMSO
100 µl/ml

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.308	0.367	0.44
	0.388	0.383	0.398
	0.237	0.495	0.242
	0.325	0.27	0.18
	0.319	0.312	0.083
	0.176	0.352	0.189
SD	0.075	0.233	0.124
Mean OD	0.292	0.477	0.315

DMSO
10 µl/ml

	12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
	0.392	0.337	0.583
	0.455	0.339	0.37
	0.162	0.143	0.387
	0.240	0.393	0.388
	0.332	0.222	0.308
	0.319	0.288	0.297
SD	0.105	0.102	0.101
Mean OD	0.317	0.287	0.390

Table A-2 (continued)

		Blank		
		12hrs(OD)	24hrs(OD)	48hrs(OD)
		0.001	0.001	0
		-0.001	-0.001	0
		0.004	-0.001	0
		-0.004	0.001	0
		0.001	0.001	0
		-0.001	-0.001	0
SD		0.00268	0.00110	0
Mean OD		0	0	0

Table A-3-1 PGE₂ value of standard of Part IV anti-inflammatory effect of plant extracts

PGE ₂ (pg/ml)	OD	Mean (OD) (A)	Corrected OD (B) [(A) – (OD Mean)]	%B/B0
NSB	-0.109 -0.112	-0.1105 (A)	-	-
0	0.311 0.305	0.308	0.4185 (B ₀)	100
39	0.277 0.253	0.265	0.3755	89.73
78	0.174 0.218	0.196	0.3065	73.24
156	0.189 0.111	0.15	0.2605	62.25
312	0.027 0.003	0.015	0.1255	29.99
625	-0.014 -0.035	-0.0245	0.086	20.55
1250	-0.041 -0.053	-0.047	0.0635	15.17
2500	-0.048 -0.053	-0.0505	0.06	14.34

Table A-3-2 OD values and corrected values of PGE₂ at 6 hours tested period of Part IV anti-inflammatory effect of plant extracts

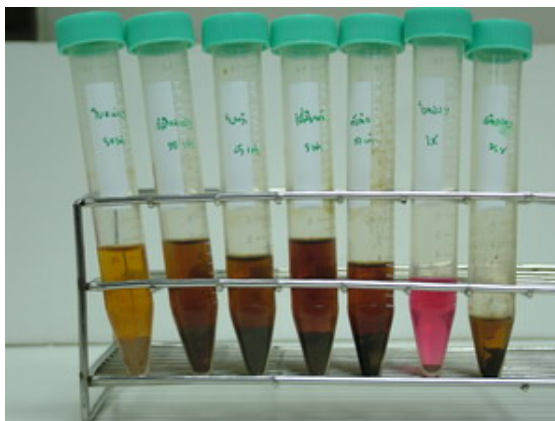
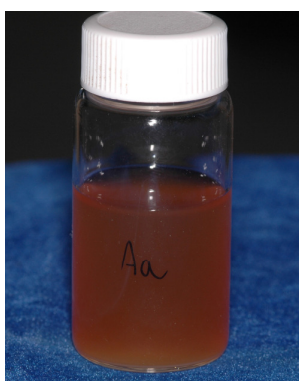
6 hours	OD	Mean of OD	Corrected OD	%B/B0	PGE ₂ (pg/ml)	Comparison (Control =1)
control	0.006 0.013	0.0095	0.12	28.67	11.162	1
<i>Ao</i> leaves (3.125 mg/ml)	0.016 0.019	0.0175	0.128	30.585	10.886	0.976
<i>Ao</i> leaves (31.25 mg/ml)	-0.001 -0.02	-0.0105	0.1	23.895	11.851	1.06
<i>Sc</i> leaves (6.25 mg/ml)	-0.009 0	-0.0045	0.106	25.329	11.645	1.043
<i>Sc</i> leaves (62.5 mg/ml)	-0.025 -0.007	-0.016	0.0945	22.581	12.041	1.075
<i>Pn</i> pericarp (6.25 mg/ml)	0.028 -0.013	0.0075	0.118	28.196	11.231	1.007
<i>Pn</i> pericarp (62.5 mg/ml)	-0.014 -0.019	-0.0165	0.094	22.461	12.059	1.08
<i>Ao</i> bark (0.97 mg/ml)	0.021 0.034	0.0275	0.138	32.975	10.541	0.942
<i>Ao</i> bark (9.7 mg/ml)	0.007 0	0.0035	0.114	27.24	11.366	1.018
<i>Tb</i> dried-fruit (5.95 mg/ml)	0.029 0.016	0.0225	0.133	31.78	10.714	0.96
<i>Tb</i> dried-fruit (59.5 mg/ml)	-0.018 -0.035	-0.0265	0.084	20.072	12.403	1.111

Table A-3-3 OD values and corrected values of PGE₂ at 12 hours tested period of Part IV anti-inflammatory effect of plant extracts

12hours	OD	Average (OD)	Corrected (mean OD)	%B/B0	PGE ₂	Comparison (Control =1)
control	-0.01 -0.02	-0.015	0.0955	22.82	12.007	1
<i>Ao</i> leaves (3.125 mg/ml)	0.03 0.035	0.0325	0.143	34.17	10.369	0.864
<i>Ao</i> leaves (31.25 mg/ml)	0.011 -0.024	-0.0065	0.104	24.851	11.714	0.975
<i>Sc</i> leaves (6.25 mg/ml)	0.041 0.026	0.0335	0.144	34.409	10.334	0.86
<i>Sc</i> leaves (62.5 mg/ml)	-0.009 -0.03	-0.0195	0.091	21.744	12.162	1.012
<i>Pn</i> pericarp (6.25 mg/ml)	-0.016 -0.038	-0.027	0.0835	19.952	12.42	1.035
<i>Pn</i> pericarp (62.5 mg/ml)	-0.03 -0.014	-0.022	0.0885	21.147	12.248	1.02
<i>Ao</i> bark (0.97 mg/ml)	0.016 -0.003	0.0065	0.117	27.957	11.266	0.938
<i>Ao</i> bark (9.7 mg/ml)	-0.005 -0.056	-0.0305	0.08	19.116	12.541	1.045
<i>Tb</i> dried-fruit (5.95 mg/ml)	-0.027 0.003	-0.012	0.0985	23.536	11.903	0.991
<i>Tb</i> dried-fruit (59.5 mg/ml)	-0.043 -0.044	-0.0435	0.067	16.01	12.99	1.081

Table A-3-4 OD values and corrected values of PGE₂ at 24 hours tested period of Part IV anti-inflammatory effect of plant extracts

24 hours	OD	Average (OD)	Corrected (mean OD)	%B/B0	PGE2	Comparison (Control =1)
control	-0.026 -0.01	-0.018	0.0925	22.103	12.110345	1
<i>Ao</i> leaves (3.125 mg/ml)	0.017 0.045	0.031	0.1415	33.811	10.42069	0.86
<i>Ao</i> leaves (31.25 mg/ml)	0.013 -0.013	0	0.1105	26.404	11.489655	0.95
<i>Sc</i> leaves (6.25 mg/ml)	0.033 0.019	0.026	0.1365	32.616	10.593103	0.88
<i>Sc</i> leaves (62.5 mg/ml)	-0.041 -0.055	-0.048	0.0625	14.934	13.144828	1.08
<i>Pn</i> pericarp (6.25 mg/ml)	0.025 0.029	0.027	0.1375	32.855	10.558621	0.872
<i>Pn</i> pericarp (62.5 mg/ml)	-0.043 -0.03	-0.0365	0.074	17.682	12.748276	1.05
<i>Ao</i> bark (0.97 mg/ml)	-0.008 -0.034	-0.021	0.0895	21.386	12.213793	1.008
<i>Ao</i> bark (9.7 mg/ml)	-0.005 -0.0016	-0.0033	0.1072	25.615	11.603448	0.958
<i>Tb</i> dried-fruit (5.95 mg/ml)	0.021 0.002	0.0115	0.122	29.152	11.093103	0.916
<i>Tb</i> dried-fruit (59.5 mg/ml)	-0.04 -0.036	-0.038	0.0725	17.324	12.8	1.057

Figure**Figure A-1** Example of plant extracts preparation**Figure A-2** Example of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa)

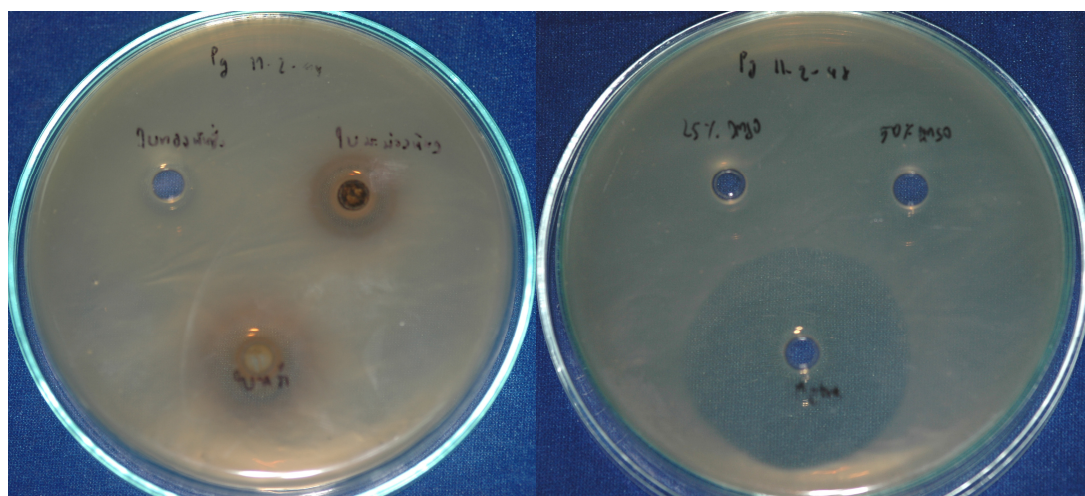


Figure A-3 Example of antibacterial activity by agar diffusion method

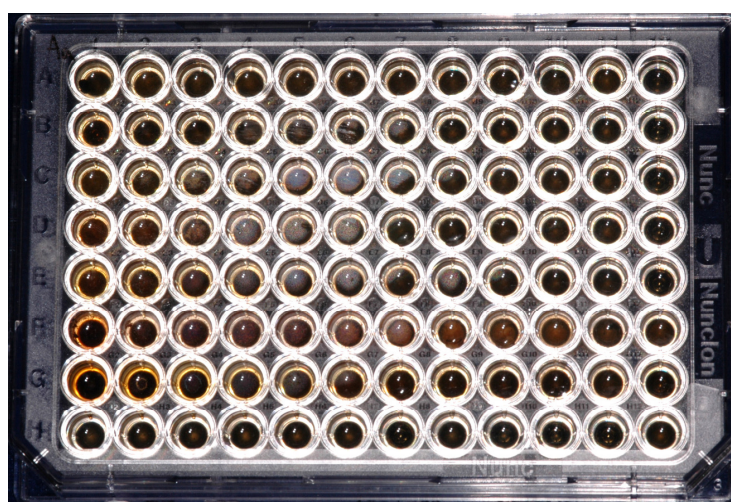


Figure A-4 Example of the Minimal inhibitory concentration (MIC) by two-fold broth microdilution method

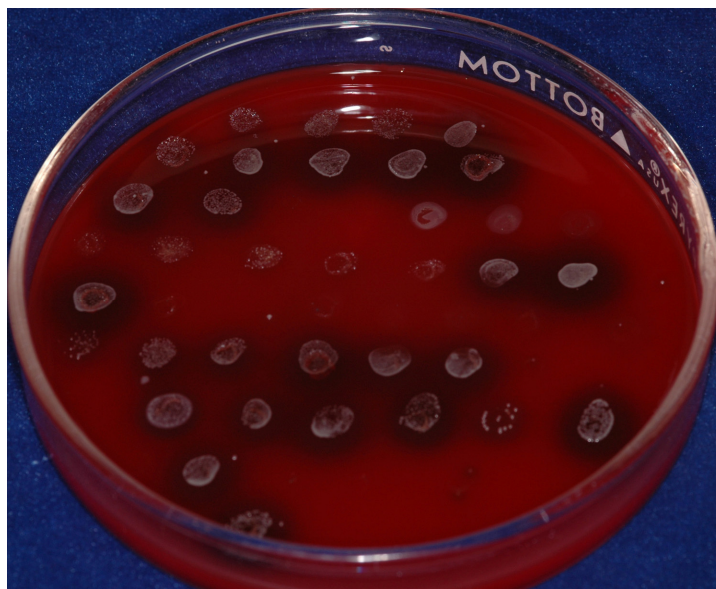


Figure A-5 Example of the Minimal bacterial concentration (MBC) by using blood agar plate



Figure A-6 Example of cell culture (Human gingival fibroblast)

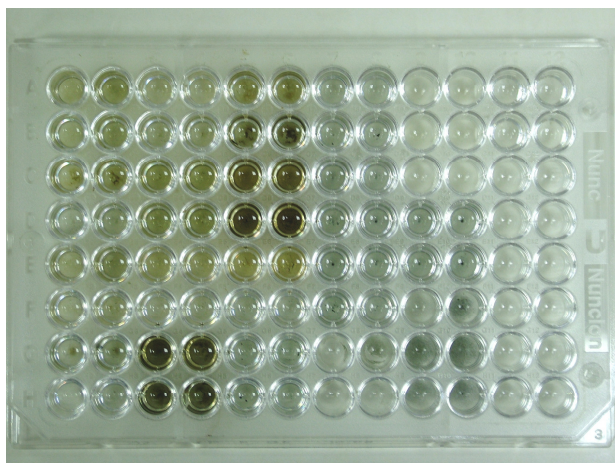


Figure A-7 Example of MTT assay



Figure A-8 Biotrak™ visible plate reader (Amersham Biosciences, USA)



Figure A-9 Example of Prostaglandins E₂ (PGE₂) by a commercial specific enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) kit (R&D system, USA)

ที่ ศธ 0521.1.03/ **0709**

คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ตู้ไปรษณีย์เลขที่ 17
ที่ทำการไปรษณีย์โทรเลขคอหงส์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

หนังสือฉบับนี้ให้ไว้เพื่อรับรองว่า

โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษากิจกรรมฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นไทยบางชนิด ฤทธิ์ต้านการอักเสบและความเป็นพิษของสารที่มีผลต่อเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหงือก ”

หัวหน้าโครงการ นางสาวทรงลักษณ์ ศรีสวัสดิ์

สังกัดหน่วยงาน นักศึกษาปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้ผ่านการพิจารณาและได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย (Ethics Committee) ซึ่งเป็นคณะกรรมการพิจารณาศึกษาการวิจัยในคนของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ แล้ว

ให้ไว้ ณ วันที่ 4 สิงหาคม 2547

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุวรรณา จิตภักดีบดินทร์)

รองคณบดีฝ่ายวิจัยและวิเทศสัมพันธ์

ประธานกรรมการ

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์วิลาศ สัตยสันต์สกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สรียา ศรีสินทร)

.....กรรมการ
(นายแพทย์วรงค์ เชาวน์ชูเวชช)

.....กรรมการ
(ดร.สุธี อยู่สถาพร)

ไม่ได้เข้าร่วมประชุม
.....กรรมการ
(อ.ทพ.วรงค์ ปัญญาองค์)

.....กรรมการ
(อ.ทพญ.อังคณา เรียบรมนตรี)

ใบรับทราบ

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นไทยบางชนิด
ฤทธิ์ด้านการอักเสบและความเป็นพิษของสารที่มีผลต่อเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหงือก

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า.....อายุ.....ปี

อาศัยอยู่บ้านเลขที่.....ถนน.....ตำบล.....อำเภอ.....

จังหวัด.....

ได้รับทราบโครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นไทย
บางชนิด ฤทธิ์ด้านการอักเสบและความเป็นพิษของสารที่มีผลต่อเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหงือก

จากคำอธิบายของ..... ดังนี้

ขอความอนุเคราะห์ เก็บฟันซี่ที่ท่านจำเป็นต้องถอนออกเพื่อนำเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหงือก ที่ติดมากับฟัน นำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ทดสอบกับสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพรท้องถิ่น โดยจะเป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อจะประเมินการนำมาใช้ในสัตว์ทดลองหรือในมนุษย์ได้ ในลำดับต่อไป ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัยนี้ เป็นการค้นหาสารสกัดพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและทดสอบความเป็นพิษของสารที่มีผลต่อเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหงือก เป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาสารสกัดที่มีประโยชน์ในการรักษาโรคปริทันต์ต่อไปในอนาคต

ข้าพเจ้าเข้าใจคำอธิบายข้างต้นและรับทราบการขั้นตอนการปฏิบัติตามโครงการดังกล่าวแล้ว
 จึงได้ลงลายมือชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....ผู้รับทราบ

(...../...../.....)

ลงชื่อ.....ทันตแพทย์ผู้ทำการตรวจรักษา

(...../...../.....)

ใบเชิญชวน

ขอเชิญเข้าร่วมโครงการวิจัยเรื่อง

1. การศึกษาฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นไทยบางชนิด ฤทธิ์ด้านการอักเสบและความเป็นพิษของสารที่มีผลต่อเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหงือก
2. การศึกษาผลของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นไทยบางชนิดที่มีฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ฤทธิ์ด้านการอักเสบและความเป็นพิษของสารที่มีผลต่อเซลล์เอ็นดัลปริทันต์

เรียน ท่านผู้อ่านที่นับถือ

ข้าพเจ้าทพญ. ทรงลักษณ์ ศรีสวัสดิ์ และ ผศ.ทพญ.ดร.วิไลรัตน์ วรภมร ไคร่ขอเล่าถึงโครงการวิจัยที่กำลังทำอยู่ และขอเชิญชวนท่านเข้าร่วมโครงการนี้

ปัจจุบันโรคเหงือกอักเสบและปริทันต์อักเสบเป็นโรคสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพช่องปาก และส่งผลต่อสุขภาพโดยรวมและทำให้เกิดการการสูญเสียทรัพยากรต่างเพื่อการรักษาโรค โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ หาสารสกัดสมุนไพรท้องถิ่นที่มีผลในการรักษาหรือป้องกัน โรคเหงือกอักเสบและปริทันต์อักเสบ โครงการนี้จะมีส่วนของการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับท่านคือ หากท่านมีฟันซี่ที่ไม่ใช่ประโยชน์ในช่องปาก หรือ จำเป็นต้องถอนฟันเพื่อการจัดฟัน ผู้วิจัยไคร่ขอเก็บเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหงือกและเซลล์เอ็นดัลปริทันต์ที่ติดมากับฟันที่ถูกถอน เพื่อนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและนำไปทดสอบกับสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพรท้องถิ่น โดยจะนำผลที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน ในการพัฒนาหาสารสกัดพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่มีผลในการรักษา หรือป้องกันเหงือกอักเสบและปริทันต์อักเสบ อีกทั้งยังเป็นการสนับสนุนการใช้พืชสมุนไพรท้องถิ่น ต่อไป

ไม่ว่าท่านจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้หรือไม่ ท่านจะยังคงได้รับการรักษาที่ดีเช่นเดียวกับผู้ป่วยคนอื่น ๆ และถ้าท่านไม่ต้องการที่จะร่วมกับการศึกษานี้ ท่านก็สามารถกระทำได้อย่างอิสระ

ถ้าท่านมีคำถามใด ๆ ก่อนที่จะตัดสินใจเข้าร่วมโครงการนี้ โปรดซักถามคณะผู้วิจัยได้อย่างเต็มที่

ขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

ทพญ. ทรงลักษณ์ ศรีสวัสดิ์

ผศ. ทพญ.ดร. วิไลรัตน์ วรภมร

หมายเหตุ :- กรุณาอ่านข้อความให้เข้าใจก่อนเซ็นชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการ