

บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

4.1 สารสกัดจากเปลือกต้นพยอมโดยใช้ตัวทำละลาย เอทิล อะซีเตท เอทานอล เมทานอล และน้ำ

จากการสกัดสารจากเปลือกพยอมตามวิธีในข้อ 3.1 ได้สารสกัดจากเปลือกพยอมจากตัวทำละลายแต่ละชนิดดังนี้

1. สารสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทิล อะซีเตท (EA) มีลักษณะ แข็งแห้งเป็นผลึกสีน้ำตาลเข้ม ด้านล่างของผิวหน้าสารสกัดมีลักษณะเป็นยางเหนียวหนืดสีเข้มคล้ายยางมะตอย (ภาพที่ 4.1)

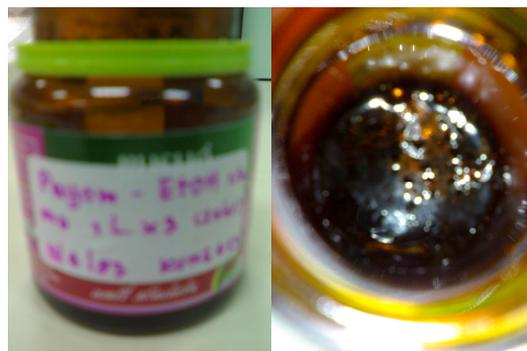
2. สารสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล (ET) มีลักษณะ เหนียวหนืด ค่อนข้างแข็ง สีน้ำตาลเข้มเกือบดำ (ภาพที่ 4.2)

3. สารสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล (ME) มีลักษณะ แข็งแห้ง สีน้ำตาลเข้มเกือบดำ (ภาพที่ 4.3)

4. สารสกัดโดยใช้ตัวทำละลายน้ำ (W) มีลักษณะ แข็งเป็นผลึกแข็ง ชุ่ม สีน้ำตาลเข้ม และผลึกบางส่วนมีสีขาว (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.1 สารสกัดเปลือกพยอม EA



ภาพที่ 4.2 สารสกัดเปลือกพยอม ET



ภาพที่ 4.3 สารสกัดเปลือกพยอม ME



ภาพที่ 4.4 สารสกัดเปลือกพยอม W

4.2 ผลการทดสอบ Antimicrobial activity โดยวิธี disc diffusion method

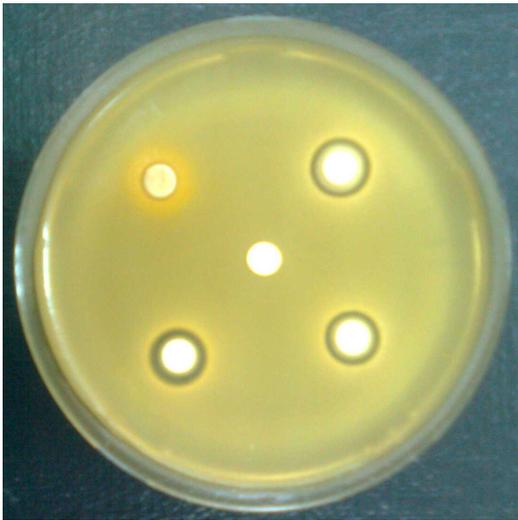
- ละลายสารสกัดที่ได้จากข้อ 4.1 ในสารละลาย DMSO (Dimethyl sulfoxide) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 mg/ml

- นำ disc ปลอดเชื้อวางลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ จากนั้นหยดสารสกัดที่ละลายแล้ว ปริมาตร 10 µl ลงบน disc จากนั้นนำ disc ที่มีสารสกัดไปวางบนผิวหน้าอาหารที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 3.2.4 โดยใช้เชื้อในการทดสอบ 6 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 , *Salmonella typhimurium* ATCC 19113, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 และ *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 และให้สารละลาย DMSO 10 µl เป็นตัวควบคุม แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดบริเวณใส เปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสของเชื้อแต่ละชนิด ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.5

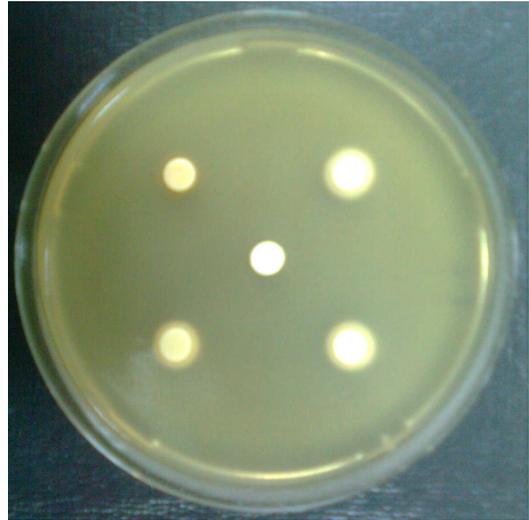
ตารางที่ 4.1 ขนาดของบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยสารสกัดพยอม

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (มม.)			
	สารสกัด EA	สารสกัด ET	สารสกัด ME	สารสกัด W
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	11	10.5	10.5	ND
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	14	13	12	8
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	14	12	12.5	ND
<i>E. coli</i> ATCC 25922	ND	ND	ND	ND
<i>S. typhimurium</i> ATCC 19113	ND	ND	ND	ND
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ : ND – ไม่สามารถวัดได้



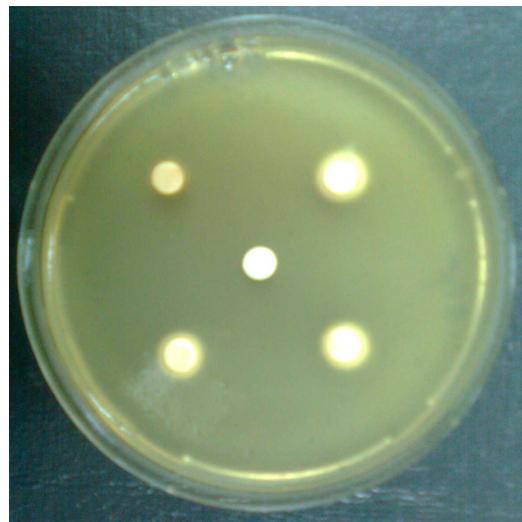
S. aureus ATCC 25923



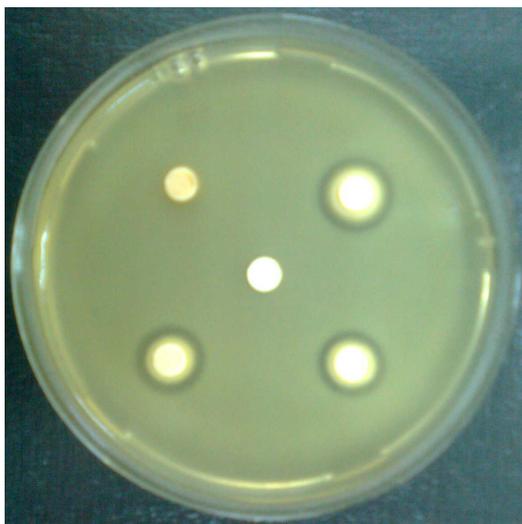
E. coli ATCC 25922



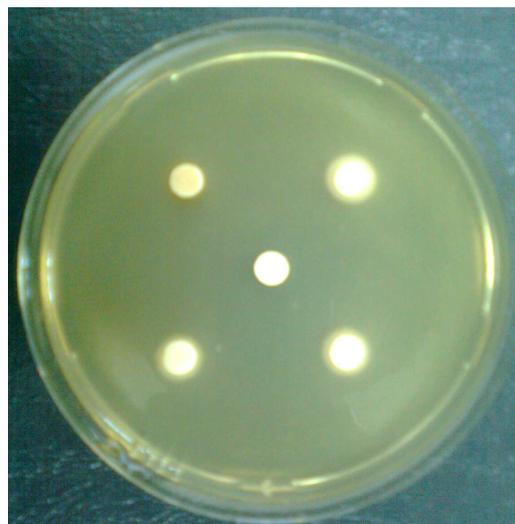
B. cereus ATCC 11778



S. typhimurium ATCC 19113



L. monocytogenes
ATCC 19115



V. parahaemolyticus
ATCC 17802

ภาพที่ 4.5 บริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยสารสกัดพยอมที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ; disc ซ้ายบน : สารสกัดพยอมที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายน้ำ (W); disc ขวาบน : สารสกัดพยอมที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทิล อะซีเตท (EA) ; disc ซ้ายล่าง : สารสกัดพยอมที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล (ME) ; disc ขวาล่าง : สารสกัดพยอมที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล (ET); disc ตรงกลาง : ตัวควบคุมคือ DMSO 10 μ l

จากผลการทดลองการทดสอบ Antimicrobial activity โดยวิธี disc diffusion method โดยใช้สารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เอทิล อะซีเตท เอทานอล เมทานอล และน้ำ ในการทดสอบยับยั้งการเจริญของเชื้อ 6 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* ATCC 25923 , *S. typhimurium* ATCC 19113, *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 25922, *L. monocytogenes* ATCC 19115 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 โดยมี DMSO เป็นตัวควบคุม ผลปรากฏว่า DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์

สารสกัดพยอมที่สกัดได้จากตัวทำละลายเอทิล อะซีเตท เอทานอล และเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ โดยสามารถวัดขนาดของเส้นผ่าน

ศูนย์กลางบริเวณใส ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้ ได้ดังนี้ คือ 11, 10.5 และ 10.5 มม. ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซีเตท มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุด และสารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเมทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากัน ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งได้น้อยกว่าสารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซีเตท สำหรับสารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพยอมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 ผลที่ได้คือ สารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 ได้ โดยสามารถวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสได้ 14, 13, 12 และ 8 ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซีเตท มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 ได้ดีที่สุด และสารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล และน้ำ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ATCC 11778 ได้น้อยลงมา ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพยอมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 19115 ผลที่ได้คือ สารสกัดพยอมที่สกัดได้จากตัวทำละลายเอทิล อะซีเตท เอทานอล และเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 19115 ได้ โดยสามารถวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้ ได้ดังนี้ คือ 14, 12 และ 12.5 มม. ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซีเตท มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ATCC 19115 ได้ดีที่สุด และสารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล และเอทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 19115 ได้น้อยลงมา ตามลำดับ สำหรับสารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ATCC 19115

สารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 19113 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 เนื่องจากไม่เกิดบริเวณใสรอบ disc ที่หยดสารสกัด

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อแต่ละสายพันธุ์ พบว่า สารสกัดพยอม สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 ได้ดีที่สุด เชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 19115 และเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 รองลงมา ตามลำดับ ในขณะที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 19113 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 ได้ และจากผลการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดพยอมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นแกรมบวกได้ แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นแกรมลบ

4.3 ค่า MIC (minimal inhibition concentration) และค่า MBC (minimal bactericidal concentration) ของสารสกัดจากเปลือกพยอม ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

- ละลายสารสกัดที่ได้จากข้อ 4.1 ตามวิธีในข้อ 3.3.1 และนำไปหาค่า MIC และ MBC ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด โดยใช้สารละลายเอทานอล 70% ปริมาตร 100 μ l ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 900 μ l เป็นตัวควบคุม เพื่อทดสอบว่าตัวทำละลายสารสกัดไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ และหาค่า MIC และ MBC ตามวิธีในข้อ 3.3 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่า MIC และ MBC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยสารสกัดพยอม

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ค่า MIC/MBC มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร							
	สารสกัด EA		สารสกัด ET		สารสกัด ME		สารสกัด W	
	ค่า MIC	ค่า MBC	ค่า MIC	ค่า MBC	ค่า MIC	ค่า MBC	ค่า MIC	ค่า MBC
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.195	0.391	0.391	0.391	0.391	0.780	3.125	6.25
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	0.049	0.195	0.098	0.098	0.098	0.098	1.560	1.560
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	0.195	0.391	0.391	0.780	0.391	0.391	3.125	12.500
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3.125	6.250	3.125	6.250	3.125	12.500	ND	ND
<i>S. typhimurium</i> ATCC 19113	12.500	12.500	12.500	12.500	25.000	25.000	ND	ND
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0.780	1.560	0.391	1.560	0.780	1.560	6.250	12.500

หมายเหตุ : ND –ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ

จากการหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดพยอมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* ATCC 25923 , *S. typhimurium* ATCC 19113, *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 25922, *L. monocytogenes* ATCC 19115 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 พบว่า สารสกัดพยอมโดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดได้ ยกเว้นสารสกัดพยอมโดยใช้ตัวทำละลายน้ำไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. typhimurium* ATCC 19113

และสารละลายเอทานอลที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (ไม่แสดงผล)

เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ของสารสกัดพยอมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียพบว่า ค่า MIC ที่ต่ำที่สุดของสารสกัดพยอม ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซีเตท ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 โดยมีค่าเท่ากับ 0.049 มก.ต่อมล. และค่า MIC สูงที่สุดของสารสกัดพยอม ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล ในการยับยั้งเชื้อ *S. typhimurium* ATCC 19113 โดยมีค่าเท่ากับ 25.000 มก.ต่อมล. โดยสารสกัดพยอมที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซีเตทมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด และสารสกัดพยอมที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยที่สุดหรือไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเลย

เมื่อเปรียบเทียบค่า MBC ของสารสกัดพยอมในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียพบว่า ค่า MBC ที่ต่ำที่สุดของสารสกัดพยอม ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซีเตท ในการฆ่าเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 โดยมีค่าเท่ากับ 0.195 มก.ต่อมล. และค่า MBC สูงที่สุดของสารสกัดพยอม ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ ในการฆ่าเชื้อ *S. typhimurium* ATCC 19113 โดยมีค่าเท่ากับ 25.000 มก.ต่อมล. โดยสารสกัดพยอมที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซีเตทมีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด และสารสกัดพยอมที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำมีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรียได้น้อยที่สุดหรือไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรียเลย

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างค่า MIC และ MBC ของสารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด พบว่าสารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซีเตท มีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด สำหรับสารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล เมทานอลและน้ำ มีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียลดน้อยลงตามลำดับ และสารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิดสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *E. coli* ATCC 25922 และ *S. typhimurium* ATCC 19113 ได้มากไปหาน้อยตามลำดับ

4.4 การแยกสารสกัดเพื่อหาสารออกฤทธิ์ที่ดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อโดยใช้ column chromatography และ gradient column chromatography

จากการทดลองหาค่า MIC และ MBC แล้ว พบว่าสารสกัดพยอมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซีเตท ให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด จึงนำสารสกัดดังกล่าวมาแยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้ column chromatography และใช้ตัวทำละลาย dichloromethane : methanol ในอัตราส่วนต่างๆ ตามวิธีในข้อ 3.4 ได้สารสกัดที่ผ่านการแยกด้วย column chromatography ทั้งหมด 5 fraction จากนั้นนำทั้ง 5 fraction มาหาค่า MIC และ MBC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่า MIC และ MBC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยสารสกัด EA ที่ผ่านการแยกด้วย column chromatography

ตัวอย่าง	ค่า MIC/MBC มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	สายพันธุ์จุลินทรีย์		
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115
SR(B)-3/1	ค่า MIC	ND	ND	ND
	ค่า MBC	ND	ND	ND
SR(B)-3/2	ค่า MIC	ND	ND	ND
	ค่า MBC	ND	ND	ND
SR(B)-3/3	ค่า MIC	0.391	0.195	0.391
	ค่า MBC	3.125	0.391	6.250
SR(B)-3/4	ค่า MIC	ND	0.195	0.780
	ค่า MBC	ND	0.391	6.250
SR(B)-3/5	ค่า MIC	0.195	0.195	0.195
	ค่า MBC	1.560	0.391	3.125

หมายเหตุ : ND –ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ

จากการทดลองพบว่าสาร SR(B)-3/1 และ SR(B)-3/2 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ และสาร SR(B)-3/4 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 แต่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ATCC 11778 และ *L. monocytogenes* ATCC 19115 โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.195 และ 0.391 มก.ต่อมล.ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 และ 0.780 และ 6.250 มก. มล. ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 19115

สำหรับสาร SR(B)-3/5 ให้ฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าจุลินทรีย์ทั้งสามสายพันธุ์ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC ที่ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.195 มก.ต่อมล. ในการยับยั้งเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ และค่า MBC ที่ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.391 มก.ต่อมล. ในการฆ่าเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 และสาร SR(B)-3/3 และ SR(B)-3/4 มีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าจุลินทรีย์ได้น้อยลงตามลำดับ

จากการทดลองหาค่า MIC และ MBC แล้ว พบว่าสาร SR(B)-3/5 ให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด จึงนำสารสกัดดังกล่าวมาแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อโดยใช้ gradient column chromatography และใช้ตัวทำละลาย dichloromethane : methanol โดยเพิ่มปริมาณ methanol ขึ้นทีละ 5% ตามวิธีในข้อ 3.4 ได้สารสกัดที่ผ่านการแยกด้วย gradient column chromatography ทั้งหมด 9 fraction จากนั้นนำทั้ง 9 สาร มาหาค่า MIC และ MBC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่า MIC และ MBC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 โดยสารสกัด SR(B)-3/5 ที่ผ่านการแยกด้วย gradient column chromatography

ตัวอย่าง	ค่า MIC มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	ค่า MBC มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
SR(B)-8/1	0.365	0.365
SR(B)-8/2	0.313	0.313
SR(B)-8/3	2.250	2.250
SR(B)-8/4	0.625	0.625
SR(B)-8/5	0.210	0.420
SR(B)-8/6	0.190	0.190
SR(B)-8/7	0.410	0.810
SR(B)-8/8	0.390	0.390
SR(B)-8/9	0.810	0.810

จากการทดลองพบว่าสารตัวอย่างทั้ง 9 มีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ โดยสาร SR(B)-8/6 มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุดซึ่งมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.190 มก.ต่อมล. และสาร SR(B)-8/5 มีฤทธิ์ในการยับยั้งรองลงมาซึ่งมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.210 และ 0.420 มก.ต่อมล. และสาร SR(B)-8/3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งน้อยที่สุดซึ่งมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 2.250 มก.ต่อมล.

จากการทดลองหาค่า MIC และ MBC แล้ว พบว่าสาร SR(B)-8/6 และ SR(B)-8/5 ให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด จึงนำสารสกัดดังกล่าวมาแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อ โดยใช้ gradient column chromatography และใช้ตัวทำละลาย dichloromethane : methanol โดยเพิ่มปริมาณ methanol ขึ้นทีละ 5% ตามวิธีในข้อ 3.4 ได้สารสกัดที่ผ่านการแยกด้วย gradient column chromatography จากสาร SR(B)-8/5 ทั้งหมด 4 fraction และจากสาร SR(B)-8/6 ทั้งหมด 6 fraction จากนั้นนำทั้ง 10 สาร มาหาค่า MIC และ MBC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 และทดสอบความบริสุทธิ์ของสารโดย Thin layer chromatography และใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลาย dichloromethane : methanol ในอัตราส่วน 4:1

ตารางที่ 4.5 ค่า MIC และ MBC ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 โดยสารสกัด SR(B)-8/5 และ SR(B)-8/6 ที่ผ่านการแยกด้วย gradient column chromatography

ตัวอย่าง	ค่า MIC มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	ค่า MBC มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	ความบริสุทธิ์
SR(B)-10/1	0.590	0.590	ผสม
SR(B)-10/2	0.333	0.665	ผสม
SR(B)-10/3	0.219	0.875	ผสม
SR(B)-10/4	1.325	2.650	ผสม
SR(B)-12/1	0.214	0.856	ผสม
SR(B)-12/2	0.201	0.402	บริสุทธิ์
SR(B)-12/3	0.395	0.395	ผสม
SR(B)-12/4	0.224	0.446	บริสุทธิ์
SR(B)-12/5	0.206	0.822	ผสม
SR(B)-12/6	0.412	0.412	ผสม

จากการทดลองพบว่าสารตัวอย่างทั้ง 10 มีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ โดยสาร SR(B)-12/2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุดซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 0.201 มก.ต่อมล. และสาร SR(B)-12/3 มีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรียดีที่สุดซึ่งมีค่า MBC เท่ากับ 0.395 มก.ต่อมล. และสาร SR(B)-10/3, SR(B)-12/1, SR(B)-12/4 และ SR(B)-12/5 มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.206-0.224 มก.ต่อมล. และค่า MBC อยู่ระหว่าง 0.446-0.875 มก.ต่อมล. สำหรับสาร SR(B)-10/1, SR(B)-10/2, SR(B)-10/4 และ SR(B)-12/6 มีค่า MIC และ MBC มากกว่า 0.333 และ 0.412 มก.ต่อมล. ขึ้นไป ตามลำดับ

จากการทดสอบความบริสุทธิ์พบว่าสาร SR(B)-12/2 และสาร SR(B)-12/4 เป็นสารที่คาดว่าบริสุทธิ์เนื่องจากการทดสอบบน thin layer chromatography ให้แถบสารเพียงแถบเดียว ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุดคือสาร SR(B)-12/2 และเป็นสารบริสุทธิ์