บทที่ 10

การใช้ประโยชน์สารทุติยภูมิในพืชและเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของพืช : คุณสมบัติการต่อต้านแบคทีเรียของสารลิกแนนจากพรรณไม้ในเขตบริเวณพื้นที่มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา

โดย ดวงพร เปรมจิต[1]

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร[1]

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สารกลุ่มลิกแนนเป็นสารที่พบในพืชหลายชนิด สารลิกแนนอยู่ในกลุ่มสารที่เป็นฮอร์โมนที่ได้จากพืช (Phytoestrogen) ซึ่งออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่างเช่นเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ (Antioxidant) สารต่อต้านมะเร็ง (Anticancer) สารต่อต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial) มีรายงานการพบลิกแนนในเมล็ดลินิน งา ฟักทอง ข้าวไรย์ ถั่วเหลือง พืชอื่นๆ เช่น บรอกโคลี และในผลไม้หลายๆ ชนิด (Ayres and Loike 1990, Hiroyuki *et al.*, 2003) สารลิกแนนเป็นสารพวกโพลีฟีนอลสังเคราะห์มาจากสารตั้งต้นคือ Phenylalanine สารในกลุ่มนี้เกิดขึ้นจากการรวมตัวของสาร Cinamic alcohol เป็นไดเมอร์แล้วโครงสร้างถูกดัดแปลงไปเป็นDibenzylbutane skeleton ซึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็นสารอื่นๆอีกมากมายหลายชนิด โดยสารเหล่านี้มีโครงสร้างแกนหลักเป็นC_6C_3 เมื่อเรารับประทานพืช ผักที่มีสารลิกแนนเข้าไป สารลิกแนนเหล่านี้จะถูกย่อยและเปลี่ยนไปเป็น enterodiol และ enterolactone โดยแบคทีเรียในลำไส้เล็ก (Ayres and Loike ,1990)

เนื่องจากสารลิกแนนมีความสำคัญต่อมนุษย์มากเป็นทั้งอาหารและยาดังที่ได้กล่าวมา นอกจากนั้นยังเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้กว้างขวาง ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาพืชพรรณไม้ซึ่งอาจจะเป็นสมุนไพรหรือไม่ใช่สมุนไพรที่กระจายตัวอยู่ในเขตบริเวณพื้นที่มหาวิทยาลัยนเรศวรวิทยาเขตสารสนเทศพะเยาเพื่อนำมาคัดแยกหาสารลิกแนน ซึ่งอาจจะนำไปสู่การพบพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพสามารถนำมาเป็นแหล่งหลักของสารลิกแนนที่จะไปประยุกต์ใช้งานต่อไปตามความเหมาะสมทั้งยังช่วยให้การอนุรักษ์พรรณไม้นั้นได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ไปควบคู่กัน

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจากพันธุ์ไม้ในเขตมหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยาที่ผ่านการคัดกรองสารลิกแนนกลุ่ม aryltetralin

การทบทวนวรรณกรรมและเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลิกแนนเป็นสารพวกโพลีฟีนอลเกิดจากการรวมตัวของ cinamic alcohol เป็นไดเมอร์ จากนั้นมีการดัดแปลงไปเป็น dibenzylbutane skeleton ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นสารอื่นๆได้หลายชนิดโดยสารเหล่านี้มีโครงสร้างเป็นหลักเป็น C_6C_3 แบ่งเป็นกลุ่มดังนี้ คือ Tetrahydrofurans Furofurans และ Aryltetrahydronapthalene (Tetralin lignans) (Freudenberg and Weinges .,1961) สารลิกแนนที่มีความสำคัญมากในปัจจุบันนี้คือ podophyllotoxin ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยารักษามะเร็งปอด มะเร็งรังไข่ มีชื่อการค้าว่า etoposide teniposide แหล่งของ podophyllotoxin คือเหง้าของพืชที่ชื่อว่า *Podophyllum peltatum* ซึ่งกำลังสูญพันธุ์ สารลิกแนนกลุ่มต่าง ๆ นั้นพบได้ในพืชทั่วไปทั้งมีดอกและไม่มีดอกหลายชนิดโดยไม่จำกัดวงศ์ เช่น พืชในวงศ์ Berberidaceae Cupressaceae Linaceae Polygalaceae เป็นต้น (Broomhead and Dewick 1990, Hartwell *et. al.* 1953, Hokanson, 1978) ดังนั้นการคัดเลือกพืชมีสารลิกแนนเป็นองค์ประกอบ จากพรรณไม้ในบริเวณมหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยานั้นเพื่อสร้างโอกาสทางการค้นพบพืชชนิดใหม่ที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยารักษามะเร็ง หรือ สารต่อต้านจุลินชีพหรือ สารต่อต้านไวรัส ซึ่งขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นจะดำเนินการหลังจากการคัดเลือกพืช (Thurston, *et. al.* 1986)

การใช้ลิกแนนในทางการแพทย์แผนโบราณและสมัยใหม่

ลิกแนน มีประวัติที่ยาวนานและน่าทึ่ง ในยาแผนโบราณ ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามวัฒนธรรมของท้องที่นั้นๆ การบันทึกครั้งแรกสุดในการใช้ลิกแนนในทางการแพทย์ ต้องย้อนหลังไปกว่า 1,000 ปี (Kelly and Hartwell , 1954) จากหนังสือ Leech book of BALD ซึ่งเป็นหนังสือเกี่ยวกับการแพทย์ฉบับแรกๆของประเทศอังกฤษ (Cockayne , 1961) รากของต้น Chervil ป่า ซึ่งประกอบด้วยลิกแนนจำพวก deoxypodophyllotoxin ถูกนำมาใช้เพื่อบรรเทาอาการของโรคมะเร็ง ประมาณ 400-600 ปีที่แล้ว ชาวเขาหิมาลัย และชาวอินเดียนแดง ค้นพบว่ายางไม้ที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์จากรากและลำต้นใต้ดินของ *Podophyllum perennial* มีสรรพคุณเป็นยาระบาย นอกจากนั้นยังเป็นยารักษาพิษจากงูได้เช่นกัน ชาวอเมริกันก็มีการใช้ รากและลำต้นใต้ดิน ของต้น May Apple (American Mandrake) โดยใช้เป็นยาระบาย ยาถ่ายพยาธิ รักษาโรคโลหิตจาง และแก้ผดผื่น (Kelly and Hartwell , 1954 ; Hartwell and Schrecker, 1954) ในจีนและญี่ปุ่นมีการใช้พืชชนิดที่อุดมไปด้วย ลิกแนน แต่ส่วนประกอบต่างๆของพืชเหล่านี้ยังไม่ได้รับการพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์ อย่างไรก็ตามมีรายงานการใช้ปรากฏอยู่เป็นหลักฐานทางการแพทย์จากหนังสือ Chinese Pharmacopoeia บันทึกไว้ว่า รากแห้งและลำต้นของ *Kadsura coccinea* [Lem. A.C. Smith (Schizandraceae)] ซึ่งเป็นพืชล้มลุกนำมาใช้รักษาโรคไขข้ออักเสบ และ แผลในลำไส้ (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 1977) รากของพืชชนิดนี้ ประกอบด้วย

ลิกแนนจำพวก dibenzocyclo-octadiene ถึง 10 ชนิด (Lianniang ., *et al* , 1985) อีกตัวอย่างหนึ่งเป็นการใช้เปลือกไม้ของ *Fraxinus mandshuria* เป็นส่วนประกอบในยาแผนโบราณของจีนที่ชื่อว่า "qin pi" พบลิกแนนได้มากถึง 8 ชนิดเป็นอย่างต่ำ (Wu .,*et al,* 1983) ต่อมา Tsukamoto และคณะ (1984a) ค้นพบลิกแนน 8 ชนิด จากเปลือกไม้ของ *Fraxinus mandshuria* Rupr. Var japonica Maxim (Oleaceae) โดย 3 ใน 8 ชนิดที่ค้นพบนั้น เป็นลิกแนนชนิดใหม่ ในญี่ปุ่นพบรายงานการใช้ เปลือกไม้แห้งของ *F. japonica* Blume ปั่นยาขับปัสสาวะ แก้ไข้ แก้อักเสบ และรักษาโรคไขข้อ (Kariyone and Kimura, 1976) พบว่าลิกแนนเหล่านี้มีคุณสมบัติยับยั้งกระบวนการ cyclic adenosine monophosphate และสามารถแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีเช่นกัน

สมัยโบราณ แถบเอเชียมีการใช้ เปลือกของ *Olea europaea* L. เป็นยาแก้อาการไข้ รักษาไขข้อ ยาบำรุง และรักษาวัณโรคต่อมน้ำเหลืองในคอ Tsukamoto และคณะ (1984b) สามารถสกัดลิกแนนได้จากเปลือกไม้ชนิดนี้ ซึ่งคุณสมบัติทางยาดังกล่าวอาจมาจาก สารที่พบในเปลือกไม้ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านการทำลายจากโรคและศัตรู

จากรายงานการใช้ลิกแนนเป็นยาแผนโบราณอย่างแพร่หลาย ทำให้มีข้อสงสัยว่า สารประกอบหลักของลิกแนน สามารถพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ รวมทั้งใช้ในการรักษาโรคได้ ดังนั้นการคัดแยกและการจำแนกคุณสมบัติทางเคมี ของลิกแนนเหล่านี้ พร้อมทั้งการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวิจัยในอนาคต

การวิจัยลิกแนนและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากพืชวงศ์ต่างๆ

มีนักวิจัยจำนวนมากที่สนใจในการค้นพบสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แต่การเพิ่มขึ้นของสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ดื้อยาได้หลายชนิด และคุณสมบัติการลดประสิทธิภาพการทำงานของสารต่อต้านอนุมูลอิสระ จึงนำมาสู่ความต้องการที่จะศึกษาค้นคว้าสารต่อต้านการเกิดโรคโดยเชื้อจุลินทรีย์ ในทางการแพทย์ การรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์เป็นเรื่องยาก เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ที่ดื้อยาได้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น แต่ปัจจุบันมีการค้นพบสารประเภท secondary metabolites ที่มีคุณสมบัติต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนั้นยังได้ทำการพัฒนามาเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์เพื่อใช้รักษาโรคต่างๆที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ดังนั้นนักวิจัยจึงได้มีความสนใจในการศึกษาสารประเภท secondary metabolites ที่มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย, เชื้อรา และ ไวรัส

มีพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งคุณสมบัติเช่นนี้ สามารถนำไปใช้พัฒนาในการจัดการโรคที่เกี่ยวกับแบคทีเรียได้ (Narasimhan ., *et al* , 1995) โดย Sateesh และคณะ (2004) พบว่าพืชในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา *R.solani* และแบคทีเรีย *X.oryzae* pv. *Oryzae* ยกตัวอย่างเช่น สารสกัดจากใบของ *D.metal, Z.jujub* และ, *I.camea* โดยเฉพาะสารสกัด

เมธานอลจะให้ฤทธิ์ในการยับยั้งสูงที่สุด และ สารสกัดใบของ *Artabotrys hexapetalus* ให้ผลในการยับยั้ง แบคทีเรีย *X.oryzae* pv. *Oryzae* ได้ดี (Grainge and Alvarez, 1987) นอกจากนี้ Eswaramurthy และคณะ (1993) พบว่าสารสกัดจากใบของ *A.indica* มีฤทธิ์ต้านการเจริญของโรคไหม้บนเมล็ดข้าวที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย เช่นเดียวกับ Gangopadhyay (1998) ที่พบว่าเมื่อใช้สารสกัดจากขมิ้น (*Curcuma longa*) แล้วสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *X.oryzae* pv. *oryzae* ที่เจริญบนต้นข้าวได้

Nakatani และคณะ (1988) พบว่าเปลือกหุ้มเมล็ดของ *Myristica argentea* มีลิกแนนชนิด 1,4-diaryl-2,3-dimethylbutane 4 ชนิด คือ *erythro*-austrobailignan-6 , *meso*-dihydroguaiaretic acid, *rel*-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2,3-dimethylbutan-1-o1 (myristargenol A) และ*rel*-1,4-di(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2,3-dimethylbutan-1-o1 (myristargenol B) สารเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้ง *Streptococcus mutans*

Paulethi และ คณะ (2000) วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจากใบของ *Styrax ferrugineus* พบสารลิกแนน 5 ชนิดคือ 1) 5-[3″-(β-D -glucopyranosyloxy)propyl]-7-methoxy-2-(3′,4′-dimethoxyphenyl) benzofuran 2) *nor*-lignans 5-(3″-hydroxypropyl)-7-methoxy-2-(3′,4′-methylenedioxyphenyl) benzofuran 3) 5-(3″-hydroxypropyl)-7-methoxy-2-(3′,4′-dimethoxy-phenyl)- benzofuran 4) 5-[3″-(β-D-glucopyranosyloxy)propyl]-7-methoxy-2-(3′,4′-methylene-dioxyphenyl) benzofuran และ 5) lignan, dihydrodehydrodiconiferyl alcohol ลิกแนนทุกชนิดที่พบมีฤทธิ์ในการต่อต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

Kazuyoshi และคณะ (2001) เสนอรายงานการสกัดสารลิกแนนชนิดใหม่จาก *Vitex rotundifolia* วงศ์ Verbenaceae พืชชนิดนี้เจริญเติบโตได้ดีบริเวณชายหาดของประเทศญี่ปุ่นหรือชายหาดแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ คนญี่ปุ่นเรียกผลของพืชชนิดนี้ว่า Mankeishi ในสมัยโบราณคนจีน ญี่ปุ่นใช้สารสกัดจากผลไปทำยาแก้หวัด และลดอาการอักเสบจากการติดเชื้อ มีการวิจัยก่อนหน้านี้สามารถสกัดสาร iridiods และ diterpenoids จากผล *V. rotundifolia* แต่ยังไม่มีรายงานสารลิกแนน กลุ่มวิจัยนี้พบว่ามีสารลิกแนน 1-phenylnaphthalene เป็นแกนในโครงสร้าง จำนวน 9 ชนิด เช่น vitrofoal D, vitrofoal E, vitrofoal F ซึ่งพบว่ามีสาร ลิกแนนที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ mrthicillin-resistant *Staphylococus aureus* (MRSA)

Carlos และคณะ (2006) พบว่าสารสกัด เมทานอลจากเนื้อไม้ของ *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch มีสารลิกแนน 5 ชนิด ได้แก่ secoisolariresinol, pinoresinol, eudesmin,lariciresinol และ larisiresinol-4-methyl ether ได้นำสารลิกแนนที่แยกได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย รา และยีตส์ โดยมีตัวแทนแบคทีเรียในการศึกษา ได้แก่ *Citrobacter* sp., *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, และ *Pseudomonas aeruginosa* ส่วนราที่ใช้ศึกษาได้แก่ราที่พบในราก เช่น *Mucor niehei*, *Paecilomyces variotii*, *Ceratocysti pilifera*,

Trametes vesicolor, *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme* , *F. sporotrichum* และ *Trichophyton mentagrophytes* และ ยีตส์ คือ *Candida pilifera* พบว่า pinoresinol สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ secoisolariresinol ออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา เช่น *T. vesicolor* และ *C. pilifera* ที่ความเข้มข้น 300-400 ไมโครกรัม/ ดิสค์ ตามลำดับ นอกจากนั้นสารสกัดเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตอย่างสิ้นเชิงต่อ *T. vesicolor* , *Fusarium* spp และ ยับยั้ง *Trichophyton mentagrophytes* ที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/ ดิสค์

วิธีการดำเนินการวิจัย

การทดลองในโครงการวิจัยนี้นำสารสกัดเมทานอลจากพืชที่ผ่านการคัดกรองสารลิกแนนโดย TLC มาทำการทดสอบฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรีย 3 ชนิดคือ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* โดยวิธี disc diffusion method

เครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

(1) มีด เขียง (2) โกร่งบดยา (Motar) (3) ฟาสก์ก้นกลม (Round bottom flask) (4) กรวยแยกสาร (Separating funnel) (5) ชุดเครื่องกรอง (Sartorin) (6) กระดาษกรอง (7) เครื่อง Rotary evaporator (8) Hot Air Oven (9) Autoclave (10) Larmina airflow (11) Hot plate (12) Vortex (13) pH meter (14) Light microscope (15) Incubator (16) เครื่องชั่ง 2, 4 ตำแหน่ง (17) Paper disc (18) Pipette-man (19) Pasture pipettes (20) Tip (21) Beaker (22) Erlenmayer flask (23) Petridish (24) test tube (25) Magnetic bar (26) Incubator loop (27) Incubator (28) แท่งแก้วรูปตัวแอล (29) Haemacytometer

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

- *Staphylococus aureus* TISTR No. 118 (Gram positive)
- *Bacillus subtilis* TISTR No. 008 (Gram positive)
- *Escherichia coli* TISTR No. 780 (Gram negative)

การเตรียมสารสกัดจากไม้ยืนต้นตัวอย่าง

การสกัดสารใช้เมทานอล (AR-grade) เป็นตัวทำละลาย โดยมีขั้นตอนดังนี้

- หั่นพืชเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้น้ำหนักแห้งคงที่

- บดพืชที่แห้งแล้วด้วยโกร่งบดยา (Motar) เก็บน้ำหนักแห้ง แล้วนำผงพืชแห้งเก็บไว้ใน Desiccators

- ชั่งผงสมุนไพร 25 กรัม หมัก (Maceration) ในเมทานอล 300 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48-60 ชั่วโมง

- กรองแยกส่วนกากออก โดยใช้ Vacuum

-นำส่วนของเหลวที่กรองได้ใส่ใน round bottom flask แล้วไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 ° C ภายใต้ความดันต่ำ ทำการระเหยเมทานอลออกจนกระทั่งได้สารสกัด (crude extracts) เก็บสารสกัดในหลอดทดลองปิดพาราฟิล์ม เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 ° C เพื่อใช้งานในการทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านแบคทีเรีย

การทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านแบคทีเรียโดยวิธี Agar Disc Diffusion Method

(1) วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

- เตรียม Nutrient Agar (NA) เพื่อใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษา องค์ประกอบตามสูตรมาตรฐาน อาหารที่ใช้อยู่ในรูปของอาหารแข็ง (solid medium) สแลนท์ (slant) ก่อนนำอาหารแข็งมาใช้งานให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

(2) วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

- วิธีการทำให้แบคทีเรีย active โดยการนำเชื้อแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด NB (Nutrient broth) จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้ shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- นำเชื้อแบคทีเรียที่บ่มแล้วมาทำ Cross streak ด้วย inoculation loop เพื่อหาโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง NA ในเพลตที่ผ่านการอบมาแล้ว

- นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหาร NA มา streak บนอาหารวุ้นเอียง (NA slant) บ่มข้ามคืน เก็บไว้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทดสอบ (start material)

-เขี่ยเชื้อจากอาหารวุ้นเอียง 1-2 loop เลี้ยงในอาหารเหลว NB บ่มข้ามคืน เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่บ่มได้ไปทำการนับจำนวนเซลล์ เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมในการทดสอบต่อไป

(3) วิธีการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย

- นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการบ่ม 18 ชั่วโมงแล้วมาทำ Serial dilution เพื่อเจือจางเซลล์จนได้ปริมาณเซลล์ 5 x10^8 เซลล์/มิลลิลิตร

- ทำการนับจำนวนเซลล์ใน heamacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า คำนวณปริมาตรเซลล์ที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 5 x10^8 เซลล์ นำไป spread ลงบนอาหารในเพลตที่จะทำการทดสอบ

(4) วิธีการทดสอบหาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแบบ Agar Disc Diffusion

- เพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวน เซลล์ 5 x10^8 เซลล์โดยการ spread ด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม บนอาหารแข็ง เมื่อเชื้อแห้งแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- การทดลองที่เป็นตัวควบคุม ได้แก่ disc ที่ชุบยาปฏิชีวนะ 3 ชนิดคือ Kanamycin, ampicillin, penicillin, methanol และ disc เปล่า

- การทดลองชุดทดสอบ คือ disc ชุบสารสกัดเมทานอลของส่วนต่างๆของไม้ยืนต้น

(5) วิธีการเก็บผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย

-นำ Petri dish ที่ทำการทดสอบทั้งหมดบ่มข้ามคืน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทำการวัด clear zone

- ทำการวัดโดยใช้ไม้บรรทัดวัดในแนวนอนและแนวตั้งนำผลการวัดจากการทดลอง 3 ซ้ำ (3 replicate) แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.D.)

ผลการศึกษาวิจัย

การคัดกรองลิกแนนจากตัวอย่างไม้ยืนต้นโดย TLC

ป่าในเขตพื้นที่มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยาเป็นป่าเต็งรัง พรรณไม้ที่สนใจเก็บมาศึกษาเป็นตัวอย่างในการศึกษามีจำนวน 80 ชนิด จำแนกเป็น 32 วงศ์ (อ้างอิงชื่อวงศ์,ชื่อพื้นเมืองและชื่อวิทยาศาสตร์จากหนังสือ ชื่อพรรณไม้ของประเทศไทย(เต็ม , 2544)) จากตัวอย่างทั้งหมดสามารถคัดกรองไม้ยืนต้นที่มีผลทดสอบ TLC ปรากฏแถบของสารลิกแนนจำนวน 15 วงศ์ ได้แก่วงศ์ Araliaceae, Aslepiadaceae, Bignoniceae, Celastraceae, Ericaceae, Euphobiaceae, Flacourtiaceae, Labiatae, Leguminosae-Caesalpinoideae, Leguminosae-Papillinoideae, Myrtaceae, Ochnaceae, Opilliaceae, Rubiaceae และ Strychnaceae โดยวงศ์ Leguminosae-Papillinoideae สามารถคัดกรองลิกแนนจากชนิดพืชได้มากที่สุดถึง 9 ชนิด รองลงมาคือ Rubiaceae และ Euphobiaceae ซึ่งมี 6 และ 4 ชนิดตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10.1

ตารางที่ 10.1. แสดงวงศ์ ชื่อพื้นเมือง ชื่อวิทยาศาสตร์ ส่วนของพืชตัวอย่างที่คัดกรองพบลิกแนนโดย TLC (นพดล และคณะ , 2552a,b)

วงศ์	ชื่อพื้นเมือง	ชื่อวิทยาศาสตร์	ลิกแนน		
			เปลือก	ใบ	กิ่ง
Araliaceae	อ้อยช้าง	*Heteropanax fragrans* (Roxb. ex DC.) Seem.	√	√	-
Asclepiadaceae	เถาเอนอ่อน	*Cryptolesis buchanani* Roem&Schult.	-	-	√
Bignoniaceae	กาสะลองคำ	*Radermachera irnea* (Kurz) Steenis	√	√	-
	แคดอกลาย	*Stereospermum neuranthum* Kurz	√	-	-
	แคทราย	*Stereospermum colias* (Buch.Ham. Ex Dillwyn) Mabb	√	-	-
	เพกา	*Oroxylum indicum* (L.) Kurz	√	√	-
Celastraceae	มะแตกเครือ	*Celastrus paniculata* Willd.	√	√	-
Ericaceae	ดาวราย	*Craibiodendron stellatum* (Pierre) W.W.Sm	-	√	-
	ส้มปี้	*Vaccinium sprengelii* (G.Don.) Sleumer	-	√	-
Euphorbiaceae	ผักขี้มด	*Glichidion hirsutum* (Roxb.) Voigt	-	√	-
	มะเม่าสาย	*Antidesma acidum* Retz.	-	√	-
	สลีนก	*Balakata baccata* (Roxb.) Esser	√	√	√
	เหมือดหลวง	*Aporosa villosa* (Wall. Ex Lindl.) Baill.	√	-	-
Flacourtiaceae	ตะขบป่า	*Flacourtia indica* (Burm.f.) Merr.	√	√	-
Labiatae	กาสามปีก	*Vitex peduncularis* Wall. Ex Schauer	-	√	-
	ตีนนก	*Vitex pinnata*	-	√	-
	สัก	*Tectona grandis* L.f.	√	√	-
	สักขี้ไก่	*Premna tomentosa* Willd.	√	-	-
Leguminosae-Caesalpiniodeae	คูน	*Cassia fistula* L.	√	√	-
Leguminosae-Papilionoideae	เก็ดแดง	*Dalbergia dongnaiensis* Pierre	√	-	-
	ครามป่า	*Indigofera caloneura* Kurz	-	√	-
	เครือปี้	*Dalbergia velutina* Benth.	-	√	√
	เครือพันขวา	*Millettia extensa* Benth.	-	√	√
	เครือพันซ้าย	*Spatholobus parviflorus* (DC.) Kuntze	-	√	-
	เครือไหล	*Millettia pachycarpa* Benth.	-	-	√
	ทองหลางป่า	*Erythrina subumbrans* (Hassk.) Merr.	-	√	-
	ประดู่	*Pterocarpus marcocarpus* Kurz	√	-	-
	ปี้พง	*Dalbergia cana Graham* ex Kurz	√	-	-

ตารางที่ 10.1. แสดงวงศ์ ชื่อพื้นเมือง ชื่อวิทยาศาสตร์ ส่วนของพืชตัวอย่างที่คัดกรองพบลิกแนนโดย TLC (ต่อ)

วงศ์	ชื่อพื้นเมือง	ชื่อวิทยาศาสตร์	ลิกแนน		
			เปลือก	ใบ	กิ่ง
Myrtaceae	เคาะ	*Tristaniopsis burmanica* (Griff.) Peter G. Wilson & J.T. Waterh. Var. *rufescens* (Hence) J.Parn.&Nic Lughadha	√	√	-
	มะห้า	*Syzygium albiflorum(*Duthie & Kurz) Bahadur & R.C.Guar	-	√	-
	หว้า	*Syzygium cumini* (L.) Skeels	√	√	-
Ochnaceae	ตานเหลือง	*Ochna intergerrima* (Lour.) Merr.	-	√	-
Opiliaceae	ผักหวานป่า	*Melientha suavis* Pierre	√	√	√
Rubiaceae	กว้าว	*Haldina cordifolia* (Roxb.) Ridsdale	-	√	√
	คำมอกน้อย	*Gardenia obtusifolia* Roxb. ex Kurz	√	-	-
	เค็ด	*Catunaregam tomentosa* (Blume ex DC.) Tirveng.	√	√	-
	ตุ้มกว้าว	*Mitragyna rotundifolia* (Roxb.) Kuntze	-	√	-
	มะคังแดง	*Dioecrescis erythroclada* (Kurz) Tirveng.	√	√	-
	ยอป่า	*Morinda coreia* Ham.	√	√	-
Strychnaceae	แสลงใจ	*Strychnos nux-vomica* L.	√	√	-

√ หมายถึง พบแถบลิกแนน - หมายถึง ไม่พบแถบลิกแนน

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแบบ Agar Disc Diffusion

จากขั้นตอนทำการคัดกรองสารลิกแนนตัวอย่างไม้ยืนต้นโดย TLC สามารถคัดไม้ยืนต้นจำนวน 15 วงศ์ 35 สปีชีส์ รวมตัวอย่างทั้งหมด จำนวน 60 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นตัวอย่างจากส่วนเปลือกจำนวน 21 ตัวอย่าง ใบ 30 ตัวอย่าง และกิ่ง 7 ตัวอย่าง นำสารสกัดจากตัวอย่างทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแบบ Agar Disc Diffusion ตัวแทนแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ในการทดลองนี้มีสองชนิด ได้แก่ *S. aureus* และ *B. subtilis* ส่วนตัวแทนแบคทีเรียแกรมลบคือ *E. coli*

สารสกัดเมทานอลของตัวอย่างที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในเพลทเกิดเป็นวงใส (Zone of inhibition) วัดขนาดวงใสและบันทึกผลดังอธิบายในบทที่ 2 โดยใช้เปรียบเทียบผลกับ Kanamycin, Ampicillin, และ Penicillin ซึ่งเป็นตัว positive control และเปรียบเทียบผลกับ น้ำ และ เมทานอล ที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัด ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียดังแสดงตารางที่ 10.2

ตารางที่ 10.2. แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากตัวอย่างไม้ยืนต้นในเขตมหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา

DISC	Zone of growth inhibition (mm.)*		
	S.aureus	*B.subtilis*	*E.coli*
Control	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Distilled water	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Methanol	2.00±0.4	5.00 ±1.0	5.00±0.4
Kanamycin 30 μg	14.6±4.0	29.3±0.5	18.0±1.32
Ampicillin 10 μg	23±1.7	16.3± 2.5	10.5±1.3
Penicillin 10 μg	27.8±5.5	16.7±2.5	6.3±0.4
Heteropanax fragrans (Roxb. ex DC.) Seem.			
- Bark	3.3±1.6	4.8±2.4	0.0
- Leaf	3.3±1.3	5.9±0.6	0.0
Cryptolesis buchanani Roem&Schult.			
- Stem	4.2±1.6	0.0	2.3±1.2
Radermachera irnea (Kurz) Steenis			
- Leaf	5.0±1.3	0.0	5.8±1.8
Stereospermum neuranthum Kurz			
- Bark	5.7±1.8	3.8±1.5	2.2±1.3
Stereospermum colias (Buch.-Ham. Ex Dillwyn) Mabb			
- Bark	2.7±0.4	2.3±0.5	1.0±0.0
Oroxylum indicum (L.) Kurz			
- Bark	4.3±0.2	10.0±1.2	4.5±1.0
- Leaf	4.5±1.3	6.7±1.0	2.0±0.6
Vaccinium sprengelii (G.Don.) Sleumer			
- Leaf	9.2±1.7	0.0	0.0
Antidesma acidum Retz.			
- Leaf	3.2±0.9	1.3±0.6	0.0

ตารางที่ 10.2. แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากตัวอย่างไม้ยืนต้นในเขตมหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา (ต่อ)

DISC	Zone of growth inhibition (mm.)*		
	S.aureus	*B.subtilis*	*E.coli*
Control	0.0	0.0	0.0
Distilled water	0.0	0.0	0.0
Methanol	2.0±0.4	5.0 ±1.0	5.0±0.4
Kanamycin 30 μg	14.6±4.0	29.3±0.5	18.0±1.3
Ampicillin 10 μg	23±1.7	16.3± 2.5	10.5±1.3
Penicillin 10 μg	27.8±5.5	16.7±2.5	6.3±0.4
Balakata baccata (Roxb.) Esser - Bark	0.0	11.7±0.6	1.7±0.3
- Leaf	1.0±0.0	1.7±2.1	1.00±0.0
- Stem	2.8±0.4	11.0±1.7	5.8±1.4
Aporosa villosa (Wall. Ex Lindl.) Baill. - Bark	2.0±1.00	0.0	0.0
Flacourtia indica (Burm.f.) Merr. - Leaf	3.2±0.3	0.0	0.0
Vitex peduncularis Wall. Ex Schauer - Leaf	5.0±1.6	6.4±0.0	0.0
Vitex pinnata - Leaf	9.2±1.26	9.5±2.3	0.0
Tectona grandis L.f. - Leaf	1.7±0.6	8.2±0.6	0.0
Premna tomentosa Willd. - Bark	1.8±1.0	2.2±1.0	4.0±2.0
Cassia fistula L. - Bark	2.2±0.8	4.3±1.5	0.0
- Leaf	3.0±1.0	5.2±1.8	1.3±0.6
Indigofera caloneura Kurz - Leaf	2.7±0.7	0.0	0.0

ตารางที่ 10.2. แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากตัวอย่างไม้ยืนต้นในเขตมหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา (ต่อ)

DISC	Zone of growth inhibition (mm.)*		
	S.aureus	*B.subtilis*	*E.coli*
Control	0.0	0.0	0.0
Distilled water	0.0	0.0	0.0
Methanol	2.0±0.4	5.0 ±1.0	5.0±0.4
Kanamycin 30 μg	14.6±4.0	29.3±0.5	18.0±1.32
Ampicillin 10 μg	23±1.7	16.3± 2.5	10.5±1.3
Penicillin 10 μg	27.8±5.5	16.7±2.5	6.3±0.4
Dalbergia velutina Benth.			
- Leaf	6.3±1.2	0.0	7.0±0.0
- Stem	2.5±1.00	4.00±2.50	4.17±0.76
Millettia extensa Benth.			
- Leaf	2.5±0.5	1.3±0.6	0.0
- Stem	3.3±0.8	3.5±1.0	0.0
Spatholobus parviflorus (DC.) Kuntze			
- Leaf	0.0	4.0±1.3	9.0±1.0
Millettia pachycarpa Benth.			
- Stem	1.3±0.2	0.0	0.0
Erythrina subumbrans (Hassk.) Merr.			
- Leaf	4.0±1.1	5.8±1.0	0.0
Dalbergia cana Graham ex Kurz			
- Bark	3.3±0.6	3.3±1.6	0.0
Tristaniopsis burmanica (Griff.) Peter G. Wilson & J.T. Waterh. Var. *rufescens* (Hence) J.Parn.&Nic Lughadha			
- Bark	0.0	0.0	0.0
- Leaf	0.0	7.17±1.0	0.0

ตารางที่ 10.2. แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากตัวอย่างไม้ยืนต้นในเขตมหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา (ต่อ)

DISC	Zone of growth inhibition (mm.)*		
	S.aureus	*B.subtilis*	*E.coli*
Control	0.0	0.0	0.0
Distilled water	0.0	0.0	0.0
Methanol	2.0±0.4	5.0 ±1.0	5.0±0.4
Kanamycin 30 μg	14.6±4.0	29.3±0.5	18.0±1.32
Ampicillin 10 μg	23±1.7	16.3± 2.5	10.5±1.3
Penicillin 10 μg	27.8±5.5	16.7±2.5	6.3±0.4
Syzygium albiflorum(Duthie & Kurz) Bahadur & R.C.Guar			
- Leaf	3.0±0.0	0.0	4.3±0.5
Syzygium cumini (L.) Skeels			
- Bark	6.2±1.0	0.0	0.0
- Leaf	0.0	0.0	0.0
Melientha suavis Pierre			
- Bark	3.8±0.3	7.7±1.5	9.3±0.6
- Leaf	0.0	5.2±1.3	6.2±1.0
- Stem	2.5±0.5	5.9±0.76	8.8±1.2
Haldina cordifolia (Roxb.) Ridsdale			
- Leaf	5.3±1.2	0.0	3.8±1.3
- Stem	1.3±0.6	0.0	0.0
Catunaregam tomentosa (Blume ex DC.) Tirveng.			
- Bark	2.0±1.0	3.3±0.8	3.3±0.2
- Leaf	0.0	0.0	0.0
Mitragyna rotundifolia (Roxb.) Kuntze			
- Leaf	7.0±1.0	0.0	7.2±1.2

ตารางที่ 10.2. แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากตัวอย่างไม้ยืนต้นในเขตมหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา (ต่อ)

DISC	Zone of growth inhibition (mm.)*		
	S.aureus	*B.subtilis*	*E.coli*
Control	0.0	0.0	0.0
Distilled water	0.0	0.0	0.0
Methanol	2.0±0.4	5.0 ±1.0	5.0±0.4
Kanamycin 30 μg	14.6±4.0	29.3±0.5	18.0±1.32
Ampicillin 10 μg	23±1.7	16.3± 2.5	10.5±1.3
Penicillin 10 μg	27.8±5.5	16.7±2.5	6.3±0.4
Dioecrescis erythroclada (Kurz.) Tirveng.			
- Bark	0.0	0.0	0.0
- Leaf	0.0	3.5±0.2	1.0±0.0
Morinda coreia Ham.			
- Bark	0.0	1.8±0.8	2.2±0.3
- Leaf	3.8±0.7	0.0	1.7±0.6
Strychnos nux-vomica L.			
- Bark	5.5±0.5	0.0	6.2±0.8

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษาวิจัย

สรุปผลการศึกษาวิจัย

การคัดกรองลิกแนนจากตัวอย่างไม้ยืนต้นโดย TLC

จากการคัดกรองลิกแนนในไม้ยืนต้นพบว่ามีจำนวน 40 ชนิด ที่มีผลบน TLC แสดงว่ามีลิกแนนในสารสกัดหยาบเมทานอล และจาก ตารางที่ 10.1 สรุปได้ว่า พืชในวงศ์ Leguminosae-Papilionoideae สามารถคัดกรองลิกแนนจากชนิดพืชได้มากที่สุดถึง 9 ชนิด รองลงมาคือ Rubiaceae และ Euphorbiaceae ซึ่งมี 6 และ 4 ชนิด

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแบบ Agar Disc Diffusion

เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแบบ Agar Disc Diffusion จากสารสกัดหยาบจำนวน 60 ตัวอย่าง จากพันธุ์ไม้ 40 ชนิด (ตารางที่ 10.2) โดยตัวแทนแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ในการทดลองนี้มี

สองชนิดได้แก่ *S. aureus* และ *B. subtilis* ส่วนตัวแทนแบคทีเรียแกรมลบคือ *E. coli* โดยแบคทีเรียที่สารสกัดหยาบสามารถยับยั้งได้ใกล้เคียงกับ positive control 2 ชนิดได้แก่ Ampicillinและ Penicillin (clear zone = 10.5±1.3 mm. และ6.3±0.4 mm. ตามลำดับ) คือ *E.coli* ซึ่งสารสกัดจาก เครือพันซ้าย(ใบ) ผักหวานป่า(เปลือกและกิ่ง) มีค่า clear zone ใกล้เคียงกับ Ampicillin คือ 9.0±1.0 mm.,9.3±0.6 mm. และ 8.8±1.2 mm. ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมี สารสกัดจาก กาสะลองคำ(ใบ),สลีนก(กิ่ง) เครือปี้(ใบ) ตุ้มกว้าว (ใบ)แสลงใจ(เปลือก)และผักหวานป่า(ใบ)มีค่า clear zone ใกล้เคียงกับ Penicillinคือ 5.8±1.8mm. ,5.8±1.4mm.,7.0±0mm.,7.2± 1.2mm., 6.2±0.8 mm.และ 6.2±1.0 mm. ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังมีสารสกัดที่ให้ผลของค่า clear zone มากที่สุด คือ สารสกัดจากเปลือกของสลีนกที่ให้ค่า clear zone สูงที่สุด คือ 11.7±0.6 mm

วิจารณ์ผลการศึกษาวิจัย

จากการคัดกรองลิกแนนในไม้ยืนต้นพบว่ามีจำนวน 40 ชนิด จากพืชทดสอบทั้งหมด 80 ชนิด ที่คัดกรองพบลิกแนนด้วยวิธี TLC โดยพืชในวงศ์ Leguminosae-Papilionoideae สามารถคัดกรองลิกแนนจากชนิดพืชได้มากที่สุดถึง 9 ชนิด รองลงมาคือ Rubiaceae และ Euphorbiaceae ซึ่งมี 6 และ 4 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการสกัดลิกแนนที่ผ่านมา ยกตัวอย่างเช่น การสกัดลำต้นและรากของหญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria* L.: family Euphorbiaceae) สามารถค้นพบลิกแนน 4 ชนิดคือ 5-demethoxyniranthin, urinatetralin, dextrobursehernin, urinaligran (Chang .,*et al* , 2003) ,การสกัดพบลิกแนน (+)-lariciresinol 9′-stearate จากลำต้นของ *Tephrosia vogelii* (family leguminosae) (Huan .,*et al* ,2009) และ การพบลิกแนน (+)-lyoniresinol , 3⟨−O−®− glucopyranoside และลิกแนน (-)-lyoniresinol 3⟨−O−®−lucopyranoside จากการสกัดลำต้นของ *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (family , Rubiaceae) ด้วย เมทานอล : น้ำ (30:70, v/v) (Silva .,*et al* ,2006)

การทดสอบฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียพบว่า จากสารสกัดหยาบจำนวน 60 ตัวอย่าง จะพบสารสกัดหยาบจำนวนถึง 44 ชนิดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย คิดเป็นร้อยละ 73 ของสารสกัดที่นำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ผลที่ได้นี้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของสารสกัดที่เป็นสารสกัดหยาบ รัตนา(2547) ได้อธิบายผลของสารสกัดหยาบของสมุนไพร ต่อฤทธิ์การต้านแบคทีเรียว่า พืชสมุนไพรที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบ เป็นสารสกัดสมุนไพรที่ไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ จะมีส่วนผสมที่ซับซ้อนของสารประกอบหลายชนิดซึ่งฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรบางชนิดมาจากฤทธิ์การผสมผสานระหว่างสารหลายๆชนิด แต่หากอยู่ในสภาพสารเดี่ยวหรือสารบริสุทธิ์อาจจะไม่มีฤทธิ์หรือมีฤทธิ์อ่อน ด้วยเหตุนี้สารสกัดหยาบที่ได้จึงมีฤทธิ์การต่อต้านแบคทีเรียได้ แต่การทดลองนี้ต้องการทราบว่าลิกแนนที่ตรวจพบโดย TLC มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียหรือไม่ ขั้นตอนต่อไปที่ยังดำเนินการศึกษาต่อเนื่องคือ การทดสอบด้วยวิธี pure extract fraction ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

เต็ม สมิตินันทน์ (2544). **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย** (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน.

นพดล สำเภา, ศิริพงษ์ เปรมจิต,เสวียน เปรมประสิทธิ์ และดวงพร เปรมจิต (2552a) **การคัดกรองลิกแนนจากไม้ยืนต้นที่กระจายตัวในเขตมหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา.** *วารสารเกษตรนเรศวร ปีที่12 (ฉบับพิเศษ) สิงหาคม-ธันวาคม 2552* ; หน้า 398-403

นพดล สำเภา (ผู้บรรยาย). (30 กรกฎาคม 2552b) การคัดกรองลิกแนนจากไม้ยืนต้นที่กระจายตัวในเขตมหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา.ใน **การประชุมวิชาการ งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 7 : เกษตรกู้วิกฤตเศรษฐกิจไทย .** พิษณุโลก: คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547).**การตรวจสอบและการสกัดแยกสาระสำคัญจากสมุนไพร.** สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.กรุงเทพฯ หน้า 7

Ayres D.C.,and Loike J.D.(1990). **Lignans: Chemical, biological and clinical Properties.** Cambridge University Press. Cambidge.

Broomhead A.J., Dewick P.M. (1990). **Tumour-inhibitory anyltetralin lignans in Podophyllum versipelle, Diphylleia cymosa and Diphylleia grayi**. *Phytochemistry* 29 : 3831-3837

Carlos L.C ., Guillermo A., Ana M.G., Jose B.,Cristian F., Pedro A., Magalis B., Maritza H., Miguel Martinez, and Mario S.(2006) **Antifungal and Antibacterial Activities of *Araucaria araucana* (Mol.)K. Koch Heartwood Lignans.***Z*. Naturforsch. **61c**, 35-43

Chang C.-C.; Lien Y.-C.; Liu K.C.S.C. and Lee S.-S. (2003) **Lignans from Phyllanthus urinaria**. *Phytochemistry*, 63 : 825-833

Cockayne,T.O.(1961) **Leech book of BALD: In: Lecchdom, Wortcunnings and Starcraft of Early England.vol 2** . The Holland Press, London . p.313

Eswaramurthy S, Mariappan V, Muthusamy M, Alagianalingam MN and Subramaniam KS.(1993) **Efficacy of neem products in the control of rice bacterial blight.** *World neem conference, Bangalore, India* ; p. 783–5.

Freudenberg K. and Weinges K (1961) **A system of nomenclature for lignans.** *Tetraheron* 15, p. 115-28.

Gangopadhyay S. (1998) **Turmeric (Curcuma longa), an ecofriendly ingredient to control seed-borne rice diseases.** *Curr Sci 75*: p. 16–17.

Grainge M, Alvarez AM. (1987) **Antibacterial and antifungal activity of *Artabotrys hexapetalus* leaf extract.** *Int J Trop Plant Dis 5:* p. 173–9.

Hartwell J.L., Johnson J.M., Fitzgerald D.B. and Belkin M. (1953) **Podophyllotoxin from *Juniperus sreeie* :Savinin.** *J Am. Chem. Soc* 75 : 2535-2536

Hartwell, J.L. and Schrecker, A.W.(1954) **Lignans of podophyllum. In Zechmeister,.L.** *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*15: 83-166

Hiroyuki T., Akihiro N., Chuel K.K., Kalsumi F., Hiroshi N., and Moore M.A. (2003). **Carcinogenesis and Its Modification by Environmental Endocrine Disruptors: *In Vivo* Experimental and Epidemiological Findings**. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 33:259-270

Hokanson G.C. (1987). **Podophyllotoxin and 4' - demethylPodophyllotoxin from *Polygala polygama* (Polygalaceae).** *J.Nat.Prod.* 41 : 497-498.

Huan H.W., Han H.X. , Hai H.X. , Liang X.X. ,and Xiao Y. W. (2009) **Sesquiterpenes and Lignans from *Tephrosia vogelii.*** *Helvetica Chimica Acta.*92(2) ; 370 – 374

Kariyone, T.and Kimurta, Y.(1976) **Saishin Wakanyakuyoshokubutsu .** Hirokawas Shoten , Tokyo :pp. 105

Kazuyoshi K ., Aki Y., Kimiko T., Shuko Y., Hirofumi S., Tomihiko H., and Yoshihisa T.(2001) **Phenylnaphthalene Compounds from the Subterranean Part of *Vitex rotundifolia* and Their Antibacterial Activity Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.** *J. Nat. Prod., 64* (5); pp 588–591

Kelly, M.G. and Hartwell, J.L.(1954)**The biological effects and the chemical composition of podophyllin : a review.** *J. Nat. Canc. Inst.*14: 967-1010

Lianniang, L. , Hung, X. and Rui, T. (1985)**Dibenzocyclooctadiene lignans from roots and stems of *Kadsura coccinea.*** *Planta Medica.* 51: 297-300

Nakatani N., Ikeda K., Kikuzaki H., Kido M. and Yamaguchi Y.(1988) **Diaryldimethylbutane lignans from *Myristica argentea* and their antimicrobial action against *Streptococcus mutans*. *Phytochemistry*** *Volume 27, Issue 10*, ; p. 3127-3129

Narasimhan V, Selvam R and Mariappan V.(1995). In: Mariappan V, editor. **Neem for the management of crop diseases**. *New Delhi: Associated Publishing Co.*; p. 115–21.

Pauletti P.M. , AraujÂjo A.R., Young M.C.M. , Giesbrecht A.M. amd Bolzani V.S. (2000) ***nor-*** **Lignans from the leaves of *Styrax ferrugineus* (Styracaceae) with antibacterial and antifungal activity.** *Phytochemistry 55*; p. 597 - 601

Pharmacopoeia of the People's Republic of China (1977) vol.1, page 594

Sateesh K., Marimuthu T., Thayumanavan B., Nandakumar R. and Samiyappan R. (2004) **Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of Datura metel against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.** *Physiological and Molecular Plant Pathology 65* : 91–100

Silva V. C.,. Silva G. H, Bolzani V. S.,and Lopes M. N. (2006) **Isolation of lignans glycosides from *Alibertia sessilis* (Vell.) K.Schum. (Rubiaceae) by preparative high-performance liquid chromatography.** *Ecl. Quim., Sao Paulo*, 31(4): 55-58

Thurston, L.S., Irie H. , Tanis, Han F-S, Liu X-C, Cheng Y.C., and Lee K.H. (1986). **Antitumour agents.Part 78. Inhibition of human DNA topisomerase II by Podophyllotoxin & a-pettatin analoques.** *J Med. Chem.* 29, 1547-1550

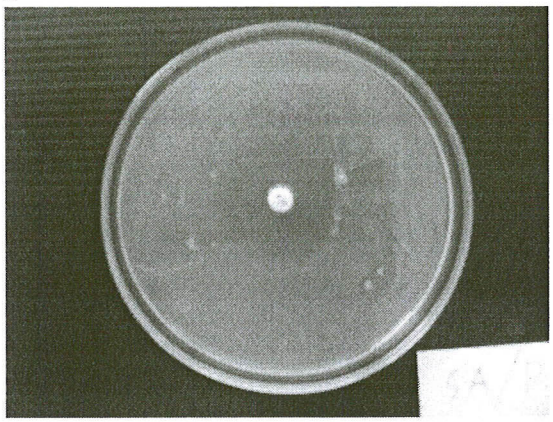
Tsukamoto, H., Hisada, S. and Nishibe, S. (1984b)**Ligans from the bark of *Olea* Plants .** *Chem. Pharm. Bull.* 32: 2730-5

Tsukamoto, H., Hisada, S. and Nishibe, S.(1984a)**Lignans from the bark of *Fraximus mandshurica* var. *japonica* & *F. japonica* .** *Chem. Pharm. Bull.* 32 : 4482-9

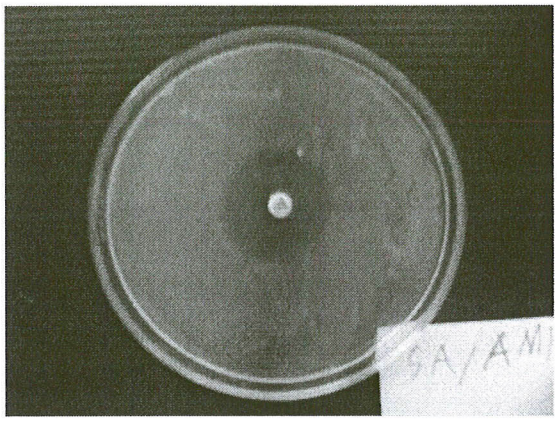
Wu, J-L.,Shen, J. and Xie, Z-W. (1983)**Pharmcognostical studies on the Chinese drug Qin Pi (*Cortex fraxini*). Part 2. Identification of the drug & its adulterants .** *Actu Pharmaceuitica Sinica* .18 : 377-83

ภาคผนวก

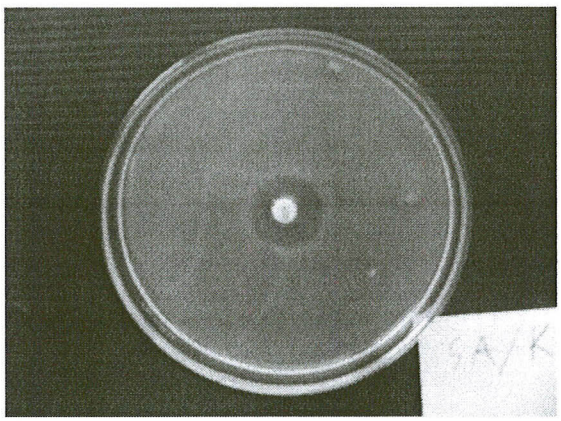
ภาพแสดงฤทธิ์ในการต่อต้านแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ของสารสกัดหยาบเมทานอล จากพืชตัวอย่าง และยาปฏิชีวนะที่ใช้เป็น control



รูปที่ 1 *Staphylococcus aureus* / Penicillin 10μg (inhibition zone = 27.8 ±5.5 mm)

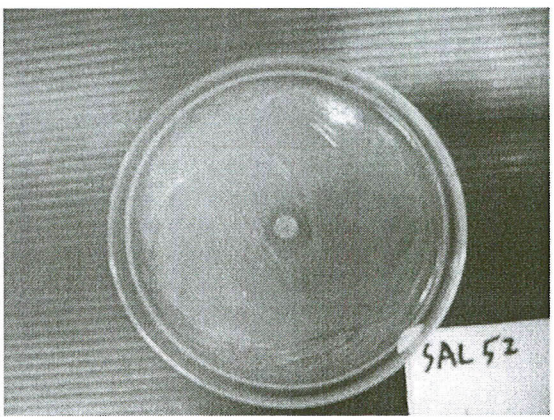


รูปที่ 2 *Staphylococcus aureus* / Ampicillin 10μg (inhibition zone = 23±1.7 mm)



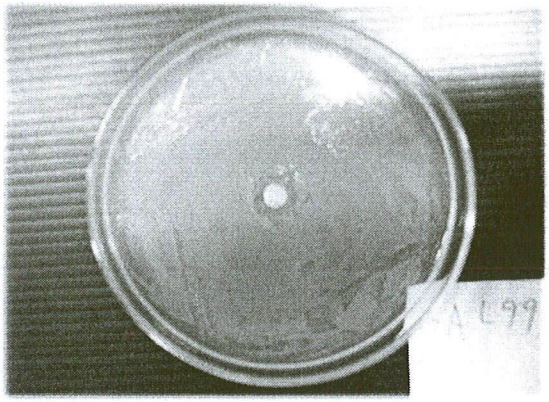
รูปที่ 3 *Staphylococcus aureus* /Kanamycin 30 μg (inhibition zone = 14.6 ±4.0 mm)

รูปที่ 4 *Staphylococcus aureus* /*Oroxylum indicum* (L.) Kurz [leaf] (inhibition zone = 4.5 ±1.3 mm)

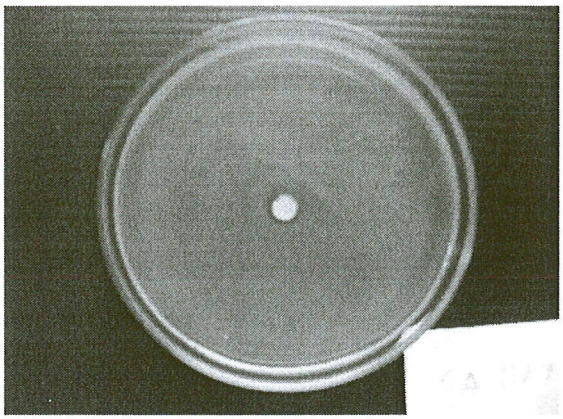


รูปที่ 5 *Staphylococcus aureus* / *Vitex peduncularis* Wall. Ex Schauer [leaf] (inhibition zone = 5.0 ±0.6mm)

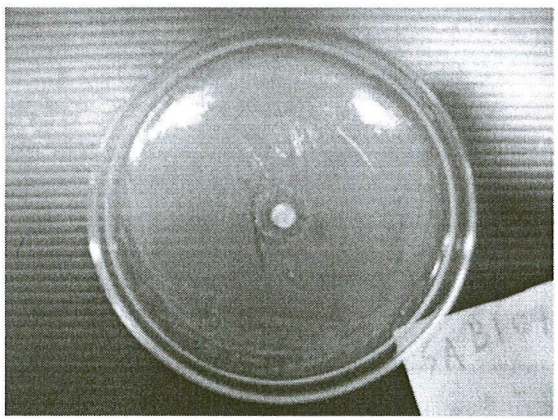
รูปที่ 6 *Staphylococcus aureus* / *Vitex pinnata* [leaf] (inhibition zone = 9.2 ±1.26 mm)



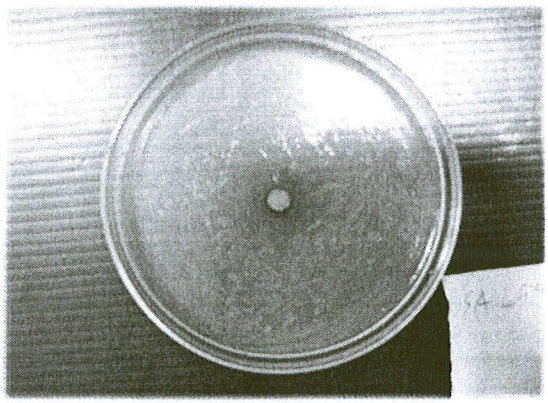
รูปที่ 7 *Strephylococus aureus* / *Morinda coreia* Ham. [leaf] (inhibition zone = 3.8± 0.7 mm)



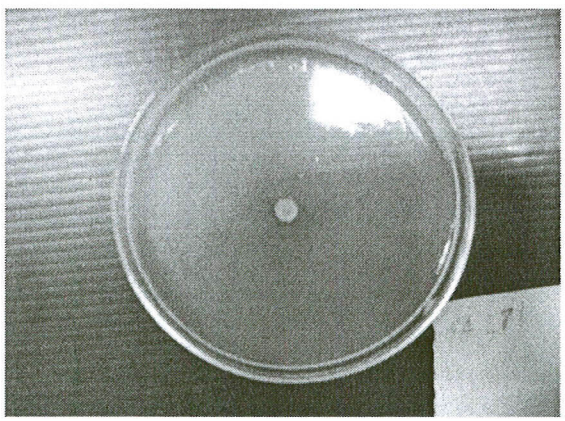
รูปที่ 8 *Staphylococcus aureus* / *Melientha suavis* Pierre [Bark] (inhibition zone = 3.8 ± 0.3 mm)



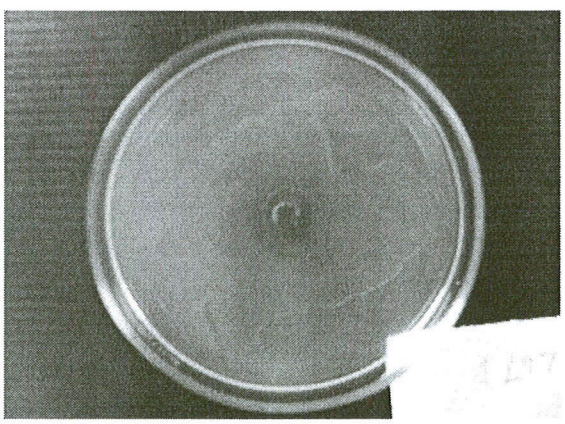
รูปที่ 9 *Staphylococcus aureus* / *Strychnos nux-* L. [Bark] (inhibition zone =5.5 ±0.5 mm)



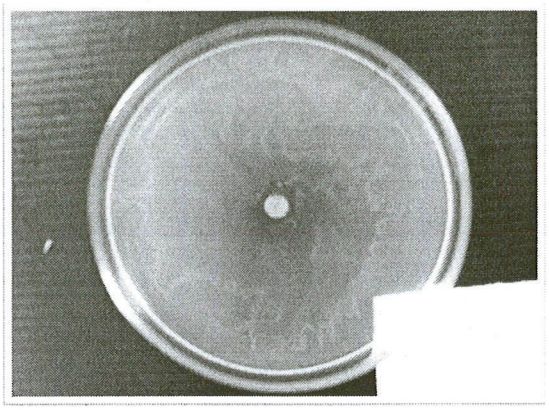
รูปที่ 10 *Staphylococcus aureus* / *Tectona grandis vomica* [Bark] (inhibition zone = 1.7 ± 0.6 mm)



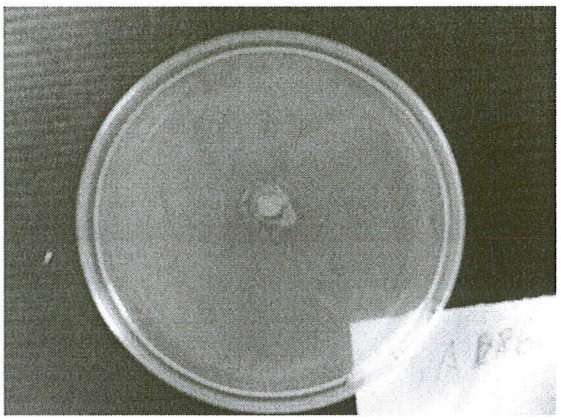
รูปที่ 11 *Staphylococcus aureus* / / *Erythrina subumbrans* (Hassk.) Merr. [Leaf] (inhibition zone = 4.0 ± 1.1 mm)



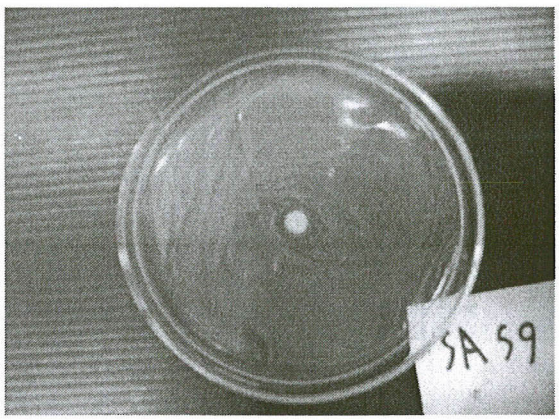
รูปที่ 12 *Staphylococcus aureus* / *Mitragyna rotundifolia* (Roxb.) Kuntze [Leaf] (inhibition zone = 7.0± 1.0 mm)



รูปที่ 13 *Staphylococcus aureus* / *Heteropanax fragrans* (Roxb. ex DC.) Seem. [Bark] (inhibition zone = 3.3± 0.6 mm)

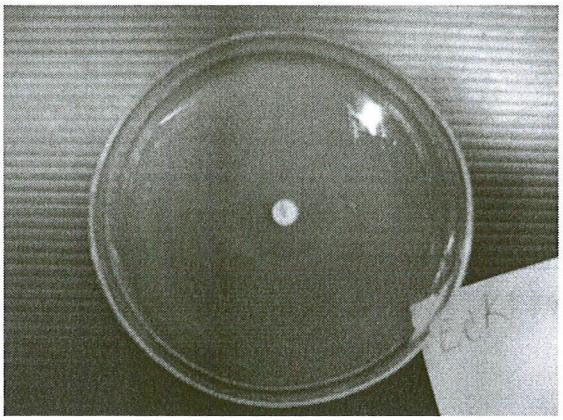


รูปที่ 14 *Staphylococcus aureus* / *Syzygium cumini* (L.) Skeels [Bark] (inhibition zone = 6.2 ± 1.0 mm)

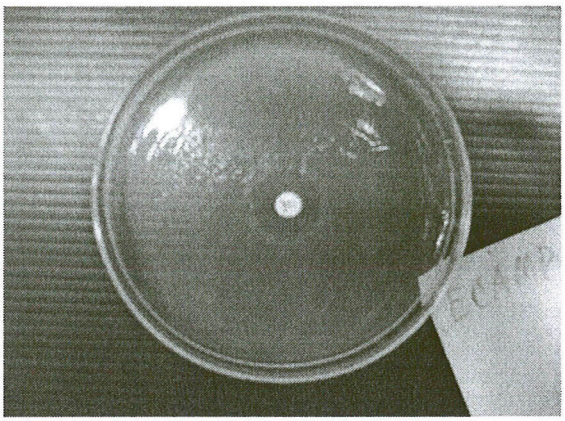


รูปที่ 15 *Staphylococcus aureus* / *Cryptolesis buchanani* Roem&Schult. [Stem] (inhibition zone = 4.2 ± 1.6 mm)

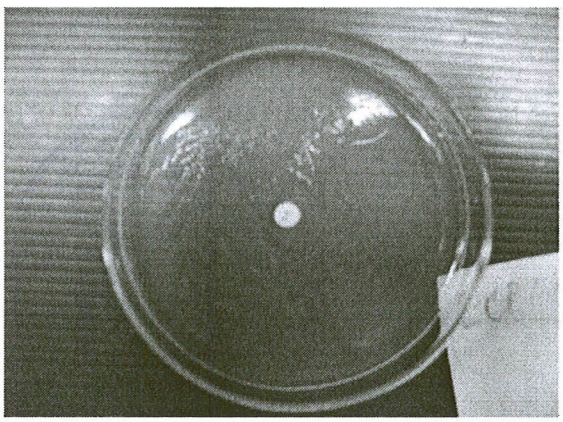
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



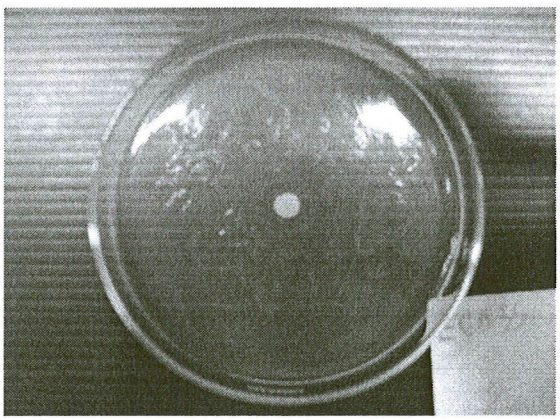
รูปที่ 16 *Escherichia coli* / Kanamycin 30 μg
(inhibition zone =18.0 ±1.32 mm)



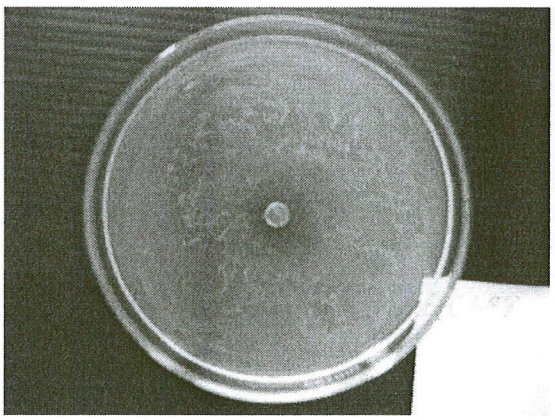
รูปที่ 17 *Escherichia coli* /Ampicillin 10μg
(inhibition zone = 10.5±1.3 mm)



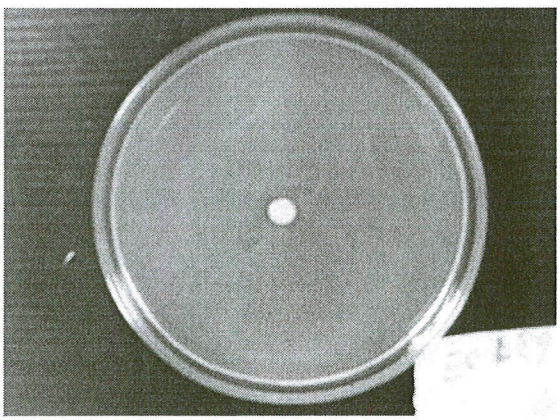
รูปที่ 18 *Escherichia coli* / Penicillin 10μg
(inhibition zone =6.3 ±0.4 mm)



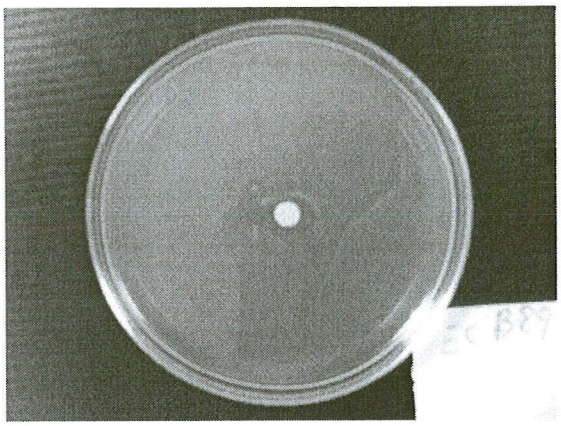
รูปที่ 19 *Escherichia coli* / *Premna tomentosa* Willd.
[Bark] (inhibition zone = 4.0± 2.0 mm)



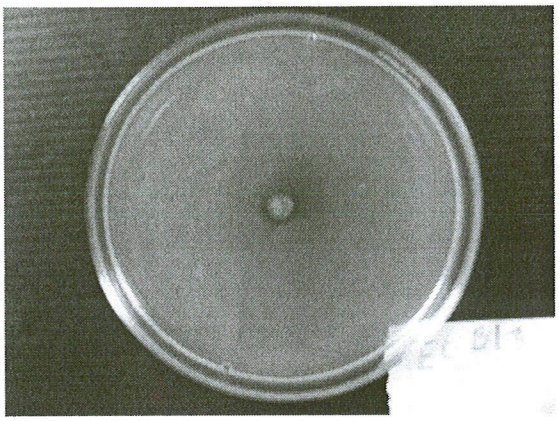
รูปที่ 20 *Escherichia coli* / *Balakata baccata* (Roxb.) Esser
[Stem] (inhibition zone = 5.8 ± 1.4 mm)



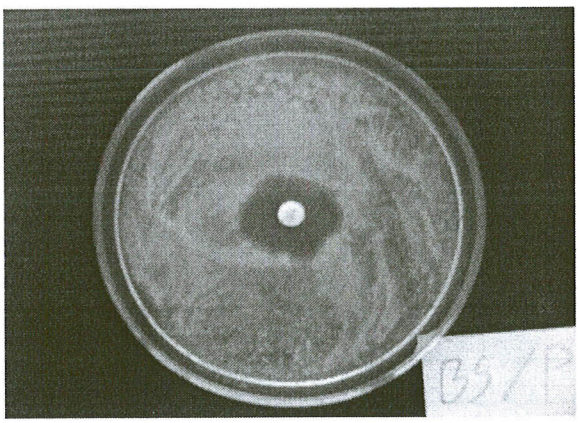
รูปที่ 21 *Escherichia coli* / *Melientha suavis* Pierre
[leaf] (inhibition zone = 6.2 ± 1.0 mm)



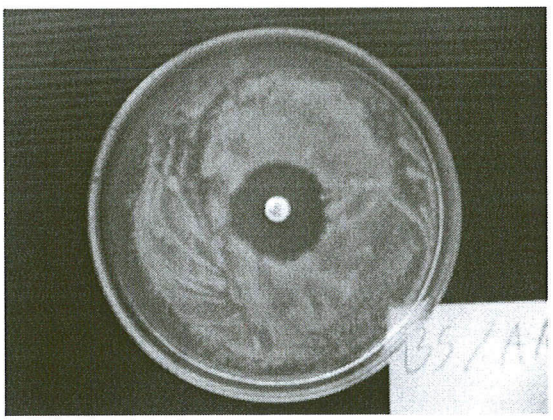
รูปที่ 22 *Escherichia coli/ Melientha suavis* Pierre [Bark] (inhibition zone = 9.3 ± 0.6 mm)



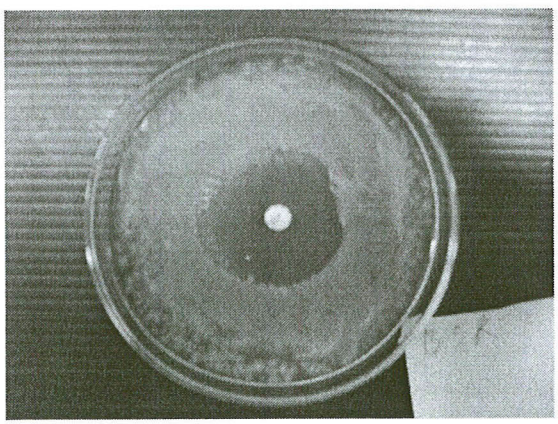
รูปที่ 23 *Escherichia coli / Oroxylum indicum* (L.) Kurz [Bark] (inhibition zone = 4.5 ± 1.0 mm)



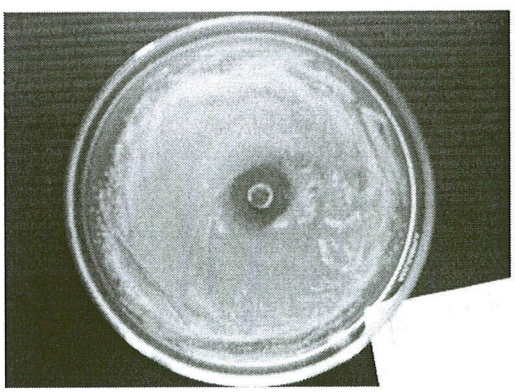
รูปที่ 24 *Bacillus subtilis* / Penicillin 10μg (inhibition zone = 16.7 ±2.5 mm)



รูปที่ 24 *Bacillus subtilis* / Ampicillin 10μg (inhibition zone = 16.3 ±2.5 mm)

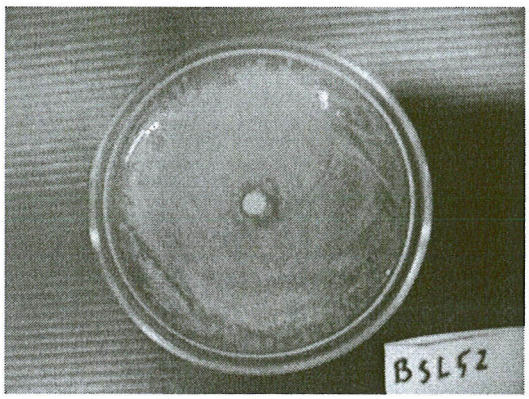


รูปที่ 26 *Bacillus subtilis* / Kanamycin 30 μg (inhibition zone = 29.3±0.5 mm)

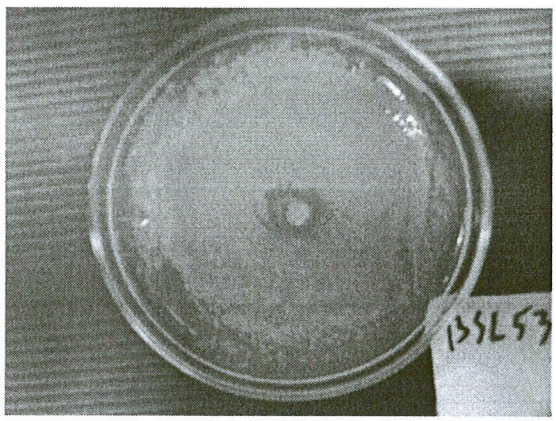


รูปที่ 27 *Bacillus subtilis* / *Balakata baccata* (Roxb.) Esser [stem] (inhibition zone = 11.0 ± 1.7 mm)

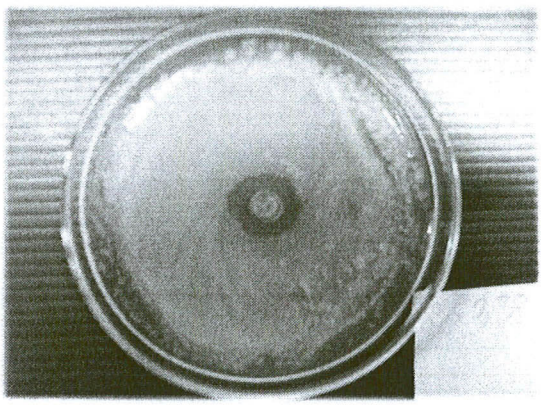
รูปที่ 28 *Bacillus subtilis* / *Oroxylum indicum* (L.) Kurz [leaf] (inhibition zone = 6.7± 1.0 mm)



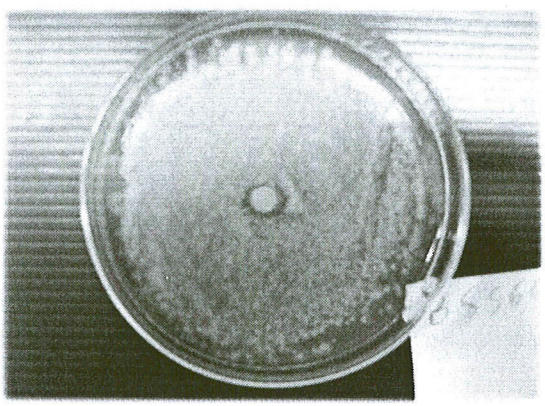
รูปที่ 29 *Bacillus Subtilis* / *Vitex peduncularis* Wall. Ex Schauer [leaf] (inhibition zone = 6.4± 0.0 mm)



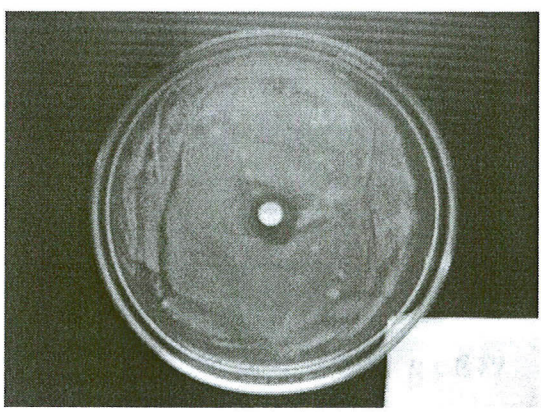
รูปที่ 30 *Bacillus subtilis* / *Vitex pinnata* [leaf] (inhibition zone = 9.5± 2.3 mm)



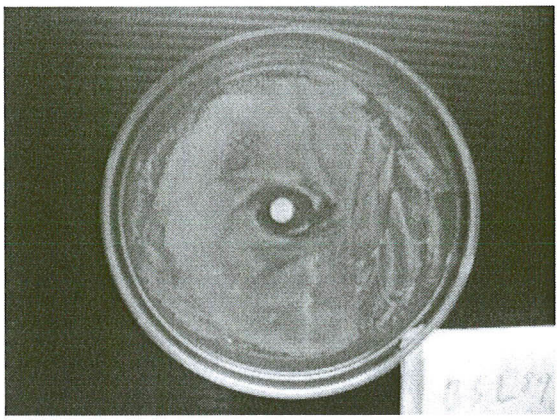
รูปที่ 31 *Bacillus subtilis* / *Balakata baccata* (Roxb.) Esser [Bark] (inhibition zone = 11.7± 0.6 mm)



รูปที่ 32 *Bacillus subtilis* / *Dalbergia velutina* Benth. Pierre [stem] (inhibition zone = 4.0± 2.5 mm)

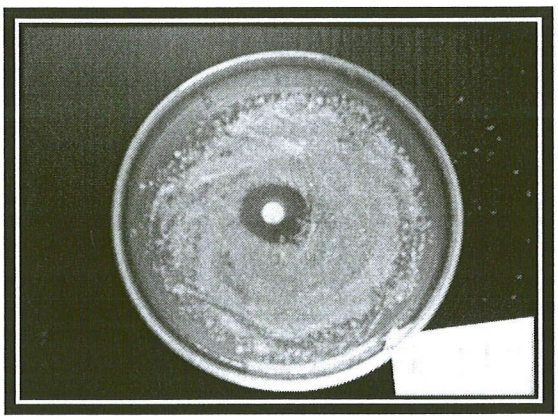


รูปที่ 33 *Bacillus subtilis* / *Meliantha suavis* Pierre [Bark] (inhibition zone = 7.7 ± 1.5 mm)

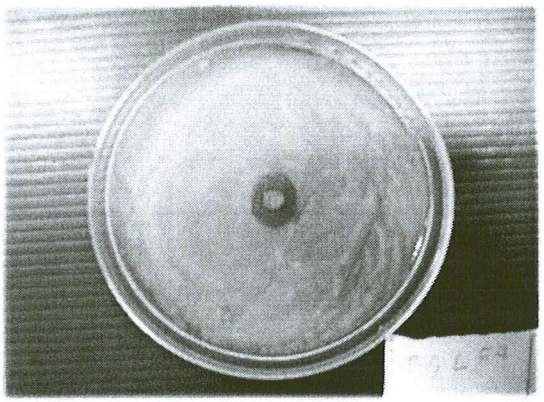


รูปที่ 34 *Bacillus subtilis* / *Melientha suavis* Pierre [leaf] (inhibition zone = 5.2 ± 1.3 mm)

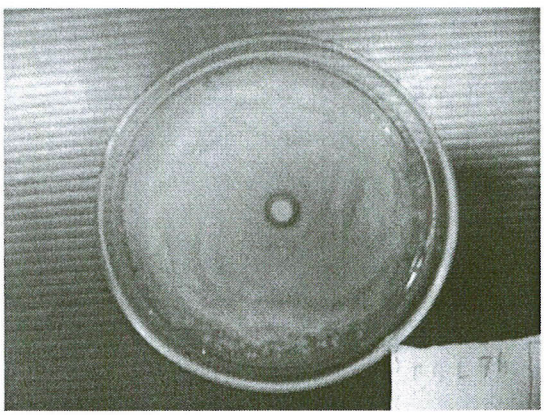
รูปที่ 35 *Bacillus subtilis* / *Tristaniopsis burmanica* (Griff.) Peter G. Wilson & J.T. Waterh. Var. *rufescens* (Hence) J.Parn.&Nic Lughadha [leaf] (inhibition zone = 7.17 ± 1.0 mm)



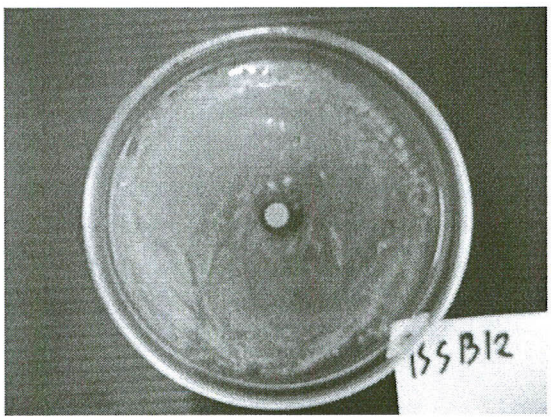
รูปที่ 36 *Bacillus subtilis* / *Oroxylum indicum* (L.) [Bark] (inhibition zone = 10.0 ± 1.2 mm)



รูปที่ 37 *Bacillus subtilis* / *Tectona grandis* L.f. Kurz [Leaf] (inhibition zone = 8.2 ± 0.6 mm)



รูปที่ 38 *Bacillus subtilis* / *Erythrina subumbrans* (Hassk.) Merr. [Leaf] (inhibition zone = 5.8 ± 1.0 mm)



รูปที่ 39 *Bacillus subtilis* / *Stereospermum colias* (Buch.-Ham. Ex Dillwyn) Mabb [Bark] (inhibition zone = 2.3 ± 0.5 mm)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Nutrient Agar ปริมาณ 1 ลิตร มีส่วนผสมดังนี้

Beef Extract	3	gram
Peptone	5	gram
Distilled water	1	litre
Agar	15	gram

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Nutrient Broth ปริมาณ 1 ลิตร มีส่วนผสมดังนี้

Beef Extract	3	gram
Peptone	5	gram
Distilled water	1	litre