



ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดเปลือกส้มโอต่อการผลิตชีวมวลและสารประกอบฟีนอลิก  
ทั้งหมดของโปรโตคอร์กกล้วยไม้สกุลหวาย



โดย  
นางสาวสุวิมล เดชอรัญญ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

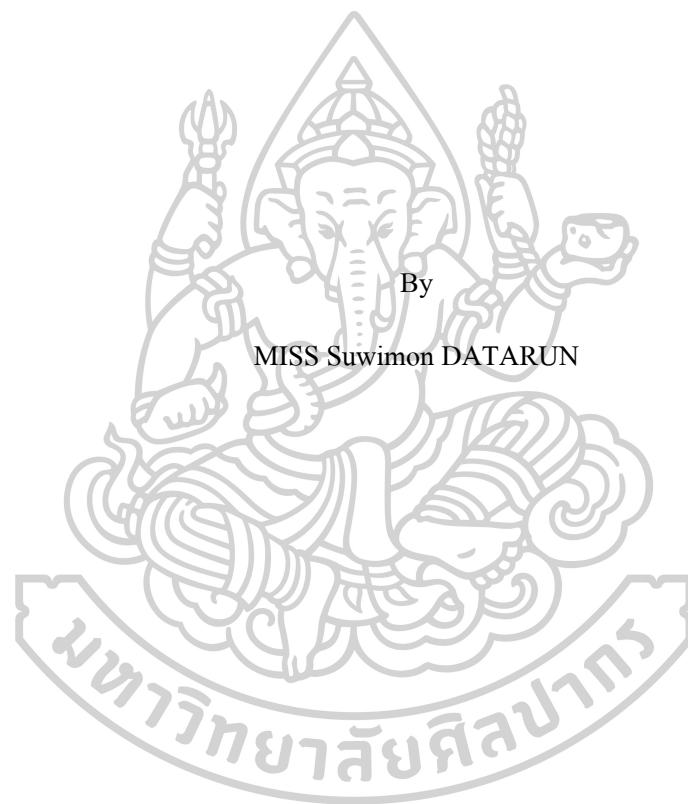
ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดเปลือกส้มโอต่อการผลิตชีวมวลและ  
สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย



โดย  
นางสาวสุวิมล เดชอรัญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต  
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES FROM POMELO PEEL EXTRACT ON  
BIOMASS AND TOTAL PHENOLIC CONTENT PRODUCTION OF  
DENDROBIUM PROTOCORM



By

MISS Suwimon DATARUN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)

Department of BIOTECHNOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2021

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดเปลือกส้มโอต่อการ  
ผลิตชีวมวลและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรโตคอกซ์  
มกล้ายไม้สกุลหวาย

โดย นางสาวสุวิมล เดชอรัญ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข  
รองศาสตราจารย์ ดร. สุวัฒนา พุกกะศรี

---

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย ..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิตา วัฒนการุณ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุวัฒนา พุกกะศรี)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุพันธ์ กงบังเกิด)

620920068 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

คำสำคัญ : อนุภาคซิลเวอร์นาโน, เปลือกส้มโอ, กล้วยไม้สกุลหวาย, ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย, การต้านอนุมูลอิสระ

นางสาว สุวิมล เชนธัญ: ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากสารสกัดเปลือกส้มโอต่อการผลิตชีวมวลและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา

ปัจจุบันการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) ด้วยวิธีทางชีวภาพนับว่าเป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความมุ่งหมายที่จะสังเคราะห์ AgNPs โดยอาศัยสารสกัดจากเปลือกส้มโอมาดำเนินการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ AgNPs ได้แก่ ความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  (1, 2 และ 3 มิลลิโมลาร์) ร่วมกับ pH ของสารสกัด (4.8, 5, 6, 7 และ 8) เวลาในการทำปฏิกิริยา (24 และ 48 ชั่วโมง) และรูปแบบในการทดสอบ และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้านต่าง ๆ ของ AgNPs โดยใช้เทคนิค UV-Visible, FT-IR, XRD, TEM และ EDX ตามลำดับ จากนั้นประเมินคุณสมบัติของ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้ในด้านการยับยั้งแบคทีเรียและการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตชีวมวลและสารต้านอนุมูลอิสระของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย ผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสังเคราะห์ AgNPs โดยใช้สารสกัดจากเปลือกส้มโอคือ  $\text{AgNO}_3$  ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, สารสกัดที่ pH 8, เวลาทำปฏิกิริยานาน 24 ชั่วโมง และใช้รูปแบบการทดสอบอย่างรวดเร็ว เมื่อวิเคราะห์การสังเคราะห์ AgNPs ด้วย UV-Vis พบปรากฏการณ์ surface plasmon resonance (SPR) ที่ความยาวคลื่นในช่วง 402-411 นาโนเมตร ส่วนการระบุหมู่ฟังก์ชันด้วย FTIR จะพบหมู่ฟังก์ชัน O-H, C=O และ C-O ของแอลกอฮอล์ ฟีนอล กรดคาร์บอกซิลิก และอะโรมาติกที่เกี่ยวข้องกับการรีดิวซ์  $\text{Ag}^+$  เป็น  $\text{Ag}^0$  ซึ่งก่อให้เกิด AgNPs และผลึกที่ได้เป็นผลึกของโลหะเงินที่มีโครงสร้างแบบ face-centered cubic (fcc) อีกทั้งเมื่อวิเคราะห์ด้วย TEM จะเห็นได้ว่าอนุภาคมีลักษณะเป็นทรงกลม มีขนาดเฉลี่ยที่ 31.1 นาโนเมตร นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วย EDX ที่พบการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 3 keV สามารถยืนยันได้ว่ามีองค์ประกอบของ Ag และจากการศึกษาสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียพบว่า AgNPs ที่สังเคราะห์มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ 100% ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการศึกษาการนำ AgNPs ไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายพบว่า AgNPs ที่ความเข้มข้น 1-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเพิ่มชีวมวล (สัดส่วนการเจริญของน้ำหนักแห้ง) โปรโตคอร์มอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม AgNPs ในขณะที่ AgNPs ความเข้มข้น 75-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ชีวมวลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้ยังพบว่า AgNPs ทุกความเข้มข้นที่เสริมลงไปในการเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการผลิตสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดย AgNPs ที่ความเข้มข้น ในช่วง 1-20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถส่งเสริมการผลิตสารฟลาโวนอยด์ในกลูโคสสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายได้

620920068 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : SILVER NANOPARTICLE, POMELO PEEL, DENDROBIUM ORCHID, ANTIBACTERIAL ACTIVITY, ANTIOXIDANT

MISS SUWIMON DATARUN : EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES FROM POMELO PEEL EXTRACT ON BIOMASS AND TOTAL PHENOLIC CONTENT PRODUCTION OF DENDROBIUM PROTOCOLM THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR BUDSARAPORN NGAMPANYA, Ph.D.

Biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) is currently considered as an environmentally friendly method. Thus, this research aimed to biosynthesize AgNPs using green peel pomelo extract. The factors involved in AgNPs synthesis, such as a combination of AgNO<sub>3</sub> concentrations (1 mM, 2 mM and 3mM) and pH of plant extract (4.8, 5, 6, 7 and 8), reaction time (24 and 48 hours) and format of plant extract pouring were investigated. The synthesized AgNPs were then characterized and identified by UV-Visible spectroscopy, XRD, FT-IR, XRD, TEM, and EDX techniques, respectively. Additionally, a property of AgNPs to inhibit bacterial growth and application of AgNPs for production of biomass and antioxidants in protocorms of *Dendrobium officinale* were also evaluated. The optimum conditions for AgNPs synthesis using the extract of pomelo green peel were 2 mM AgNO<sub>3</sub>, pH of the extract at 8, a reaction time of 24 hours, together with the rapid pouring of the extract. The UV-Vis spectra of the synthesized reactions showed the surface plasmon resonance (SPR) peak in the range of 402-411 nm. FTIR analysis revealed the presence of O-H, C=O and C-O functional groups of alcohol, phenol, carboxylic acid and aromatic which involved in the reduction of Ag<sup>+</sup> to Ag<sup>0</sup> resulting in the formation of AgNPs. Crystals of silver in a structure of the face-centered cubic (fcc) was detected by XRD. The TEM analysis also showed that the particles were round and had averaged size of 31.1 nm. Moreover, a maximum absorbance of 3 keV analyzed by EDX confirmed the presence Ag in NPs. For antibacterial evaluation, AgNPs could inhibit gram-negative bacteria by 100% at a concentration of 200 mg/L. Additionally, the application of AgNPs for culturing protocorm of *D. officinale* suggested AgNPs in range of 1-50 mg/L was non-significant effect on increasing of protocorm biomass (growth ratio based on dry mass) when compared with the control. On the other hand, biomass of protocorms in the cultures containing AgNPs in range of 75-100 mg/L were significantly decreased (p<0.05). In comparison with the control, all tested concentrations of AgNPs (1-100 mg/L) showed significant effects (p<0.05) to phenolics and flavonoids production as well as antioxidant activity of protocorms. Results suggested that AgNPs in range of 1-20 mg/L could promote the production of phenolic and flavonoid compound as well as activity of antioxidants in protocorms of *D. officinale*.

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนสนับสนุนการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ มหาวิทยาลัยศิลปากร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม ประจำปีงบประมาณ 2564

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ รศ.ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องจนสำเร็จสมบูรณ์ และประสบผลสำเร็จไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สิริพร พงศ์ทองผาสุข รศ.ดร.สุวัฒนา พุกษะศรี และ ผศ.ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบ และทั้งให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ แนวทางการแก้ปัญหาวิทยานิพนธ์ รวมถึงให้ความช่วยเหลือในด้านเครื่องมือและอุปกรณ์สิ่งอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษา และข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ต่อทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ทั้งคำแนะนำ สิ่งอำนวยความสะดวก และให้ความช่วยเหลือในด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณบิดาและมารดา ที่สนับสนุนส่งเสริมและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อน พี่ และน้อง ๆ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และให้กำลังใจมาโดยตลอดในการทำวิจัยในครั้งนี้

นางสาว สุวิมล เดชอรัญ



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง .....	ฉ
สารบัญภาพ .....	ฉ
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 .....	4
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง .....	4
2.1 นาโนเทคโนโลยี.....	4
2.2 กระบวนการสังเคราะห์ AgNPs .....	5
2.3 หลักการสังเคราะห์ AgNPs ทางชีวภาพ.....	7
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ AgNPs ทางชีวภาพ .....	8
2.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ AgNPs ทางชีวภาพ .....	12
2.6 การประยุกต์ใช้ AgNPs ที่สังเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพ .....	16
บทที่ 3 .....	20



วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย .....	20
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย .....	21
3.3 เปลือกผลไม้ที่ใช้ในการวิจัย .....	21
3.4 พืชที่ใช้ในการวิจัย .....	21
3.5 แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย .....	22
3.6 ระเบียบวิธีวิจัย .....	22
3.6.1 การสังเคราะห์ AgNPs จากสารสกัดเปลือกส้มโอ .....	22
3.6.1.1 การเตรียมสารสกัดจากเปลือกส้มโอ .....	22
3.6.1.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ AgNPs.....	23
3.6.1.2.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลาย $\text{AgNO}_3$ ร่วมกับ pH ของ	
สารสกัดเปลือกส้มโอ .....	23
3.6.1.2.2 ศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา .....	23
3.6.1.2.3 ศึกษาลักษณะในการทดสอบสารสกัดเปลือกส้มโอ .....	24
3.6.2 พิสูจน์เอกลักษณ์ของ AgNPs .....	24
3.6.2.1 UV-visible spectroscopy (UV-Vis) .....	24
3.6.2.2 X-ray diffraction spectroscopy (XRD) .....	24
3.6.2.3 Transmission electron microscopy (TEM) .....	25
3.6.2.4 Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) .....	26
3.6.2.5 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) .....	26
3.6.3 การประเมินผลการประยุกต์ใช้ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้จากสารสกัดเปลือกส้มโอ.....	27
3.6.3.1 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของ AgNPs ทางชีวภาพ .....	27
3.6.3.1.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ .....	27

3.6.3.1.2	ศึกษาฤทธิ์ของ AgNPs ในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion .....	27
3.6.3.1.3	ศึกษาความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibition Concentration หรือ MIC) .....	28
3.6.3.1.4	ศึกษาความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration หรือ MBC) .....	28
3.6.3.2	ศึกษาความเข้มข้นของ AgNPs ต่อการผลิตชีวมวล สารพิษทุกเคมี (สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรโตคอร์มกล้ายไม้หวายจีน <i>D. officinale</i> .....	28
3.6.3.2.1	การเตรียมโปรโตคอร์มกล้ายไม้สกุลหวายสำหรับการเพิ่มจำนวน .....	28
3.6.3.2.2	ผลของความเข้มข้น AgNPs ต่อการผลิตชีวมวล .....	29
3.6.3.2.3	การวิเคราะห์สารพิษทุกเคมี (สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์) และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของโปรโตคอร์มกล้ายไม้สกุลหวายจีน ( <i>D. officinale</i> ) .....	30
3.6.4	วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ .....	31
บทที่ 4	.....	32
	ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	32
4.1	การสังเคราะห์ AgNPs ด้วยวิธีทางชีวภาพจากสารสกัดเปลือกส้มโอ .....	32
4.1.1	การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ AgNPs .....	33
4.2	ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ .....	38
4.2.1	Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) .....	38
4.2.2	X-ray diffraction spectroscopy (XRD) .....	40
4.2.3	Transmission electron microscopy (TEM) .....	41
4.2.4	Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) .....	43

4.3 การประยุกต์ใช้ AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ.....	44
4.3.1 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของ AgNPs จากสารสกัดเปลือกส้มโอ.....	44
4.3.2 ผลของการศึกษาความเข้มข้นของ AgNPs ต่อการผลิตชีวมวลและสารพฤษเคมีของ โปรโตคอร์ัมกล้วยไม้หวายจีน <i>D. officinale</i> .....	56
บทที่ 5 .....	63
สรุปผลการวิจัย.....	63
รายการอ้างอิง .....	65
ภาคผนวก ก.....	76
ภาคผนวก ข.....	83
ภาคผนวก ค.....	86
ประวัติผู้เขียน .....	97



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การสังเคราะห์ AgNPs ทางชีวภาพจากสารสกัดจากพืชต่าง ๆ .....	6
ตารางที่ 2 การใช้ AgNPs ในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ .....	17
ตารางที่ 3 ผลของการใช้ AgNPs ต่อการเจริญของพืชชนิดต่างๆ .....	19
ตารางที่ 4 ปริมาณสารพิษตกค้างและสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากเปลือกส้มโอ .....	33
ตารางที่ 5 ผลของเวลาในการทำปฏิกิริยาต่อ % ผลผลิตของ AgNPs .....	36
ตารางที่ 6 ผลของรูปแบบการเพาะสักร (ค่อยๆ เท และเทอย่างรวดเร็ว) ต่อ % ผลผลิตของ AgNPs .....	37
ตารางที่ 7 ทฤษฎีในการยับยั้งแบคทีเรียของ AgNPs (1-30 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สังเคราะห์จากสารสกัดของเปลือกส้มโอ แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง หน่วยเซนติเมตร (cm) .....	48
ตารางที่ 8 ทฤษฎีในการยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) (30-500 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สังเคราะห์จากสารสกัดของเปลือกส้มโอ แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (cm) .....	50
ตารางที่ 9 ค่า CFU/ml ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่มีการเติมตัวอย่าง (Amp, AgNO <sub>3</sub> , P.E, 30, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตรของ AgNPs) ลงในอาหารเพาะเลี้ยง และค่า MIC และ MBC ของ AgNPs .....	52
ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นการยับยั้งของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ใช้ AgNPs ในการทดสอบ .....	54
ตารางที่ 11 ผลของ AgNPs (0, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อสัดส่วนการเจริญเติบโต .....	57
ตารางที่ 12 ผลของ AgNPs (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อสัดส่วนการเจริญเติบโต (น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง) ของโปรโตคอร์มกล้ายไม้หวายจีน <i>D. officinale</i> ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ .....	60

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 การประยุกต์ใช้ AgNPs ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ.....	4
ภาพที่ 2 กระบวนการที่ใช้สังเคราะห์ AgNPs (กายภาพ, เคมี และชีวภาพ).....	5
ภาพที่ 3 สัมไอสายพันธุ์ขาน้ำผึ้ง.....	7
ภาพที่ 4 การสังเคราะห์ AgNPs ด้วยวิธีทางชีวภาพ.....	8
ภาพที่ 5 กลไกในการสังเคราะห์ AgNPs ทางชีวภาพ.....	8
ภาพที่ 6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ AgNPs ที่ pH ต่าง ๆ และขนาดของ AgNPs.....	9
ภาพที่ 7 TEM ของ AgNPs ที่ pH ต่างกัน.....	9
ภาพที่ 8 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงช่วง UV-vis ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ AgNPs.....	12
ภาพที่ 9 สเปกตรัม FTIR ของ AgNPs.....	13
ภาพที่ 10 สเปกตรัม XRD ของ Ag.....	14
ภาพที่ 11 AgNPs จากกล้อง TEM.....	15
ภาพที่ 12 สเปกตรัม EDX ของ AgNPs ที่สังเคราะห์โดยใช้ F.carica.....	16
ภาพที่ 13 การเตรียมเปลือกส้ม โอดั้งแต่เปลือกสด ไปยังสารสกัดของส้มโอ.....	22
ภาพที่ 14 เครื่อง UV-Visible spectrophotometer (Biochrom Libra S22, UK).....	24
ภาพที่ 15 เครื่อง X-ray diffraction spectroscopy (AERIS).....	25
ภาพที่ 16 เครื่อง Transmission electron microscopy ควบคู่กับ Energy-dispersive X-ray spectroscopy.....	26
ภาพที่ 17 เครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (PerkinElmer).....	27
ภาพที่ 18 กล้วยไม้สกุลหวายจีน (Dendrobium officinale).....	29
ภาพที่ 19 การเปลี่ยนสีของสารสกัดจากเปลือกส้มโอที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย AgNO <sub>3</sub> .....	32

ภาพที่ 20 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง UV-Visible ของ AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ โดยศึกษาความเข้มข้นของ AgNO<sub>3</sub> ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (1 (A), 2 (B) และ 3 (C) มิลลิโมลาร์) ผสมกับสารสกัดเปลือกส้มโอที่ปรับ pH ปริมาตร 75 มิลลิลิตร (4.8, 5, 6, 7 และ 8) ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง .....35

ภาพที่ 21 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง UV-Visible ของ AgNPs จากสารสกัดเปลือกส้มโอโดยศึกษาเวลาในการทำปฏิกิริยา (24 และ 48 ชั่วโมง) ความเข้มข้นของ AgNO<sub>3</sub> 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดเปลือกส้มโอที่ pH 8 ปริมาตร 75 มิลลิลิตร.....36

ภาพที่ 22 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง UV-Visible ของ AgNPs ที่สังเคราะห์ทางชีวภาพ ศึกษารูปแบบการทดสอบ (ค่อยๆ เท และเทอย่างรวดเร็ว) ความเข้มข้นของ AgNO<sub>3</sub> 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดเปลือกส้มโอที่ pH 8 ปริมาตร 75 มิลลิลิตร.....37

ภาพที่ 23 สเปกตรัม Fourier transform infrared ของ AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ pH 8 ร่วมกับ AgNO<sub>3</sub> 2 มิลลิโมลาร์, ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 24 ชั่วโมง.....39

ภาพที่ 24 รูปแบบ XRD ของ AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ pH 8 ร่วมกับความเข้มข้นของ AgNO<sub>3</sub> 2 มิลลิโมลาร์, เวลาทำปฏิกิริยาที่ 24 ชั่วโมง.....40

ภาพที่ 25 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ AgNPs จากสารสกัดเปลือกส้มโอด้วยวิธี TEM.....42

ภาพที่ 26 โปรไฟล์ Energy dispersive X-ray analysis pattern (EDX) ของ AgNPs ทางชีวภาพ.....43

ภาพที่ 27 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) ของเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและนำมาข้อมแกรม.....44

ภาพที่ 28 โชนการยับยั้งของสารละลาย AgNO<sub>3</sub> 2 มิลลิโมลาร์, Ampicillin 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร P.E. และ AgNPs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร) ด้วยวิธี agar well diffusion.....47

ภาพที่ 29 โชนการยับยั้งของสารละลาย AgNO<sub>3</sub> 2 มิลลิโมลาร์, Ampicillin 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร P.E. และ AgNPs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (30, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร) ด้วยวิธี agar well diffusion.....49

ภาพที่ 30 ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย .....51

ภาพที่ 31 อาหารที่แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลาย AgNPs ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC) A) E. coli และ B) P. aeruginosa .....53

ภาพที่ 32 โพรโตคอร์มของกล้วยไม้หวายจีนที่เพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่งเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหารเหลว half-strength MS ที่มีการเติมตัวกระตุ้น.....	56
ภาพที่ 33 ผลของความเข้มข้น AgNPs (0, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อปริมาณ สารพฤษเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระ .....	58
ภาพที่ 34 โพรโตคอร์มของกล้วยไม้หวายจีนที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ในอาหารเหลว half-strength MS ที่มีการเสริมด้วย AgNPs (1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร).....	59
ภาพที่ 35 ผลของความเข้มข้น AgNPs (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อการผลิต สารพฤษเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระ .....	62





## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

อนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) นิยมนำไปใช้เป็นสารต้านจุลชีพในสินค้าอุปโภคบริโภค เช่น ผงซักฟอก เครื่องใช้ไฟฟ้า และอุปกรณ์ทางการแพทย์ แต่ในด้านการเกษตรนั้นยังมีการนำมาใช้ค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานมานี้มีการนำ AgNPs มาใช้เป็นตัวกระตุ้นเพื่อเพิ่มชีวมวลและสารพฤกษเคมีของแคลลัส (Ali *et al.*, 2019) เนื่องจาก AgNPs สามารถดูดซึมและเคลื่อนย้ายได้ง่ายภายในเซลล์พืช (Saha & Dutta Gupta, 2018) โดยทั่วไป AgNPs ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์นั้นมักทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของมนุษย์ (Ndikau *et al.*, 2017) ดังนั้นการสังเคราะห์ทางชีวภาพจึงได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น การสังเคราะห์อนุภาคนาโนทางชีวภาพ โดยใช้สารสกัดจากพืชนั้นจะอาศัยสารจากพืชมาทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ซึ่งมีข้อดี คือ ไม่เป็นพิษ ราคาถูก และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Jasuja *et al.*, 2014) โดยเฉพาะการสังเคราะห์จากของเสียทางการเกษตรจำพวกเปลือกผลไม้ นั้นได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เช่น เปลือกส้ม (Skiba & Vorobyova, 2019), เปลือกกล้วย (Ibrahim, 2015) และ (Kokila *et al.*, 2015), เปลือกทับทิม (Goudarzi *et al.*, 2016) และเปลือกส้มโอ (Ali *et al.*, 2020) งานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการสังเคราะห์ AgNPs จากเปลือกส้มโอ เนื่องจากเปลือกส้มโอเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) และสารต้านอนุมูลอิสระมากมายที่สามารถใช้เป็นตัวรีดิวซ์สำหรับการสังเคราะห์ AgNPs (Jalani *et al.*, 2018) ปัจจุบันการประยุกต์ใช้ AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดจากพืชเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชยังมีค่อนข้างน้อย จากงานวิจัยของ Ali *et al.* (2019) มีการทดสอบการเสริม AgNPs เป็นตัวกระตุ้นในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Caralluma tuberculata* พบว่ามีการสะสมของชีวมวลและสารทุติยภูมิ (Ali *et al.*, 2019) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์ AgNPs จากสารสกัดจากเปลือกส้มโอส่วนสีเขียว โดยในเบื้องต้นจะศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ AgNPs เช่น ความเข้มข้นของ AgNO<sub>3</sub>, pH ของสารสกัด, รูปแบบการทดสอบสารสกัด และเวลาในการทำปฏิกิริยา เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์จากนั้นจะศึกษาการประยุกต์ใช้ AgNPs สำหรับการเพิ่มของชีวมวล สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Phenolic และ Flavonoid) และสารต้านอนุมูลอิสระของโพรโตคอร์ัมกล้วยไม้สกุลหวายจีน (*Dendrobium officinale*) อีกทั้งยังประเมินฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของ AgNPs อีกด้วย

## 1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ AgNPs จากสารสกัดเปลือกส้มโอ

1.2.2 ประเมินผลของ AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอต่อการผลิตชีวมวลและสารพฤกษเคมี (Phenolic และ Flavonoid) และสารต้านอนุมูลอิสระของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย (*D. officinale*)

## 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ AgNPs จากสารสกัดเปลือกส้มโอ โดยปัจจัยที่มีการศึกษา คือ ความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  (1, 2 และ 3 มิลลิโมลาร์) ร่วมกับ pH ของสารสกัด (4.8, 5, 6, 7 และ 8), เวลาในการทำปฏิกิริยา (24 และ 48 ชั่วโมง) และรูปแบบการเทสารสกัด (ค่อย ๆ เท และเทอย่างรวดเร็ว) โดยปัจจัยความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  ร่วมกับ pH ของสารสกัด จะพิจารณาสภาวะที่ดีที่สุดจากค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุด ณ  $\lambda_{\text{max}}$  ที่ปรากฏและในส่วน of รูปแบบการเทสารสกัดและเวลาในการทำปฏิกิริยา จะพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้

1.3.2 พิสูจน์เอกลักษณ์ของ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้จากสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้เทคนิคดังต่อไปนี้ ได้แก่ UV-Visible spectroscopy, X-ray diffraction spectroscopy (XRD), Transmission electron microscopy (TEM), Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) และ Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) เพื่อทราบขนาด รูปร่าง และความบริสุทธิ์ของ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้

1.3.3 ประเมินผลการประยุกต์ใช้ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้

1.3.3.1 ประเมินฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่นำมาใช้ทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้วิธี Agar well diffusion ซึ่งฤทธิ์ในยับยั้งจะประเมินจากการวัดโซนของการยับยั้งในหน่วยเซนติเมตร (cm) และมีการประเมินเพื่อหาความเข้มข้นของ AgNPs ในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (MIC, Minimal inhibitory concentration) และหาความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MBC, minimal bactericidal concentration)

1.3.3.2 ประเมินผลของความเข้มข้น AgNPs ต่อการผลิตชีวมวล สารพฤกษเคมี (Phenolic และ Flavonoid) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายจีนที่เพาะเลี้ยงใน

อาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง (Static condition) เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยมีการวิเคราะห์สัดส่วนการเจริญ (Growth ratio) การผลิตสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic) และสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (FRAP และ DPPH)

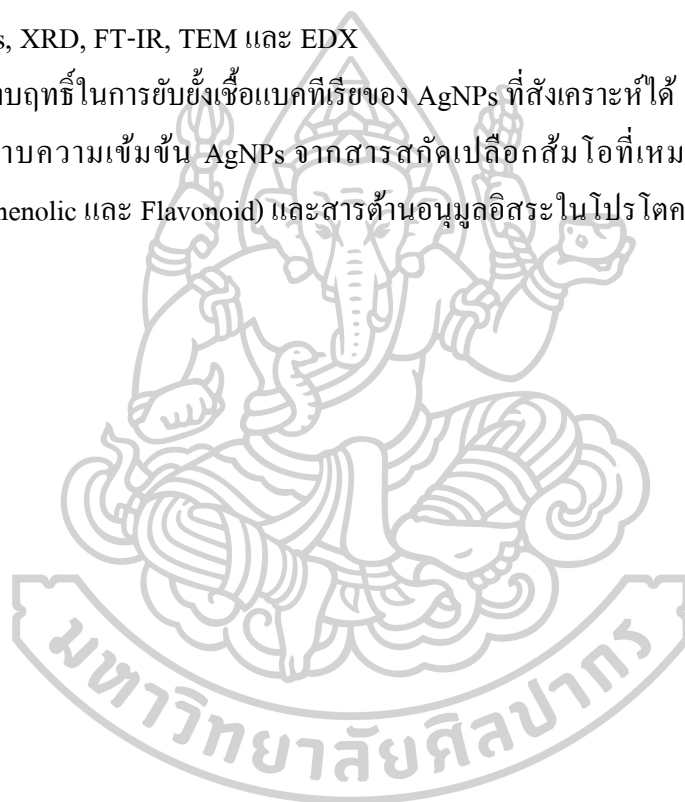
#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้สถานะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ AgNPs ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้สารสกัดจากเปลือกส้มโอซึ่งเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เป็นประโยชน์

1.4.2 ทราบคุณลักษณะของ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้จากสารสกัดเปลือกส้มโอในด้านต่าง ๆ ได้แก่ UV-Vis, XRD, FT-IR, TEM และ EDX

1.4.3 ทราบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้

1.4.4 ทราบความเข้มข้น AgNPs จากสารสกัดเปลือกส้มโอที่เหมาะสมต่อการผลิตสารพฤกษเคมี (Phenolic และ Flavonoid) และสารต้านอนุมูลอิสระในโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายจีน

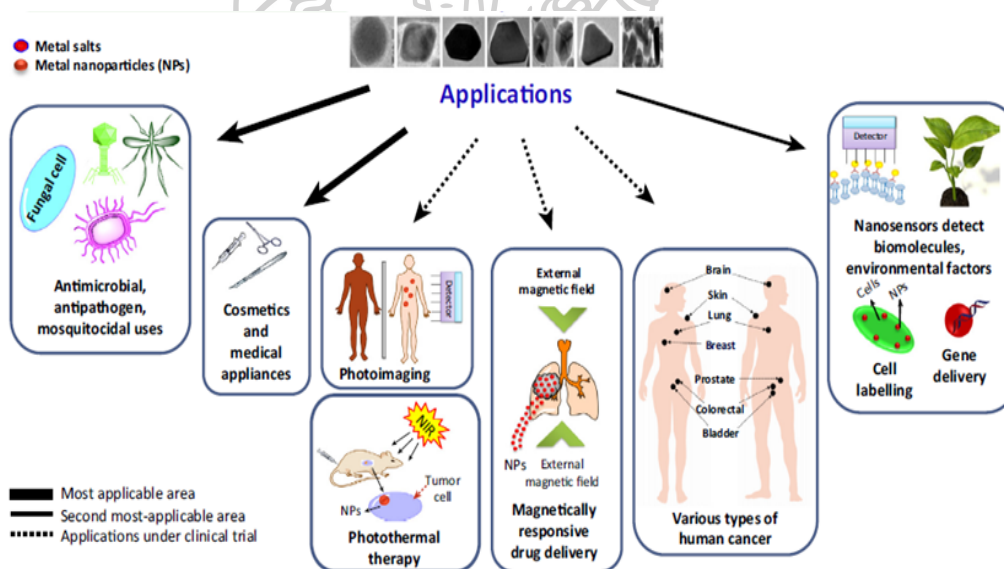


## บทที่ 2

### วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 นาโนเทคโนโลยี

อนุภาคนาโน (NPs) เป็นวัสดุที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 1-100 นาโนเมตร (Jeevanandam *et al.*, 2018) และมีคุณสมบัติเฉพาะตัว เช่น น้ำหนักของโมเลกุลต่ำ, อัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมีขนาดใหญ่, มีความสามารถในการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน และการทำปฏิกิริยาต่อพื้นผิว ((Bayda *et al.*, 2019) และ (Salachna *et al.*, 2019)) โดยมีการนำ AgNPs ไปประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ยา, บรรจุภัณฑ์อาหาร, เซ็นเซอร์สำหรับโมเลกุลชีวภาพ, เทคโนโลยีส่งยีน และติดตามเซลล์ในพืชและยา รวมทั้งมีการนำไปใช้กับเครื่องสำอางด้วย (ภาพที่ 1) (Singh *et al.*, 2016) นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอีกด้วย (Rahmawati *et al.*, 2022)

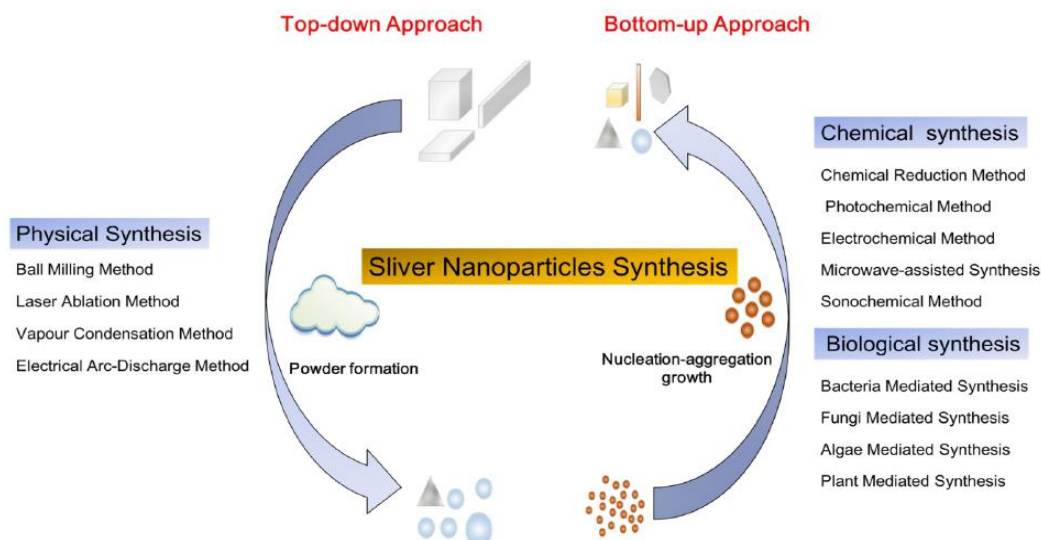


ภาพที่ 1 การประยุกต์ใช้ AgNPs ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ

(Singh *et al.*, 2016)

## 2.2 กระบวนการสังเคราะห์ AgNPs

กระบวนการสังเคราะห์ AgNPs แบ่งออกเป็น 2 กระบวนการ คือ จากบนสู่ล่าง (top-down) และ จากล่างขึ้นบน (bottom-up) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กระบวนการที่ใช้สังเคราะห์ AgNPs (กายภาพ, เคมี และชีวภาพ)

(Xu *et al.*, 2020)

โดยวิธีการ top-down คือการก่อตัวของ NPs โดยใช้แรงทางกายภาพ (physical forces) ในการสังเคราะห์ เช่น พลังงานกลที่ใช้ในการบดและการเจียร, พลังงานความร้อนที่ใช้การควบแน่นของไอ และการใช้แสงเลเซอร์ (Ju-Nam & Lead, 2008) วิธี top-down เป็นวิธีในการสังเคราะห์ NPs ทางกายภาพซึ่งจะได้ NPs ที่บริสุทธิ์และไม่มีสารเคมีเจือปน แต่วิธีดังกล่าวทำให้ NPs เกาะตัวกันเป็นก้อน เนื่องจากไม่มีสารที่ทำให้คงตัว (stabilized agent) หรือสารยึดเกาะ (capping agent) อีกทั้งยังใช้อุปกรณ์และพลังงานที่ซับซ้อน

ส่วนวิธีการ bottom-up จะเป็นการสร้างกลุ่ม NPs ที่ซับซ้อนจากองค์ประกอบในระดับโมเลกุลซึ่งจะอาศัยกระบวนการ nucleation และ growth processes (Ju-Nam & Lead, 2008) และ (Prasad Yadav *et al.*, 2012) โดยวิธีนี้เป็นวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีและชีวภาพ ในส่วนของการสังเคราะห์ทางเคมีจะใช้ควบคู่กับพลังงาน เช่น ปฏิกริยาจากแสง (photochemical) (Zheng *et al.*, 2016), ปฏิกริยาไฟฟ้าเคมี (electrochemical) (Kuntyi *et al.*, 2019), คลื่นไมโครเวฟ (microwave-assisted) (Chung *et al.*, 2018) และ คลื่นความถี่ (sonochemical) (Shameli *et al.*, 2012) แม้ว่าวิธีทางเคมีจะทำให้ NPs ได้อย่างรวดเร็ว แต่การใช้สารเคมีก็มีข้อจำกัดในเรื่องของอันตรายหากนำไปใช้งานทางการแพทย์และสิ่งแวดล้อม

ดังนั้นกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในการสังเคราะห์ AgNPs เพื่อลดความกังวลเรื่องความเป็นพิษ โดยทั่วไปกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ

จะทำได้โดยอาศัยจุลินทรีย์หรือสารสกัดจากพืชในกระบวนการสังเคราะห์ สำหรับในงานวิจัยผู้วิจัยได้สนใจเลือกใช้สารสกัดจากพืช เนื่องจากในพืชมีสารพฤกษเคมีจำพวกฟลาโวน, เทอร์พีนอยด์, ฟลาโวนอยด์, ฟีนอลิก, อัลคาลอยด์ และควินิน (Kuppusamy *et al.*, 2016) ที่นำมาใช้เป็นตัวรีดิวซ์ได้ อีกทั้งยังใช้ระยะเวลาในการรีดิวซ์โลหะสั้นกว่าจุลินทรีย์ (Jha *et al.*, 2009) ดังตัวอย่างงานวิจัยที่แสดงในตารางที่ 1 ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีการใช้สารสกัดจากพืชมาสังเคราะห์อนุภาคนาโนค่อนข้างมาก

ตารางที่ 1 การสังเคราะห์ AgNPs ทางชีวภาพจากสารสกัดจากพืชต่าง ๆ

พืชที่ใช้สังเคราะห์	ชนิดของ NPs	การประยุกต์ใช้	อ้างอิง
<i>Musa paradisiaca</i>	ซิลเวอร์	ต้านจุลชีพ	Ibrahim (2015)
<i>Citrullus lanatus</i>	ซิลเวอร์	-	Ndikau <i>et al.</i> (2017)
<i>Cucumis prophetarum</i>	ซิลเวอร์	ต้านจุลชีพและยับยั้งเซลล์มะเร็ง	Hemlata <i>et al.</i> (2020)
<i>Euphrasia officinalis</i>	ซิลเวอร์และทอง	ยับยั้งเซลล์มะเร็ง	Singh <i>et al.</i> (2018)
<i>Carissa carandas</i>	ซิลเวอร์	ต้านจุลชีพ	Rahuman <i>et al.</i> (2021)
<i>Eranthemum pulchellum</i>	ซิลเวอร์	ต้านจุลชีพและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ	Yadav <i>et al.</i> (2021)
<i>Citrus sinensis</i>	ซิลเวอร์	ต้านจุลชีพ	Mogole <i>et al.</i> (2021)
	ซิลเวอร์	ต้านจุลชีพ	Dutta <i>et al.</i> (2020)
<i>Citrus maxima</i>	ซิลเวอร์	ต้านจุลชีพ	Ali <i>et al.</i> (2020)
	ซิลเวอร์	ต้านจุลชีพ	Kaviya <i>et al.</i> (2011)

สำหรับงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำสารสกัดจากเปลือกส้มโอส่วนสีเขียวสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้งมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ เนื่องจากเปลือกส้มโอเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำนวนมากในจังหวัดนครปฐมและเปลือกของส้มโอยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารสำคัญที่ช่วยสังเคราะห์ AgNPs ได้สำเร็จ อีกทั้งในรายงานการวิจัยของ Toh *et al.* (2013) ที่ได้เปรียบเทียบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของเนื้อและเปลือกส้มโอส่วนสีเขียว 2 สายพันธุ์ พบว่าเปลือกส้มโอส่วนสีเขียวทั้ง 2 สายพันธุ์มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเนื้อส้มโอ



นอกจากนี้ส้มโอพันธุ์สีเขียวยังมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าส้มโอสีชมพู ทำให้อนุมานได้ว่า ส้มโอสีเขียวยังมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าและเป็นแหล่งอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลที่ทำให้ผู้วิจัยนำเปลือกส้มโอส่วนสีเขียวสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง (ภาพที่ 3) มาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

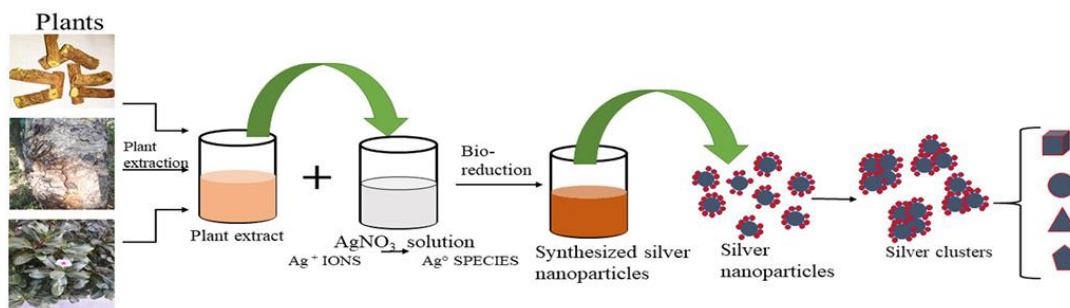


ภาพที่ 3 ส้มโอสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

### 2.3 หลักการสังเคราะห์ AgNPs ทางชีวภาพ

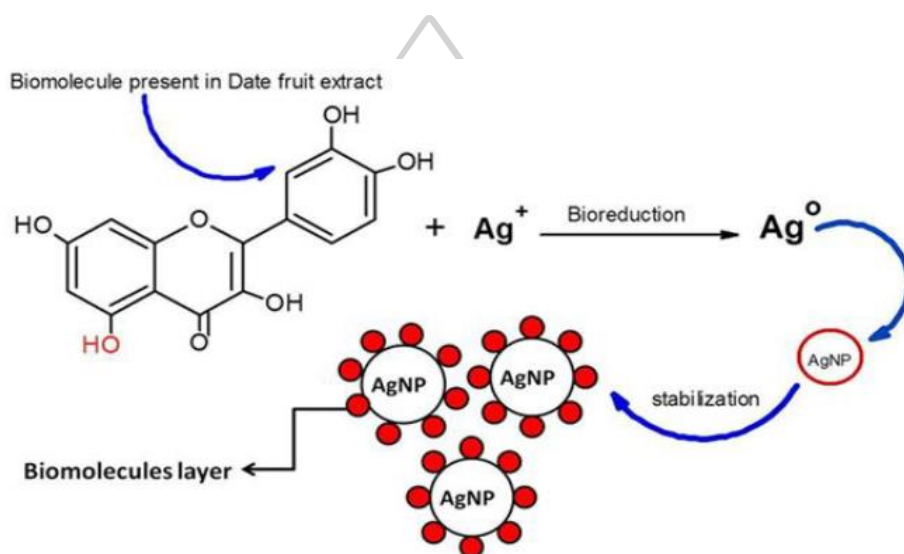
กระบวนการสังเคราะห์ AgNPs ทางชีวภาพจากพืชทำได้โดยนำสารสกัดจากพืชผสมกับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ( $\text{AgNO}_3$ ) ในช่วงระยะเวลาหนึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายผสมซึ่งบ่งบอกการก่อตัวของอนุภาคนาโน โดยสารละลาย  $\text{AgNO}_3$  ซึ่งมีไอออนบวก ( $\text{Ag}^+$ ) จะเปลี่ยนสถานะเป็น zero-valent ( $\text{Ag}^0$ ) เมื่อเติมสารสกัดจากพืชที่มีสารพฤกษเคมีจำนวนมาก โดยสารเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ จากนั้นจะเกิดกระบวนการสร้างนิวเคลียสขึ้น (nucleation process) หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะการก่อตัว (growth) ขึ้นทันที และนำไปสู่การรวมตัวของอนุภาคขนาดเล็กเพื่อสร้างอนุภาคนาโนขนาดใหญ่ขึ้น สุดท้ายรูปร่างต่างๆ ของอนุภาคนาโนจะก่อตัวขึ้น เช่น ลูกบาศก์ ทรงกลม สามเหลี่ยม หกเหลี่ยม ห้าเหลี่ยม แท่ง และสายไฟ ดังภาพที่ 4 และ 5 โดยมีปัจจัยที่ส่งผลต่อการสังเคราะห์และการก่อตัวของอนุภาคนาโน ได้แก่ พีเอช, อุณหภูมิ, ความเข้มข้นของสารสกัดจากพืช, เวลาในการทำปฏิกิริยา, ความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$ , ความดัน และอื่นๆ (Roy *et al.*, 2019)





ภาพที่ 4 การสังเคราะห์ AgNPs ด้วยวิธีทางชีวภาพ

(Jain *et al.*, 2021)



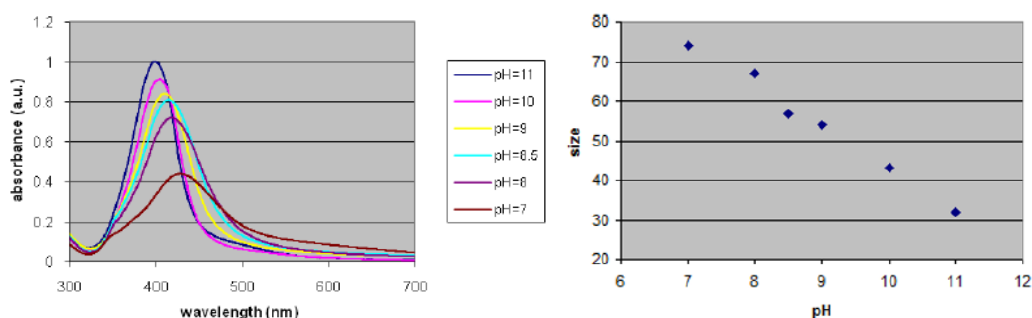
ภาพที่ 5 กลไกในการสังเคราะห์ AgNPs ทางชีวภาพ

(Zafar & Zafar, 2019)

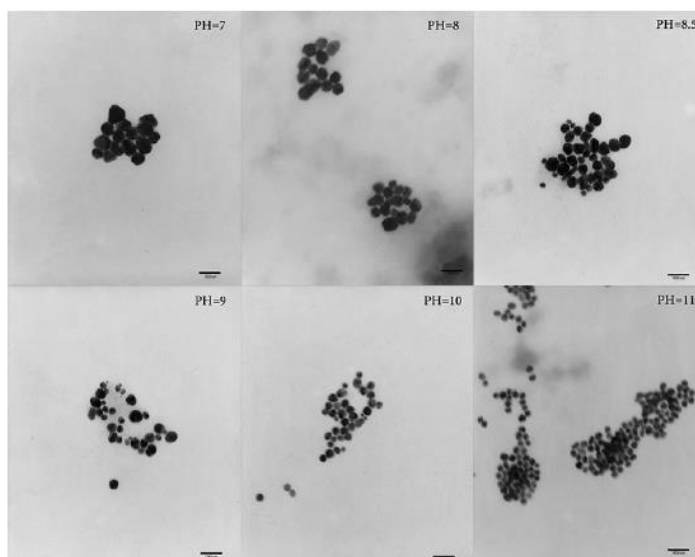
## 2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ AgNPs ทางชีวภาพ

### 2.4.1 พีเอช (pH)

ในกระบวนการสังเคราะห์ AgNPs มีการใช้สารละลาย  $\text{AgNO}_3$  และสารสกัดจากพืชภายในกระบวนการสังเคราะห์ โดยมีการปรับ pH ของสารสกัดจากพืช จากรายงานการวิจัยของ Alqadi *et al.* (2014) กล่าวไว้ว่าการเปลี่ยนแปลงของพีเคเรโซแนนซ์พลาสมอนบนพื้นผิว (surface plasmon resonance) บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงขนาดของ AgNPs อีกทั้งความยาวคลื่นที่สั้นลง บ่งชี้การลดลงของขนาด AgNPs (ภาพที่ 6A) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการเพิ่มค่า pH ของสารสกัด (pH เบส) ส่งผลให้เกิดอนุภาคนาโนที่มีขนาดเล็กลง (ภาพที่ 6B) และรูปร่างเป็นทรงกลมมากขึ้น (ภาพที่ 7) ในทางกลับกันพีเคเรโซแนนซ์พลาสมอนบนพื้นผิวที่มีลักษณะพีคที่กว้าง (broad) จะมีการก่อตัวของ AgNPs ที่มีขนาดหลากหลาย



ภาพที่ 6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ AgNPs ที่ pH ต่าง ๆ และขนาดของ AgNPs (Alqadi *et al.*, 2014)



ภาพที่ 7 TEM ของ AgNPs ที่ pH ต่างกัน

(Alqadi *et al.*, 2014)

Tripathy *et al.* (2009) ได้สังเคราะห์ AgNPs จากสารสกัดที่ได้จากใบสะเดา (*Azadirachta indica*) พบว่าเมื่อปรับ pH ให้อยู่ในช่วงเบสจะทำให้ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเล็กกว่า pH ที่เป็นกรด ซึ่ง pH ที่เป็นเบสจะมีประจุของ  $\text{OH}^-$  อยู่มากทำให้เกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้ามากขึ้น ทำให้เพิ่มความเสถียรให้กับ AgNPs และส่งผลให้การรวมตัวของ AgNPs เกิดน้อยลง ในขณะที่ช่วง pH ที่เป็นกรดนั้น AgNPs จะเกิดการรวมตัวกันมากขึ้น เนื่องจากการฟอร์มตัวของ AgNPs ในขั้นตอนการเกิดนิวเคลียสเกิดขึ้นได้ดีทำให้เกิดการฟอร์มตัวของอนุภาคที่มีขนาดใหญ่

Rousta & Ghasemi (2019) ศึกษาการสังเคราะห์ AgNPs โดยใช้สารสกัดจากใบ *Artemisia siebori* Besser เพื่อประเมินปัจจัยที่ส่งผลต่อการสังเคราะห์ โดยปัจจัยที่ศึกษาคือ pH ที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 พบว่า pH ในช่วงเบสให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงที่สุดและมีอนุภาคขนาดเล็กกว่า pH ในช่วงกรด อีกทั้ง pH เบสยังให้การกระจายตัวของ AgNPs ได้สูงที่สุด

Sharma *et al.* (2019) ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ AgNPs ซึ่งปัจจัยดังกล่าวคือ pH ของสารสกัดจากใบ *Ocimum gratissimum* โดยมีการปรับ pH ของสารสกัดที่ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 จะเห็นได้ว่า pH ในช่วง 4-6 (pH กรด) ไม่พบพีคของ surface plasmon resonance (SPR) ในทางกลับกันช่วง pH 7, 8 และ 9 (pH เบส) พบพีคของ SPR สูงสุดที่ pH 9 ซึ่งบ่งชี้การสังเคราะห์ AgNPs ที่เพิ่มขึ้น

จากรายงานการวิจัยที่กล่าวข้างต้นเกี่ยวกับปัจจัยของ pH ของสารสกัด จะเห็นได้ว่า pH มีผลต่อขนาดและรูปร่างของอนุภาค โดย pH ที่อยู่ในช่วงเหมาะสมสำหรับการก่อตัวของ AgNPs คือ pH ในช่วงเบส

#### 2.4.2 ความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรต ( $\text{AgNO}_3$ )

ความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  ส่งผลอย่างมากต่อการสังเคราะห์ AgNPs จากรายงานการวิจัยของ Jalani *et al.* (2018) ศึกษาผลของเวลาในการทำปฏิกิริยา, ปริมาณสารสกัดจากพืช และความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  ที่อาจจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนทางชีวภาพ โดยผู้วิจัยจะกล่าวถึงปัจจัยของความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  ที่ 1, 2, 3, 4, และ 5 มิลลิโมลาร์

พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  เพิ่มขึ้น พีค SPR จะเลื่อนตามความยาวคลื่นที่ยาวขึ้น ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่า  $\text{AgNO}_3$  ที่มีความเข้มข้นที่สูง (3-5 มิลลิโมลาร์) ทำให้มีการก่อตัวของ AgNPs ขนาดใหญ่ (Bar *et al.*, 2009) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  ที่ 2 มิลลิโมลาร์

Asimuddin *et al.* (2020) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ AgNPs จากสารสกัดใบ *Azadirachta indica* โดยศึกษาในส่วนของอุณหภูมิในการสังเคราะห์, เวลาในการทำปฏิกิริยา, ปริมาตรของสารสกัด และความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  โดยจะกล่าวถึงความเข้มข้น  $\text{AgNO}_3$  ซึ่งมีการศึกษาที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75, 1 และ 2 มิลลิโมลาร์ จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  มีผลอย่างมากต่อผลผลิตของ AgNPs จากความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  ที่เพิ่มขึ้นทำให้พีคของ SPR ก็เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน เนื่องจากการก่อตัวของ AgNPs ที่เพิ่มขึ้น (Yang *et al.*, 2011)

จากรายงานการวิจัยที่กล่าวไว้ข้างต้นเกี่ยวกับปัจจัยของความเข้มข้น  $\text{AgNO}_3$  พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  เพิ่มขึ้นทำให้พีค SPR มีการเคลื่อนของความยาวคลื่นที่ยาวขึ้น ซึ่งส่งผลทำให้มีการก่อตัวของ AgNPs เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

### 2.4.3 เวลาในการทำปฏิกิริยา

กระบวนการสังเคราะห์ AgNPs จำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม ดังรายงานการวิจัยของ Veerasamy *et al.* (2011) กล่าวว่าไว้ว่า เมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจะทำให้มีการก่อตัวของอนุภาคมากขึ้น เนื่องจากอนุภาคที่ก่อตัวขึ้นมีความไม่เสถียรจึงจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ ซึ่ง AgNPs ที่มีการรวมตัวกันหลังจากช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดจะส่งผลทำให้อนุภาคมีขนาดที่ใหญ่ขึ้น โดยเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการปฏิกิริยาของงานวิจัยดังกล่าว คือ 60 นาที

Shameli *et al.* (2012) ศึกษาคุณสมบัติของ AgNPs ที่เวลาในการทำปฏิกิริยาต่าง ๆ (1, 3, 6, 24 และ 48 ชั่วโมง) และประเมิน AgNPs ด้วย TEM, XRD, FTIR และ Zeta potential จากงานวิจัยพบว่า เมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นทำให้ความเข้มของพีค SPR เพิ่มขึ้นจนถึงเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 24 ชั่วโมง แต่หลังจาก 48 ชั่วโมงพีคของ SPR มีลักษณะกว้าง (broad) และค่าการดูดกลืนแสงลดลง โดยปรากฏการณ์ดังกล่าวเกี่ยวข้องกับขนาดของอนุภาคที่ใหญ่ขึ้นและการรวมตัวกันของผลึก (Darroudi *et al.*, 2010) อนุภาคที่มีขนาดใหญ่อาจเกิดจาก stabilizer ไม่สามารถยับยั้งขนาดของ AgNPs ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Jalab *et al.* (2021) ศึกษาผลของสภาวะ (ความเข้มข้นของสารสกัด, ชนิดของสารสกัด, อุณหภูมิในการสังเคราะห์ และเวลาในการทำปฏิกิริยา) ต่อขนาดของ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้จากงานวิจัยพบว่า เมื่อเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นก็จะทำให้ได้ขนาดของอนุภาคเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยภายหลังจากช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม อนุภาคจะเริ่มจับตัวกันเป็นก้อนและขนาดของอนุภาคก็เพิ่มขึ้นด้วย

จากรายงานการวิจัยที่กล่าวไว้ข้างต้นที่เกี่ยวกับเวลาในการทำปฏิกิริยาของการสังเคราะห์อนุภาค สรุปได้ว่าระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาแปรผันตรงกับปริมาณของ AgNPs และถ้าใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยานานขึ้นจะทำให้ได้อนุภาคขนาดใหญ่

### 2.4.4 ลักษณะการทดสอบการทดสอบในสารละลาย AgNO<sub>3</sub>

ในส่วนของคุณสมบัติการทดสอบการทดสอบในสารละลาย AgNO<sub>3</sub> ก็มีความสำคัญในการกำหนดขนาดของ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้เช่นเดียวกัน ดังรายงานการวิจัยของ Nakhjavani *et al.* (2017) กล่าวว่า การเติมสารละลาย AgNO<sub>3</sub> ลงในสารสกัดจากชาและมีการกวนจะทำให้ขนาดของอนุภาคเล็กลง

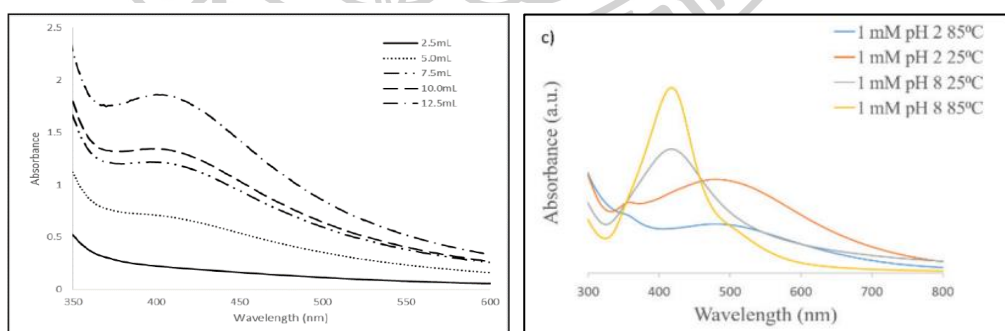
## 2.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ AgNPs ทางชีวภาพ

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธีทางชีวภาพมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบขนาด, รูปร่าง, โครงสร้างของผลึก, ธาตุที่เป็นองค์ประกอบใน AgNPs และหมู่ฟังก์ชันที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ AgNPs โดยมีการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ ดังนี้

### 2.5.1 UV-visible spectroscopy (UV-Vis)

เป็นเทคนิคที่นำมาใช้วิเคราะห์ลักษณะเบื้องต้นของสารละลาย AgNPs ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย เชื่อถือได้ และสามารถตรวจสอบการสังเคราะห์และความคงตัวของ AgNPs การวิเคราะห์จะอาศัยหลักการตรวจสอบสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorption spectrum) ในช่วงความยาวคลื่น UV-Visible โดยใน AgNPs จะพบแถบ valence และแถบการนำไฟฟ้าที่อยู่ใกล้กันมาก ส่งผลให้มีการเคลื่อนที่อย่างอิสระของอิเล็กตรอน จากนั้นพวกอิเล็กตรอนอิสระจะทำให้เกิดแถบพลาสมอนเรโซแนนซ์ (SPR) กล่าวคือเกิดจากการผันผวนของอิเล็กตรอน AgNPs ในการสะท้อนกับคลื่นแสง (Panja *et al.*, 2021) กระบวนการสังเคราะห์ AgNPs เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นและแสดงแถบการดูดกลืนแสงที่แรงและคมชัดในช่วง 400–500 นาโนเมตร (Sathyavathi *et al.*, 2010)

Jalani *et al.* (2018) สังเคราะห์ AgNPs โดยใช้สารสกัดจากเปลือกส้มโอซึ่งมีการเติมสารสกัดในปริมาตรที่แตกต่างกัน คือ 2.5, 5, 7.5, 10 และ 12.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ absorption spectrum ที่ช่วงความยาวคลื่น UV-visible พบว่าปรากฏ peak ในช่วง 401.6 - 407.6 นาโนเมตร ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ DoGan Calhan & M (2020) ซึ่งพบ peak ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนอยู่ในช่วง 400 - 500 นาโนเมตร (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงช่วง UV-vis ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ AgNPs ด้วยวิธีทางชีวภาพ

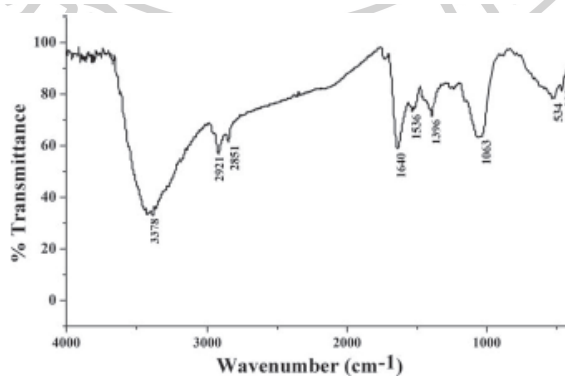
(Jalani *et al.*, 2018) และ (DoGan Calhan & M, 2020)

### 2.5.2 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

เป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบ, โครงสร้างทางเคมี, พันธะทางเคมี และหมู่ฟังก์ชันของ โมเลกุล (Baudot *et al.*, 2010) โดยการระบุลักษณะเฉพาะของ AgNPs ด้วย FTIR เพื่อระบุโมเลกุล ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารเคลือบ (coating agent) และสารทำให้คงตัว (stabilizing agent) และเพื่อ ตรวจสอบการ reduction ของไอออนเงินได้ (Silva *et al.*, 2019)

Siddharthan (2019) สังเคราะห์ AgNPs ทางชีวภาพโดยใช้สารสกัดจากใบของ *Catharanthus roseus* พบการแสดงพีกสำคัญที่ 2401, 2073, 1706, 1084 และ 8208  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งบ่งชี้ว่ามี หมู่ฟังก์ชันต่างๆ เช่น หมู่กรดคาร์บอกซิลิก (O-H), กลุ่มอัลไคนีส (RC=CH), หมู่คีโตน (C=O), แอลกอฮอล์, หมู่เอไมด์, วงแหวนพีนิล, กลุ่มเอมีนปฐมภูมิและทุติยภูมิ (N-H) ตามลำดับ

Ali *et al.* (2020) สังเคราะห์ AgNPs ทางชีวภาพโดยใช้สารสกัดจากเปลือกส้มโอ แสดง จุดสูงสุด 9 จุดที่ 378, 2921, 2851, 1640, 1536, 1396, 1063, 534 และ 466  $\text{cm}^{-1}$  ในส่วนของจุดสูงสุด ที่ 3361.02  $\text{cm}^{-1}$  แสดงถึงการยืด OH สำหรับแอลกอฮอล์และฟีนอลที่อาจมีอยู่ในสารสกัดจากผลส้ม โอ (S *et al.*, 2017), จุดสูงสุดที่ 2921 และ 2851  $\text{cm}^{-1}$  แสดงการยืดตัวของ C-H (Sathyavathi *et al.*, 2010), เอไมด์ I และเอไมด์ II ของโปรตีนแสดงที่ 1640 และ 1536  $\text{cm}^{-1}$  (Shanker *et al.*, 2003), จุดสูงสุดที่ 1396  $\text{cm}^{-1}$  สอดคล้องกับ C-N bonds, ในขณะที่จุดสูงสุดที่ 1063  $\text{cm}^{-1}$  อาจเกิดจากการยืด ของ C-O และ C-O-C (Baudot *et al.*, 2010) และพีคการดัดโค้งที่แสดงที่ 534 และ 466  $\text{cm}^{-1}$  แสดง ถึงความแรงของ C-Cl ในสารประกอบฮาโลเจน (Balaji *et al.*, 2009)



ภาพที่ 9 สเปกตรัม FTIR ของ AgNPs

(Ali *et al.*, 2020)



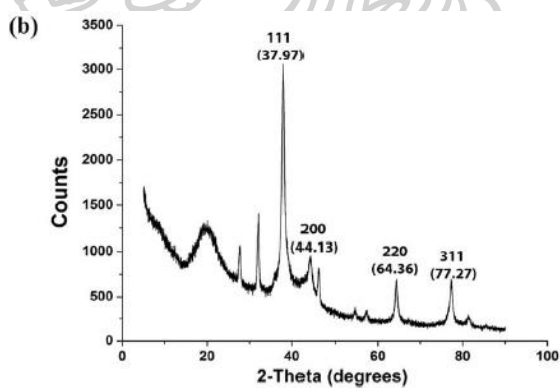
### 2.5.3 X-ray diffraction spectroscopy (XRD)

วิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของความเป็นผลึกของ AgNPs (Jain *et al.*, 2021) โดยรังสีเอกซ์ที่ตกกระทบพื้นผิวของคริสตัลจะส่งผลให้เกิดรูปแบบของการเลี้ยวเบนและสามารถสะท้อนโครงสร้างทางเคมีและกายภาพของตัวอย่างได้ (Panja *et al.*, 2021)

Ali *et al.* (2020) สังเคราะห์ AgNPs จากสารสกัดเปลือกส้มโอแล้วนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค XRD เปรียบเทียบกับโครงสร้างมาตรฐานของ Ag พบการปรากฏของ peak ที่ 37.1, 44.1, 64.36 และ 77.27 และยังพบ peak ของ AgCl บางส่วน

Jyoti *et al.* (2016) สังเคราะห์ AgNPs จาก *Urtica dioica* Lin เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย XRD พบการสะท้อนที่ 38.45°, 46.35°, 64.75° และ 78.05° ของระนาบผลึกที่ (111), (200), (220) และ (311)

Anandalakshmi *et al.* (2015) สังเคราะห์ AgNPs จาก *Pedaliium murex* พบยอดที่ 38.19°, 44.37°, 64.56° และ 77.47° ของระนาบผลึกที่ (111), (200), (220) และ (311)



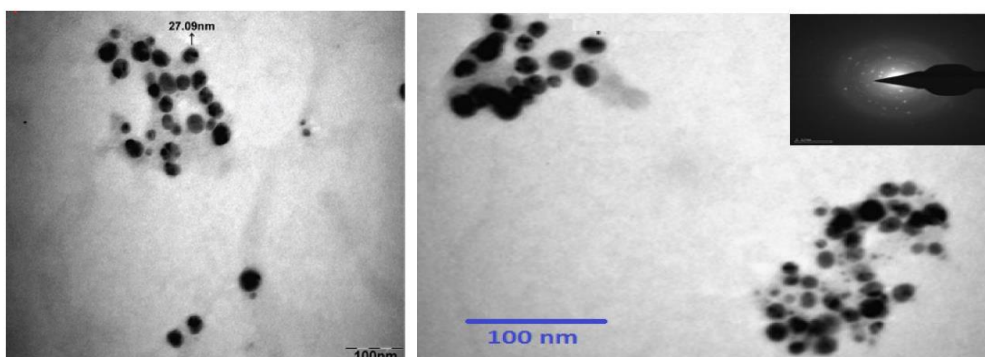
ภาพที่ 10 สเปกตรัม XRD ของ Ag

(Ali *et al.*, 2020)



### 2.5.4 Transmission electron microscopy (TEM)

เป็นเทคนิคที่สำคัญในการกำหนดลักษณะของอนุภาค โดยสามารถหาอนุภาคในเชิงปริมาณ, ขนาดของอนุภาค, การกระจายของขนาดของอนุภาค และสัณฐานวิทยาของอนุภาค (Panja *et al.*, 2021) ดังรายงานการวิจัยได้มีการสังเคราะห์ AgNPs จากสารสกัดของใบ *Viburnum lantana*, *Couroupita guianensis* และ *Malachra capitata* จากนั้นนำ AgNPs ส่งผ่านด้วย TEM จะให้ขนาดช่วง 20–70, 25–40, 30–35 นาโนเมตร ตามลำดับ และมีรูปร่างเป็นทรงกลมอย่างเห็นได้ชัด (Shafaghat, 2014), (Devaraj *et al.*, 2013) และ (Srirangam & Parameswararao, 2017)

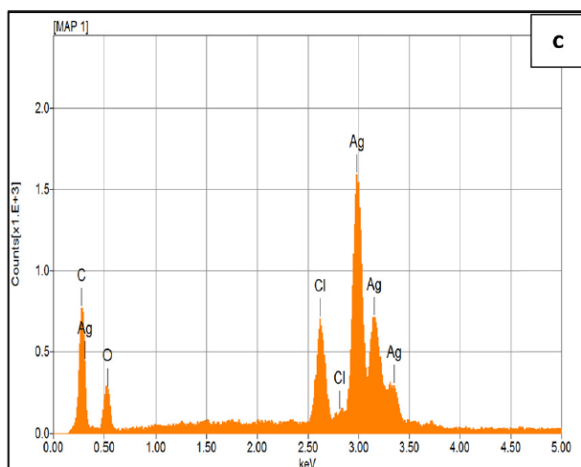


ภาพที่ 11 AgNPs จากกล้อง TEM

(Shafaghat, 2014) และ (Srirangam & Parameswararao, 2017)

### 2.5.5 Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX)

เป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบเฉพาะของ AgNPs ซึ่ง EDX จะวิเคราะห์ควบคู่กับ TEM โดย EDX ขึ้นอยู่กับการปล่อยรังสีเอกซ์ที่มีลักษณะเฉพาะของชิ้นงานที่นำมาทดสอบ ลำแสงของอนุภาคที่มีประจุพลังงานสูงจะถูกโฟกัสไปที่ตัวอย่างและอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงจะตกลงไปในแกนกลางและพลังงานจากการจับอิเล็กตรอนจะถูกปล่อยออกมา (Colpan *et al.*, 2018) ดังรายงานการวิจัยของ Almasoud *et al.* (2021) มีการวิเคราะห์ EDX ในองค์ประกอบของ AgNPs โดยทั่วไปผลึกของ AgNPs แสดงพีคประมาณ 3 keV เนื่องจากเรโซแนนซ์พลาสมอนพื้นผิวและกระบวนการสังเคราะห์ พีคของ Ag ปรากฏที่ 3 keV เนื่องจากมีธาตุ Ag เป็นองค์ประกอบ



ภาพที่ 12 สเปกตรัม EDX ของ AgNPs ที่สังเคราะห์โดยใช้ *F.carica*

## 2.6 การประยุกต์ใช้ AgNPs ที่สังเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพ

### 2.6.1 การประยุกต์ใช้ NPs ในการต้านจุลชีพ

ปัจจุบันในด้านเกษตรกรรมมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชและปุ๋ยในปริมาณที่มากเกินไป ซึ่งจะส่งผลเสียต่อดินและเพิ่มความต้านทานให้กับศัตรูพืช ดังนั้นการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบใหม่จึงมีความจำเป็น ดังนั้น AgNPs ที่สังเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวภาพจึงมีบทบาทที่นำมาใช้เป็นสารต้านจุลชีพในปัจจุบัน

จากรายงานการวิจัยที่แสดงในตารางที่ 2 ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของ AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ โดยจะทดสอบการต้านเชื้อดังต่อไปนี้ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยเป็นแบคทีเรียก่อโรคในพืช น้ำ และดิน โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ

Jones *et al.* (2014) กล่าวไว้ว่า *E. coli* ถูกพบในแหล่งน้ำผิวดิน และเกิดการปนเปื้อนมาจากปศุสัตว์ทำให้เกษตรกรที่มีการเพาะปลูกผักและผลไม้มีความกังวลอย่างมาก เนื่องจาก *E. coli* อาจะปนเปื้อนมาในน้ำที่จะใช้ในการเกษตร

Walker *et al.* (2004) มีรายงานว่า *P. aeruginosa* เป็นเชื้อก่อโรคในพืชที่สามารถสร้างไบโอฟิล์มและฆ่าได้ค่อนข้างยาก และ *P. aeruginosa* ทำให้เกิดโรคที่สามารถแพร่เชื้อไปยังรากของ *Arabidopsis thaliana* และ โหระพา (*Ocimum basilicum*) ทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในดินได้ ทำให้พืชเกิดการตายหลังจากเพาะปลูกเป็นเวลา 7 วัน

ในรายงานที่กล่าวข้างต้นถือเป็นวัตถุประสงค์หนึ่งที่จะนำเชื้ดงกล่าวมาใช้ในการทดลอง ซึ่งมีการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้ทางชีวภาพ ผลที่ได้จากการทดลองนี้จะสามารถประเมินการนำ AgNPs ไปประยุกต์และแก้ไขปัญหาในด้านเพาะเลี้ยงพืชได้ในอนาคต

ตารางที่ 2 การใช้ AgNPs ในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดของ จุลินทรีย์	ความเข้มข้นของ AgNPs	ผลที่ได้	อ้างอิง
<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i>	25, 50, 75, 100 และ 125 µg/ml	ยับยั้งที่ 8 mm - 15 mm	Rahuman <i>et al.</i> (2021)
<i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , และ <i>S. aureus</i>	2, 4 และ 6 µL	ยับยั้งที่ 10 – 48 mm	Almasoud <i>et al.</i> (2021)
<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> และ <i>S. aureus</i>	25, 50, 75, 100 และ 125 µg/ml	AgNPs ทางชีวภาพยับยั้งได้ดีกว่า AgNPs ทางเคมี โดยยับยั้งที่ 15 mm-18 mm	Garibo <i>et al.</i> (2020)
<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , และ <i>S. aureus</i>	500 และ 1000 ppm	ยับยั้งที่ 10.7 mm - 14.3 mm	Singh <i>et al.</i> (2016)
<i>Alternaria solani</i>	10, 20 และ 50 ppm	50 ppm สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด	Mohamed (2015)

## 2.6.2 การประยุกต์ใช้ NPs ทางเกษตร

มีการนำ AgNPs มาประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชชนิดต่างๆ การกระตุ้นให้มีการพัฒนาไปเป็นต้นหรือราก ตลอดจนการกระตุ้นให้มีการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ สำหรับข้อมูลการวิจัยที่แสดงในตารางที่ 3 เป็นตัวอย่างที่แสดงให้เห็นถึงผลกระทบเชิงบวกของการใช้ AgNPs ต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยรายงานการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า AgNPs สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและการผลิตสารของพืชได้ แต่บางรายงานการวิจัยกล่าวไว้ว่าที่ความเข้มข้นต่ำจะไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชและเมื่อให้ความเข้มข้นของ AgNPs สูงเกินไป จะทำให้ไปทำลายเซลล์พืชส่งผลให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชด้วย สำหรับในงานวิจัยนี้สนใจที่จะนำ AgNPs มาประยุกต์ใช้ในด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อส่งเสริมการเพิ่มของชีวมวลและการสร้างสารพฤกษเคมี โดยมีการรวบรวมข้อมูลความเข้มข้นของ AgNPs ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งความเข้มข้นในการทดลอง คือ 0, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะทดสอบในโปรโตคอลของกล้วยไม้สกุลหวายจีน (*D. officinale*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการแพร่กระจายค่อนข้างกว้าง โดยส่วนใหญ่นิยมนำมาใช้เป็นยาแผนจีน เช่น นำมาใช้เป็นยาขจัดความร้อน ด้านระบบการย่อยอาหาร และนำมาเป็นยาต้านมะเร็งได้อีกด้วย (Ding *et al.*, 2002)



ตารางที่ 3 ผลของการใช้ AgNPs ต่อการเจริญของพืชชนิดต่างๆ

ชนิดของพืช	ความเข้มข้นของ AgNPs	ผลที่ได้	อ้างอิง
Rice calli	0, 5, 10, 15 และ 20 mg/L	ความเข้มข้นที่ 5 mg/L กระตุ้นการงอกและผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี	Manickavasagam <i>et al.</i> (2019)
Potted Oriental Lilies	0, 25, 100 และ 150 ppm	สามารถกระตุ้นการเจริญและเร่งการออกดอกของลิลี่ได้	Salachna <i>et al.</i> (2019)
<i>Campomanesia rufa</i>	0.39, 0.77, 1.54 และ 15.4 mg/L	ความเข้มข้น 0.39, 0.77 และ 1.54 mg/L ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มชีวมวล และ 15.4 mg/L พบว่าต้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ	Timoteo <i>et al.</i> (2019)
Bitter gourd	0, 1, 5 และ 10 mg/L	ความเข้มข้น 5 และ 10 mg/L มีการกระตุ้นการผลิตสารฟลูคาเวมี	Chung <i>et al.</i> (2018)
<i>Brassica juncea</i>	0, 25, 50, 100, 200 และ 400 ppm	ความเข้มข้นที่ 50 ppm เหมาะสำหรับการเจริญและการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ	Sharma <i>et al.</i> (2012)
<i>Vanilla planifolia</i>	0, 25, 50, 100 และ 200 mg/L	ต้นอ่อนมีการเพิ่มจำนวนและผลิตสารฟีนอลิกและให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ	Spinoso-Castillo <i>et al.</i> (2017)

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Agar	Lab M LIMITED
Aluminium chloride ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	SIGMA – ALDRICH
Ascorbic acid	SIGMA – ALDRICH
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ( <i>DPPH</i> )	SIGMA – ALDRICH
Ferrous sulfate ( $\text{FeSO}_4$ )	SIGMA – ALDRICH
Folin-Ciocalteu's reagent	SIGMA – ALDRICH
Gallic acid	SIGMA – ALDRICH
Hydrochloric acid (HCl)	LAB-SCAN
Methanol	LAB SUPLIES
Myo-inositol	SIGMA – ALDRICH
Murashige and Skoog (MS)	PHYTOTECH
Nitric acid ( $\text{HNO}_3$ )	QREC
Quercetin	SIGMA – ALDRICH
Sodium acetate ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )	SRLCHEM
Sodium carbonate ( $\text{NaCO}_3$ )	SRLCHEM
Sodium hydroxide (NaOH)	RCILABSCAN
Silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ )	LOBA
Sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ )	FLUKA
Sucrose	AMRESCO
3.3.16 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)	SIGMA – ALDRICH

### 3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Autoclave	TOMY SX-700, SS-325
Auto pipette	BIOHIT, DENVILLE
Balance	SARTORIUS
Centrifuge	HEMLE
Conductivity meter	METTLER TOLEDO
Cuvette	STARNA
Desiccator	NIKKO
Energy dispersive x-ray spectrometer (EDX) *	TECNAI G2 20 S-Twin
Freeze dry	SCANVAC
Fourier transform infrared spectrophotometer (FTIR) *	PERKINELMER
Hot air oven	BINDER
Hotplate Stirrer	FISHER SCIENTIFIC
Laminar flow	DWYER MARK II
Microplate reader	TECAN
pH meter	ULTRA BASIC
Spectrophotometer	BIOCHROM LIBRA S22
Transmission electron microscope (TEM) *	TECNAI G2 20 S-Twin
Vacuum pump	ROCKER
Water bath	MEMMERT
X-ray diffraction (XRD)	AERIS

หมายเหตุ \* คือ เครื่องมือที่ส่งวิเคราะห์

### 3.3 เปลือกผลไม้ที่ใช้ในการวิจัย

เปลือกส้ม โอสถพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ได้จากตลาดปฐมมงคล อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม

### 3.4 พืชที่ใช้ในการวิจัย

โปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium officinale*) ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุนาต ออบสุวรรณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร



### 3.5 แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

3.5.1 แบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* และ *B. subtilis*

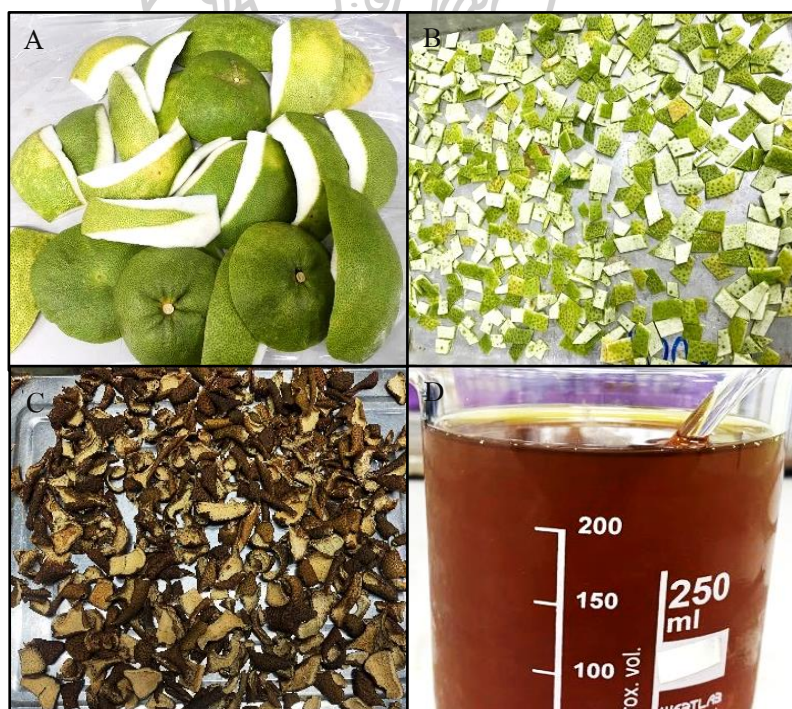
3.5.2 แบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli* และ *P. aeruginosa*

### 3.6 ระเบียบวิธีวิจัย

#### 3.6.1 การสังเคราะห์ AgNPs จากสารสกัดเปลือกส้มโอ

##### 3.6.1.1 การเตรียมสารสกัดจากเปลือกส้มโอ

นำเปลือกส้มโอ (ส่วนสีเขียว) มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น และหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นชั่งเปลือกส้มโอแห้ง 60 กรัม ใสลงในน้ำปราศจากไอออน (DI water) 600 มิลลิลิตรให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที รอให้เย็นแล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 จากนั้นนำสารสกัดที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีการนำสารสกัดเปลือกส้มโอไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH และ FRAP)



ภาพที่ 13 การเตรียมเปลือกส้มโอตั้งแต่เปลือกสดไปยังสารสกัดของส้มโอ

A. เปลือกส้มโอ B. เปลือกส้มโอที่มีการหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ C. เปลือกส้มโอที่ผ่านการอบที่ 60 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง D. สารสกัดที่ได้จากเปลือกส้มโอ

### 3.6.1.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ AgNPs

การสังเคราะห์ AgNPs จะมีการเติมสารสกัดจากเปลือกส้มโอ 75 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย  $\text{AgNO}_3$  1000 มิลลิลิตร และนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายผสมปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนแล้วล้างตะกอนด้วยน้ำ DI และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นนำส่วนของตะกอนไปทำให้แห้งภายใต้ความดันเย็นยิ่งยวด (Freeze drying) และเก็บผงของ AgNPs ในโถดูดความชื้น โดยงานวิจัยนี้มีการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ AgNPs คือ ศึกษาผลของความเข้มข้น  $\text{AgNO}_3$  (1, 2 และ 3 มิลลิโมลาร์) ร่วมกับ pH ของสารสกัดจากเปลือกส้มโอ (pH 4.8, pH 5, pH 6, pH 7 และ pH 8) พิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดที่ปรากฏในช่วงความยาวคลื่นที่มีการตรวจหาค่าการดูดกลืนแสง (absorption spectrum), เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (24 และ 48 ชั่วโมง) และลักษณะในการทดสอบสกัดเปลือกส้มโอ (ค่อยๆ เท กับ เทอย่างรวดเร็ว) จะพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (% yield) ของ AgNPs ซึ่งคำนวณได้ตามสูตรดังกล่าว (Sood & Chopra, 2017)

$$\% \text{Yield} = \frac{\text{น้ำหนักของ AgNPs ที่ผ่านการ Freeze dried}}{\text{น้ำหนักของ AgNO}_3 \text{ ที่ใช้}} \times 100$$

โดยมีขั้นตอนการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

#### 3.6.1.2.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลาย $\text{AgNO}_3$ ร่วมกับ pH ของสารสกัดเปลือกส้มโอ

นำสารสกัดจากเปลือกส้มโอที่มีการปรับค่า pH ที่ 4.8, 5, 6, 7 และ 8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.5 โมลาร์ หรือกรดไนตริก ( $\text{HNO}_3$ ) 0.5 โมลาร์ 75 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย  $\text{AgNO}_3$  ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร และนำไปให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย AgNPs ที่ช่วงความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer

#### 3.6.1.2.2 ศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

นำสารสกัดเปลือกส้มโอ pH 8 ผสมกับสารละลาย  $\text{AgNO}_3$  ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และนำไปให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย AgNPs ที่ช่วงความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer

### 3.6.1.2.3 ศึกษาลักษณะในการทดสอบสกัดเปลือกส้มโอ

นำสารสกัดเปลือกส้มโอที่ pH 8 เทผสมกับสารละลาย  $\text{AgNO}_3$  ที่ 2 มิลลิโมลาร์ โดยจะปล่อยสารสกัดผ่านบิวเรต โดยใช้อัตราการไหล (Flow rate) ที่ 7 มิลลิลิตรต่อนาที กับ สารสกัดอย่างรวดเร็ว โดยใช้เวลา 1 นาที และนำไปให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย AgNPs ที่ช่วงความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer

### 3.6.2 พิสูจน์เอกลักษณ์ของ AgNPs

พิสูจน์เอกลักษณ์ (characterization) ของ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคต่างๆ ได้แก่ UV- Visible spectroscopy, X- ray diffraction spectroscopy (XRD), Transmission electron microscopy (TEM), Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) และ Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

#### 3.6.2.1 UV-visible spectroscopy (UV-Vis)

เทคนิควิเคราะห์เบื้องต้นที่ใช้ยืนยันการก่อตัวของ AgNPs ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย และความยาวคลื่นจำเพาะของ AgNPs โดยนำสารละลายคอลลอยด์ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer (Biochrom Libra S22, UK)



ภาพที่ 14 เครื่อง UV-Visible spectrophotometer (Biochrom Libra S22, UK)

#### 3.6.2.2 X-ray diffraction spectroscopy (XRD)

เทคนิควิเคราะห์โครงสร้างผลึกของ AgNPs โดยนำสารละลายคอลลอยด์ของ AgNPs ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนแล้วล้างตะกอนด้วยน้ำ DI และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นนำส่วนของตะกอนไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze-dried) และบดผงของ AgNPs ด้วยครกเครื่องแก้วอาร์เกต และนำไปวิเคราะห์ XRD ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ยี่ห้อ AERIS โดยใช้ Cu Ka ที่มีความยาวคลื่น 1.54 อังสตรอม (Å), ความต่างศักย์ 40 กิโลโวลต์ (KV), กระแสไฟฟ้า 8 มิลลิแอมแปร์ (mA) และ ช่วงมุม  $2\theta$  เท่ากับ  $20-90^\circ$  และหาขนาดของผลึก AgNPs โดยใช้สูตร Debye-Scherrer's equation ดังสมการ (Bharani *et al.*, 2012)

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

โดย K คือ 0.9

$\lambda$  คือ ความยาวคลื่นของแหล่งกำเนิดรังสีเอกซ์ เช่น คอปเปอร์ (Cu) จะมีค่าเท่ากับ 0.154 นาโนเมตร

$\beta$  คือ ความกว้างที่ความสูงเป็นครึ่งหนึ่งของความสูงสูงสุดของกราฟระฆัง (Full width half maximum, FWHM)

$\theta$  คือ มุมของเบรค (Bragg's angle)



ภาพที่ 15 เครื่อง X-ray diffraction spectroscopy (AERIS)

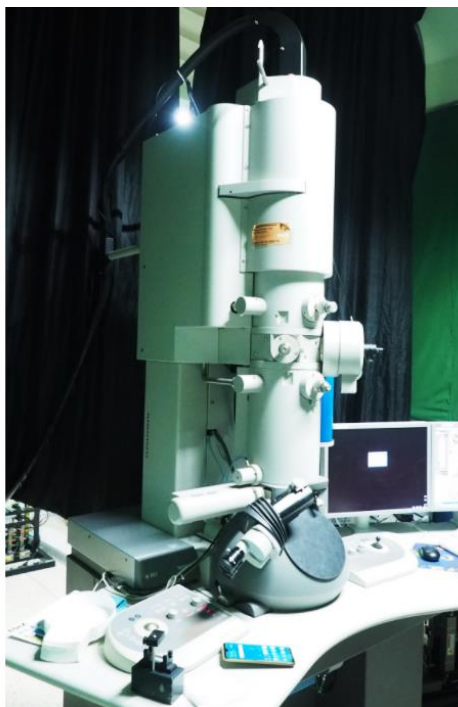
### 3.6.2.3 Transmission electron microscopy (TEM)

วิเคราะห์ขนาดและรูปร่างของ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้ โดยนำผง AgNPs 0.02 กรัม ใส่ในขวดเปล่า จากนั้นกระจายตัวในน้ำ DI 1000 ไมโครลิตร และ sonicate ด้วย ultrasonic cleaner นาน 15 นาที 2 รอบ หยดสารละลายคอลลอยด์ 1 หยด (ปริมาตรไม่เกิน 20 ไมโครลิตร) ลงบน copper grid ที่ coat ด้วย carbon ทิ้งไว้ให้แห้งเป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ขนาดและรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (TEM) ยี่ห้อ FEI (TECNAI G2 20) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น



### 3.6.2.4 Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX)

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ AgNPs ควบคู่กับเครื่อง TEM ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น



ภาพที่ 16 เครื่อง Transmission electron microscopy ควบคู่กับ Energy-dispersive X-ray spectroscopy

### 3.6.2.5 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

วิเคราะห์ประเภทของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และพันธะเคมีหรือหมู่ฟังก์ชันที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากเปลือกส้มโอและ AgNPs โดยนำตัวอย่าง 50 มิลลิกรัม วางบนผิวหน้า Crystal top plate จากนั้นทำการวิเคราะห์ ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร



ภาพที่ 17 เครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (PerkinElmer)

### 3.6.3 การประเมินผลการประยุกต์ใช้ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้จากสารสกัดเปลือกส้มโอ

#### 3.6.3.1 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของ AgNPs ทางชีวภาพ

##### 3.6.3.1.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

นำแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ เพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียมาปรับความเข้มข้นให้ได้  $1 \times 10^8$  CFU/ml จากนั้นนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

##### 3.6.3.1.2 ศึกษาฤทธิ์ของ AgNPs ในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion

นำแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์  $10^8$  ไมโครลิตร ( $10^8$  CFU/ml) ใส่ลงบนจานอาหาร NA เกลี่ยอย่างสม่ำเสมอ และรอให้ผิวด้านบนของอาหารแห้ง จากนั้นใช้ Cork borer ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เจาะรูออก และเติมสารละลายของ AgNPs (1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ (30, 50, 100, 200, 300 และ 500 มิลลิกรัม/ลิตร) ที่ผ่านการ sonicate เป็นเวลา 15 นาที และหยดเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม (well) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย Positive Control คือ Ampicillin 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Negative control คือ สารสกัดจากเปลือกส้มโอ 0.1 กรัมต่อลิตร และ AgNO<sub>3</sub> 2 มิลลิโมลาร์ โดยจะพิจารณาจากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งรอบ well ในหน่วยเซนติเมตร ซึ่งการทดลองนี้จะทำ 3 ซ้ำ (Li *et al.*, 2017), (Mickymaray, 2019), (Sharma, 2014) และ (Al-Otibi *et al.*, 2020)



### 3.6.3.1.3 ศึกษาความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibition Concentration หรือ MIC)

นำสารละลาย stock ของ AgNPs (1000 มิลลิกรัมต่อลิตร) เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 30, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหาร NB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรีย ( $10^8$  CFU/ml) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย Positive Control คือ Ampicillin 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Negative control คือ สารสกัดจากเปลือกส้มโอ 0.1 กรัมต่อลิตร และ  $\text{AgNO}_3$  2 มิลลิโมลาร์ (Garibo *et al.*, 2020) และ (Ibrahim, 2015) หลังจากเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง พิจารณา MIC โดยวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร และนำมาคำนวณ CFU/ml และเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Li *et al.*, 2017)

### 3.6.3.1.4 ศึกษาความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration หรือ MBC)

นำเชื้อที่มีการเพาะเลี้ยงในสารละลาย AgNPs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทำ MIC มา 100 ไมโครลิตร จากนั้นเกลี่ย (spread) ลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยง NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Garibo *et al.*, 2020) และ (Ibrahim, 2015) ถ้าสารละลาย AgNPs สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้จะไม่มีโคโลนีขึ้นบนจานอาหารเพาะเลี้ยง ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลาย AgNPs ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้จะเป็นค่าของ MBC

### 3.6.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของ AgNPs ต่อการผลิตชีวมวล สารพฤกษเคมี (สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรโตคอร์มกล้วยไม้หวายจีน *D. officinale*

#### 3.6.3.2.1 การเตรียมโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายสำหรับการเพิ่มจำนวน

นำโปรโตคอร์มเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนลงในอาหารเหลวครึ่งสูตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครส (pH 5.6) จากนั้นเพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่งในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 กล้วยไม้สกุลหวายจีน (*Dendrobium officinale*)

### 3.6.3.2.2 ผลของความเข้มข้น AgNPs ต่อการผลิตชีวมวล

นำโปรโตคอร์ัมกล้วยไม้หวายจีน (*D. Officinale*) 1 กรัม ใส่งในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 8 ออนซ์ ที่บรรจุอาหารเหลวครึ่งสูตร MS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ปริมาณเซลล์ตั้งต้นคิดเป็น 10%) ที่มีการเติม AgNPs ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปรับ pH ของอาหารให้ได้ 5.6 จากนั้นนำอาหารดังกล่าวไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 100 กิโลปาสกาล (kPa) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส จากนั้นเพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่งในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บผลการทดลอง โดยวิเคราะห์สัดส่วนส่วนการเจริญ (Growth ratio), สารประกอบฟีนอลิก, สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสัดส่วนการเจริญคำนวณตามสูตรต่อไปนี้

$$\text{Growth ratio} = \frac{W_2 - W_1}{W_1}$$

$W_1$  = น้ำหนักก่อนการเพาะเลี้ยง และ  $W_2$  = น้ำหนักหลังการเพาะเลี้ยง

จากผลการทดลองดังกล่าวความเข้มข้นของ AgNPs ที่ 25-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ในการยับยั้งสูงที่สุด แต่ไม่พบความแตกต่างของสัดส่วนการเจริญเติบโต (น้ำหนักแห้ง) ที่ 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )

ดังนั้นจึงได้เลือกศึกษาความเข้มข้นของ AgNPs ในช่วงความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยศึกษาความเข้มข้นของ AgNPs ที่ 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้า ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกผลการและวิเคราะห์สัดส่วนการเจริญ (Growth ratio), สารประกอบฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

**3.6.3.2.3 การวิเคราะห์สารพฤกษเคมี (สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์) และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายจีน (*D. officinale*)**

**3.6.3.2.3.1 การสกัดสารโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวาย**

นำผงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม AgNPs ความเข้มข้นต่าง ๆ มา 1 กรัม เติมเมทานอล 3 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 30 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ส่วนของของเหลวเหนือตะกอนจะถูกแยกออกมา และในส่วนของตะกอนจะนำไปสกัดใหม่ จากนั้นนำส่วนของเหลวที่ได้จากการสกัด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมี (Phenolic และ Flavonoid) และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Obsuwan *et al.*, 2019)

**3.6.3.2.3.2 วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด**

นำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ 7.5% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติม 10% Folin-Ciocalteu reagent บ่มเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย Gallic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน แสดงผลปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในรูปของ mg gallic acid /g DW. (Obsuwan *et al.*, 2019)

**3.6.3.2.3.3 วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด**

นำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 5%  $\text{NaNO}_2$  ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มเป็นเวลา 6 นาที และเติม 10%  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที เติม NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย Quercetin เป็นสารละลายมาตรฐาน แสดงผลปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในรูปของ mg quercetin / g sample (Zhang *et al.*, 1992)

### 3.6.3.2.3.4 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) นำสารสกัดกล้วยไม้ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.0634 มิลลิโมลาร์ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 3 วินาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 519 นาโนเมตร โดยใช้ DPPH เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งวิธีนี้จะแสดงผลในรูปของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH (Obsuwan *et al.*, 2019)

$$\% \text{ DPPH} = \left( \frac{Abs_{t0} - Abs_{t30}}{Abs_{t0}} \right) \times 100$$

$Abs_{t0}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสมหลังจากบ่มเป็นเวลา 0 นาที

$Abs_{t30}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสมหลังจากบ่มเป็นเวลา 30 นาที

ทดสอบ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) นำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย FRAP ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร (Sodium acetate buffer 300 มิลลิลิตร pH 3.6, 10 มิลลิลิตร TPTZ ใน 40 มิลลิลิตร HCl และ  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  20 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10:1:1 (v/v)) บ่มในที่มืดเป็นเวลา 4 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้  $FeSO_4$  เป็นสารมาตรฐาน (Phongtongpasuk *et al.*, 2016)

### 3.6.4 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

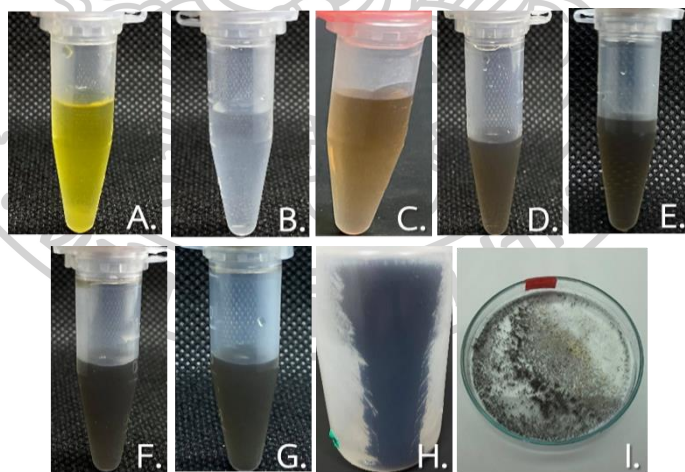
ผลการทดลองแสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติดำเนินการโดยใช้ One-Way ANOVA หรือ Independent T-Test ผ่านโปรแกรม SPSS โดยมีการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลในระดับความเชื่อมั่น 95 % ( $P < 0.05$ )

## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การสังเคราะห์ AgNPs ด้วยวิธีทางชีวภาพจากสารสกัดเปลือกส้มโอ

จากการทดลองนำสารสกัดจากเปลือกส้มโอมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย  $\text{AgNO}_3$  พบว่า สารละลายผสมจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเหลืองน้ำตาลอ่อนหลังจากให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (ภาพที่ 19C) หลังจากผ่านไป 1 ชั่วโมงสารละลายผสมเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง (ภาพที่ 19D) ซึ่งบ่งชี้การสร้าง AgNPs เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction reaction) ของซิลเวอร์ไอออน ( $\text{Ag}^+$ ) เป็นอนุภาคนาโนเงิน ( $\text{Ag}^0$ ) (Ibrahim, 2015) โดยโมเลกุลอินทรีย์ที่อยู่ในสารสกัดเปลือกส้มโอ ดังแสดงในตารางที่ 4 เข้ามามีบทบาทเป็นตัว capping และ stabilizer ทำให้สารละลายผสมเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำเข้ม หลังจาก 24 และ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 19F และ G) จากนั้นนำสารละลายผสมปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที จะได้ตะกอนของอนุภาคซิลเวอร์ (ภาพที่ 19H) และจะได้เป็นผงของ AgNPs (ภาพที่ 19I) โดยสีที่เกิดขึ้นขณะขั้นตอนการสังเคราะห์เกิดจากการสัน โดยรวมของอิเล็กตรอนที่เป็นสื่อกระแสไฟฟ้าใน AgNPs (Mulvaney, 1996) และ (Paulkumar *et al.*, 2013)



**ภาพที่ 19** การเปลี่ยนสีของสารสกัดจากเปลือกส้มโอที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย  $\text{AgNO}_3$  (A) สารสกัดจากเปลือกส้มโอ (Pomelo extract), (B)  $\text{AgNO}_3$ , (C) Pomelo extract ผสมกับ  $\text{AgNO}_3$  นาน 10 นาที, (D) Pomelo extract ผสมกับ  $\text{AgNO}_3$  นาน 1 ชั่วโมง, (E) Pomelo extract ผสมกับ  $\text{AgNO}_3$  นาน 6 ชั่วโมง, Pomelo extract ผสมกับ  $\text{AgNO}_3$  นาน 24 ชั่วโมง, Pomelo extract ผสมกับ  $\text{AgNO}_3$  นาน 48 ชั่วโมง, (H) ตะกอนของ AgNPs และ (I) ผงของ AgNPs



ตารางที่ 4 ปริมาณสารพฤกษเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากเปลือกส้มโอ

สารสกัดจากเปลือกส้มโอ	สารพฤกษเคมี		สารต้านอนุมูลอิสระ	
	ฟีนอลิก (mg GAE/g)	ฟลาโวนอยด์ (mg QE/g)	DPPH (% Inhibition)	FRAP (mg FeSO <sub>4</sub> /g)
	19.21 ± 0.014	2.56 ± 0.008	17.24 ± 4.720	8.75 ± 0.020

#### 4.1.1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ AgNPs

ศึกษาปัจจัยของความเข้มข้น AgNO<sub>3</sub> (1, 2 และ 3 มิลลิโมลาร์) ร่วมกับ pH ของสารสกัดจากเปลือกส้มโอ (pH 4.8, pH 5, pH 6, pH 7 และ pH 8) โดยจะพิจารณาเลือกสภาวะที่ให้ค่าสูงสุดของการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ตรวจหาช่วง 200 – 800 นาโนเมตร

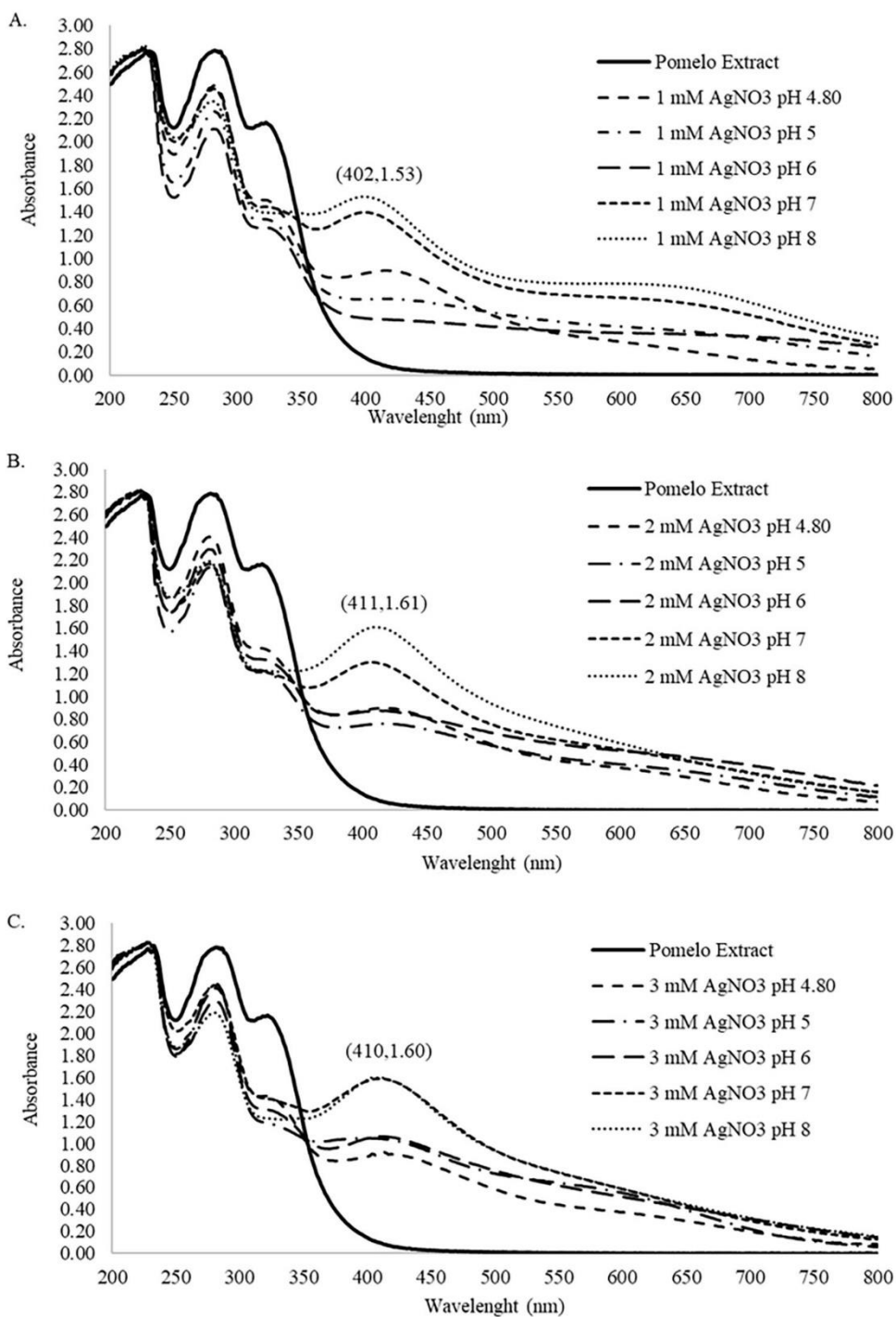
จากผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 20 (A-C) พบว่าค่าสูงสุดของ surface plasmon resonance (SPR) ของ AgNPs ที่สังเคราะห์ในทุกสภาวะถูกพบในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 402-411 นาโนเมตร แต่ในทางกลับกัน ไม่พบการเกิด SPR ในสภาวะที่มีเพียงสารสกัดจากพืช ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Ali *et al.* (2020) ได้มีการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย UV-Vis ที่ความเข้มข้นของ AgNO<sub>3</sub> 2 และ 4 มิลลิโมลาร์ และพบค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของอนุภาคนาโนที่ 426 นาโนเมตร SPR ที่ถูกพบในทุกสภาวะของงานวิจัยนี้จะอยู่ในช่วง 402-411 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ที่ตีพิมพ์เมื่อเร็วๆ นี้ โดยความยาวคลื่นของ SPR สูงสุดสำหรับ AgNPs จะอยู่ในช่วง 400-500 นาโนเมตร (Aref & Salem, 2020)

เมื่อพิจารณาค่า pH พบว่า pH 4.80, pH 5 และ pH 6 (pH กรด) ของสารสกัดที่ทดสอบกับความเข้มข้นของ AgNO<sub>3</sub> จะเห็นได้ว่าการก่อตัวของ AgNPs ค่อนข้างน้อย และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 430 นาโนเมตร ในขณะที่ pH 7 และ 8 (pH เบส) พบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับ pH ที่เป็นกรด และพบแถบ SPR ของ AgNPs ที่ช่วงความยาวคลื่น 402-411 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงบ่งบอกถึงผลผลิตของ AgNPs ที่มากหรือน้อย และค่า pH ก็เป็นอีกหนึ่งในปัจจัยที่มีอิทธิพลมากที่สุด มีการอธิบายว่าการเปลี่ยนแปลงของ pH ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารพฤกษเคมีในพืช ซึ่งส่งผลกระทบต่อความสามารถในการจับตัวและการลดลงของไอออนของโลหะในระหว่างการสังเคราะห์อนุภาคนาโน โดยค่า pH ที่แตกต่างกันจะส่งผลกระทบต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลผลิตของ AgNPs (Singh *et al.*, 2016) จากผลการทดลองจะเห็นว่าที่ความ



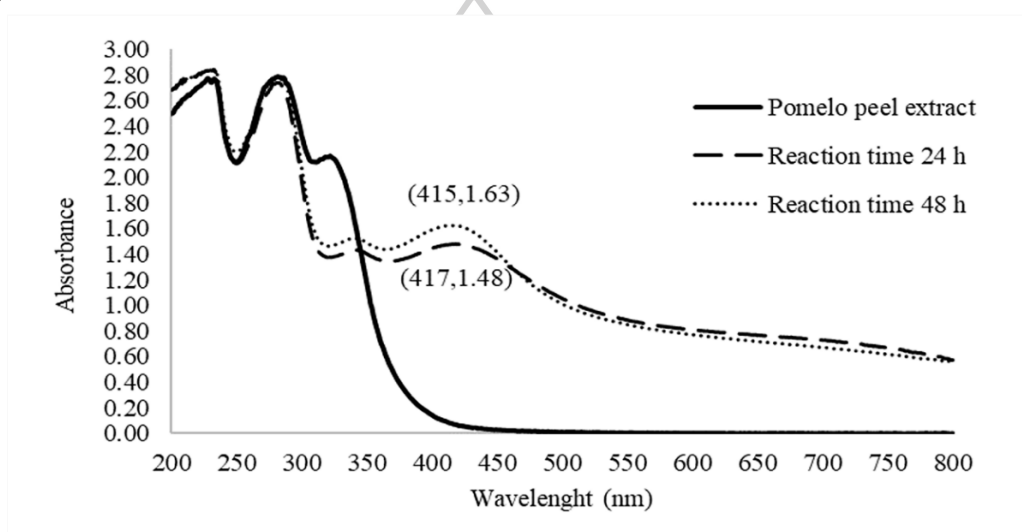
เข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  2 มิลลิโมลาร์ ให้ผลผลิตของ AgNPs สูงสุดที่ค่าการดูดกลืนแสง 1.61 และสังเกตเห็นได้ว่าไม่พบพีคที่ป็นเบรอนหรืออุกรบกวอน อีกทั้งยังให้ลักษณะของพีคที่แหลมคม (Sharp peak) และให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นต่ำสุด จะสะท้อนถึง AgNPs ขนาดเล็ก (Smitha *et al.*, 2008) ดังรายงานการวิจัยของ Alqadi *et al.* (2014) กล่าวไว้ว่าการเปลี่ยนแปลงของพีคเรโซแนนซ์พลาสมอนบนพื้นผิว (surface plasmon resonance) บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงขนาดของ AgNPs อีกทั้งความยาวคลื่นที่สั้นลงบ่งชี้การลดลงของขนาด AgNPs ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการเพิ่มค่า pH ของสารสกัด (pH เบส) ส่งผลให้เกิดอนุภาคนาโนที่มีขนาดเล็กและรูปร่างเป็นทรงกลมมากขึ้น ในทางกลับกันพีคเรโซแนนซ์พลาสมอนบนพื้นผิวที่มีลักษณะพีคที่กว้าง (broad) จะมีการก่อตัวของ AgNPs ที่มีขนาดหลากหลาย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์ AgNPs คือ ความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  ที่ 2 มิลลิโมลาร์ และมีการปรับ pH ของสารสกัดเปลือกส้มโอ เท่ากับ 8





ภาพที่ 20 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง UV-Visible ของ AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ โดยศึกษาความเข้มข้นของ AgNO<sub>3</sub> ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (1 (A), 2 (B) และ 3 (C) มิลลิโมลาร์) ผสมกับสารสกัดเปลือกส้มโอที่ปรับ pH ปริมาตร 75 มิลลิลิตร (4.8, 5, 6, 7 และ 8) ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การพิจารณาผลของเวลาในการปฏิกิริยา 24 และ 48 ชั่วโมงต่อการสังเคราะห์ AgNPs จะแสดงในภาพที่ 21 และตารางที่ 5 โดยพบว่าผลผลิตของ AgNPs ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 24 และ 48 ชั่วโมง คือ 1.48 และ 1.63 ตามลำดับ และพบการดูดกลืนแสงสูงสุดของพีค SPR ที่ 417 และ 415 นาโนเมตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาความเข้มของการดูดกลืนแสง พบว่าระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 48 ชั่วโมง ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าที่ 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์ (%) ผลผลิตของ AgNPs ที่ได้จากปฏิกิริยา 24 และ 48 ชั่วโมงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นจึงเลือกสถานะในการทำปฏิกิริยาที่ 24 ชั่วโมงสำหรับการสังเคราะห์ AgNPs



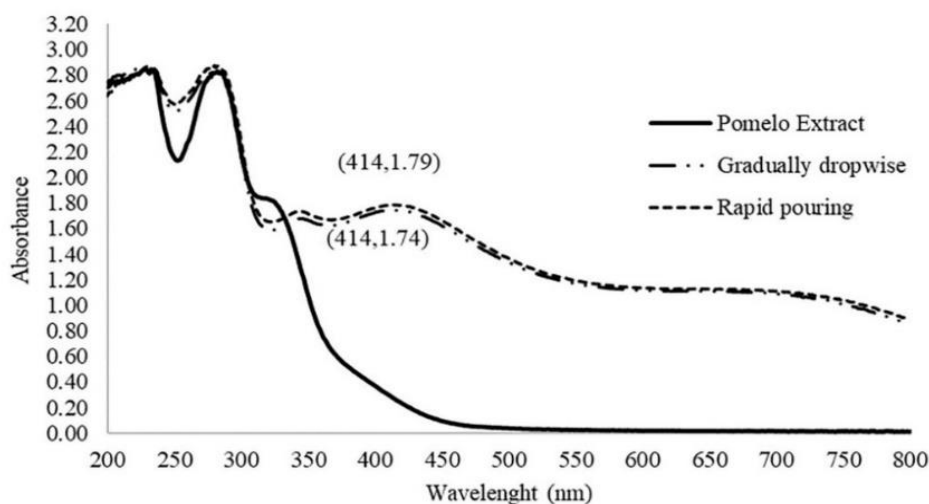
ภาพที่ 21 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง UV-Visible ของ AgNPs จากสารสกัดเปลือกส้มโอ โดยศึกษาเวลาในการทำปฏิกิริยา (24 และ 48 ชั่วโมง) ความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดเปลือกส้มโอที่ pH 8 ปริมาตร 75 มิลลิลิตร

ตารางที่ 5 ผลของเวลาในการทำปฏิกิริยาต่อ % ผลผลิตของ AgNPs

เวลาในการ ทำปฏิกิริยา (ชั่วโมง)	น้ำหนักของ $\text{AgNO}_3$ ที่ใช้ (กรัม)	ปริมาตรที่ใช้ สังเคราะห์ AgNPs (ลิตร)	% ผลผลิต ของ AgNPs
24	0.3397	1	$19.6153 \pm 1.4247$
48			$24.7277 \pm 5.1080$

% ผลผลิต วิเคราะห์ทางสถิติด้วย Independent T-test T-test,  $F = 2.429$  and  $\text{Sig} = 0.194$  บ่งชี้ถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$

สำหรับการพิจารณาผลของรูปแบบการเทสารสกัดจากพืช พบว่ารูปแบบการเทสารสกัดทั้งค่อย ๆ เท และเทอย่างรวดเร็วส่งผลให้เกิด AgNPs ที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 1.74 และ 1.79 ตามลำดับ สเปกตรัมที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 22) และ % ผลผลิตของการเททั้งสองรูปแบบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตามที่แสดงในตารางที่ 6



ภาพที่ 22 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง UV-Visible ของ AgNPs ที่สังเคราะห์ทางชีวภาพ ศึกษา รูปแบบการเทสารสกัด (ค่อย ๆ เท และเทอย่างรวดเร็ว) ความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดเปลือกส้มโอที่ pH 8 ปริมาตร 75 มิลลิลิตร  
ตารางที่ 6 ผลของรูปแบบการเทสารสกัด (ค่อย ๆ เท และเทอย่างรวดเร็ว) ต่อ % ผลผลิตของ AgNPs

รูปแบบการเทสารสกัด	น้ำหนักของ $\text{AgNO}_3$ ที่ใช้ (กรัม)	ปริมาตรที่ใช้สังเคราะห์ AgNPs (ลิตร)	% ผลผลิตของ AgNPs
ค่อย ๆ เท	0.3397	1	$21.5877 \pm 1.8586$
เทอย่างรวดเร็ว	0.3397	1	$19.6153 \pm 1.4247$

\* หมายเหตุ ค่อย ๆ เท คือ ปล่อยสารสกัดผ่านบิวเรตผสมกับสารละลาย  $\text{AgNO}_3$  โดยใช้อัตราการไหล (Flow rate) ที่ 7 มิลลิลิตรต่อนาที และส่วนของการเทอย่างรวดเร็ว คือ เทสารสกัดผสมกับสารละลาย  $\text{AgNO}_3$  ผ่านบีกเกอร์ โดยใช้อัตราการไหลที่ 75 มิลลิลิตรต่อนาที  
% ผลผลิต วิเคราะห์ทางสถิติด้วย Independent T-test T-test.  $F = 2.429$  and  $\text{Sig} = 0.194$  บ่งชี้ถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$

## 4.2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ

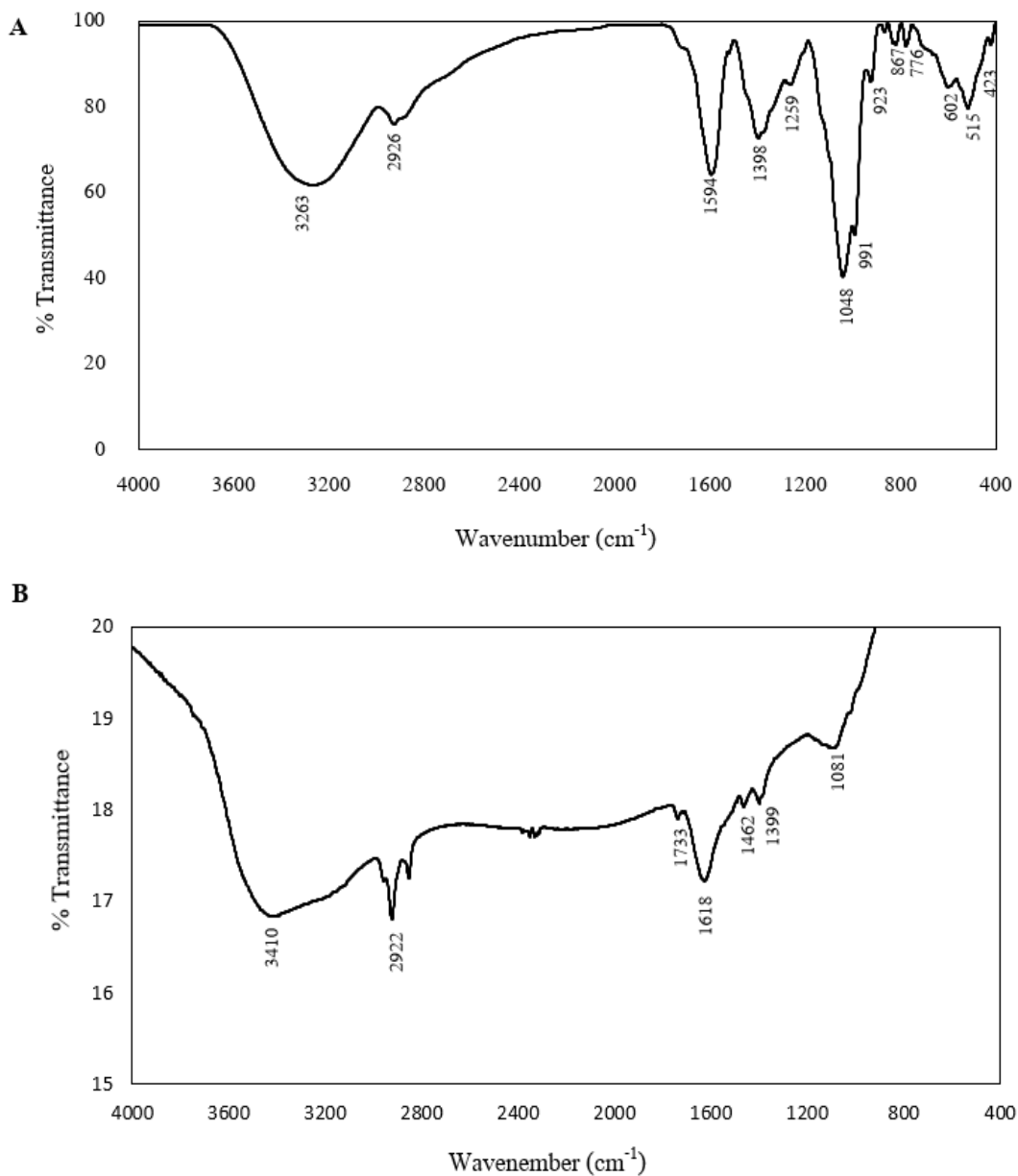
### 4.2.1 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

ผลการระบุหมู่ฟังก์ชันหลัก ๆ ของสารพฤกษเคมีในสารสกัดเปลือกส้มโอที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยารีดักชันของซิลเวอร์ไอออนและการรักษาเสถียรภาพของ AgNPs สเปกตรัม FTIR ของสารสกัดเปลือกส้มโอและ AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ แสดงดังภาพที่ 23 A และ B ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสเปกตรัมทั้งสองมีการเปลี่ยนแปลง โดย peak ที่  $3263$  และ  $3410\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการยืดตัวของ O-H ของ แอลกอฮอล์ (Alcohol) และฟีนอล (Phenol) ซึ่งมีอยู่ในสารสกัดจากเปลือกส้มโอ ((Ali *et al.*, 2020), (Ibragic *et al.*, 2021) และ (Mogole *et al.*, 2021)), จุดสูงสุดที่  $2926$ ,  $2922$  และ  $1462\text{ cm}^{-1}$  เกิดการสั่นสะเทือนแบบยืด (stretching vibration) ของสายโซ่ aliphatic hydrocarbons (C-H) ในกลุ่มของ methylene หรือ methyl จากไขมันในสารสกัด ((Hamouda *et al.*, 2019), (Ibragic *et al.*, 2021) และ (Mogole *et al.*, 2021)), จุดสูงสุดที่  $1594$  และ  $1618\text{ cm}^{-1}$  เกิดการยืดของ CONH ซึ่งแสดงกลุ่มเอไมด์ (Amide) ของโปรตีน, จุดสูงสุดที่  $1398$  และ  $1399\text{ cm}^{-1}$  เป็นลักษณะเฉพาะของสายอะลิฟาติก (Aliphatic) ( $\text{CH}_2$  และ  $\text{CH}_3$ ) (Mogole *et al.*, 2021), จุดสูงสุดที่  $1259$ ,  $1048$  และ  $1081\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการยืดตัวของ C-O จาก แอลกอฮอล์ (Alcohol) กรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic acid) เอสเทอร์ (Ester) และ อีเทอร์ (Ether) ((Khan *et al.*, 2021), (Sowmyya & Lakshmi, 2018) และ (Thirunavoukkarasu *et al.*, 2013)) และในจุดสูงสุดที่  $1733\text{ cm}^{-1}$  ของสเปกตรัม AgNPs เกิดการสั่นแบบยืดของ C=O ของสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic) (Mogole *et al.*, 2021) บ่งชี้ได้ว่าอาจจะมีสารสกัดในปริมาณน้อยเหลืออยู่ใน AgNPs อีกทั้งยังพบจุดสูงสุดอื่น ๆ ในสเปกตรัม FTIR ของสารสกัดเปลือกส้มโอ ที่  $991$ ,  $923$ ,  $867$ ,  $776$ ,  $602$ ,  $515$  และ  $423\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งอาจจะสอดคล้องกับสารประกอบอะโรมาติกและฮาโลเจน (Aromatic และ Halogen) (Yuen *et al.*, 2005)

จากการวิเคราะห์ FTIR พบว่า สเปกตรัม ของ AgNPs มีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่ง wavenumber เมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารสกัดจากเปลือกส้มโอ ซึ่งบ่งชี้การก่อตัวของ AgNPs โดยในกลุ่มของ O-H, C=O และ C-O ของ alcohol, phenol, carboxylic acid และ aromatic เป็นหมู่ฟังก์ชันของฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิก ที่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์  $\text{Ag}^+$  เป็น  $\text{Ag}^0$  รวมถึงหมู่ฟังก์ชัน Ester, Ether และ Halogens ที่มีคุณสมบัติดังที่กล่าวข้างต้น (Khan *et al.*, 2021) สุดท้ายกลุ่มของ Amide ของโปรตีนมีหน้าที่ในการป้องกันไม่ให้อนุภาคเกาะติดกันและจับตัวเป็นก้อนขนาดใหญ่ (Chutrakulwong *et al.*, 2020)

อีกทั้งยังพบ peak ของ C=O ใน AgNPs แสดงให้เห็นว่าเกิดการรีดิวซ์  $\text{Ag}^+$  เป็น  $\text{Ag}^0$  ได้ไม่สมบูรณ์ แต่พบ % Transmittance ค่อนข้างน้อย ในอีกแง่หนึ่งกล่าวได้ว่ากลุ่มของ C=O ที่ปรากฏ

อยู่ในสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ และอยู่บนพื้นผิวของ AgNPs ที่ทำหน้าที่ห่อหุ้ม (Capping) และรักษาเสถียรภาพ (Stabilizer) ของ AgNPs



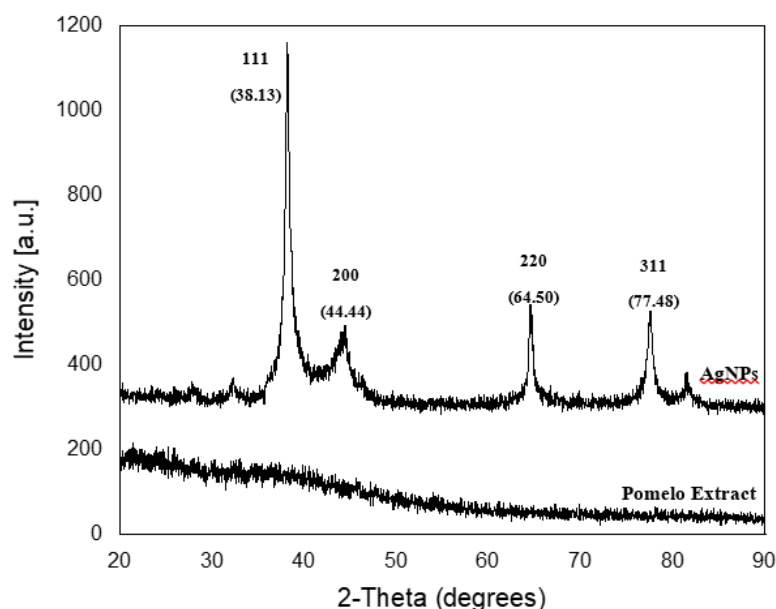
ภาพที่ 23 สเปกตรัม Fourier transform infrared ของ AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ pH 8 ร่วมกับ AgNO<sub>3</sub> 2 มิลลิโมลาร์, ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 24 ชั่วโมง และลักษณะการทดสอบที่รวดเร็ว

(A) สเปกตรัมของสารสกัดจากเปลือกส้มโอ และ (B) สเปกตรัมของ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้จากสารสกัดเปลือกส้มโอ



#### 4.2.2 X-ray diffraction spectroscopy (XRD)

นำ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้จากสารสกัดเปลือกส้มโอในสภาวะที่เหมาะสม (ความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  2 มิลลิโมลาร์, สารสกัด pH 8, เวลาในการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง และลักษณะการทดสอบแบบรวดเร็ว) พิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์เพื่อยืนยันลักษณะของผลึก เช่น โครงสร้างของผลึก ขนาดผลึก และความเครียด (การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของวัสดุ เมื่อมีแรงภายนอกมากระทำ) (Akbaari *et al.*, 2011) และโครงสร้างของผลึกของ AgNPs แสดงดังภาพที่ 24 จะเห็นได้ว่าที่ 2-Theta ตั้งแต่ 20-90 พบพีคที่ 38.13, 44.44, 64.50 และ 77.48 ซึ่งสอดคล้องกับระนาบของผลึกเงิน (111), (200), (220) และ (311) ตามลำดับ โดยพีคที่ได้ข้างต้นค่อนข้างสอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานก่อนหน้านี้ ((Ibrahim, 2015), (Mathew *et al.*, 2020) และ (Chowdhury *et al.*, 2021)) อีกทั้งในส่วนของระนาบข้างต้นสอดคล้องกับโครงสร้างของผลึกเงินแบบ Face-centered cubic (fcc) (Chowdhury *et al.*, 2021) และให้ขนาดของผลึก AgNPs 24.35 นาโนเมตร นอกจากนี้ยังพบพีคอื่น ๆ ที่ 28.03, 32.26 และ 81.64 ซึ่งแสดงถึงผลึกของ  $\text{AgCl}$  (Ali *et al.*, 2020) และสารประกอบอินทรีย์ที่มีอยู่ในสารสกัด (Roopan *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตามในส่วน XRD ของสารสกัดจากเปลือกส้มโอ (Pomelo Extract) พบว่าไม่มีพีคของโครงสร้างผลึกเนื่องจากสารสกัดของเปลือกส้มโอไม่มีรูปร่างของผลึกหรือความเข้มข้นของสารสกัดอาจมีปริมาณค่อนข้างมากทำให้บดบังโครงสร้างของผลึก (Bayat *et al.*, 2021)

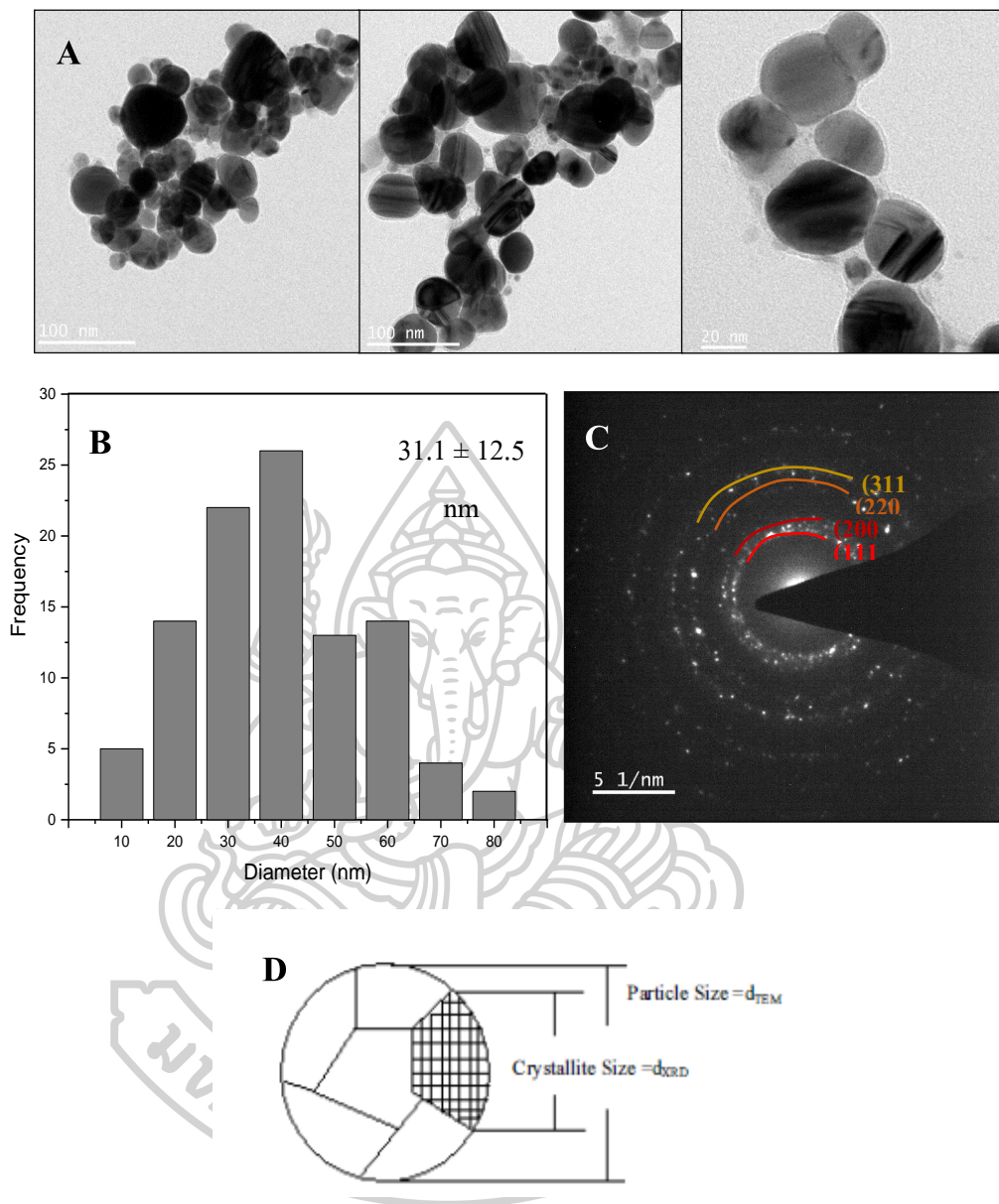


ภาพที่ 24 รูปแบบ XRD ของ AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ pH 8 ร่วมกับความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  2 มิลลิโมลาร์, เวลาทำปฏิกิริยาที่ 24 ชั่วโมง และลักษณะการทดสอบแบบรวดเร็ว

### 4.2.3 Transmission electron microscopy (TEM)

ผลการประเมินสัณฐานวิทยาและขนาดของ AgNPs โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ได้แสดงในภาพที่ 25 จะเห็นได้ว่ามีการก่อตัวของ AgNPs ที่มีรูปร่างของอนุภาคเป็นทรงกลม ((Ali *et al.*, 2020), (Masum *et al.*, 2019) และ (Mickymaray, 2019)) และมีการกระจายตัวแบบ polydisperse ((Mogole *et al.*, 2021) และ (Rahuman *et al.*, 2021)) (ภาพที่ 25A) ในส่วนการกระจายขนาดของ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้แสดงไว้ใน Histogram (ภาพที่ 25B) จะเห็นได้ว่าขนาดของอนุภาคมีการกระจายตัวอยู่ที่ 0-87 นาโนเมตร และมีการกระจายตัวสูงสุดที่ 33-43 นาโนเมตร มีขนาดเฉลี่ยที่  $31.1 \pm 12.5$  นาโนเมตร อีกทั้งรูปแบบการเลี้ยวเบนของอิเล็กตรอนในพื้นที่ที่เลือก (SAED pattern) แสดงไว้ดังภาพที่ 25C พบว่ารูปแบบ SAED ของ AgNPs ที่ปรากฏจุดสว่างบ่งบอกถึงลักษณะของผลึก AgNPs โดยแสดงให้เห็นขอบที่มีลักษณะเป็นวงแหวนวงกลมที่สอดคล้องกับระนาบ (111), (200), (220) และ (311) ของโครงสร้างผลึก Ag แบบ face-centered cubic (fcc) โดยรูปแบบของ SAED มีระนาบสอดคล้องกับผลการทดลองของ XRD อีกด้วย

จากการเปรียบเทียบขนาดของผลึกที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค XRD และขนาดของอนุภาคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TEM พบว่า ขนาดของผลึกที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย XRD จะมีขนาดเล็กกว่า (24.35 นาโนเมตร) ผลึกที่วิเคราะห์ด้วย TEM (31.1 นาโนเมตร) โดยผลที่ได้จากการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sallehudin *et al.* (2018) และ Mondal *et al.* (2020) ที่ได้รายงานว่าขนาดของผลึก AgNPs จาก XRD จะเท่ากับหรือเล็กกว่าจากการวิเคราะห์ด้วย TEM ทั้งนี้ก็เนื่องจากส่วนของผลึกนาโน (Nanocrystalline) ที่วิเคราะห์ด้วย XRD จะปรากฏอยู่ในบริเวณพื้นที่เฟสเดียวที่เล็กที่สุด (Smallest single phase) ของ AgNPs ในขณะที่การวิเคราะห์ด้วย TEM จะบ่งบอกได้ทั้งขนาดรูปร่างทางสัณฐานวิทยาและขนาดผลึกที่ครอบคลุมทั่วทั้งบริเวณผลึก โดยแต่ละบริเวณของผลึกจะแบ่งพื้นที่ด้วยขอบของผลึกนั้น ๆ ดังแสดงในภาพที่ 25D อีกทั้งผลึกแต่ละอันจะมีลักษณะเป็นผลึกเดี่ยว (Single crystal) กล่าวได้ว่าผลึกสามารถประกอบด้วยศูนย์ หนึ่ง หรือสองมิติ หรือมีมิติจำนวนมาก (Akbaari *et al.*, 2011)

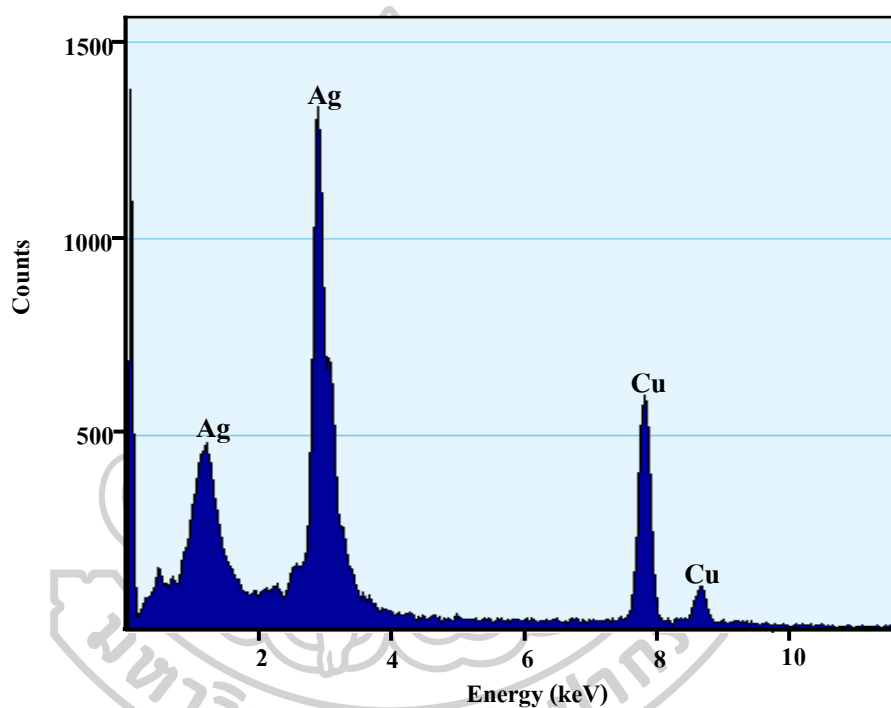


ภาพที่ 25 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ AgNPs จากสารสกัดเปลือกส้มโอด้วยวิธี TEM

(A) TEM ของ AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ (B) Histogram แสดงการกระจายขนาดของ AgNPs (C) การเลี้ยวเบนอิเล็กตรอนในพื้นที่ที่เลือก (SAED pattern) ของ AgNPs และ (D) ลักษณะของขนาด AgNPs ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TEM (Particle size) และวิธี XRD (Crystallite size) (Akbaari *et al.*, 2011)

#### 4.2.4 Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX)

ผลจากวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุที่เกี่ยวข้องกับการก่อตัวของ AgNPs ได้แสดงไว้ในภาพที่ 26 จะเห็นได้ว่าพบพีคสัญญาณที่ 3 keV เนื่องจากการสะท้อนของพลาสมอนบนพื้นผิว surface plasmon resonance ซึ่งเกิดจากธาตุ Ag ที่เป็นองค์ประกอบหลักใน AgNPs ((Ali *et al.*, 2020), (Hemlata *et al.*, 2020) และ (Ibrahim, 2015)) นอกจากนี้ยังตรวจพบสัญญาณของธาตุ Cu เนื่องจาก grid ที่เป็นทองแดง (Cu) และเคลือบด้วยคาร์บอน (C) ซึ่งใช้สำหรับการเตรียมตัวอย่าง (Saha & Dutta Gupta, 2018) และ (Singh *et al.*, 2016)



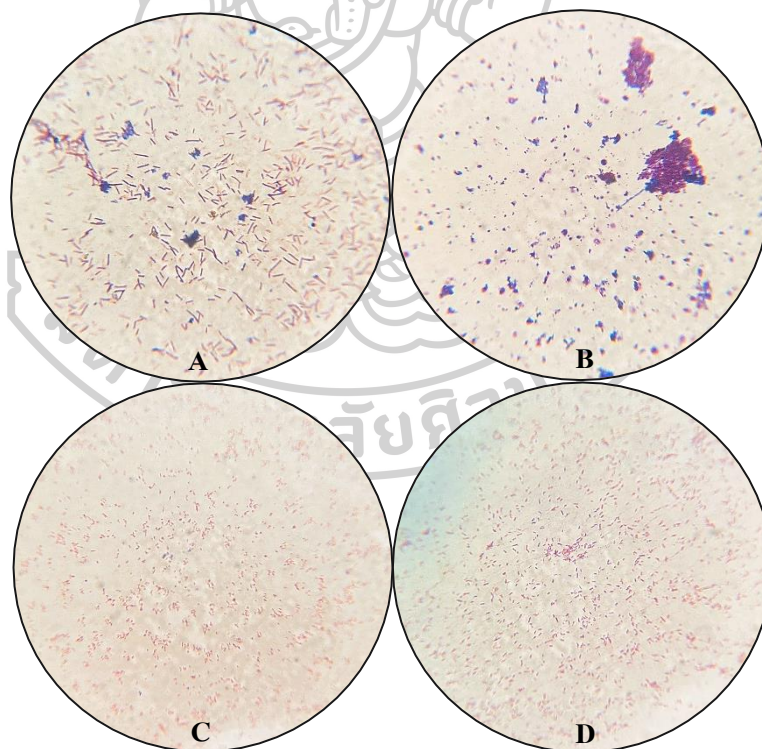
ภาพที่ 26 โปรไฟล์ Energy dispersive X-ray analysis pattern (EDX) ของ AgNPs ทางชีวภาพ

### 4.3 การประยุกต์ใช้ AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ

#### 4.3.1 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของ AgNPs จากสารสกัดเปลือกส้มโอ

จากการประเมิน AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอต่อการต้านแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* โดยใช้วิธี agar well diffusion และการหาความเข้มข้นของ AgNPs ในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

ภาพที่ 27 เป็นการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย โดยได้มีการนำเซลล์แบคทีเรียไปย้อมแกรมและส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตลักษณะของเซลล์ พบว่าแบคทีเรียแกรมบวก คือ *B. subtilis* และ *S. aureus* จะย้อมติดสีม่วง โดย *B. subtilis* มีรูปร่างเป็นแท่ง ส่วน *S. aureus* มีรูปร่างเป็นทรงกลม อาจอยู่รวมกันคล้ายพวงองุ่น (ภาพที่ 27A และ B) ในส่วนของแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli* และ *P. aeruginosa* จะย้อมติดสีแดง โดย *E. coli* มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ๆ เช่นเดียวกับ *P. aeruginosa* (ภาพที่ 27C และ D)

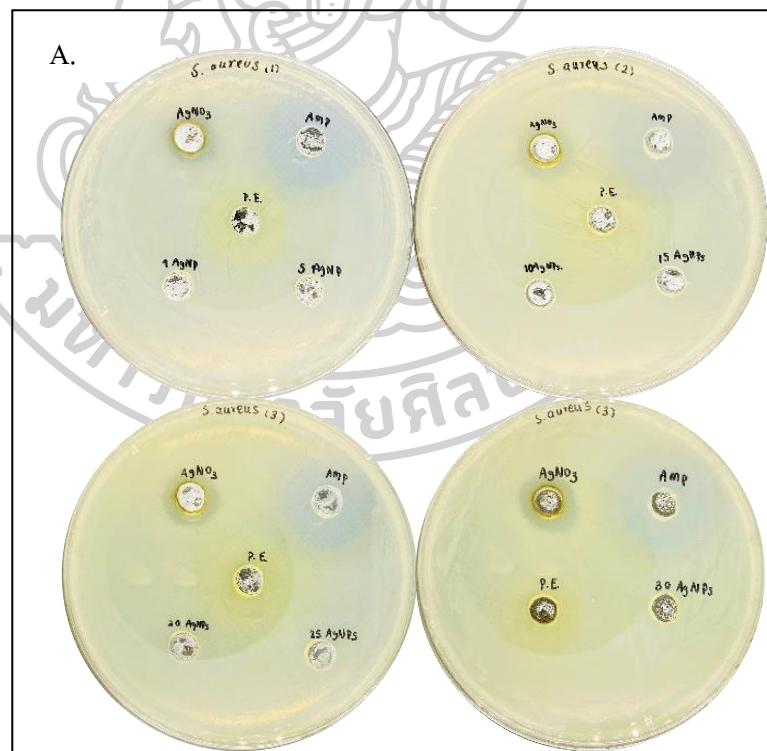


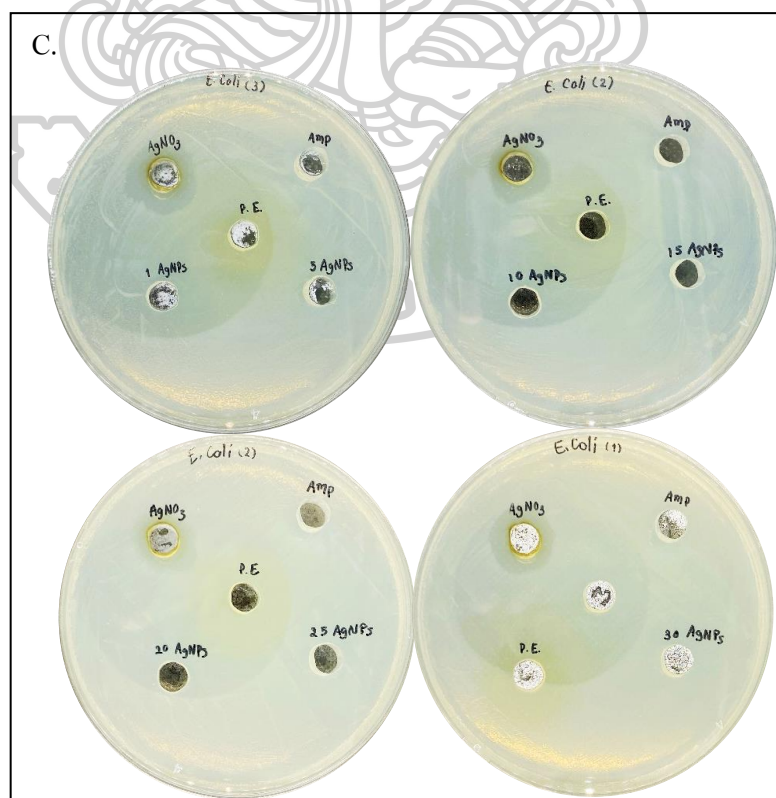
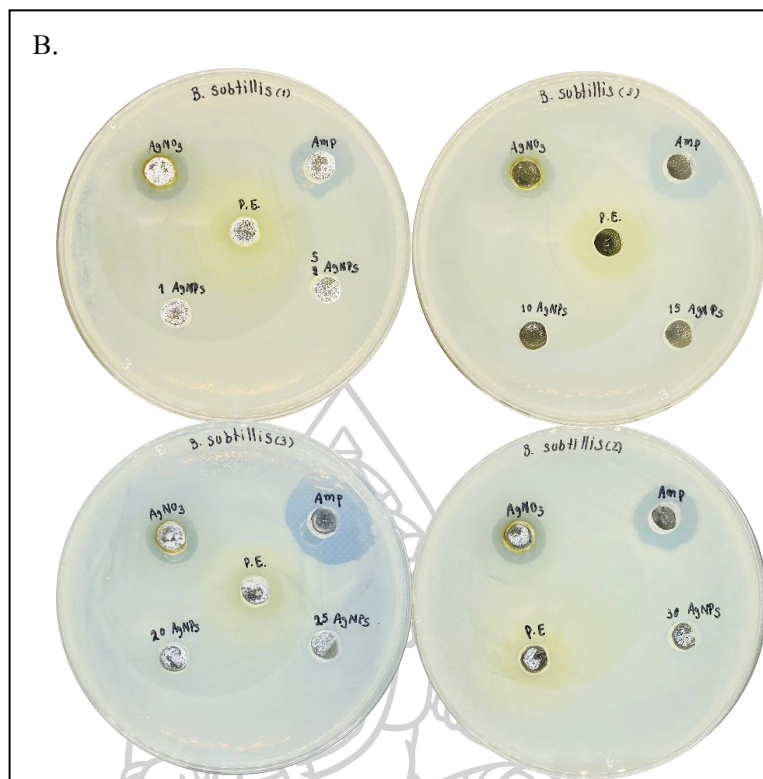
ภาพที่ 27 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) ของเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและนำมาย้อมแกรม

A) *B. subtilis* B) *S. aureus* C) *E. coli* และ D) *P. aeruginosa* (100 x)

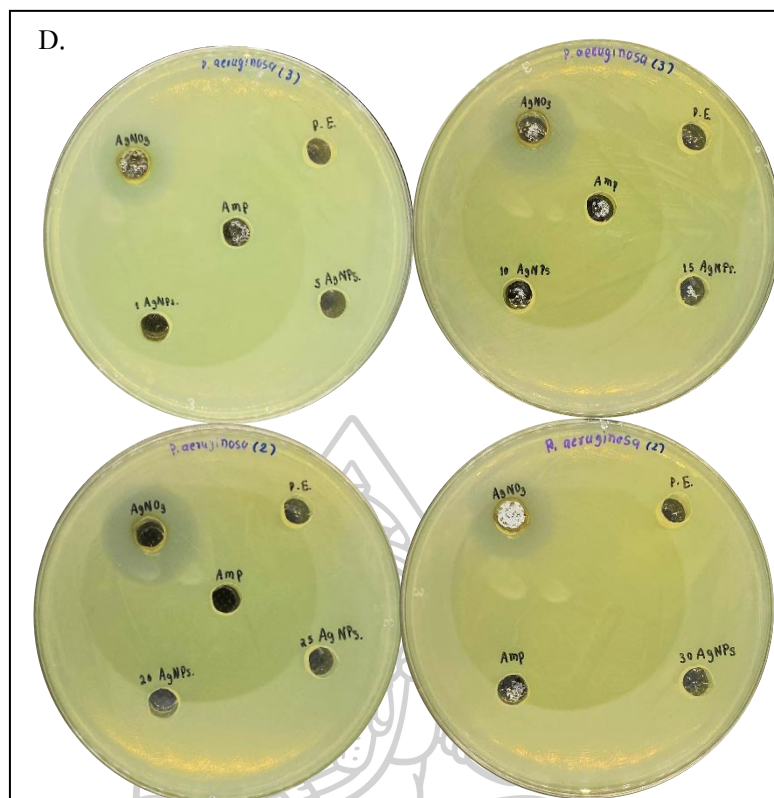


ผลของการต้านแบคทีเรียของ AgNPs ด้วยวิธี agar well diffusion จะแสดงโซนของการยับยั้งดังภาพที่ 28 จะเห็นได้ว่าไม่พบโซนการยับยั้งของ AgNPs (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทั้ง 4 สายพันธุ์ แต่พบโซนการยับยั้งของ AgNO<sub>3</sub> และ แอมพิซิลลิน (Ampicillin) (ภาพที่ 28 A-D) โดยเมื่อพิจารณาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งดังตารางที่ 7 พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งของแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*) ที่ทดสอบกับ AgNO<sub>3</sub> ให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ในส่วนของยาปฏิชีวนะ Ampicillin พบว่าแบคทีเรียแกรมลบให้ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งต่ำกว่าแบคทีเรียแกรมบวกอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแกรมลบมีส่วนห่อหุ้ม ได้แก่ เยื่อหุ้มชั้นนอก ที่ประกอบด้วยไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ ผนังเซลล์ peptidoglycan ที่มี การเชื่อมด้วยสายโซ่เปปไทด์ และไซโตพลาสซึมหรือเยื่อหุ้มชั้นใน โดยเยื่อหุ้มชั้นนอกทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันไม่ให้ยาปฏิชีวนะเจาะเข้าไปในเซลล์ได้ ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกจะไม่มีเยื่อหุ้มชั้นนอก ดังนั้นทำให้ Ampicillin ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีแต่จะด้อยในแบคทีเรียแกรมลบ (Exner *et al.*, 2017)









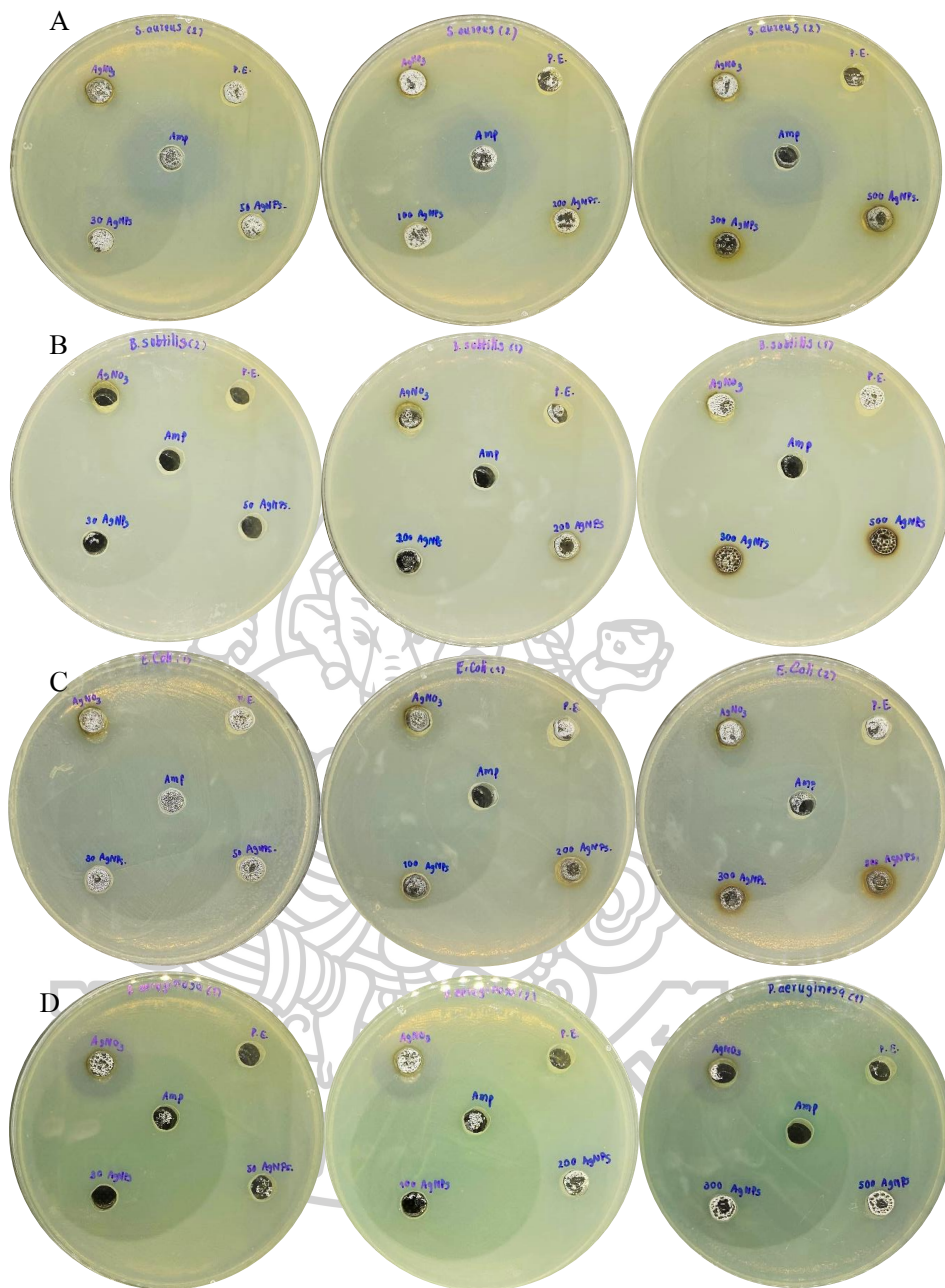
ภาพที่ 28 โชนการยับยั้งของสารละลาย  $\text{AgNO}_3$  2 มิลลิโมลาร์, Ampicillin 10 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร, 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร P.E. และ AgNPs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร) ด้วยวิธี agar well diffusion โดยทดสอบบนเชื้อดังต่อไปนี้ A) *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) B) *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) C) *Escherichia coli* (*E. coli*) และ D) *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)

ตารางที่ 7 ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของ AgNPs (1-30 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สังเคราะห์จากสารสกัดของเปลือกส้มโอ แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง หน่วยเซนติเมตร (cm)

สารที่ใช้ทดสอบ	สายพันธุ์ของแบคทีเรีย (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (cm))			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
AgNO <sub>3</sub>	1.5±0.0436 <sup>c</sup>	1.4±0.0657 <sup>c</sup>	1.7±0.1605 <sup>b</sup>	2.1±0.0717 <sup>a</sup>
P.E.	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000
Ampicillin	2.5±0.1412 <sup>a</sup>	1.8±0.1843 <sup>b</sup>	0.2±0.2580 <sup>c</sup>	0±0.0000 <sup>c</sup>
1 mg/L AgNPs	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000
5 mg/L AgNPs	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000
10 mg/L AgNPs	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000
15 mg/L AgNPs	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000
20 mg/L AgNPs	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000
25 mg/L AgNPs	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000
30 mg/L AgNPs	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000

ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์ตัวอักษรเดียวกันแสดงถึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตามวิธี Duncan's new Multiple Range Test ที่  $p < 0.05$

จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้มีการเพิ่มความเข้มข้นของ AgNPs เป็น 30, 50, 100, 200, 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังภาพที่ 29 (A-D) จะเห็นได้ว่าไม่พบโซนยับยั้งของ AgNPs ทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อพิจารณาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งดังตารางที่ 8 พบว่าให้ผลไปในทิศทางเดียวกับการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นดังตารางที่ 7 เนื่องจากขนาดความหนาของวุ้น (Agar) จะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารทดสอบ โดยสารทดสอบในหลุมจะมีการแพร่ผ่าน (diffusion) ไปยังโพลีเมอร์ของวุ้น หากความหนาของชั้นวุ้นอาหารไม่เท่ากันก็จะทำให้ความเข้มข้นของสารทดสอบที่อยู่ในวุ้นไม่เท่ากัน โดยอาจส่งผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง ถ้าวุ้นบางจะทำให้เกิดโซนยับยั้งขนาดใหญ่และตัวอย่างของสารทดสอบมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเพิ่มขึ้นแต่ถ้าวุ้นมีลักษณะหนาจะเกิดโซนยับยั้งขนาดเล็ก เนื่องจากความเข้มข้นของตัวอย่างสารทดสอบลดลง ส่งผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งลดลงอีกด้วย (Oxoid, 2022)



ภาพที่ 29 โชนการยับยั้งของสารละลาย  $AgNO_3$  2 มิลลิโมลาร์, Ampicillin 10 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร, 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร P.E. และ AgNPs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (30, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร) ด้วยวิธี agar well diffusion โดยทดสอบบนเชื้อดังต่อไปนี้ A) *S. aureus* B) *B. subtilis* C) *E. coli* และ D) *P. aeruginosa*

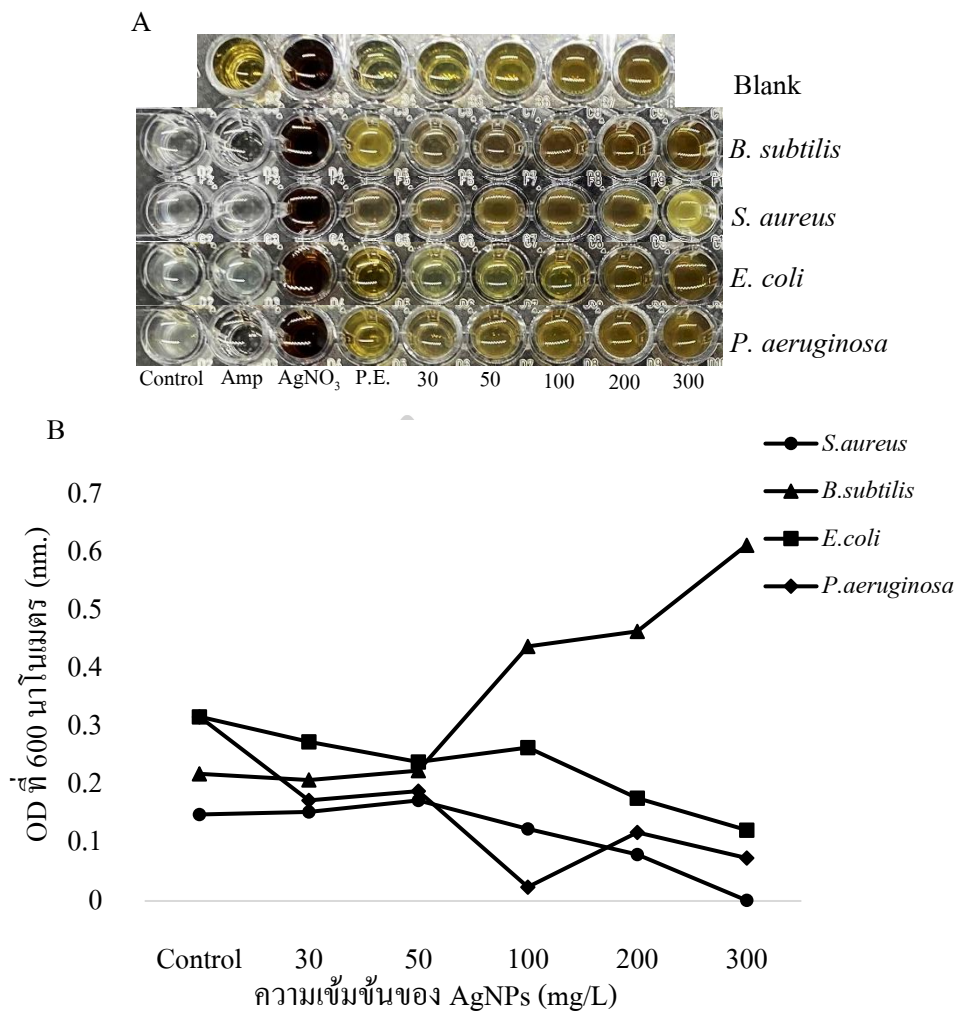
ตารางที่ 8 ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) (30-500 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่สังเคราะห์จากสารสกัดของเปลือกส้มโอ แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (cm)

สารที่ใช้ทดสอบ	สายพันธุ์ของแบคทีเรีย (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (cm))			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
AgNO <sub>3</sub>	0.9±0.7150 <sup>b</sup>	0.9±0.2593 <sup>b</sup>	1.5±0.1100 <sup>a</sup>	1.9±0.0864 <sup>a</sup>
P.E.	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000
Ampicillin	2.9±0.0550	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000
30 mg/L AgNPs	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000
50 mg/L AgNPs	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000
100 mg/L AgNPs	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000
200 mg/L AgNPs	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000
300 mg/L AgNPs	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000
500 mg/L AgNPs	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000	0±0.0000

ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์ตัวอักษรเดียวกันแสดงถึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตามวิธี Duncan's new Multiple Range Test ที่  $p < 0.05$

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาความเข้มข้นของ AgNPs ในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) โดยมีการนำเชื้อแบคทีเรียเลี้ยงลงในอาหาร NB ร่วมกับ AgNPs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อสังเกตลักษณะทางกายภาพของความขุ่นในแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *B. subtilis*) ที่ทดสอบกับ AgNPs พบว่าไม่มีความแตกต่างกับ Control และเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*) พบว่าความขุ่นของเชื้อจางลง (ภาพที่ 30A) และเมื่อพิจารณาค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ (ภาพที่ 30B) พบว่า *S. aureus* ที่เลี้ยงร่วมกับ AgNPs ที่ 100, 200, และ 300 นาโนเมตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับ Control แต่ในส่วนของ *B. subtilis* เลี้ยงร่วมกับ AgNPs ที่ 100, 200, และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น และในส่วนของ *E. coli* กับ *P. aeruginosa* ที่เลี้ยงร่วมกับ AgNPs ที่ 30-300 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับ Control



ภาพที่ 30 ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย

A) ลักษณะทางกายภาพของความขุ่นจากแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่มีการเติมตัวอย่าง (Amp, AgNO<sub>3</sub>, P.E, 30, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตรของ AgNPs) ลงในอาหารและเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง B) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่มีการเติมตัวอย่างลงในอาหารและเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



จากการพิจารณาลักษณะทางกายภาพของความขุ่นและค่าของความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร ดังกล่าว (ภาพที่ 30A และ B) มีแนวโน้มที่จะสามารถประเมินผลของความเข้มข้น AgNPs ในการยับยั้งแบคทีเรียเบื้องต้นได้ แต่ยังคงไม่สามารถยืนยันผลการทดลองได้ ผู้วิจัยจึงพิจารณาจากการหา CFU/ml ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ทดสอบกับ AgNPs เพื่อประเมินหาค่า MIC ดังตารางที่ 9 พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกที่เลี้ยงร่วมกับ AgNPs (30-300 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ค่า CFU/ml สูงกว่า Control แสดงว่าเชื้อยังคงมีการเจริญเติบโตทำให้ไม่มีค่าของ MIC อีกทั้งผลของแบคทีเรียที่ทดสอบกับ Ampicillin และ AgNO<sub>3</sub> พบว่าให้ค่า CFU/ml ลดลง ในส่วนของแบคทีเรียแกรมลบ พบว่า CFU/ml ของ AgNPs ที่ 30-300 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับ Control ดังนั้นค่า MIC ของแบคทีเรียแกรมลบ คือ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ AgNPs

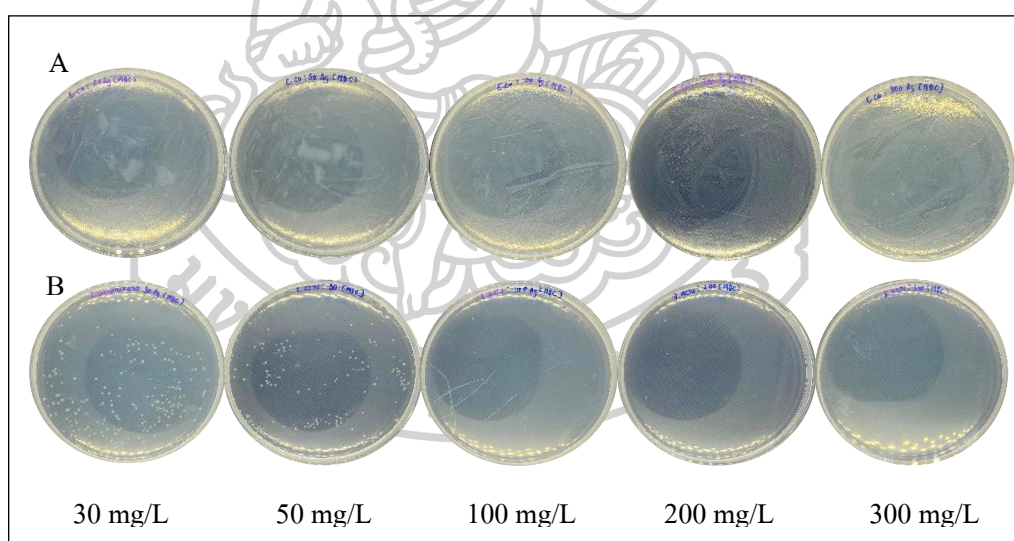
ตารางที่ 9 ค่า CFU/ml ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่มีการเติมตัวอย่าง (Amp, AgNO<sub>3</sub>, P.E, 30, 50, 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตรของ AgNPs) ลงในอาหารเพาะเลี้ยง และค่า MIC และ MBC ของ AgNPs

สารที่ใช้ทดสอบ	สายพันธุ์ของแบคทีเรีย (CFU/ml)			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Control	1.63x10 <sup>9</sup>	4.73x10 <sup>8</sup>	1.21x10 <sup>12</sup>	7.79x10 <sup>12</sup>
Ampicillin	4.44x10 <sup>7</sup>	4.90x10 <sup>7</sup>	0	3.10x10 <sup>12</sup>
AgNO <sub>3</sub>	0	0	0	0
P.E.	8.00x10 <sup>8</sup>	5.98x10 <sup>9</sup>	1.87x10 <sup>8</sup>	0
30 mg/L AgNPs	1.37x10 <sup>10</sup>	5.69x10 <sup>9</sup>	5.17x10 <sup>11</sup>	1.21x10 <sup>12</sup>
50 mg/L AgNPs	1.45x10 <sup>9</sup>	6.83x10 <sup>8</sup>	8.97x10 <sup>11</sup>	8.27x10 <sup>11</sup>
100 mg/L AgNPs	1.33x10 <sup>10</sup>	7.72x10 <sup>9</sup>	4.47x10 <sup>11</sup>	1.34x10 <sup>11</sup>
200 mg/L AgNPs	5.49x10 <sup>10</sup>	4.90x10 <sup>9</sup>	2.63x10 <sup>11</sup>	0
300 mg/L AgNPs	3.02x10 <sup>9</sup>	7.53x10 <sup>9</sup>	3.90x10 <sup>11</sup>	0
MIC	+	+	30 mg/L	30 mg/L
MBC	+	+	+	200 mg/L

+ คือ แบคทีเรียมีการเจริญเติบโต และ 0 คือ แบคทีเรียไม่มีการเจริญเติบโต



จากนั้นผู้วิจัยจึงนำค่า MIC มาศึกษาหาค่าความเข้มข้นของ AgNPs ในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) โดยนำแบคทีเรียแกรมลบที่ทดสอบกับ AgNPs ที่ความเข้มข้น 30-300 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหาร NA บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้า AgNPs สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้จะไม่มีโคโลนีขึ้นบนจานอาหารเพาะเลี้ยง ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดของ AgNPs ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้จะเป็นค่าของ MBC ซึ่งจากผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 31 จะเห็นได้ว่าอาหารที่เพาะเลี้ยง *E. coli* ร่วมกับ AgNPs ที่ 30-300 มิลลิกรัมต่อลิตร มีโคโลนีปรากฏในทุกความเข้มข้นที่กล่าวมา (ภาพที่ 31A) แสดงว่าความเข้มข้นต่ำสุดของ AgNPs ไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้  $\geq 99.9\%$  (MBC) ซึ่งผลสอดคล้องกับ % การยับยั้งในตารางที่ 10 พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ AgNPs (30 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ % การยับยั้งเพียง 57.18% ในส่วนของอาหารที่เพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* ร่วมกับ AgNPs ที่ 30-300 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบโคโลนีที่ความเข้มข้น 200-300 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 31B) แสดงว่าความเข้มข้นต่ำสุดของ AgNPs ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้  $\geq 99.9\%$  (MBC) คือ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับ % การยับยั้งในตารางที่ 10 พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุด (200 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ % การยับยั้ง 100 % ด้วยเช่นกัน



ภาพที่ 31 อาหารที่แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลาย AgNPs ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC) A) *E. coli* และ B) *P. aeruginosa*

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ใช้ AgNPs ในการทดสอบ

สาร ที่ใช้ทดสอบ	% ผลของการยับยั้ง			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>Ampicillin</b>	97.27±3.1388	89.65±3.8066	100.00±0.0000	50.27±1.6050
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	100.00±0.0000	100.00±0.0000	100.00±0.0000	100.00±0.0000
<b>P.E.</b>	50.97±20.2402	0±0.0000	99.98±0.0058	100.00±0.0000
<b>30 mg/L AgNPs</b>	0±0.0000	0±0.0000	57.18±10.4287	80.59±2.3685
<b>50 mg/L AgNPs</b>	11.19±14.3005	0±0.0000	25.69±3.9168	90.04±6.7922
<b>100 mg/L AgNPs</b>	0±0.0000	0±0.0000	62.98±7.0477	97.59±0.2371
<b>200 mg/L AgNPs</b>	0±0.0000	0±0.0000	78.18±3.1366	100.00±0.0000
<b>300 mg/L AgNPs</b>	0±0.0000	0±0.0000	67.68±6.5785	100.00±0.0000

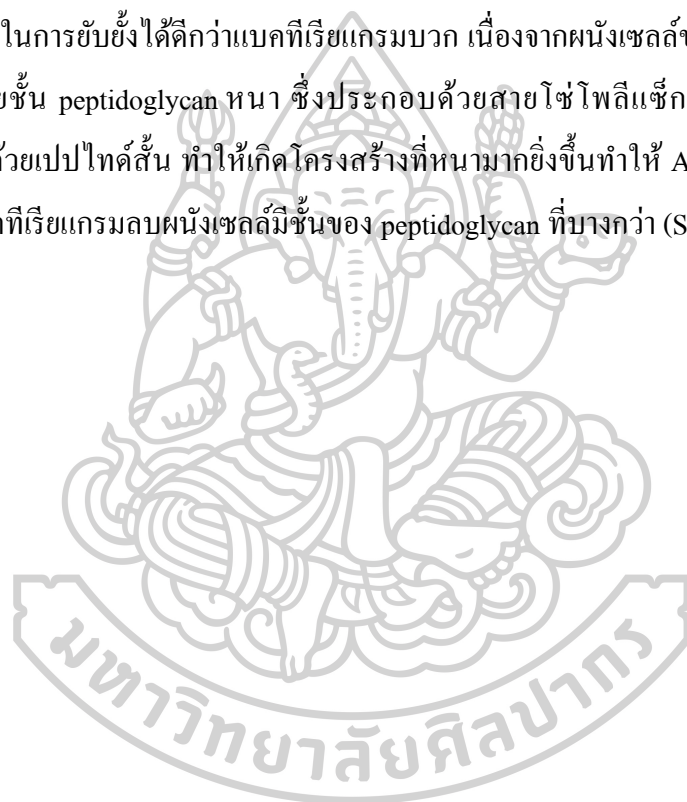
ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ดังนั้นจากผลการทดลองการประเมินความเข้มข้น AgNPs ที่สังเคราะห์จากสารสกัดเปลือกส้มโอต่อการต้านแบคทีเรียก่อโรค และทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี agar well diffusion สรุปได้ว่าทุกความเข้มข้นของ AgNPs (0-500 มิลลิกรัมต่อลิตร) ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ ในส่วนของการพิจารณาหาค่า MIC พบว่าจากผลของลักษณะทางกายภาพของความขุ่นและค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร สามารถประเมินผลการยับยั้งได้แค่นั้นเบื้องต้น ซึ่งสุดท้ายผู้วิจัยจะประเมินผล MIC จากค่า CFU/ml โดยพบว่าในแบคทีเรียแกรมบวกที่เลี้ยงร่วมกับ AgNPs ไม่มีค่าของ MIC แต่ในแบคทีเรียแกรมลบให้ค่า MIC ของทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร อีกทั้งในส่วนหาค่า MBC มีเพียงสายพันธุ์ *P. aeruginosa* ที่ AgNPs ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถฆ่าเชื้อได้ 100%

โดยจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าวิธี MIC เหมาะสำหรับการประเมินหาความเข้มข้นต่ำสุดของ AgNPs ที่ยับยั้งแบคทีเรีย วิธีดังกล่าวจะมีการเติม AgNPs ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย โดย AgNPs จะค่อยๆ ปลดปล่อย Ag<sup>+</sup> ออกมาในอาหารและสัมผัสกับเซลล์แบคทีเรียได้โดยตรงและมีพื้นที่ผิวในการสัมผัสได้อย่างทั่วถึง กลไกในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรม

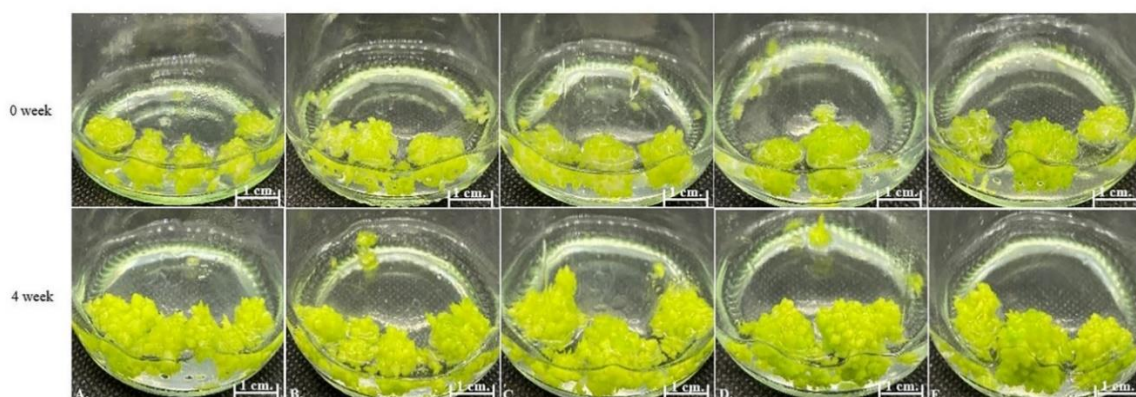
ลบบที่มีผนังเซลล์ประจุลบจะเกิดขึ้นโดยประจุลบที่ผนังเซลล์จะดึงดูด AgNPs ที่มีประจุบวก โดย  $Ag^+$  จะสัมผัสกับผนังเซลล์และไปทำลายผนังเซลล์ ทำให้ AgNPs ผ่านเข้าไปภายในเซลล์ และปล่อย  $Ag^+$  เข้าสู่เซลล์ไปขัดขวางกระบวนการทางชีววิทยา ซึ่งจะเข้าไปทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน ทำให้เกิดความเสียหายภายในเซลล์ และนำไปสู่การผลิต ROS (Reactive oxygen species) หรือทำให้เกิดภาวะเครียด จนกระทั่งหยุดการขนส่งอิเล็กตรอนและนำไปสู่การตายของเซลล์แบคทีเรีย ((Jadhav *et al.*, 2021) และ (Yougbare *et al.*, 2021))

สุดท้ายเมื่อพิจารณาผลดังตารางที่ 10 จะปรากฏได้ว่า AgNPs ที่ใช้ทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบให้ฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยชั้น peptidoglycan หนา ซึ่งประกอบด้วยสายโซ่โพลีแซ็กคาไรด์แบบเส้นตรงที่เชื่อมโยงกันด้วยเปปไทด์สั้น ทำให้เกิดโครงสร้างที่หนามากยิ่งขึ้นทำให้ AgNPs เข้าสู่เซลล์ได้ยาก ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบมีชั้นของ peptidoglycan ที่บางกว่า (Shrivastava *et al.*, 2007)



#### 4.3.2 ผลของการศึกษาความเข้มข้นของ AgNPs ต่อการผลิตชีวมวลและสารพฤกษเคมีของ โพรโตคอร์ัมกล้วยไม้หวายจีน *D. officinale*

จากการทดลองเพาะเลี้ยงโพรโตคอร์ัมกล้วยไม้หวายจีน (*D. officinale*) ในอาหารเหลว ½ MS ที่เติม AgNPs ความเข้มข้นต่างๆ (0, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพาะเลี้ยงในสภาวะตั้งนิ่งเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพจะเห็นได้ว่าชิ้นส่วนของโพรโตคอร์ัมมีสีเขียวสดในอาหารที่เติม AgNPs ในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบและชิ้นพืชมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจากก่อนการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 32) สำหรับสัดส่วนการเจริญเติบโต (Growth ratio) จากตารางที่ 11 พบว่าความเข้มข้นของ AgNPs ที่ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ Growth ratio น้ำหนักสดสูงสุดที่ 0.9359 ในขณะที่ Growth ratio ของน้ำหนักแห้งจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของ AgNPs ที่ 0, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ Growth ratio น้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในทางตรงกันข้ามอาหารที่เสริมความเข้มข้นของ AgNPs ที่ 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโตของโพรโตคอร์ัม *D. officinale*



ภาพที่ 32 โพรโตคอร์ัมของกล้วยไม้หวายจีนที่เพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่งเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหารเหลว half-strength MS ที่มีการเติมตัวกระตุ้น

A) 0 B) 25 C) 50 D) 75 และ E) 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ AgNPs

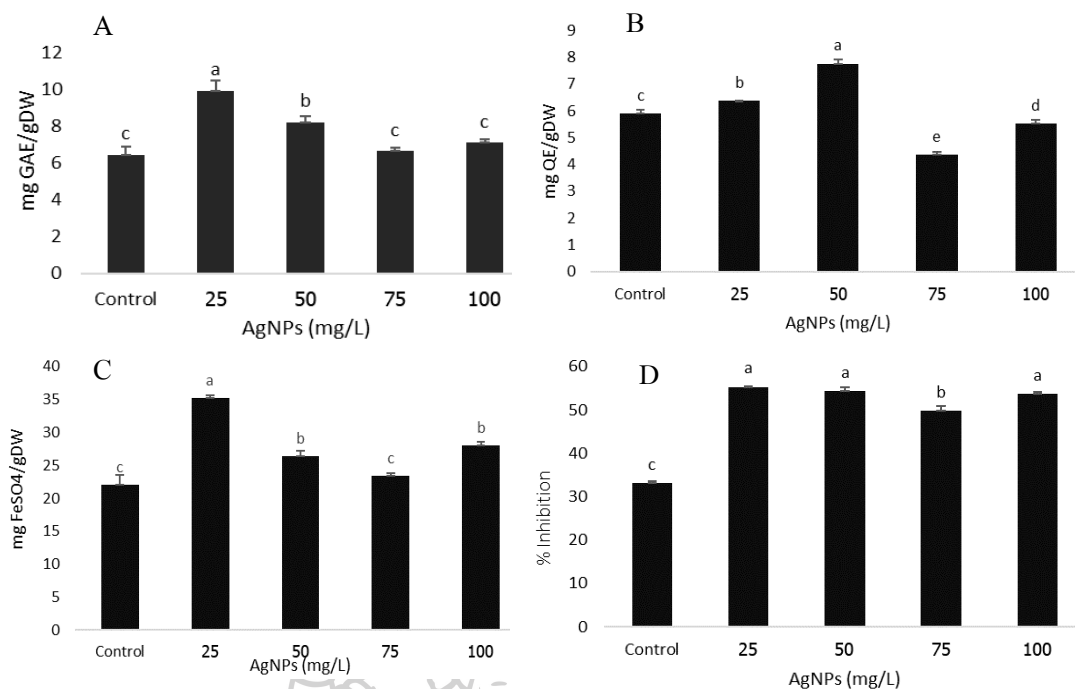
ตารางที่ 11 ผลของ AgNPs (0, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อสัดส่วนการเจริญเติบโต (น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง) ของโปรโตคอร์ม *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

AgNPs (mg/L)	สัดส่วนการเจริญเติบโต (น้ำหนักสด)	สัดส่วนการเจริญเติบโต (น้ำหนักแห้ง)
0	0.5292 ± 0.0169 <sup>c</sup>	3.3750 ± 0.0402 <sup>a</sup>
25	0.9359 ± 0.0499 <sup>a</sup>	3.4469 ± 0.0349 <sup>a</sup>
50	0.8740 ± 0.0773 <sup>ab</sup>	3.2168 ± 0.0978 <sup>a</sup>
75	0.7260 ± 0.0229 <sup>b</sup>	2.8873 ± 0.0120 <sup>b</sup>
100	0.8222 ± 0.0203 <sup>ab</sup>	2.5947 ± 0.1339 <sup>b</sup>

ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเดียวกันแสดงถึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตามวิธี Duncan's new Multiple Range Test ที่  $p < 0.05$

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้หวายจีน *D. officinale* เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จะเห็นได้ว่าการผลิตสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในโปรโตคอร์ม ดังภาพที่ 33 โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในอาหาร half-strength MS ที่เติม AgNPs 25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ AgNPs อื่นๆ ในส่วนของปริมาณฟลาโวนอยด์มีการผลิตสูงสุดที่ความเข้มข้น AgNPs 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยรวมแสดงให้เห็นว่าที่ 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรของ AgNPs มีการผลิตฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับอัตราส่วนการเจริญเติบโต (น้ำหนักแห้ง) ในแง่ของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าวิธี FRAP ให้ฤทธิ์ต้านในการอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร AgNPs และในส่วนของ DPPH ให้ฤทธิ์ต้านในการอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร AgNPs จากผลการทดลองสรุปได้ว่า AgNPs ที่สังเคราะห์จากเปลือกส้มโอในส่วนของเปลือกสีเขียวที่ความเข้มข้นของ AgNPs ช่วง 25-50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถใช้เป็นตัวกระตุ้นสำหรับการผลิตสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากโปรโตคอร์มของกล้วยไม้หวายจีนได้





ภาพที่ 33 ผลของความเข้มข้น AgNPs (0, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์และสารต้านอนุมูลอิสระ

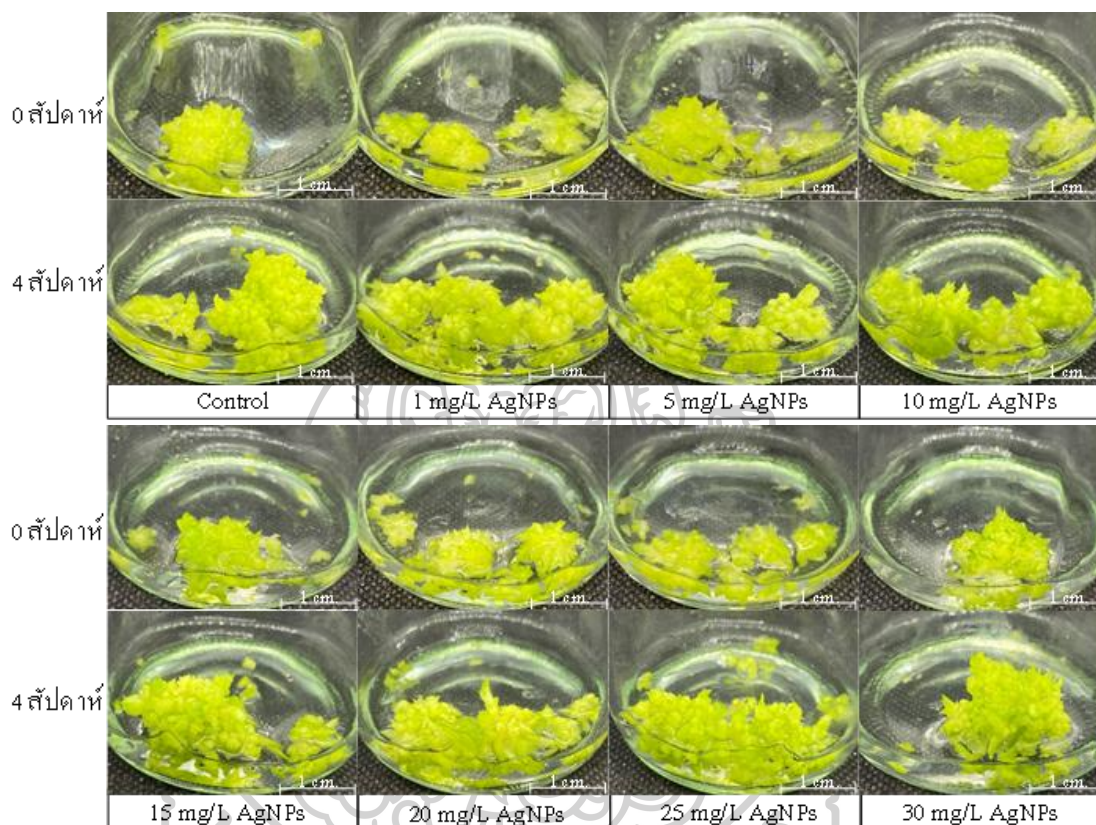
A. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด B. ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด C. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) D. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's new Multiple Range Test ที่  $p < 0.05$

จากผลการทดลองดังกล่าวความเข้มข้นของ AgNPs ที่ 25-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ในการยับยั้งสูงที่สุด (ภาพที่ 33) ในขณะที่สัดส่วนการเจริญเติบโต (น้ำหนักแห้ง) ช่วงระหว่าง 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าการผลิตชีวมวลไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 11)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาผลของ AgNPs ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้หวายจีน ดังภาพที่ 34 พบว่า กลุ่มของโปรโตคอร์มมีสีเขียวสดตั้งแต่มีการเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 0 จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 4 และจะเห็นได้ว่าในทุกความเข้มข้นของ AgNPs ไม่ส่งผลต่อสีของชิ้นส่วนของโปรโตคอร์ม อีกทั้งกลุ่มโปรโตคอร์มยังคงมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 เมื่อพิจารณาถึงสัดส่วนการเจริญเติบโต (Growth ratio) จากตารางที่ 12 พบว่า การเติม AgNPs ในช่วงความเข้มข้น 5-25 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ Growth



ratio ของน้ำหนักรากสูงสุด แต่ในทางกลับกันเมื่อพิจารณาจาก Growth ratio ของน้ำหนักรากแห้งที่มีแนวโน้มให้ผลที่แม่นยำกว่า จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของ AgNPs ที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ Growth ratio ของน้ำหนักรากแห้งสูงสุด อย่างไรก็ตาม การเติม AgNPs ความเข้มข้นสูง (30 มิลลิกรัมต่อลิตร) กลับพบว่าให้ค่า Growth ratio ต่ำที่สุด



ภาพที่ 34 โปรโตคอร์ัมของกล้วยไม้หวายจีนที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ในอาหารเหลว half-strength MS ที่มีการเสริมด้วย AgNPs (1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 12 ผลของ AgNPs (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อสัดส่วนการเจริญเติบโต (น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง) ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้หวายจีน *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

AgNPs (mg/L)	สัดส่วนการเจริญเติบโต (น้ำหนักสด)	สัดส่วนการเจริญเติบโต (น้ำหนักแห้ง)
0	0.4538 ± 0.1776 <sup>b</sup>	5.8517 ± 1.7444 <sup>ab</sup>
1	0.6566 ± 0.0533 <sup>ab</sup>	7.0092 ± 0.3754 <sup>a</sup>
5	0.7845 ± 0.0732 <sup>a</sup>	6.6850 ± 1.1464 <sup>ab</sup>
10	0.7759 ± 0.2847 <sup>a</sup>	6.6062 ± 0.8198 <sup>ab</sup>
15	0.8938 ± 0.2319 <sup>a</sup>	6.8370 ± 1.1293 <sup>ab</sup>
20	0.7636 ± 0.1425 <sup>a</sup>	6.0897 ± 0.2699 <sup>ab</sup>
25	0.8155 ± 0.2202 <sup>a</sup>	5.4725 ± 1.0107 <sup>ab</sup>
30	0.6607 ± 0.2183 <sup>ab</sup>	5.2308 ± 0.9270 <sup>b</sup>

ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ภายในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรเดียวกันแสดงถึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตามวิธี Duncan's new Multiple Range Test ที่  $p < 0.05$

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *D. officinale* เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จะเห็นได้ว่าการเสริมตัวกระตุ้น AgNPs ลงในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่อการผลิตสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ และให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ดังแสดงในภาพที่ 35 เมื่อพิจารณาการผลิตสารฟุกษเคมี พบว่าตัวกระตุ้น AgNPs มีผลต่อการผลิตสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีการเติมตัวกระตุ้น AgNPs (Control) (ภาพที่ 35 A และ B) โดยการผลิตสารประกอบฟีนอลิก พบว่าความเข้มข้นของ AgNPs ในช่วง 1-25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลเชิงบวก เนื่องจากกลุ่มโปรโตคอร์มมีการผลิตประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับอาหารสูตรควบคุมที่ไม่เติม AgNPs (Control) ในขณะที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลเชิงลบต่อการผลิตสารประกอบฟีนอลิกที่ลดลง (ภาพที่ 35A) และเมื่อพิจารณาการผลิตฟลาโวนอยด์ จะเห็นได้ว่าการเติม AgNPs ความเข้มข้นในช่วง 1-20 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลเชิงบวกทำให้ปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับอาหารสูตรควบคุมที่ไม่เติม AgNPs (Control) ขณะที่การเติม AgNPs ความเข้มข้นระหว่าง 25-30 มิลลิกรัมต่อลิตร กลับให้ผลในเชิงลบ (ภาพที่ 35B)

ในส่วนของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่มีการวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP และ DPPH เมื่อพิจารณาจาก FRAP พบว่าความเข้มข้นของ AgNPs ในช่วง 1-25 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลเชิงบวกต่อ

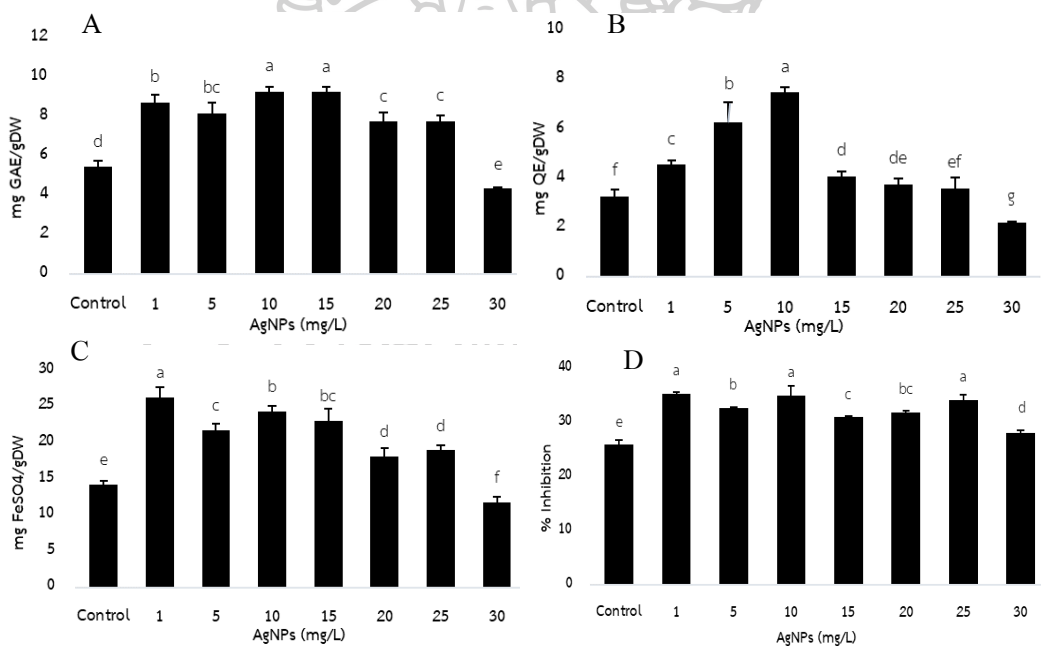
กลุ่มโปรโตคอร์ม โดยให้ฤทธิ์ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสูตรที่ไม่เติม AgNPs และที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร จะส่งผลเชิงลบ (ภาพที่ 35C) ในขณะที่การวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของ AgNPs ตั้งแต่ 1-30 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลเชิงบวกเมื่อเทียบกับสูตรควบคุม (Control) (ภาพที่ 35D)

อย่างไรก็ดี ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของ AgNPs ที่ 25-30 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ Growth ratio ของน้ำหนักแห้งน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรควบคุม หรือเนื่องจากเซลล์ของกลุ่มโปรโตคอร์มบางส่วนเริ่มตาย (ตารางที่ 12) แต่การเติม AgNPs 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังคงมีการผลิตสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์และให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีเมื่อเทียบกับสูตรควบคุม (Control) ในขณะที่การเติม AgNPs 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึงแม้ว่าจะยังมีการผลิตสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์และให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) ก็ตาม แต่การผลิตสารดังกล่าวนี้มีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับ สูตรควบคุม (ภาพที่ 30 A, B และ C) ในทางตรงกันข้ามการเติม AgNPs 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสูตรควบคุมเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH (ภาพที่ 35D)

จากการทดลองเติมตัวกระตุ้น AgNPs ลงในอาหารเพาะเลี้ยง โปรโตคอร์มกล้วยไม้หวายจีน จะเห็นได้ว่าการเติม AgNPs ความเข้มข้นสูง จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโต (Growth ratio น้ำหนักแห้ง) ของพืช โดยเมื่อโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายจีนสัมผัสกับอาหารที่มีความเข้มข้นของ AgNPs สูง ๆ ซึ่ง AgNPs ดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อ Receptor ที่เชื่อมเซลล์ ทำให้ Receptor เปิดออกและมีการแลกเปลี่ยนไอออนเกิดขึ้น รวมไปถึงไอออนของอนุภาคนาโนที่สามารถเข้าไปในเซลล์ของพืชได้เช่นกัน ทำให้เซลล์พืชผลิต Reactive oxygen species (ROS) ตามกลไกป้องกันสิ่งแปลกปลอมและทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) อย่างไรก็ตามเซลล์พืชที่ผลิต ROS มากเกินไป อาจส่งผลกระทบต่อทำลายเซลล์พืช และทำให้ DNA หรือเชื่อมเซลล์ เกิดความเสียหาย หรือเกิดการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ และนำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด อีกทั้ง ROS ยังส่งผลกระทบต่อการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับทำให้เกิดการผลิตสารเมแทบอไลต์ได้ (metabolite) (Anjum *et al.*, 2019) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ ที่ชี้ให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) สามารถผลิตขึ้นได้เมื่อได้รับ AgNPs

อย่างไรก็ตาม มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า การเติมตัวกระตุ้น AgNPs ความเข้มข้นต่ำ ๆ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้หวายจีน สามารถช่วยบรรเทาความเครียดและกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ (Poschenrieder *et al.*, 2013)

จากการศึกษาผลความเข้มข้นของ AgNPs เพื่อส่งเสริมการผลิตชีวมวล, สารพฤกษเคมีจำพวกฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์ และสารต้านอนุมูลอิสระ จากโปรโตคอร์ัมของกล้วยไม้หวายจีน *D. officinale* ให้ได้ปริมาณมาก ควรเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม AgNPs ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 30 A และ B) อีกทั้งถ้าต้องการให้โปรโตคอร์ัมมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นควรเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมตัวกระตุ้น AgNPs ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 35 C และ D) ทำให้สารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสามารถทำงานได้ดีจึงทำให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูง ไม่จำเป็นต้องให้มีการผลิตสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงที่สุด ดังตัวอย่างรายงานการวิจัยของ Kahkonen *et al.* (1999) ที่กล่าวว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชไม่จำเป็นต้องสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูงขึ้น ทั้งนี้การศึกษานิดของสารที่เป็นองค์ประกอบในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระปริมาณสูงควรวิเคราะห์เจาะจงเพื่อให้ชนิดของสารที่แน่นอนนั้นต่อไป



ภาพที่ 35 ผลของความเข้มข้น AgNPs (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อการผลิตสารพฤกษเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระ

A. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด B. ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด C. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) D. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตาม วิธี Duncan's new Multiple Range Test ที่  $p < 0.05$



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์ AgNPs ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยอาศัยสารสกัดจากเปลือกส้มโอที่เป็นของทางเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งการนำเอาเปลือกส้มโอมาใช้นอกจากจะเป็นการกำจัดของเสียทางการเกษตรแล้ว ก็ยังเป็นช่องทางในการเพิ่มมูลค่าของเหลือใช้ในทางการเกษตรอีกด้วย โดยงานวิจัยได้มีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ พิสูจน์เอกลักษณ์ และการประยุกต์ใช้ AgNPs ในด้านการยับยั้งแบคทีเรีย การผลิตชีวมวลและสารต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ AgNPs จากสารสกัดของเปลือกส้มโอ โดยศึกษาปัจจัยของความเข้มข้น  $\text{AgNO}_3$  ร่วมกับ pH ของสารสกัด ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา และรูปแบบของการเทสารสกัด สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ AgNPs คือ ความเข้มข้นของ  $\text{AgNO}_3$  2 มิลลิโมลาร์ pH ของสารสกัดคือ 8 ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 24 ชั่วโมง และมีการเทสารสกัดอย่างรวดเร็ว

พิสูจน์เอกลักษณ์ของ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้จากสภาวะที่เหมาะสม พบว่าเกิดปรากฏการณ์ surface plasmon resonance (SPR) ขึ้นในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 402-411 นาโนเมตร และเมื่อวิเคราะห์ FTIR พบหมู่ฟังก์ชัน O-H, C=O และ C-O ของแอลกอฮอล์ ฟีนอล กรดคาร์บอกซิลิก และอะโรมาติก ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของสารพฤษเคมีที่ทำหน้าที่ในการรีดิวซ์ AgNPs ในส่วนของ XRD พบระนาบของโครงสร้างผลึกแบบ face-centered cubic และ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้มีรูปร่างเป็นทรงกลม มีขนาดเฉลี่ยอยู่ที่ 31.1 นาโนเมตร อีกทั้งเมื่อวิเคราะห์ EDX พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่ 3 keV ซึ่งเกิดจากธาตุ Ag ที่เป็นองค์ประกอบใน AgNPs อีกด้วย

การนำ AgNPs ไปประยุกต์ใช้ในด้านกรยับยั้งแบคทีเรีย จะเห็นได้ว่า AgNPs มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ดี และในการผลิตชีวมวล สารพฤษเคมี และสารต้านอนุมูลอิสระของโปรโตคอร์มกล้วยไม้หวายจีนนั้น อาจกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของ AgNPs ที่ 1-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่ส่งผลต่อการผลิตชีวมวลอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในส่วนของการผลิตสารพฤษเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าอาหารที่เติม AgNPs ในช่วงความเข้มข้น 1-20 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะแก่การผลิตสารพฤษเคมีและยังให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย

ผลที่ได้จากการงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นถึงการลดปริมาณของเหลือทิ้งทางการเกษตร (เปลือกส้มโอ) และนำมาใช้ประโยชน์ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนด้วยวิธีการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดย AgNPs ที่สังเคราะห์ได้จากสารสกัดเปลือกส้มโอในงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการนำมาใช้ในการต้านแบคทีเรียแกรมลบและสามารถกระตุ้นให้โปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายจีนมีการผลิตสารพฤษเคมี (ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และสารต้านอนุมูลอิสระ) ได้มากขึ้น

ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการนำไปเพิ่มผลผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกล้วยไม้สกุลหวาย เพื่อรองรับความต้องการการนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของยา อาหาร และเวชสำอาง ต่อไป

#### ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคในพืช เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ AgNPs เป็นสารป้องกันและ/หรือกำจัดโรคพืช
2. ควรมีการศึกษาหาความเข้มข้นของ AgNPs ในช่วงความเข้มข้นระดับต่ำ ๆ ที่ 1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกระตุ้นให้พืชมีการผลิตสารพฤกษเคมีในปริมาณที่มากขึ้น แต่ในส่วนของสารต้านอนุมูลอิสระควรมีการศึกษาในช่วงความเข้มข้นระดับต่ำ ๆ ที่ 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกระตุ้นให้มีการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระที่มากขึ้นเช่นเดียวกัน เพื่อนำไปสู่การเพิ่มปริมาณของสารพฤกษเคมีและสารต้านอนุมูลอิสระที่เพียงพอต่อความต้องการของอุตสาหกรรมต่าง ๆ
3. ควรมีการทดสอบความเป็นพิษของ AgNPs ที่เป็นสารตกค้างในสภาพแวดล้อมหลังการนำไปใช้งานเป็นสารกำจัดศัตรูพืชทางการเกษตร





## รายการอ้างอิง

- Akbaari, B., Tavandashti, M. P., & Zandrahimi, M. (2011). Particle size characterization of nanoparticles a practical approach. *Iranian Journal of Materials Science & Engineering* 8(2).
- Al-Otibi, F., Al-Ahaidib, R. A., Alharbi, R. I., Al-Otaibi, R. M., & Albasher, G. (2020). Antimicrobial potential of biosynthesized silver nanoparticles by *Aaronsohnia factorovskyi* Extract. *Molecules*, 26(1).
- Ali, A., Mohammad, S., Khan, M. A., Raja, N. I., Arif, M., Kamil, A., & Mashwani, Z. U. (2019). Silver nanoparticles elicited in vitro callus cultures for accumulation of biomass and secondary metabolites in *Caralluma tuberculata*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 47(1), 715-724.
- Ali, K. A., Yao, R., Wu, W., Masum, M. M. I., Luo, J., Wang, Y., Zhang, Y., An, Q., Sun, G., & Li, B. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticle from pomelo (*Citrus Maxima*) and their antibacterial activity against *acidovorax oryzae* RS-2. *Materials Research Express*, 7(1).
- Almasoud, N., Alhaik, H., Almutairi, M., Houjak, A., Hazazi, K., Alhayek, F., Aljanoubi, S., Alkhaibari, A., Alghamdi, A., Soliman, D. A., Alomar, T. S., & Awad, M. A. (2021). Green nanotechnology synthesized silver nanoparticles: characterization and testing its antibacterial activity. *Green Processing and Synthesis*, 10(1), 518-528.
- Alqadi, M. K., Abo Noqtah, O. A., Alzoubi, F. Y., Alzoubi, J., & Aljarrah, K. (2014). pH effect on the aggregation of silver nanoparticles synthesized by chemical reduction. *Materials Material Science-Poland*, 32(1), 107-111.
- Anandalakshmi, K., Venugobal, J., & Ramasamy, V. (2015). Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using *Petalium murex* leaf extract and their antibacterial activity. *Applied Nanoscience*, 6(3), 399-408.
- Anjum, S., Anjum, I., Hano, C., & Kousar, S. (2019). Advances in nanomaterials as novel elicitors of pharmacologically active plant specialized metabolites: current status and future outlooks. *RSC Advances*, 9(69), 40404-40423.
- Aref, M. S., & Salem, S. S. (2020). Bio-callus synthesis of silver nanoparticles, characterization, and antibacterial activities via *Cinnamomum camphora* callus culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27.

- Asimuddin, M., Shaik, M. R., Adil, S. F., Siddiqui, M. R. H., Alwarthan, A., Jamil, K., & Khan, M. (2020). *Azadirachta indica* based biosynthesis of silver nanoparticles and evaluation of their antibacterial and cytotoxic effects. *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 648-656.
- Balaji, D. S., Basavaraja, S., Deshpande, R., Mahesh, D. B., Prabhakar, B. K., & Venkataraman, A. (2009). Extracellular biosynthesis of functionalized silver nanoparticles by strains of *Cladosporium cladosporioides* fungus. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 68(1), 88-92.
- Bar, H., Bhui, D. K., Sahoo, G. P., Sarkar, P., Pyne, S., & Misra, A. (2009). Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Jatropha curcas*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 348(1-3), 212-216.
- Baudot, C., Tan, C. M., & Kong, J. C. (2010). FTIR spectroscopy as a tool for nano-material characterization. *Infrared Physics & Technology*, 53(6), 434-438.
- Bayat, M., Zargar, M., Astarkhanova, T., Pakina, E., Ladan, S., Lyashko, M., & Shkurkin, S. I. (2021). Facile biogenic synthesis and characterization of seven metal-based nanoparticles conjugated with phytochemical bioactives using *Fragaria ananassa* Leaf Extract. *Molecules*, 26(10).
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules*, 25(1).
- Bharani, M., Karpagam, T., Varalakshmi, B., Gayathiri, G., & Priya, K. L. (2012). Synthesis and characterization of silver nanoparticles from *Wrightia tinctoria*. *Applied biology and pharmaceutical technology*, 3(1), 58.
- Chowdhury, R. A., Dhar, S. A., Das, S., Nahian, M. K., & Rakibul Qadir, M. (2021). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles from the aqueous extract of the leaves of *Citrus aurantifolia*. *Materials Today: Proceedings*, 44, 1039-1042.
- Chung, I. M., Rekha, K., Rajakumar, G., & Thiruvengadam, M. (2018). Elicitation of silver nanoparticles enhanced the secondary metabolites and pharmacological activities in cell suspension cultures of bitter melon. *3 Biotech*, 8(10), 412.
- Chutrakulwong, F., Thamaphat, K., & Limsuwan, P. (2020). Photo-irradiation induced green synthesis of highly stable silver nanoparticles using durian rind biomass: effects of light

- intensity, exposure time and pH on silver nanoparticles formation. *Journal of Physics Communications*, 4(9).
- Colpan, C. O., Nalbant, Y., & Ercelik, M. (2018). Fundamentals of fuel cell technologies. *Comprehensive Energy Systems* (Vol. 4, pp. 1107-1130).
- Darroudi, M., Ahmad, M. B., Abdullah, A. H., Ibrahim, N. A., & Shameli, K. (2010). Effect of accelerator in green synthesis of silver nanoparticles. *International Journal Molecular Sciences*, 11(10), 3898-3905.
- Devaraj, P., Kumari, P., Aarti, C., & Renganathan, A. (2013). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Cannonball* leaves and their cytotoxic Activity against MCF-7 Cell Line. *Journal of Nanotechnology*, 2013, 1-5.
- Ding, Z., Zhou, J.-Y., Wei, W.-Z., Baker, V., & Wu, G. S. (2002). Induction of apoptosis by the new anticancer drug XK469 in human ovarian cancer cell lines. *Oncogene*, 21, 4530-4538.
- DoGan Calhan, S., & M, G. U. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Onosma sericeum Willd.* and evaluation of their catalytic properties and antibacterial and cytotoxic activity. *Turk J Chem*, 44(6), 1587-1600.
- Dutta, T., Ghosh, N. N., Das, M., Adhikary, R., Mandal, V., & Chattopadhyay, A. P. (2020). Green synthesis of antibacterial and antifungal silver nanoparticles using *Citrus limetta* peel extract: Experimental and theoretical studies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(4).
- Exner, M., Bhattacharya, S., Christiansen, B., Gebel, J., Bermes-Goroncy, P., Hartemann, P., Heeg, P., Ilschner, C., Kramer, A., Larson, E., Merken, W., Mielke, M., Oitmanns, P., Ross, B., Rotter, M., Maria, R., Schmithausen, Gunther-Hans, Sonntag, & Trautmann, M. (2017). Antibiotikaresistenz: was ist so besonders an den Gram-negativen multiresistenten bakterien? *GMS Hygiene and Infection Control*, 12, 2196-5226.
- Garibo, D., Borbon-Nunez, H. A., de Leon, J. N. D., Garcia Mendoza, E., Estrada, I., Toledano-Magana, Y., Tiznado, H., Ovalle-Marroquin, M., Soto-Ramos, A. G., Blanco, A., Rodriguez, J. A., Romo, O. A., Chavez-Almazan, L. A., & Susarrey-Arce, A. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Lysiloma acapulcensis* exhibit high-antimicrobial activity. *Scientific Reports*, 10(1), 12805.

- Goudarzi, M., Mir, N., Mousavi-Kamazani, M., Bagheri, S., & Salavati-Niasari, M. (2016). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles prepared from two novel natural precursors by facile thermal decomposition methods. *Sci Rep*, 6, 32539.
- Hamouda, R. A., Hussein, M. H., Abo-Elmagd, R. A., & Bawazir, S. S. (2019). Synthesis and biological characterization of silver nanoparticles derived from the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Scientific Reports*, 9(1), 13071.
- Hemlata, Meena, P. R., Singh, A. P., & Tejavath, K. K. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Cucumis prophetarum* aqueous leaf extract and their antibacterial and Antiproliferative activity against cancer cell lines. *ACS Omega*, 5(10), 5520-5528.
- Ibragic, S., Smjecanin, N., Milusic, R., & Nuhanovic, M. (2021). Pomelo peel and sugar beet pulp as novel biosorbents in purification of biodiesel. *Biofuels*, 13(6), 755-762.
- Ibrahim, H. M. M. (2015). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(3), 265-275.
- Jadhav, S. A., Patil, A. H., Thoravat, S. S., Patil, V. S., & Patil, P. S. (2021). A brief overview of antimicrobial nanotextiles prepared by in situ synthesis and deposition of Silver nanoparticles on Cotton. *Nanobiotechnology Reports*, 16(4), 543-550.
- Jain, N., Jain, P., Rajput, D., & Patil, U. K. (2021). Green synthesized plant-based silver nanoparticles: therapeutic prospective for anticancer and antiviral activity. *Micro and Nano Systems Letters*, 9(1).
- Jalab, J., Abdelwahed, W., Kitaz, A., & Al-Kayali, R. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Acacia cyanophylla* and its antibacterial activity. *Heliyon*, 7(9), e08033.
- Jalani, N. S., Michell, W., Hanani, S. Z., Hashim, U., & Abdullah, R. (2018). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Citrus grandis* peel extract. *Malaysian Journal of Analytical Science*, 22(4).
- Jasuja, N., Gupta, D., Reza, M., & Joshi, S. (2014). Green synthesis of AgNPs stabilized with biowaste and their antimicrobial activities. *Brazilian journal of microbiology*, 45(4), 1325-1332.

- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J Nanotechnol*, 9, 1050-1074.
- Jha, A. K., Prasad, K., Kumar, V., & Prasad, K. (2009). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Eclipta* leaf. *Biotechnology Progress*, 25(5), 1476-1479.
- Jones, L. A., Worobo, R. W., & Smart, C. D. (2014). Plant-pathogenic oomycetes, *Escherichia coli* strains, and *Salmonella* spp. Frequently found in surface water used for irrigation of fruit and vegetable crops in New York State. *Appl Environ Microbiol*, 80(16), 4814-4820.
- Ju-Nam, Y., & Lead, J. R. (2008). Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science Total Environmental*, 400(1-3), 396-414.
- Jyoti, K., Baunthiyal, M., & Singh, A. (2016). Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(3), 217-227.
- M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. 47, 3954-3962.
- Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B., Muthumary, J., & Srinivasan, K. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using *citrus sinensis* peel extract and its antibacterial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 79(3), 594-598.
- Khan, M., Khan, A. U., Moon, I. S., Felimban, R., Alserihi, R., Alsanie, W. F., & Alam, M. (2021). Synthesis of biogenic silver nanoparticles from the seed coat waste of pistachio (*Pistacia vera*) and their effect on the growth of eggplant. *Nanotechnology Reviews*, 10(1), 1789-1800.
- Kokila, T., Ramesh, P. S., & Geetha, D. (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Cavendish* banana peel extract and its antibacterial and free radical scavenging assay: a novel biological approach. *Applied Nanoscience*, 5(8), 911-920.
- Kuntyi, O. I., Kytsya, A. R., Mertsalo, I. P., Mazur, A. S., Zozula, G. I., Bazylyak, L. I., & Topchak, R. V. (2019). Electrochemical synthesis of silver nanoparticles by reversible current in solutions of sodium polyacrylate. *Colloid and Polymer Science*, 297(5), 689-695.
- Kuppusamy, P., Yusoff, M. M., Maniam, G. P., & Govindan, N. (2016). Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications - An updated report. *Saudi Pharm J*, 24(4), 473-484.



- Li, J., Ma, Q., Shoa, H., Zhou, X., Xia, H., & Xie, J. (2017). Biosynthesis, characterization, and antibacterial activity of silver nanoparticles produced from rice straw biomass. *bioresources*, 12(3), 4897-4911.
- Manickavasagam, M., Pavan, G., & Vasudevan, V. (2019). A comprehensive study of the hormetic influence of biosynthesized AgNPs on regenerating rice calli of indica cv. IR64. *Science Reports*, 9(1), 8821.
- Masum, M. M. I., Siddiqua, M. M., Ali, K. A., Zhang, Y., Abdallah, Y., Ibrahim, E., Qiu, W., Yan, C., & Li, B. (2019). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Phyllanthus emblica* fruit extract and its inhibitory action against the pathogen *Acidovorax oryzae* strain RS-2 of rice bacterial brown stripe. *Frontiers Microbiology*, 10, 820.
- Mathew, S., Victorio, C. P., M S, J. S., & B.H, B. T. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticle using flowers of *Calotropis gigantea* (L.) W.T. Aiton and activity against pathogenic bacteria. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(12), 9139-9144.
- Mickymaray, S. (2019). One-step synthesis of silver nanoparticles using saudi arabian desert seasonal plant sisymbrium irio and antibacterial activity against multidrug-resistant bacterial strains. *Biomolecules*, 9(11).
- Mogole, L., Omwoyo, W., Viljoen, E., & Moloto, M. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Citrus sinensis* peels and evaluation of their antibacterial efficacy. *Green Processing and Synthesis*, 10(1), 851-859.
- Mohamed, M. A. (2015). One-step functionalization of silver nanoparticles using the Orsellinic acid compound isolated from the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*: characterization and antifungal activity. *Nano.chem.*, 3(1), 103-110.
- Mondal, A. H., Yadav, D., Mitra, S., & Mukhopadhyay, K. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Shewanella* sp. ARY1 and their antibacterial activity. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 8295-8310.
- Mulvaney, P. (1996). Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *American Chemical Society*, 12, 788-800.
- Nakhjavani, M., Nikkhah, V., Sarafraz, M. M., Shoja, S., & Sarafraz, M. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using green tea leaves: Experimental study on the morphological, rheological and antibacterial behaviour. *Heat and Mass Transfer*, 53(10), 3201-3209.



- Ndikau, M., Noah, N. M., Andala, D. M., & Masika, E. (2017). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Citrullus lanatus* fruit rind extract. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 8108504.
- Obsuwan, K., Jeong, B. R., & Maksuk, S. (2019). Analysis of bioactive compounds, polysaccharides and antioxidant activity in different parts of *Dendrobium* 'sonia jo daeng'. *Science, Engineering and Health Studies*, 13(2).
- Oxoid. (2022, June 20). Antibiotic susceptibility testing best practice. Retrieved from <http://www.oxoid.com/UK/blue/techsupport/its.asp?itsp=faq&cat=toxin+detection&faq=tsfaq021&c=UK&lang=EN&print=N>
- Panja, A., Mishra, A. K., Mahesh, D., Pandey, N. K., Singh, S. K., & Kumar, B. (2021). Silver nanoparticles – a Review. *Eurasian Journal of Medicine and Oncology*.
- Paulkumar, K., Rajeshkumar, S., Gnanajobitha, G., Vanaja, M., Malarkodi, C., & Annadurai, G. (2013). Biosynthesis of silver chloride nanoparticles using *Bacillus subtilis* MTCC 3053 and assessment of its antifungal activity. *ISRN Nanomaterials*, 2013, 1-8.
- Phongtongpasuk, S., Poadang, S., & Yongvanich, N. (2016). Environmental-friendly method for synthesis of silver nanoparticles from dragon fruit peel extract and their antibacterial activities. *Energy Procedia*, 89, 239-247.
- Poschenrieder, C., Cabot, C., Martos, S., Gallego, B., & Barcelo, J. (2013). Do toxic ions induce hormesis in plants? *Plant Science*, 212, 15-25.
- Prasad Yadav, T., Manohar Yadav, R., & Pratap Singh, D. (2012). Mechanical milling: a top down approach for the synthesis of nanomaterials and nanocomposites. *Nanoscience and Nanotechnology*, 2(3), 22-48.
- Rahmawati, M., Mahfud, C., Risuleo, G., & Jadid, N. (2022). Nanotechnology in plant metabolite improvement and in animal welfare. *Applied Sciences*, 12(2).
- Rahuman, H. B. H., Dhandapani, R., Palanivel, V., Thangavelu, S., Paramasivam, R., & Muthupandian, S. (2021). Bioengineered phytomolecules-capped silver nanoparticles using *Carissa carandas* leaf extract to embed on to urinary catheter to combat UTI pathogens. *PLoS One*, 16(9), e0256748.

- Roopan, S. M., Rohit, Madhumitha, G., Rahuman, A. A., Kamaraj, C., Bharathi, A., & Surendra, T. V. (2013). Low-cost and eco-friendly phyto-synthesis of silver nanoparticles using *Cocos nucifera* coir extract and its larvicidal activity. *Industrial Crops and Products*, 43,
- Rousta, M. H., & Ghasemi, N. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using a mountain plant extract. *Revue Roumaine de Chimie*, 64(2), 143-152.
- Roy, A., Bulut, O., Some, S., Mandal, A. K., & Yilmaz, M. D. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Adv*, 9(5), 2673-2702.
- S, S., H, L. J. K., K, R., & M, S. (2017). Antimicrobial and antioxidant potentials of biosynthesized colloidal zinc oxide nanoparticles for a fortified cold cream formulation: A potent nanocosmeceutical application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 79, 581-589.
- Saha, N., & Dutta Gupta, S. (2018). Promotion of shoot regeneration of *Swertia chirata* by biosynthesized silver nanoparticles and their involvement in ethylene interceptions and activation of antioxidant activity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134(2), 289-300.
- Salachna, P., Byczynska, A., Zawadzinska, A., Piechocki, R., & Mizielska, M. (2019). Stimulatory effect of silver nanoparticles on the growth and flowering of potted oriental lilies. *Agronomy*, 9(10).
- Sallehudin, T. T. A., Abu Seman, M. N., & Chik Tuan Saufi, S. M. (2018). Preparation and characterization silver nanoparticle embedded polyamide nanofiltration (NF) membrane. *MATEC Web of Conferences*, 150.
- Sathyavathi, R., Krishna, M. B., Rao, S. V., Saritha, R., & Rao, D. N. (2010). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Coriandrum Sativum* leaf extract and their application in Nonlinear Optics. *Advanced Science Letters*, 3(2), 138-143.
- Shafaghat, A. (2014). Synthesis and characterization of silver nanoparticles by phytosynthesis method and their biological activity. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 45(3), 381-387.
- Shameli, K., Ahmad, M. B., Jazayeri, S. D., Sedaghat, S., Shabanzadeh, P., Jahangirian, H., Mahdavi, M., & Abdollahi, Y. (2012). Synthesis and characterization of polyethylene glycol mediated

- silver nanoparticles by the green method. *International Journal Molecular Science*, 13(6), 6639-6650.
- Shanker, S. S., Ahmad, A., & Sastry, M. (2003). Geranium leaf assisted biosynthesis of silver Nanoparticles. *Biotechbol.Prog.*, 19, 1627-1631.
- Sharma, G. (2014). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of *Abelia grandiflora* assisted AgNPs. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 06(05).
- Sharma, K., Guleria, S., & Razdan, V. K. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using *Ocimum gratissimum* leaf extract: characterization, antimicrobial activity and toxicity analysis. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 29(2), 213-224.
- Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M. G., Saradhi, P. P., Khanna, P. K., & Arora, S. (2012). Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Appl Biochem Biotechnol*, 167(8), 2225-2233.
- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., & Dash, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18(22).
- Siddharthan. (2019). Characterization of silver nanoparticles synthesized from *Catheranthus roseus* (*Vinca rosea*) plant leaf extract and their antibacterial activity. Paper presented at the International Journal of Research and Analytical Reviews (IJRAR).
- Silva, L. P., Pereira, T. M., & Bonatto, C. C. (2019). Frontiers and perspectives in the green synthesis of silver nanoparticles. In *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles* (pp. 137-164).
- Singh, H., Du, J., Singh, P., & Yi, T. H. (2018). Ecofriendly synthesis of silver and gold nanoparticles by *Euphrasia officinalis* leaf extract and its biomedical applications. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 46(6), 1163-1170.
- Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends Biotechnol*, 34(7), 588-599.
- Skiba, M. I., & Vorobyova, V. I. (2019). Synthesis of silver nanoparticles using orange peel extract prepared by plasmochemical extraction method and degradation of methylene blue under solar irradiation. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019, 1-8.

- Smitha, S. L., Nissamudeen, K. M., Philip, D., & Gopchandran, K. G. (2008). Studies on surface plasmon resonance and photoluminescence of silver nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 71(1), 186-190.
- Sood, R., & Chopra, D. S. (2017). Improved yield of green synthesized crystalline silver nanoparticles with Potential antioxidant activity. *International Research Journal of Pharmacy*, 8(4), 100-104.
- Sowmya, T., & Lakshmi, G. V. (2018). *Soymida febrifuga* aqueous root extract maneuvered silver nanoparticles as mercury nanosensor and potential microbicide. *World Scientific News*, 114, 84-105.
- Spinoso-Castillo, J. L., Chavez-Santoscoy, R. A., Bogdanchikova, N., Perez-Sato, J. A., Morales-Ramos, V., & Bello-Bello, J. J. (2017). Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 129(2), 195-207.
- Srirangam, G., & Parameswararao, K. (2017). Synthesis and characterization of silver nanoparticles from the leaf extract *Ofmalachra capitata* (L.). *Rsayan Journal of Chemistry*.
- Thirunavoukkarasu, M., Balaji, U., Behera, S., Panda, P. K., & Mishra, B. K. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticle from leaf extract of *Desmodium gangeticum* (L.) DC. and its biomedical potential. *Spectrochim Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 116, 424-427.
- Timoteo, C. D. O., Paiva, R., dos Reis, M. V., Claro, P. I. C., da Silva, D. P. C., Marconcini, J. M., & de Oliveira, J. E. (2019). Silver nanoparticles in the micropropagation of *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137(2), 359-368.
- Toh, J. J., Khoo, H. E., & Azrina, A. (2013). Comparison of antioxidant properties of pomelo [*Citrus Grandis* (L) Osbeck] varieties. *International food research journal*, 20(4), 1661-16688.
- Tripathy, A., Raichur, A. M., Chandrasekaran, N., Prathna, T. C., & Mukherjee, A. (2009). Process variables in biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Azadirachta indica* (Neem) leaves. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(1), 237-246.
- Veerasamy, R., Xin, T. Z., Gunasagaran, S., Xiang, T. F. W., Yang, E. F. C., Jeyakumar, N., & Dhanaraj, S. A. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract

- and evaluation of their antimicrobial activities. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 113-120.
- Walker, T. S., Bais, H. P., Deziel, E., Schweizer, H. P., Rahme, L. G., Fall, R., & Vivanco, J. M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* plant root interactions. pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol*, 134(1), 320-331.
- Xu, L., Wang, Y. Y., Huang, J., Chen, C. Y., Wang, Z. X., & Xie, H. (2020). Silver nanoparticles: synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*, 10(20), 8996-9031.
- Yadav, S., Prakash, J., Shekhar, H., Dwivedy, A., Patel, V., Tiwari, S., & Vishwakarma, N. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using *Eranthemum pulchellum* (Blue Sage) aqueous leaves extract: characterization, evaluation of antifungal and antioxidant properties. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, 5(2).
- Yang, J., Yin, H., Jia, J., & Wei, Y. (2011). Facile synthesis of high concentration, stable aqueous dispersions of uniform silver nanoparticles using aniline as a reductant. *Langmuir*, 27(8), 5047-5053.
- Yougbare, S., Mutalik, C., Okoro, G., Lin, I. H., Krisnawati, D. I., Jazidie, A., Nuh, M., Chang, C. C., & Kuo, T. R. (2021). Emerging trends in nanomaterials for antibacterial applications. *International Journal Nanomedicine*, 16, 5831-5867.
- Yuen, C. W. M., Ku, S. K. A., Choi, P. S. R., Kan, C. W., & Tsang, S. Y. (2005). Determining functional groups of commercially available ink jet printing reactive dyes using Infrared Spectroscopy. *Research Journal of Textile and Apparel*, 9(2), 26-38.
- Zafar, S., & Zafar, A. (2019). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Phoenix dactylifera* fruits extract and their in vitro antimicrobial and cytotoxic effects. *The Open Biotechnology Journal*, 13(1), 37-46.
- Zhang, X. P., Lu, Y. Y., & Yang, G. S. (1992). Extraction and determination of flavonoid in ginkgo. *Chinese Herbal Medicine*, 23, 122-124.
- Zheng, X., Peng, Y., Lombardi, J. R., Cui, X., & Zheng, W. (2016). Photochemical growth of silver nanoparticles with mixed light irradiation. *Colloid and Polymer Science*, 294(5), 911-916.



ภาคผนวก ก

มหาวิทยาลัยศิลปากร



### ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. การเตรียมอุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับการสังเคราะห์

เตรียมสารละลาย Aqua regia ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

โดยเตรียมสารละลาย conc. HCl: conc. HNO<sub>3</sub> ในอัตราส่วน 3: 1 (v/v)

ดังนั้น ปิเปต conc. HCl มา 75 มิลลิลิตร และ conc. HNO<sub>3</sub> มา 25 มิลลิลิตร

#### 2. การเตรียมสารละลาย AgNO<sub>3</sub> สำหรับการสังเคราะห์ AgNPs

เตรียม 3 มิลลิโมลาร์ ของ AgNO<sub>3</sub> ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

วิธีการคำนวณ

$$\frac{g}{M.W.} = \frac{CV}{1000}$$

$$\frac{g}{168.87} = \frac{(3 \times 10^{-3} M) \times 500 \text{ ml}}{1000}$$

$$g = 0.2533$$

ดังนั้น ชั่ง Silver nitrate 0.2533 กรัม ละลายในน้ำ DI ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

เตรียม 2 มิลลิโมลาร์ ของ AgNO<sub>3</sub> ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

วิธีการคำนวณ

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(3 \text{ mM AgNO}_3) (V_1) = (2 \text{ mM AgNO}_3) (500 \text{ ml})$$

$$V_1 = 333.33 \text{ ml}$$

ดังนั้น ปิเปต Stock 3 mM AgNO<sub>3</sub> 333.33 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย DI เป็น 500 มิลลิลิตร

#### 3. การเตรียมสารละลายวิเคราะห์ Total phenolic

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1 มิลลิลิตร มี Gallic acid อยู่ 0.001 กรัม

$$\text{สารละลาย 10 มิลลิลิตร มี Gallic acid อยู่ } \frac{10 \times 0.001}{1} = 0.01 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น ต้องชั่ง Gallic acid มา 0.01 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร

**เตรียมสารละลาย 10% Folin-ciocalteu's reagent ปริมาตร 100 มิลลิลิตร**

เปิด Folin-ciocalteu's มา 10 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร บรรจุใส่ในขวดสี

**เตรียมสารละลาย 7.5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ปริมาตร 100 มิลลิลิตร**

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 100 มิลลิลิตร มี Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> อยู่ 7.5 กรัม

ดังนั้น ต้องชั่ง Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> มา 7.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

#### 4. การเตรียมสารละลายวิเคราะห์ Flavonoid content

**เตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร**

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1 มิลลิลิตร มี Quercetin อยู่ 0.001 กรัม

สารละลาย 10 มิลลิลิตร มี Quercetin อยู่  $\frac{10 \times 0.001}{1} = 0.01$  กรัม

ดังนั้น ต้องชั่ง Quercetin มา 0.01 กรัม ปรับปริมาตรด้วย 99% ethanol 10 มิลลิลิตร

**เตรียมสารละลาย 5% NaNO<sub>2</sub> ปริมาตร 100 มิลลิลิตร**

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 100 มิลลิลิตร มี NaNO<sub>2</sub> อยู่ 5 กรัม

ดังนั้น ต้องชั่ง NaNO<sub>2</sub> มา 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

**เตรียมสารละลาย 10 % AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O ปริมาตร 20 มิลลิลิตร**

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 100 มิลลิลิตร มี AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 10 กรัม

สารละลาย 20 มิลลิลิตร มี AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O  $\frac{20 \text{ ml} \times 10 \text{ g}}{100 \text{ ml}} = 2$  กรัม

ดังนั้น ต้องชั่ง AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O มา 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 20 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย 1 โมลาร์ NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีการคำนวณ

$$\frac{g}{M.W.} = \frac{CV}{1000}$$

$$\frac{g}{40} = \frac{(1 M) \times 100 ml}{1000} = 4$$

ดังนั้น ต้องชั่ง NaOH มา 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

#### 4. การเตรียมสารละลายวิเคราะห์ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน  $FeSO_4$  ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1 มิลลิลิตร มี  $FeSO_4$  อยู่ 0.001 กรัม

สารละลาย 10 มิลลิลิตร มี  $FeSO_4$  อยู่  $\frac{10 \times 0.001}{1} = 0.01$  กรัม

ดังนั้น ต้องชั่ง  $FeSO_4$  มา 0.01 กรัม ปรับปริมาตรด้วย 99% ethanol 10 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย 300 มิลลิโมลาร์ Sodium acetate buffer pH 3.6 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

วิธีการคำนวณ

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A]}{[HA]}\right)$$

$$3.6 = pK_a + \log\left(\frac{[CH_3COONa]}{[CH_3COOH]}\right)$$

$$3.6 = 4.67 + \log\left(\frac{[CH_3COONa]}{[CH_3COOH]}\right)$$

$$-1.16 = \log\left(\frac{[CH_3COONa]}{[CH_3COOH]}\right)$$

$$10^{-1.16} = \left(\frac{[CH_3COONa]}{[CH_3COOH]}\right)$$

$$0.063[CH_3COOH] = [CH_3COONa] \dots \dots \dots (1)$$

$$[CH_3COONa + CH_3COOH] = 300 \text{ mM} \dots \dots \dots (2)$$

จากสมการที่ (1)+(2)

$$0.063[CH_3COOH] + [CH_3COOH] = 0.3 \text{ M}$$

$$1.069 [CH_3COONa] = 0.3 \text{ M}$$

$$[CH_3COOH] = 0.28 \text{ M}$$

$$[CH_3COONa] = 0.3 - 0.28 \text{ M}$$

$$[CH_3COONa] = 0.02 \text{ M}$$

การเตรียม 0.02 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$  pH 3.6 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

$$\frac{g}{M.W.} = \frac{CV}{1000}$$

$$\frac{g}{136.05} = \frac{(0.02 M) \times 250 \text{ ml}}{1000} = 0.6804$$

การเตรียม 0.02 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

$$C = \frac{10\%D}{M.W.}$$

$$= \frac{(10)(99.7)(1.049)}{60.05}$$

$$= 17.42 \text{ M}$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(17.42 \text{ M}) V_1 = (0.28 \text{ M}) (250 \text{ ml})$$

$$V_1 = 4.02 \text{ ml}$$

ดังนั้น ชั่ง  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0.6804 กรัม และปิเปต  $\text{CH}_3\text{COOH}$  4.02 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร ก่อนนำมาใช้งานควรปรับค่า pH

เตรียมสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ TPTZ ใน 40 มิลลิโมลาร์ HCL ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

$$\frac{g}{M.W.} = \frac{CV}{1000}$$

$$\frac{g}{312.33} = \frac{(10 \times 10^{-3} M) \times 10 \text{ ml}}{1000} = 0.0312 \text{ กรัม}$$

เตรียม 40 มิลลิโมลาร์ HCL

$$C = \frac{10\%D}{M.W.}$$

$$= \frac{(10)(37)(1.19)}{36.46} = 12.08 \text{ M}$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(12.08 \text{ M}) V_1 = (40 \times 10^{-3} \text{ M}) (10 \text{ ml})$$

$$V_1 = 0.033 \text{ ml}$$

ดังนั้น ชั่ง TPTZ 0.0312 กรัม ละลายใน HCl 0.033 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย 20 มิลลิโมลาร์  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

$$\frac{g}{M.W.} = \frac{CV}{1000}$$

$$\frac{g}{270.30} = \frac{(20 \times 10^{-3} M) \times 10 \text{ ml}}{1000} = 0.0541 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น ชั่ง  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0541 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

#### 5. การเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ 2,2-Diphenyl-1-1-Picryldrazyl (DPPH)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1 มิลลิลิตร มี Ascorbic acid 0.001 กรัม

$$\text{สารละลาย 10 มิลลิลิตร มี Ascorbic acid } \frac{10 \times 0.001}{1} = 0.01 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น ต้องชั่ง Ascorbic acid มา 0.01 กรัม ปรับปริมาตรด้วย 99% ethanol 10 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย 0.0634 มิลลิโมลาร์ DPPH ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

$$\frac{g}{M.W.} = \frac{CV}{1000}$$

$$\frac{g}{394.32} = \frac{(0.0634 \times 10^{-3} M) \times 50 \text{ ml}}{1000} = 0.0012 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น ชั่ง DPPH 0.0012 กรัม ปรับปริมาตรด้วย 95 % ethanol 50 มิลลิลิตร

#### 6. การเตรียมสารสำหรับด้านแบคทีเรีย

การเตรียมสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีการคำนวณ

สารละลาย 100 ml มี NaCl อยู่ 0.85 g

ดังนั้น ต้องชั่ง NaCl มา 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

### การเตรียมสารละลาย 1 mg/ml Ampicillin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

#### วิธีการคำนวณ

สารละลาย 1 ml มี Ampicillin 0.001 กรัม ถ้าต้องการความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1000 \mu\text{g/ml} (V_1) = 10 \mu\text{g/ml} (1000 \mu\text{L})$$

$$V_1 = 10 \mu\text{L}$$

ดังนั้น ชั่ง Ampicillin 0.001 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และปิเปตมา 10  $\mu\text{L}$  ปรับปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของ Ampicillin 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย Ampicillin กรองผ่าน syring filter ก่อนนำไปใช้งาน

### การเตรียมสารละลาย 1000 mg/L AgNPs ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

#### วิธีการคำนวณ

$$1000 \text{ มิลลิลิตร} \text{ ชั่ง AgNPs } 1000 \text{ มิลลิกรัม}$$

$$200 \text{ มิลลิลิตร} \text{ ชั่ง AgNPs } 0.2 \text{ มิลลิกรัม}$$

ดังนั้น ชั่ง AgNPs 0.2 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ DI 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป Sonicate เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อให้อนุภาคเกิดการกระจายตัวได้ดีขึ้น







ภาคผนวก ข

**ภาคผนวก ข การศึกษาผลของเวลาในการทำปฏิกิริยาและรูปแบบของการทดสอบสกัดต่อเปอร์เซ็นต์ของผลผลิตของ AgNPs**

**ตารางที่ 13** ผลของเวลาในการทำปฏิกิริยาต่อ % ผลผลิตของ AgNPs

เวลาในการ ทำปฏิกิริยา	น้ำหนักรวมของ AgNPs			ผลผลิตของ AgNPs		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
24 ชั่วโมง	0.0626	0.0653	0.072	18.4280	19.2228	21.1952
48 ชั่วโมง	0.0665	0.0812	0.0843	19.5761	23.9034	24.8160

**ตารางที่ 14** ผลของรูปแบบการทดสอบสกัด (ค่อยๆ เท และเทอย่างรวดเร็ว) ต่อ % ผลผลิตของ AgNPs

รูปแบบการ ทดสอบสกัด	น้ำหนักรวมของ AgNPs			ผลผลิตของ AgNPs		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
ค่อยๆ เท	0.0676	0.0723	0.0801	19.8999	21.2835	23.5796
เทอย่าง รวดเร็ว	0.0626	0.0653	0.072	18.4280	19.2228	21.1952

**การศึกษาผลของขนาดอนุภาคซิลเวอร์นาโนจากการวัดมือและใช้โปรแกรม ImageJ**

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ (%) Frequency ของช่วงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง AgNPs โดยมีการนำช่วงที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11-21 นาโนเมตร (วัดด้วยไม้บรรทัด) โดยจำนวนอนุภาคที่นับทั้งหมด คือ 436 อนุภาค คิดเป็น 100 %

ถ้าช่วงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11-21 นาโนเมตร นับได้ 63 อนุภาค คิดเป็น  $\frac{63 \times 100\%}{436} = 14\%$

ดังนั้นประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ AgNPs ที่ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางช่วง 11-21 นาโนเมตร คือ 14 %

ตารางที่ 15 % Frequency ของช่วงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาค โดยใช้วิธีจากการวัดด้วยไม้มบรทัด

ช่วงของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาค (nm)	จำนวน	% Frequency	Mean $\pm$ S.D.	Median $\pm$ S.D.
0-10	20	5	31.1 $\pm$ 12.5	31 $\pm$ 11.8
11-21	63	14		
22-32	96	22		
33-43	114	26		
44-54	55	13		
55-65	61	14		
66-76	19	4		
77-87	8	2		
จำนวนอนุภาคที่นับทั้งหมด	436			

ตารางที่ 16 % Frequency ของช่วงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาค โดยใช้ ImageJ

ช่วงของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาค (nm)	จำนวน	% Frequency	Mean $\pm$ S.D.	Median $\pm$ S.D.
0-10	1	0	32.1 $\pm$ 12.9	34.1 $\pm$ 12.6
11-21	37	12		
22-32	81	26		
33-43	84	27		
44-54	55	18		
55-65	35	11		
66-76	16	5		
77-87	2	1		
จำนวนอนุภาคที่นับทั้งหมด	311			



ภาคผนวก ค

**ภาคผนวก ค การศึกษาความเข้มข้นของ AgNPs ต่อการยับยั้งแบคทีเรียโดยพิจารณาจากค่าการ  
ดูดกลืนแสง, CFU/ml และ %ของการยับยั้งแบคทีเรีย**

**ตารางที่ 17 ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการเติม AgNPs ในอาหาร**

ความเข้มข้นของ AgNPs (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของแบคทีเรียแกรมบวก					
	<i>S. aureus</i>			<i>B. subtilis</i>		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
Control	0.145	0.160	0.143	0.205	0.233	0.218
30	0.143	0.17	0.147	0.193	0.197	0.235
50	0.188	0.166	0.165	0.242	0.191	0.238
100	0.168	0.122	0.082	0.469	0.402	0.442
200	0.059	0.106	0.075	0.448	0.412	0.532
300	0.002	0.000	0.001	0.547	0.655	0.633

**ตารางที่ 18 ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเติม AgNPs ในอาหาร**

ความเข้มข้นของ AgNPs (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของแบคทีเรียแกรมลบ					
	<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
Control	0.356	0.284	0.312	0.306	0.326	0.32
30	0.217	0.245	0.359	0.211	0.156	0.153
50	0.186	0.252	0.278	0.187	0.234	0.146
100	0.209	0.274	0.309	0.022	0.026	0.024
200	0.140	0.168	0.224	0.092	0.179	0.082
300	0.0190	0.099	0.248	0.044	0.119	0.060

ตารางที่ 19 ค่า CFU/ml ของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการเพาะกับ AgNPs

ความเข้มข้น ของ AgNPs (mg/L)	ค่า CFU/ml ของแบคทีเรียแกรมบวก					
	<i>S. aureus</i>			<i>B. subtilis</i>		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
Control	$1.63 \times 10^8$	$1.00 \times 10^9$	$5.33 \times 10^9$	$2.00 \times 10^7$	$4.00 \times 10^8$	$1.00 \times 10^9$
30	$1.73 \times 10^8$	$3.00 \times 10^8$	$9.33 \times 10^9$	$1.33 \times 10^8$	$6.33 \times 10^8$	$2.00 \times 10^9$
50	$5.66 \times 10^7$	$7.00 \times 10^8$	$5.00 \times 10^9$	$1.50 \times 10^8$	$2.33 \times 10^8$	$1.67 \times 10^9$
100	$1.33 \times 10^9$	$8.67 \times 10^9$	$4.33 \times 10^{10}$	$8.33 \times 10^8$	$2.33 \times 10^9$	$2.00 \times 10^{10}$
200	$8.30 \times 10^9$	$2.30 \times 10^{10}$	$1.33 \times 10^{11}$	$2.03 \times 10^9$	$2.67 \times 10^9$	$1.00 \times 10^{10}$
300	$6.73 \times 10^9$	$1.33 \times 10^9$	$1.00 \times 10^9$	$6.00 \times 10^8$	$2.00 \times 10^9$	$2.00 \times 10^{10}$

ตารางที่ 20 ค่า CFU/ml ของแบคทีเรียแกรมลบที่มีการเพาะเลี้ยงกับ AgNPs

ความ เข้มข้น AgNPs (mg/L)	ค่า CFU/ml ของแบคทีเรียแกรมลบ					
	<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
Control	$1.12 \times 10^{12}$	$1.30 \times 10^{12}$	$1.20 \times 10^{12}$	$1.67 \times 10^{11}$	$1.00 \times 10^{12}$	$3.00 \times 10^{13}$
30	$6.50 \times 10^{12}$	$5.00 \times 10^{11}$	$4.00 \times 10^{11}$	$1.29 \times 10^{12}$	$1.04 \times 10^{11}$	$1.30 \times 10^{12}$
50	$5.10 \times 10^{11}$	$3.50 \times 10^{11}$	$4.80 \times 10^{11}$	$7.60 \times 10^{11}$	$7.70 \times 10^{11}$	$9.50 \times 10^{11}$
100	$5.10 \times 10^{11}$	$3.50 \times 10^{11}$	$4.80 \times 10^{11}$	$1.17 \times 10^{11}$	$1.46 \times 10^{11}$	$1.38 \times 10^{11}$
200	$2.90 \times 10^{11}$	$2.20 \times 10^{11}$	$2.80 \times 10^{11}$	0	0	0
300	$3.30 \times 10^{11}$	$4.80 \times 10^{11}$	$3.60 \times 10^{11}$	0	0	0



ตารางที่ 21 % การยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบโดยเติม AgNPs ในอาหาร

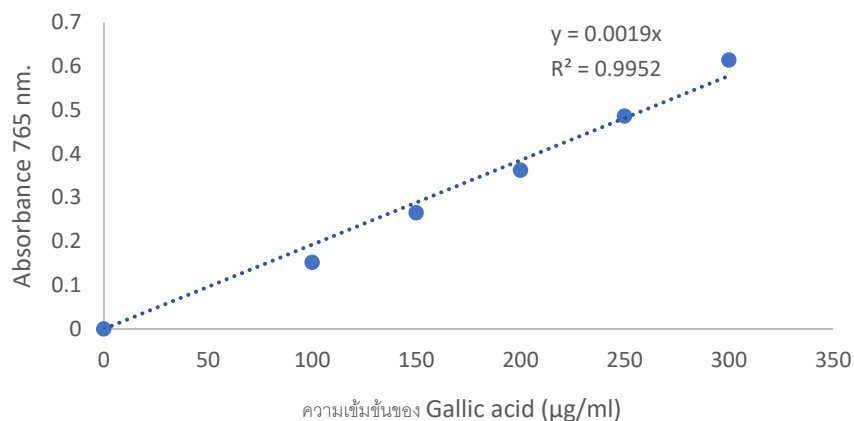
ความเข้มข้น AgNPs (mg/L)	% การยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ					
	<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
30	46.13	58.56	66.85	79.30	83.32	79.14
50	28.72	27.07	21.27	87.81	87.65	84.76
100	57.73	70.99	60.22	98.12	97.66	97.79
200	75.96	81.76	76.79	100.00	100.00	100.00
300	72.65	60.22	70.16	100.00	100.00	100.00

การศึกษาความเข้มข้นของ AgNPs ต่อการผลิตชีวมวลและสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์  
พฤษเคมีของโปรโตคอร์มกลัยไม์หายจัน

กราฟมาตรฐานของ Gallic acid (วิเคราะห์ฟีนอลิกทั้งหมด)

ตารางที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid กับค่าการ  
ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ Gallic acid (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0	0	0	0	0
100	0.152	0.154	0.15	0.152
150	0.265	0.268	0.263	0.265
200	0.387	0.34	0.362	0.363
250	0.455	0.512	0.492	0.486
300	0.616	0.597	0.63	0.614
350	0.834	0.935	0.768	0.846

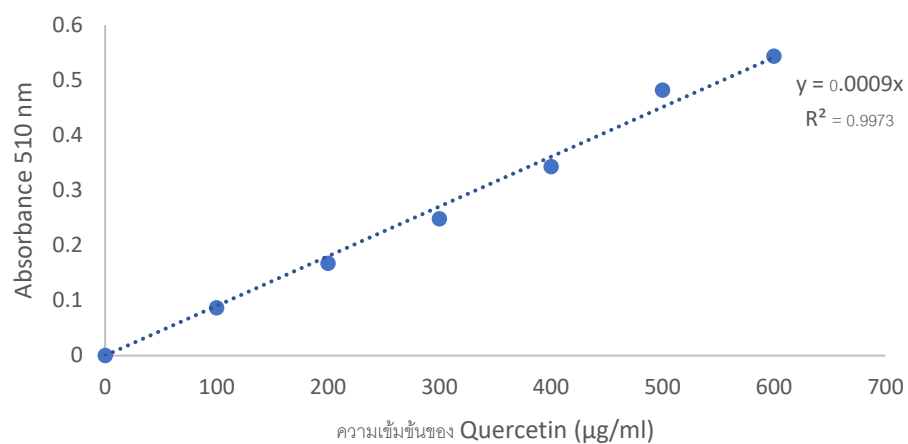


ภาพที่ 36 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Gallic acid

กราฟมาตรฐานของ Quercetin (วิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด)

ตารางที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Quercetin กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ Quercetin (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0	0	0	0	0
100	0.087	0.084	0.09	0.087
200	0.162	0.175	0.165	0.167
300	0.24	0.252	0.252	0.248
400	0.324	0.351	0.354	0.343
500	0.456	0.494	0.496	0.482
600	0.573	0.51	0.548	0.544

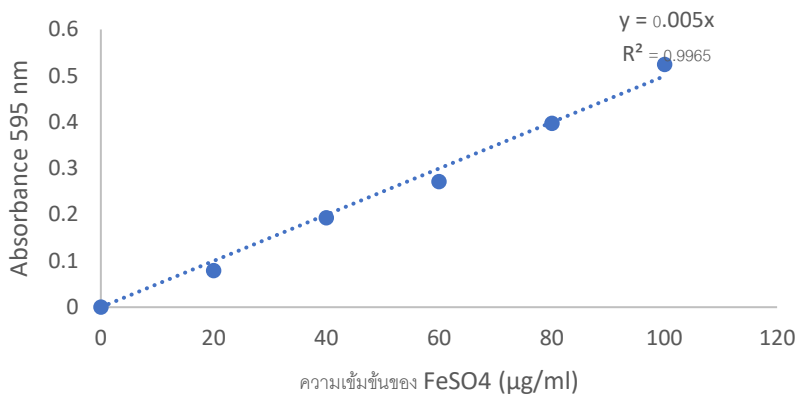


ภาพที่ 37 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Quercetin

กราฟมาตรฐานของ  $\text{FeSO}_4$  (วิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP)

ตารางที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน  $\text{FeSO}_4$  กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ Quercetin ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0	0	0	0	0
20	0.064	0.078	0.094	0.079
40	0.199	0.177	0.204	0.193
60	0.298	0.293	0.223	0.271
80	0.401	0.398	0.393	0.397
100	0.482	0.51	0.581	0.524

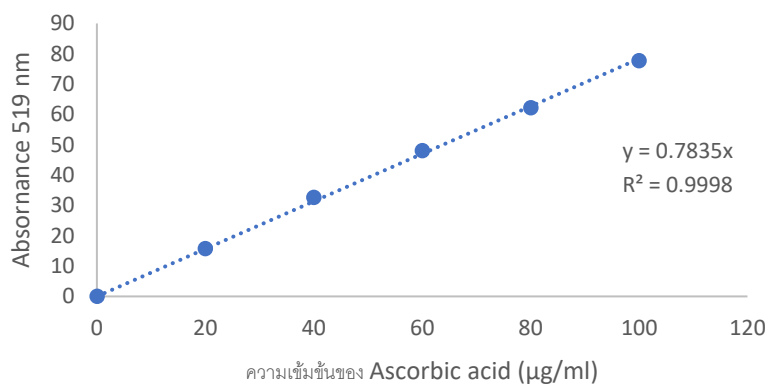


ภาพที่ 38 กราฟมาตรฐานของสารละลาย FeSO<sub>4</sub>

กราฟมาตรฐานของ Ascorbic acid (วิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH)

ตารางที่ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 519 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ Quercetin (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 519 นาโนเมตร			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0	0	0	0	0
20	0.4	0.471	0.449	0.440
40	0.344	0.367	0.345	0.352
60	0.28	0.272	0.263	0.272
80	0.169	0.226	0.198	0.198
100	0.105	0.098	0.146	0.116



ภาพที่ 39 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Ascorbic acid

ตารางที่ 26 สัดส่วนการเจริญเติบโตของน้ำหนักรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้หวายจีน (*D. officinale*) ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์โดยมีการเติมตัวกระตุ้น AgNPs

AgNPs (mg/L)	สัดส่วนการเจริญเติบโต (น้ำหนักสด)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	0.5411	0.5172	0.5291
25	0.9006	0.9711	0.9358
50	0.8193	0.9286	0.8740
75	0.7098	0.7422	0.7260
100	0.8079	0.8366	0.8222

AgNPs (mg/L)	สัดส่วนการเจริญเติบโต (น้ำหนักสด)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	เฉลี่ย
0	0.6471	0.5525	0.2584	0.3571	0.4238
1	0.5803	0.7025	0.6800	0.6634	0.6566
5	0.8163	0.8217	0.6748	0.8253	0.7485
10	1.0504	0.9895	0.5723	0.4915	0.7759
15	1.0555	1.1015	0.6000	0.8173	0.8936
20	0.6926	0.9752	0.6684	0.7183	0.7636
25	0.9202	0.9206	0.4853	0.9357	0.8155
30	0.9719	0.6270	0.4646	0.5795	0.6607

ตารางที่ 27 สัดส่วนการเจริญเติบโตของน้ำหนักแห้งของโปรโตคอร์มหายจีน (*D. officinale*)  
เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์โดยมีการเติมตัวกระตุ้น AgNPs

AgNPs (mg/L)	สัดส่วนการเจริญเติบโต (น้ำหนักแห้ง)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	3.3466	3.4034	3.3750
25	3.4223	3.4716	3.4470
50	3.1477	3.2860	3.2169
75	2.8958	2.8788	2.8873
100	2.5000	2.6894	2.5947

AgNPs (mg/L)	สัดส่วนการเจริญเติบโต (น้ำหนักแห้ง)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	เฉลี่ย
0	6.9048	7.5788	5.2271	3.6960	5.8516
1	7.3297	7.3223	6.7949	6.5897	7.0092
5	7.9524	5.3223	7.2198	6.2454	6.6850
10	7.8205	6.1795	6.3700	6.0549	6.6062
15	7.9670	7.6227	5.6593	6.0989	6.8370
20	5.8791	5.9084	6.4652	6.1062	6.0897
25	6.0549	5.8938	3.9597	5.9817	5.4725
30	5.5421	5.5128	3.8791	5.9890	5.2308



ตารางที่ 28 ความเข้มข้นของ AgNPs (0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อการผลิตสารประกอบฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

AgNPs (mg/L)	ฟีนอลิกทั้งหมด (mg/g)		ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg/g)	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
0	6.144	6.772	5.985	5.788
25	10.311	9.572	6.378	6.376
50	8.433	8.012	7.883	7.642
75	6.807	6.537	4.428	4.304
100	7.229	7.031	5.407	5.629
AgNPs (mg/L)	สารต้านอนุมูลอิสระ FRAP (mg/g)		สารต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% Inhibition)	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
0	23.088	21.034	33.49	32.71
25	35.439	34.880	55.43	55.12
50	25.672	26.993	54.96	53.57
75	23.738	23.107	50.47	48.91
100	28.442	27.568	53.41	54.03

ตารางที่ 29 ความเข้มข้นของ AgNPs (0-30 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อการผลิตผลิตสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์

AgNPs (mg/L)	ฟีนอลิกทั้งหมด (mg/g)			ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg/g)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0	5.086	5.566	5.675	5.173	6.516	5.392
1	8.328	8.831	9.054	6.568	5.742	6.589
5	7.640	8.659	8.310	3.398	2.961	2.902
10	9.076	9.236	9.554	6.927	7.935	7.617
15	8.969	9.297	9.516	8.860	9.338	8.901
20	7.223	7.867	8.163	7.953	7.594	8.089
25	7.586	8.106	7.677	6.015	6.166	5.756
30	4.370	4.402	4.386	2.948	2.678	2.432

ตารางที่ 30 ความเข้มข้นของ AgNPs (0-30 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

AgNPs (mg/L)	สารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) (mg/g)			สารต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% Inhibition)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0	13.697	14.516	14.516	36.97	35.44	34.29
1	24.941	26.059	27.805	46.36	47.32	45.98
5	20.776	22.116	22.317	31.23	34.10	32.57
10	25.146	23.886	24.018	64.75	55.56	53.83
15	21.260	23.243	24.542	45.21	47.89	47.51
20	16.760	18.677	18.863	47.13	47.32	46.17
25	19.530	19.192	18.119	45.21	44.83	46.74
30	10.884	12.129	12.250	35.25	40.23	37.74

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวสุวิมล เดชอรัญ
วัน เดือน ปี เกิด	25 เมษายน 2540
สถานที่เกิด	จังหวัดสุราษฎร์ธานี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2562 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	247/74 หมู่ที่ 4 ตำบลมะขามเตี้ย อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84000
ผลงานตีพิมพ์	<p>1. Suwimon Datarun, Kullanart Obsuwan, and Budsaraporn Ngampanya. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Pomelo Green Peel Extract. Oral presentation at Silpakorn International Conference on Total Art &amp; Science Conjunction with the 2nd International Conference on Engineering and Industrial Technology on 3-5 November 2021 in Nakhon Pathom, Proceeding.</p> <p>2. Suwimon Datarun, Kullanart Obsuwan, and Budsaraporn Ngampanya. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Pomelo Green Peel Extract and Application for Dendrobium officinale Protocorm-Like Bodies Culture. AIP Conference Proceedings XXX, XXX (2022) (Article in press)</p>