

การประเมินปริมาณฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดกากเมล็ดเทียนดำ (*Nigella sativa*)

สุธิดา เกิดเพาว์¹, เมธิญา กลกิจ², มุฮัมมัด นิยมเดช³, รุ่งทิวา ชิตทอง¹

และจันจิรา จรามรบุรพงศ์^{1*}

¹สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม

²สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม

³ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

*chanjirajara@webmail.npru.ac.th

บทคัดย่อ

เมล็ดเทียนดำถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมอาหารและยารักษาโรคมาเป็นเวลานานทั้งในรูปแบบผง น้ำมัน หรือสารสกัด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของกากเมล็ดเทียนดำซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงงานสกัดน้ำมันแบบสกัดเย็น กากเมล็ดเทียนดำถูกสกัดด้วยเครื่องชอกห์เลตโดยใช้เอทานอลและน้ำเป็นตัวทำละลาย สารสกัดได้รับการตรวจสอบหาปริมาณฟีนอลรวมด้วยรีเอเจนต์ Folin-Ciocalteu โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ($y = 0.0065x + 0.0489$, $R^2 = 0.9976$) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีการทดสอบสีของอะลูมิเนียมคลอไรด์โดยใช้เคอร์ซีตินเป็นสารมาตรฐาน ($y = 0.0013x + 0.1237$, $R^2 = 0.9988$) ประสิทธิภาพของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้รับการพิจารณาจากการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้รับการประเมินโดยวิธีการแพร่กระจายแบบ agar well ที่ความเข้มข้น 1,000 mg/mL พบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเอทานอลที่ได้คือ 7.96 ± 0.71 mg GAE/g DW และ 7.15 ± 2.75 mg QE/g DW ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสารสกัดน้ำ สารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.39 และ 1.68 mg/mL ตามลำดับ สารสกัดเหล่านี้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ทั้งหมดในช่วง 1.00 ± 0.00 ถึง 10.33 ± 0.58 mm ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากเมล็ดเทียนดำยังคงมีสารออกฤทธิ์ที่สามารถศึกษาต่อไปเพื่อนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์

คำสำคัญ: กากเมล็ดเทียนดำ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ต้านออกซิเดชัน ต้านแบคทีเรีย

Evaluation of Total Phenolic, Flavonoid Contents, Antioxidant Activities and Antibacterial Activities of *Nigella sativa* Seed Meal Extracts

Sutida Koedthawa¹, Maytiya Konkit², Muhammad Niyomdech³, Rungtiwa Chidthong¹ and Chanjira Jaramornburapong^{1*}

¹Program of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Nakhon Pathom Rajabhat University

²Program of Microbiology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Pathom Rajabhat University

³Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University

*chanjirajara@webmail.npru.ac.th

Abstract

Nigella sativa seed has been used as a food ingredient and a medicinal for a long time in powder, oil, or extract form. This research aimed to determine the total phenolic content, total flavonoid content, antioxidant activity, and antibacterial activity of *Nigella sativa* seed meal, a by-product of cold-pressed oil extraction plant. The seed meals were extracted by the Soxhlet apparatus using ethanol and aqueous as solvents. The extracts were investigated for total phenolic content with the Folin-Ciocalteu reagent using gallic acid as a standard ($y = 0.0065x + 0.0489$, $R^2 = 0.9976$). The total flavonoid content was determined by the aluminum chloride colorimetric assay using quercetin as a standard ($y = 0.0013x + 0.1237$, $R^2 = 0.9988$). The efficiency of an antioxidant activity was considered from the DPPH radical scavenging. The antibacterial activity was evaluated against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* by agar well diffusion method at 1,000 mg/mL. It was found that the TPC and TFC values of the ethanolic extract were 7.96 ± 0.71 mg GAE/g DW and 7.15 ± 2.75 mg QE/g DW, respectively, which were higher than an aqueous extract. The ethanolic and aqueous extracts also exhibited antioxidant activity with IC_{50} values of 1.39 and 1.68 mg/mL, respectively. These extracts were effective against all tested microorganisms in the range of 1.00 ± 0.00 to 10.33 ± 0.58 mm. The results showed that *Nigella sativa* seed meal still contains the active compounds that can be further studied for utilization.

Keywords: *Nigella sativa* seed meal, Phenolic, Flavonoid, Antioxidant, Antibacterial

1. บทนำ

เทียนดำ (*Nigella sativa*) หรือยี่หระดำ (black cumin) อยู่ในวงศ์ Ranunculaceae เทียนดำเป็นพืชพื้นเมืองที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบตะวันออกกลาง เช่น เลบานอนและซีเรีย ต่อมามีการกระจายพันธุ์ไปในประเทศอินเดียและทิเบต เป็นไม้ล้มลุกอายุปีเดียว ลำต้นตั้งตรง ความสูงของต้นประมาณ 30-60 เซนติเมตร มีขนใบเดี่ยว ดอกเดี่ยว ออกที่ปลายยอด หรือซอกใบ ดอกขนาดใหญ่ สีขาวหรือสีฟ้าอมม่วง ผลเป็นผลแห้งแตกได้ มีเมล็ดหลายเมล็ด เมล็ดรูปสามเหลี่ยมถึงห้าเหลี่ยม สีดำ เนื้อในสีขาว ขนาดกว้าง 1.4-1.8 มิลลิเมตร ยาว 2.5-3.0 มิลลิเมตร เมล็ดแก่แห้ง มีสีดำสนิท ผิวนอกขรุขระ ไม่มีขน

มีกลิ่นเล็กน้อย และค่อนข้างแข็ง หากใช้มีดที่เมสตี หรือนำเมสตีไปบด จะได้กลิ่นหอม ฉุน มีรสขาคีชม เผ็ด ร้อน คล้ายเครื่องเทศเมสตีมีรสเผ็ดขม สารสกัดเมสตีเทียนดำถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรเพื่อรักษาและป้องกันโรคต่างๆ มีสรรพคุณช่วยบรรเทาอาการไอ ขับเสมหะให้ลงสู่คูทวารหอบหืด เวียนศีรษะ ปวดศีรษะ หลดลมอักเสบ ไข้ ไข้หวัดใหญ่ ท้องเสีย กลากไขมันในเลือดผิดปกติ ขับลมในลำไส้ ช่วยย่อย แก้อาการท้องอืดท้องเฟ้อ แก้อาเจียน บำรุงโลหิต ขับน้ำนม ขับปัสสาวะ ขับระดู บิบบดลูก แก้อาการและขับพยาธิ เป็นต้น [1]

สารสกัดเมสตีเทียนดำประกอบด้วยโปรตีน 216 กรัม ไขมัน 406 กรัม เถ้า 45 กรัม เส้นใย 84 กรัม สารสกัดที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอิสระ 249 กรัม ความชื้น 38 กรัม แร่ธาตุหลัก 105 มิลลิกรัม แร่ธาตุรอง 18 มิลลิกรัม แร่ธาตุสังกะสี 60 มิลลิกรัม แร่ธาตุฟอสฟอรัส 527 มิลลิกรัม แร่ธาตุแคลเซียม 1,860 มิลลิกรัม วิตามินบี 15.4 มิลลิกรัม ไนอาซิน 57 มิลลิกรัม และกรดโฟลิก 160 กรัม ต่อกลีโกรัมเมสตีเทียนดำ [2] นอกจากนี้ยังมีสารสำคัญกลุ่มเทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน แอลคาลอยด์ และฟอสฟีนอลิก [3] โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมสตีเทียนดำ ได้แก่ thymoquinone, thymol, limonene, carvacrol, p-cymene, alpha-pinene, 4-terpineol, longifolene และ trans-anethole benzene [4-6] โดยมี thymoquinone เป็นสารสำคัญหลัก มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation สารสำคัญอื่นๆ ที่พบรองลงมา ได้แก่ trans-anethole, carvacrol, 4-terpineol ออกฤทธิ์ดีในการจับ superoxide anion นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มแอลคาลอยด์ คือ nigellidine, nigellimine และ nigellicine [7] สารสกัดเมสตีเทียนดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลถูกวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS พบกรดไขมันไม่อิ่มตัว ได้แก่ กรดไลโนเลอิก กรดเซอรอลิโนเลอิก กรดเซอรอลิพาลมิเตด และกรดโอเลอิก เป็นต้น [8] จากสารสำคัญที่พบเหล่านี้ส่งผลให้สารสกัดเมสตีเทียนดำมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านพยาธิใบไม้ในกระแสน้ำ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านไขมันในเลือดสูง ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ป้องกันเกี่ยวกับระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบทางเดินอาหาร ไต ตับ และระบบประสาท เป็นต้น [3]

จากงานวิจัยข้างต้นเกี่ยวกับสารสกัดเมสตีเทียนดำพบว่ามีความสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในงานวิจัยนี้จึงให้ความสำคัญกับสิ่งเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำมันเมสตีเทียนดำที่ได้จากสถานประกอบการภูมามารูม จังหวัดนครปฐม จึงนำกากเมสตีเทียนดำที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมมาศึกษาเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด ดังนั้นในงานวิจัยนี้ทำเพื่อศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดกากเมสตีเทียนดำที่เป็นของเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมสกัดน้ำมัน เพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง และทางการแพทย์ ต่อไป

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บกากเมสตีเทียนดำที่ได้หลังจากการสกัดน้ำมันด้วยวิธีบีบเย็น จากสถานประกอบการภูมามารูม ตำบลหนองงูเหลือม อำเภอมือง จังหวัดนครปฐม ปี 2566

2.2 การสกัดตัวอย่าง

นำกากเมสตีเทียนดำที่ได้มาอบด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ นำมาบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบดละเอียดแบบแห้ง นำผงกากเมสตีเทียนดำมาสกัดด้วยเครื่องชอกซ์เลต (Soxhlet extraction) ด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 1 : 10 (ผงพืช : ตัวทำละลาย) จากนั้นนำมารองโดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 และระเหยตัวทำละลายออกจากเครื่องระเหยแบบหมุนที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ซึ่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดหยาบ (%yield) จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดหยาบ (\%yield)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดพืชที่ได้} \times 100}{\text{น้ำหนักของผงพืชแห้งที่ใช้สกัด}}$$

2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมทำการทดสอบด้วยวิธี Folin ciocalteu colorimetric โดยดัดแปลงจาก Madaan et al. (2011) [9] ดังนี้

2.3.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

ชั่งกรดแกลลิก (gallic acid) 0.001 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 30, 25, 20, 15 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตร นำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96 well plate แล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 20% โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วเติม Folin Ciocalteu's reagent เข้มข้น 10% โดยปริมาตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader สร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

2.3.2 การหาค่าปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบ

ชั่งสารสกัดหยาบ 0.01 กรัม ละลายในเอทานอล 10 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายของสารสกัดหยาบปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96 well plate แล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 20% โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วเติม Folin Ciocalteu's reagent เข้มข้น 10% โดยปริมาตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักพืชแห้ง (ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยวิธี Aluminium chloride (AlCl_3) colorimetric ดัดแปลงจาก Chen et al. (2015) [10] ดังนี้

2.4.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานเคอร์ซีทีน

ชั่งสารเคอร์ซีทีน 0.01 กรัม ละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอล และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 500, 250, 125, 62.5 และ 31.2 มิลลิกรัม/ลิตร ปิเปตสารละลายเคอร์ซีทีนความเข้มข้นต่างๆ ลงใน 96-well plate ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) เข้มข้น 5% โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3) เข้มข้น 10% โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 120 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องอีก 5 นาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานเคอร์ซีทีน (ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

2.4.2 การหาค่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบ

ชั่งสารสกัดหยาบ 0.01 กรัม ละลายในเอทานอล 10 มิลลิลิตร ได้สารละลายตัวอย่างเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายสารสกัดหยาบลงใน 96-well plate ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) เข้มข้น 5% โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่

อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3) เข้มข้น 10% โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 120 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องอีก 5 นาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหยาบโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีตินในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมน้ำหนักพืชแห้ง (ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ทดสอบโดยดัดแปลงวิธีจาก Sahukari et al. (2015) [11] ดังนี้

2.5.1 การเตรียมสารละลาย DPPH

ชั่ง DPPH 0.008 กรัม ละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอล และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 0.2 มิลลิโมลาร์ DPPH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์

ชั่งโทรลอกซ์ 0.002 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 0.0625, 0.031, 0.015 และ 0.008 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย

2.5.3 การเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบ

ชั่งสารสกัดหยาบ 0.02 กรัม ละลายด้วยเอทานอล และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายของสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางให้มีความเข้มข้น เป็น 1.0, 0.50, 0.25, 0.125, 0.063, 0.032 และ 0.015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.5.4 การหาความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ด้วยวิธี DPPH

ปิเปตสารละลาย 0.2 มิลลิโมลาร์ DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate แล้วเติมสารละลายของกรดแอสคอร์บิกหรือสารสกัดหยาบปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทุกหลุมที่มีสารละลาย DPPH เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยปราศจากแสงเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูล DPPH (%DPPH radical scavenging) จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูล DPPH} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

(%DPPH radical scavenging)

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH กับสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกหรือสารสกัดหยาบ

นำค่าเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูล DPPH (%DPPH radical scavenging) มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (แกน Y) และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ หรือสารละลายของสารสกัดหยาบแต่ละความเข้มข้น (แกน X) แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์หรือสารสกัดหยาบที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) จากกราฟที่ได้

2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นโดยวิธี agar well diffusion กับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* ทดสอบโดยดัดแปลงวิธีจาก Rani et al. (2021) [12] ดังนี้

2.6.1 การเตรียม Nutrient broth solution

ชั่ง Nutrient broth 13 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนได้สารละลายใส เทแบ่งใส่หลอดทดลองประมาณครึ่งหนึ่งของหลอด จากนั้นปิดจุก แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.6.2 การเตรียม Nutrient agar

ชั่ง Nutrient broth 8.00 กรัม และ agar 15.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนได้สารละลายใส แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทใส่ลงเพลทปิดฝา ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนเก็บไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.6.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

นำห้วงเชื้อเชื้อเฝ้าไฟจนร้อนแดง ใช้ห้วงเชื้อเชื้อใส่ลงใน Nutrient broth solution นำเชื้อที่ได้ไปใส่เครื่องบ่มแบบเหวี่ยง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำมา spread บน Media ใหม่

2.6.4 การทดสอบเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus* *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ที่เตรียมได้จากข้อ 2.6.3 มาทำการเกลี่ยให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ด้วยไม้พินสาลีที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นเจาะหลุมด้วยทูปปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เติมน้ำสกัดหยาบตัวอย่างความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบโซนยับยั้งโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง รายงานค่าในหน่วยมิลลิเมตร โดยใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลบวก และใช้ 95% เอทานอล และน้ำเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลลบ (ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ลักษณะและเปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดหยาบกากเหียนดำที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล และน้ำ ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย มีผลการทดลองดังนี้

3.1 ลักษณะและเปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดหยาบกากเหียนดำ

การสกัดกากเหียนดำที่ได้จากสถานประกอบการภูมิรุ่ม ด้วยเครื่องซอกซ์เลต (Soxhlet extraction) โดยใช้ตัวทำละลาย 95% เอทานอล และน้ำ พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้มีลักษณะคล้ายกัน และมีปริมาณผลได้ที่ใกล้เคียงกัน แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 1

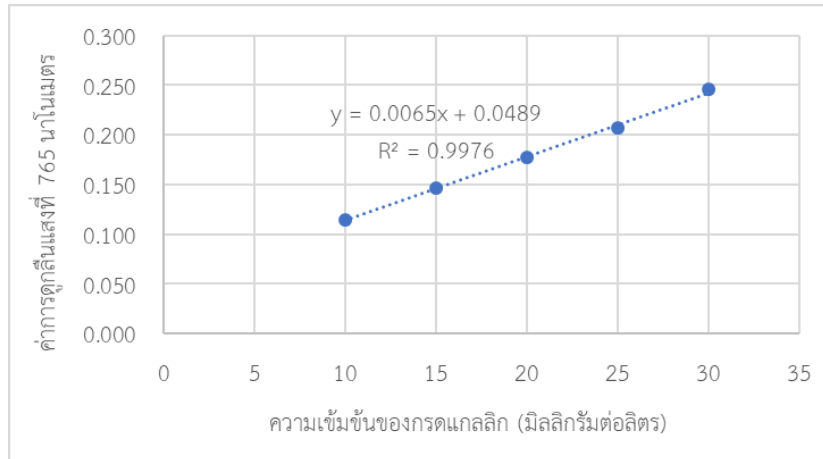
ตารางที่ 1 ลักษณะและเปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดหยาบกากเหียนดำ

ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	สารสกัดหยาบ		
	ลักษณะสารสกัดหยาบที่ได้	น้ำหนักที่ได้ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ผลได้ (%)
95% เอทานอล	ของเหลวสีน้ำตาล	4.60	22.95
น้ำ	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม	4.43	22.03

จากตารางที่ 1 พบว่าตัวทำละลาย 95% เอทานอลให้ปริมาณสารสกัดหยาบเท่ากับ 22.95% ซึ่งมากกว่าตัวทำละลายน้ำที่มีค่าเท่ากับ 22.03% เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วมีค่าที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งตัวทำละลายทั้งสองชนิดนี้เป็นตัวทำละลายที่มีขี้ แต่ตัวทำละลาย 95% เอทานอล เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถดึงสารประกอบอินทรีย์ที่มีอยู่ในสารสกัดได้มากกว่า จึงทำให้มีค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ที่มากกว่าตัวทำละลายน้ำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Singh et al. [8] ที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอล เอทิลอะซิเตท และเฮกเซนซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขี้แตกต่างกันมาสกัดเมล็ดเทียนดำ พบว่า การใช้ตัวทำละลายเอทานอลให้ปริมาณของสารสกัดและองค์ประกอบของสารสกัดมากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น จากงานวิจัยของ Singh et al. [8] และ Sirinet Pruethong [13] พบว่าสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบหลักที่พบในสารสกัดเทียนดำที่ ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS ได้แก่ Linoleic acid, Glyceryl linoleate, Linoleic acid, Ethyl ester และ Thymoquinone เป็นต้น

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม

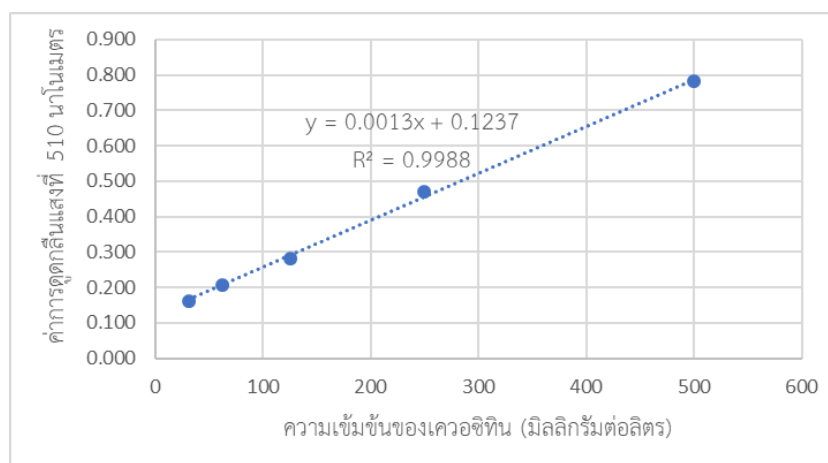
ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากเทียนดำที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล และน้ำโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ($y = 0.0065x + 0.0489$, $R^2 = 0.9976$) ดังภาพที่ 1 พบว่าสารสกัดหยาบของ 95% เอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมเฉลี่ยเท่ากับ 7.96 ± 0.71 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 กรัม ซึ่งมีปริมาณมากกว่าสารสกัดหยาบของน้ำที่มีค่าเท่ากับ 7.22 ± 0.34 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 กรัม แสดงดังตารางที่ 2 ซึ่งปริมาณฟีนอลิกที่พบดังกล่าวนี้มีผลจากการเลือกใช้ตัวทำละลายที่พบว่าตัวทำละลาย 95% เอทานอล สามารถสกัดสารอินทรีย์ที่เป็นสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิกออกมาได้มากกว่าน้ำ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Singh et al. [8] ที่นำเมล็ดเทียนดำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ด้วยเครื่องซอกซ์เลต พบว่าตัวทำละลายเอทานอลมีค่ามากที่สุด (10.88 ± 0.9 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 กรัม) เมื่อเทียบกับเอทิลอะซิเตท (9.68 ± 0.06 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 กรัม) และเฮกเซน (8.33 ± 0.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 กรัม) และเมื่อเทียบกับงานวิจัยนี้พบว่ามีความปริมาณฟีนอลิกรวมที่สูงกว่า เนื่องจากสารสำคัญบางชนิดอาจถูกสกัดออกไปอยู่ในรูปของน้ำมันก่อนหน้านี้แล้ว นอกจากนี้ยังพบว่าการเลือกใช้ตัวทำละลายและเทคนิคการสกัดก็อาจส่งผลต่อปริมาณฟีนอลิกรวมที่มีการศึกษาในงานวิจัยของ Abdelkrim Gueffai et al. [14] ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 60% เอทานอลโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์ (Ultrasound-assisted extraction; UAE) พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 35.6 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 กรัม ซึ่งมากกว่าเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอล ด้วยการแช่หมัก ที่มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 20.9 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 กรัม เมื่อเทียบกับงานวิจัยนี้ที่สกัดด้วยเครื่องซอกซ์เลตซึ่งมีการให้ความร้อนในการสกัด อาจจะทำให้สารสำคัญสลายตัวได้เช่นกัน จึงทำให้มีปริมาณฟีนอลิกรวมที่น้อยกว่า



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

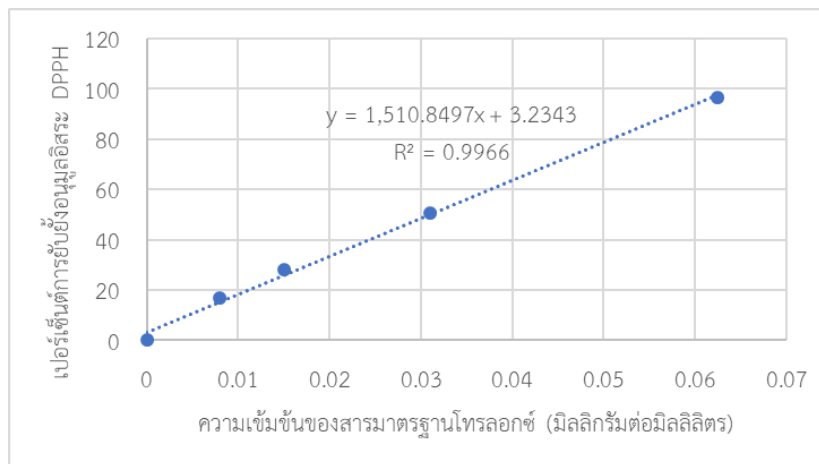
ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาดจากเทียนดำที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล และน้ำโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเคอซีทิน ($y = 0.0013x + 0.1237$, $R^2 = 0.9988$) ดังภาพที่ 2 พบว่าสารสกัดหยาดของ 95% เอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเฉลี่ยเท่ากับ 7.15 ± 2.75 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 กรัม ซึ่งมีปริมาณมากกว่าสารสกัดหยาดของน้ำที่มีค่าเท่ากับ 3.98 ± 1.07 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 กรัม แสดงดังตารางที่ 2 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mohammed Dalli et al. [15] ที่ศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาดเมล็ดเทียนดำที่สกัดด้วยเครื่องชกหั่นเล็ดโดยสกัดส่วนไขมันออกก่อนโดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน จากนั้นนำมาสกัดแบบต่อเนื่องด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน เอทานอล เมทานอล และน้ำ ตามลำดับ ซึ่งอาศัยคุณสมบัติความมีขั้วของตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบว่าสารสกัดหยาดเอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุดเท่ากับ 39.82 ± 1.25 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 มิลลิกรัม รองลงมาเป็นตัวทำละลายเมทานอล (18.4 ± 0.44) ไดคลอโรมีเทน (16.4 ± 1.39) คลอโรฟอร์ม (14.11 ± 0.99) และน้ำ (10.11 ± 0.33) ตามลำดับ ซึ่งสามารถระบุได้ว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารสำคัญกลุ่มฟลาโวนอยด์ของเทียนดำ คือ เอทานอล



ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานเคอซีทิน

3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากเหียนดำที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล และน้ำ พบว่ามีค่าความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดเหียนดำที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 1.39 และ 1.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 2 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานโพลอซที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ($y = 1,510.8497x + 3.2343$, $R^2 = 0.9966$) ดังภาพที่ 3 ซึ่งสอดคล้องกับสารสกัดเหียนดำ 95% เอทานอลที่มีปริมาณของสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากกว่าสารสกัดเหียนดำน้ำ จากงานวิจัยของ Singh et al. [8] พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงที่สุดถึง 89.75% เมื่อเทียบกับสารสกัดเหียนดำเอทานอลและเฮกเซนที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุดอยู่ในระดับปานกลาง และจากงานวิจัยของ Abdelkrim Gueffai et al. [14] พบว่าสารสกัดเหียนดำ 60% เอทานอลที่สกัดโดยใช้ คลีนอัลตราซาวด์ พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอลด้วยการแช่หมักที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ ตัวทำละลาย 95% เอทานอล และน้ำ ซึ่งมีค่า IC_{50} ที่ดีกว่าสารสกัดเหียนดำ 50% เอทานอลที่สกัดด้วยการแช่หมัก



ภาพที่ 3 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐานโพลอซ

ตารางที่ 2 ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดเหียนดำจากเหียนดำ

สารที่วิเคราะห์	ปริมาณฟีนอลิกรวม (มิลลิกรัมสมมูลของ กรดแกลลิกต่อน้ำหนัก พืชแห้ง 1 กรัม)	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (มิลลิกรัมสมมูลของ เคอซีทินต่อน้ำหนัก พืชแห้ง 1 กรัม)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH (IC_{50}) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
สารสกัดเหียนดำ 95% เอทานอล	7.96 ± 0.71	7.15 ± 2.75	1.39
สารสกัดเหียนดำน้ำ	7.22 ± 0.34	3.98 ± 1.07	1.68
สารมาตรฐานโพลอซ	-	-	0.03

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus* *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ของสารสกัดเหียนดำ 95% เอทานอลและสารสกัดเหียนดำน้ำของจากเหียนดำที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม

ต่อมิลลิเมตร แสดงดังตารางที่ 3 พบว่าสารสกัดทั้งสองนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* โดยมีบริเวณยับยั้งมากที่สุดเท่ากับ 10.33 ± 0.58 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ของสารสกัดหยาบ 95% เอทานอล เมื่อเปรียบเทียบกับจะพบว่าสารสกัดหยบน้ำจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ได้ในบริเวณที่กว้างกว่าสารสกัดหยาบ 95% เอทานอล เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดมีลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบที่ต่างกันจึงทำให้ความสามารถในการผ่านของตัวทำละลายแตกต่างกัน จากงานวิจัยของ Singh et al. [8] ที่ทำการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยบเอทิลอะซิเตทของเทียนดำที่ความเข้มข้น 1,000 ppm มีบริเวณยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ได้มากที่สุด มีค่าเท่ากับ 22.3 ± 0.8 และ 17.7 ± 2.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ และรองลงมาเป็นสารสกัดหยบเอทานอล มีค่าเท่ากับ 16.4 ± 0.81 และ 15.6 ± 0.36 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 3 บริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดหยบกากเทียนดำ

สารที่วิเคราะห์	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
สารสกัดหยบ 95% เอทานอล	10.33 ± 0.58	2.00 ± 1.00	1.00
สารสกัดหยบน้ำ	10.00	5.00	5.33 ± 0.58

B. cereus = *Bacillus cereus*, *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*, *E. coli* = *Escherichia coli*.

4. สรุปผลการวิจัย

สารสกัดหยบ 95% เอทานอลของกากเมล็ดเทียนดำที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่องซอกท์เลตมีปริมาณฟีนอลิกรวมที่ทดสอบด้วยรีเอเจนต์ Folin-Ciocalteu มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.96 ± 0.71 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 กรัม โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน และมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่ทดสอบด้วยอะลูมิเนียมคลอไรด์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.15 ± 2.75 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 กรัม โดยใช้เคอร์ซีตินเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมที่มากกว่าสารสกัดหยบของน้ำ สารสกัดหยบเอทานอลและสารสกัดหยบน้ำยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.39 และ 1.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ สารสกัดเหล่านี้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ทั้งหมดในช่วง 1.00 ถึง 10.33 ± 0.58 มิลลิเมตร จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากากเทียนดำที่เป็นผลพลอยได้จากโรงงานสกัดน้ำมันแบบสกัดเย็นยังมีคุณสมบัติที่สามารถนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ได้อีก

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยโครงการวิจัยบูรณาการนักศึกษาและอาจารย์เพื่อการพัฒนาท้องถิ่นและความเป็นเลิศทางวิชาการ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2567 ของมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม (RS_67_01) และได้รับความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือจากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร และสาขาวิชาเคมี สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ทำให้งานวิจัยนี้สามารถดำเนินไปได้ด้วยดี



6. เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] Faculty of Pharmacy, Ubon Ratchathani University. (Year not shown). Herbal medicine database, Faculty of Pharmacy, Ubon Ratchathani University. Retrieved on January 5, 2024, via website. <https://apps.phar.ubu.ac.th/thaicrudedrug/main.php?action=viewpage&pid=68>
- [2] Kesen, S. (2021). Composition and Functionality of *Nigella sativa* Seed Extracts. In M. Fawzy Ramadan (Ed.), *Black cumin (Nigella sativa) seeds: Chemistry, Technology, Functionality, and Applications* Springer International Publishing, 481-499.
- [3] Kooti, W., Hasanzadeh-Noohi, Z., Sharafi-Ahvazi, N., Asadi-Samani, M., & Ashtary-Larky, D. (2016). Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (*Nigella sativa*). *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(10), 732-745.
- [4] Gharby, S., Harhar, H., Guillaume, D., Roudani, A., Boulbaroud, S., Ibrahimi, M., Ahmad, M., Sultana, S., Hadda, T. B., Chafchaoui-Moussaoui, I., & Charrouf, Z. (2015). Chemical investigation of *Nigella sativa* L. seed oil produced in Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14(2), 172-177.
- [5] Randhawa, M. A., & Alghamdi, M. S. (2011). Anticancer activity of *Nigella sativa* (black seed) - a review. *The American Journal of Chinese medicine*, 39(6), 1075-1091.
- [6] Toma, C. C., Simu, G., Hanganu, D., Olah, N.-K., Vata, F., Hammami, C., & Hammami, M. (2010). Chemical composition of the Tunisian *Nigella sativa*. note II. Profile on fatty oil. *Farmacia*, 58, 458-464.
- [7] Gali-Muhtasib, H., El-Najjar, N., & Schneider-Stock, R. (2006) The medicinal potential of black seed (*Nigella sativa*) and its components. *Lead Molecules from Natural Products: discovery and new trends*, 2, 133-153.
- [8] Singh, S., Das, S. S., Singh, G., Schuff, C., de Lampasona, M. P., & Catalán, C. A. (2014). Composition, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and oleoresins obtained from black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). *BioMed research international*, 2014, 1-10.
- [9] Madaan, R., Bansal, G., Kumar, S., & Sharma, A. (2011). Estimation of total phenols and flavonoids in extracts of *Actaea spicata* roots and antioxidant activity studies. *Indian Journal of Pharmaceutical sciences*, 73(6), 666-669.
- [10] Chen, G.-L., Chen, S.-G., Xie, Y.-Q., Chen, F., Zhao, Y.-Y., Luo, C.-X., & Gao, Y.-Q. (2015). Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flowers subjected to *in vitro* digestion. *Journal of Functional Foods*, 17, 243-259.
- [11] Sahukari, R., Bhasha, S., Singamala, H. P., Ganjikunta, V. S. & Kesireddy, S. R. (2015). Assessment of potential antioxidant activity of polyphenolic fraction separated from *Acalypha Indica* leaves: An *In vitro* approach. *International Journal of Pharma Research & Review*, 4(8), 77-82.
- [12] Shijila Rani, A. S., Babu, S., Anbukumaran, A., Veeramani, S., Ambikapathy, V., Gomathi, S., & Senthilkumar, G. (2021). Chapter 21 - Prospective Approaches of *Pseudonocardia alaniniphila* Hydrobionts for *Litopenaeus vannamei*. In D. Dhanasekaran & A. Sankaranarayanan (Eds.), *Advances in Probiotics* (pp. 327-348). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822909-5.00021-6>
- [13] Sirinet Pruethong. (2019). Antimicrobial activity of *Nigella sativa* Linn. seed extract. [Master of Science Thesis in Cosmetic Science]. Mae Fah Luang University.



- [14] Gueffai, A. , Gonzalez- Serrano, D.J. , Christodoulou, M.C. , Orellana-Palacios, J.C. , Ortega, M.L.S. , Ouldmoumna, A., Kiari, F.Z., Ioannou, G.D., Kapnissi-Christodoulou, C.P., Moreno, A., Hadidi, M. (2022). Phenolics from Defatted Black Cumin Seeds (*Nigella sativa* L.): Ultrasound-Assisted Extraction Optimization, Comparison, and Antioxidant Activity. *Biomolecules*, 12, 1311.
- [15] Mohammed, D., Salah-eddine, A., Kandsi, F., & Gseyra, N. (2021). Evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of different extracts of *Nigella sativa* L. seeds, and the quantification of their bioactive compounds, *Materials Today: Proceedings*. 45, 7259-7263