ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบของไลเคน *Parmotrema gardneri* (C.W.Dodge) Sérus

Antioxidant Activity, Total Phenolic Content and Total Flavonoid Content of Lichen *Parmotrema gardneri* (C.W.Dodge) Sérus Crude Extract

อารีรัตน์ ใสส่อง[1,2] และ ขวัญเรือน นาคสุวรรณ์กุล[1,2*]

Areerat Saisong[1,2] and Khwanyuruan Naksuwankul[1,2*]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

[2]หน่วยวิจัยเห็ดและไลเคนส์เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University

[2]Research Unit of Mushroom and Lichens for Sustainable Utilization, Mahasarakham University

*E-mail: khwanruan.p@msu.ac.th

Received: Sep 05, 2022

Revised: Nov 08, 2022

Accepted: Nov 11, 2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของไลเคน *Parmotrema gardneri* (C.W.Dodge) Sérus ซึ่งสกัดโดยการแช่ในตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอลร้อยละ 95 เอทิลอะซิเตท และอะซิโตน และโดยการต้มในน้ำ การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric และการวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ของสารสกัดใช้วิธี aluminium chloride colorimetric ส่วนการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใช้ 3 วิธี คือ Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay), 2,2′-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) assay (ABTS assay) และ 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate assay (DPPH assay) การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารสกัดหยาบของไลเคนที่สกัดด้วยอะซิโตนมีปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดเท่ากับ 199.05±0.54 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และ 170.60±0.88 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์ซิตินต่อกรัมของสารสกัดตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดหยาบของไลเคนด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.85±0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.97±0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และด้วยวิธี FRAP assay ได้ค่า FRAP value เท่ากับ 4411.49±24.09 มิลลิกรัมของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของสารสกัด การวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สันระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของไลเคนพบว่าปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมีความสัมพันธ์แปรผันตรงกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP assay ในขณะที่ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมีความสัมพันธ์แปรผกผันกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS assay

คำสำคัญ: ไลเคน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

Abstract

This research aimed to study total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and antioxidant activity of crude extracts of lichen *Parmotrema gardneri* (C.W.Dodge) Sérus extracted by maceration in 3 solvents including 95% ethanol, ethyl acetate, and acetone and by decoction. Total phenolic contents of the extracts were analyzed by Folin-Ciocalteu colorimetric method and Total flavonoid contents of the extracts were analyzed by aluminium chloride colorimetric method. For the antioxidant activity analysis of the extracts, 3

methods including Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay), 2,2′-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) assay (ABTS assay) and 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate assay (DPPH assay) were used. The analysis of bioactive compounds revealed that the crude acetone extract of lichen had the highest TPC and TFC which were 199.05±0.54 mg gallic acid equivalent/g extract and 170.60±0.88 mg quercetin equivalent/g extract, respectively. The analysis of antioxidant activity revealed that the crude 95% ethanol extract of lichen had highest antioxidant activity. By using DPPH and ABTS assays, its IC_{50} values were 0.85±0.08 mg/mL and 0.97±0.00 mg/mL, respectively and by FRAP assay, its FRAP value was 4411.49±24.09 mg $FeSO_4$/g extract. Pearson correlation analysis between bioactive compounds contents and antioxidant activity of the crude lichen extracts demonstrated that a positive correlation existed between contents of bioactive compounds (TPC and TFC) and antioxidant activity analyzed by FRAP assay while a negative correlation was found between TFC and antioxidant activity analyzed by ABTS assay.

Keywords: Lichen, Antioxidant activity, Total phenolic content, Total flavonoid content

1. บทนำ

ไลเคน (Lichen) เป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกันระหว่างรา (Fungi) และสาหร่าย (Algae) หรือไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) ไลเคนมีประโยชน์หลายด้าน ได้แก่ ใช้เป็นดัชนีชี้วัดสภาพอากาศ ใช้เป็นยารักษาโรค ใช้เป็นอาหาร ใช้เป็นสีย้อม ใช้ผสมน้ำหอม ใช้ตรวจอายุวัตถุโบราณ เป็นต้น [1] นอกจากนี้ยังใช้สารที่ไลเคนผลิตไปยับยั้งจุลชีพได้อีกด้วยสารที่ไลเคนสร้าง เรียกว่า สารไลเคน หรือสารทุติยภูมิ (Lichen substance or secondary metabolite) สารไลเคนนี้มีประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา รายงานตีพิมพ์ครั้งแรกในปีค.ศ. 1944 ค้นพบสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เชื้อก่อโรคจากไลเคน โดยผู้วิจัยรายงานว่าพบสารไลเคนทั้งหมด 27 ชนิด จากไลเคน 42 ชนิด โดยศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดจากไลเคนยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Proteus vulgaris* และ *Alcaligenes faecalis* แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* ได้ [2] และไลเคนส่วนใหญ่สามารถผลิตสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกหลายตัวมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน (Antioxidation) โดยสารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ (Free radicals) และไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน นอกจากนั้นสารประกอบฟีนอลิกยังใช้เพื่อการถนอมอาหารโดยใช้เป็นสารกันหืนได้อีกด้วย [3]

ไลเคนชนิด *Parmotrema gardneri* (C.W.Dodge) Sérus เป็นไลเคนกลุ่มโฟลิโอส (Foliose) พบซอรีเดีย (Soridia) และซีเลีย (Cilia) บริเวณขอบ ชั้นเมดัลล่า (Medulla) ที่เป็นกลุ่มเส้นใยของราพบกรดโพรโตเซทราริก (Protocetaric acid) และกรดแอทราโนริน (Atranorin) เป็นสารทุติยภูมิหลัก และเป็นไลเคนกลุ่มที่เจริญเติบโตบนเปลือกไม้ (Corticolous) และบนหิน (Saxicolous) มีโลบ (Lobe) กว้างบางครั้งเมื่อเจริญพัฒนาเต็มที่มีซิเลียสั้น และพบแอสโคสปอร์ขนาด 16-26 x 8-14 ไมโครเมตร พบอะโพธีเชีย (Apothecia) จำนวนมาก มีหน้าจานสีดำ เมื่อหยดสารโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide) บนชั้นเมดัลล่าแล้วเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน [4] (Figure 1)

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ของสารสกัดหยาบของไลเคน *Parmotrema gardneri* (C.W.Dodge) Sérus ซึ่งสกัดโดยการแช่ในตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอลร้อยละ 95 (95% Ethanol) เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) และอะซิโตน (Acetone) และโดยการต้มในน้ำ โดยการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric และการวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ใช้วิธี Aluminium chloride colorimetric ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี 3 วิธี คือ Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay), 2,2′-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) assay (ABTS assay) และ 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate assay (DPPH assay) นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดไลเคน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน และเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์จากไลเคนในอนาคต

Figure 1 Foliose lichen (*Parmotrema gardneri*)

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. สารเคมี

สารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ได้จาก Sigma-Aldrich, Germany; สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ได้จาก Sigma-Aldrich, Germany; สารมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) ได้จาก Sigma-Aldrich, Switzerland; สารมาตรฐานเควอร์ซิติน (Quercetin) ได้จาก Sigma-Aldrich, India; สารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต (Ferrous sulfate : $FeSO_4$); สารละลาย Folin-Ciocalteu ได้จาก Merck, Germany; สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate : $NaCO_3$); สารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride : $AlCl_3$); ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide : DMSO); 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) ได้จาก Sigma-Aldrich, Germany; เฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric chloride : $FeCl_2$) และ 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) ได้จาก Sigma-Aldrich, Switzerland

2.2. ตัวอย่างไลเคนและการเตรียมสารสกัดจากไลเคน

ตัวอย่างไลเคน *P. gardneri* เก็บได้จากป่าธรรมชาติบนหิน จากป่าชุมชนบ้านหนองสูง อำเภอหนองสูง จังหวัดมุกดาหาร นำตัวอย่างไลเคนมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โครงสร้างภายใน และสารไลเคนเพื่อระบุชนิดของไลเคนที่ถูกต้อง [2], [5], [6] และเก็บรักษาตัวอย่างไลเคนเป็นตัวอย่างอ้างอิงในพิพิธภัณฑ์เห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จากนั้นนำตัวอย่างไลเคนไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้ตัวอย่างแห้ง นำตัวอย่างไลเคนมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสกับตัวทำละลาย ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด โดยทำการสกัด 2 วิธี คือ 1) การแช่ (Maceration) ในตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอลร้อยละ 95 (95% Ethanol) เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) และอะซิโตน (Acetone) โดยชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ขวดสกัดที่มีตัวทำละลาย 150 มิลลิลิตร แช่ตัวอย่างเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ใส่ขวดดูแรน (Duran tube) ทำซ้ำ 3 ครั้ง 2) การต้มในน้ำ (Decoction) โดยนำตัวอย่าง 10 กรัม ไปต้มในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ใส่ขวดดูแรน ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้จากทั้งสองวิธีไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator (รุ่น Hei-VAP Advantage ยี่ห้อ Heidolph) จากนั้นนำสารสกัดไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dry ได้สารสกัดเป็นผง ชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ในถุงปิดสนิทไว้ในตู้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ขั้นตอนต่อไป

2.3. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content: TPC) ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Dunkhunthod and Sittisart [7]

การสร้างกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Standard curve of gallic acid) ทำโดย นำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.005, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025, และ 0.030 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร

1 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocaltue phenol reagent ที่เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกันตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (OD 760 nm) ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย นำค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกมาเขียนกราฟมาตรฐานเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบของไลเคนต่อ

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบของไลเคนทำโดยเตรียมสารละลายตัวอย่างไลเคนความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารละลายมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.01, 0.02 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไลเคนที่เตรียมไว้มา 1 มิลลิลิตร มาทำตามขั้นตอนดังที่กล่าวมาข้างต้นเหมือนที่ทำกับสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย ใช้วิธีการนี้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดไลเคนที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ

ปริมาณฟีนอลิกรวมถูกรายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mg of gallic equivalent/g of extract หรือ mg GAE/g extract)

2.4. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content: TFC) ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Yayinie et al. [8]

การสร้างกราฟมาตรฐานของเควอร์ซิติน (Standard curve of quercetin) ทำโดยนำสารละลายมาตรฐานเควอร์ซิตินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.005, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025, และ 0.030 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานเควอร์ซิตินแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรมาเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร (OD 425 nm) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย นำค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเควอร์ซิตินมาเขียนกราฟมาตรฐานเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบของไลเคนต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหยาบของไลเคนทำโดยเตรียมสารละลายตัวอย่างไลเคนความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารละลายมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.01, 0.02 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไลเคนที่เตรียมไว้มา 1 มิลลิลิตร มาทำตามขั้นตอนดังที่กล่าวมาข้างต้นเหมือนที่ทำกับสารละลายมาตรฐานเควอร์ซิติน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย ใช้วิธีการนี้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดไลเคนที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ

ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมถูกรายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเควอร์ซิตินต่อกรัมของสารสกัด (mg of quercetin equivalent/g of extract หรือ mg QE/g extract)

2.5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Youn et al. [9] การเตรียมสารละลาย FRAP reagent ทำโดยผสมสารละลาย Acetate buffer pH 3.6 ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ (mM) กับสารละลาย Ferric chloride ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย 2,4,6-tri-2-pyridyl-2-triazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ จากนั้นเตรียมสารสกัดหยาบของไลเคนความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายที่ใช้สกัดตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดหยาบของไลเคนแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง และเติม FRAP reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกหลอด บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 4 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (OD 593 nm) ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต (Standard curve of ferrous sulfate) แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นค่า FRAP value ในหน่วยมิลลิกรัมของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของสารสกัด (mg $FeSO_4$/g extract)

2.6. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Wannawet and Thiangphet [10] ซึ่งทำโดยเตรียมสารสกัดหยาบของไลเคนในเอทานอลให้มีความเข้มข้นในช่วง 0-5 (0, 1, 2, 3, 4 และ 5) มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดของไลเคนที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 514 นาโนเมตร (OD 514 nm) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ดังสมการ

% Inhibition = [(Ac - As)/Ac] x 100

เมื่อ

Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (ไม่มีสารสกัดของไลเคน)

As = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดการทดลองที่มีสารสกัดของไลเคน

นำค่า % Inhibition และความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดของไลเคนไปสร้างกราฟ และหาสมการ Linear regression equation จากกราฟดังกล่าว เพื่อนำมาใช้หาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งอนุมูลอิสระให้ลดลงได้ 50% (The half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ในการทดลองนี้ใช้กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-0.025 (0, 0.005, 0.010, 0.015, 0.020 และ 0.025) มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.7. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lertcanawanichakul et al. [11] ซึ่งเริ่มจากการผสมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 mM กับสารละลาย Potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 mM ด้วยอัตราส่วน 1:2 ตามลำดับ บ่มทิ้งไว้ 12-16 ชั่วโมง เรียกสารละลายที่ได้ว่า Stock solution จากนั้นเตรียมสารสกัดหยาบของไลเคนในเอทานอลให้มีความเข้มข้นในช่วง 0-5 (0, 1, 2, 3, 4 และ 5) มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดของไลเคนที่เตรียมไว้ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติม Stock solution ปริมาตร 180 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (OD 734 nm) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ดังสมการ

% Inhibition = [(Ac - As)/Ac] x 100

เมื่อ

Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (ไม่มีสารสกัดของไลเคน)

As = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดการทดลองที่มีสารสกัดของไลเคน

นำค่า % Inhibition และความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดของไลเคนไปสร้างกราฟ และหาสมการ Linear regression equation จากกราฟดังกล่าว เพื่อนำมาใช้หาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งอนุมูลอิสระให้ลดลงได้ 50% (The half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ในการทดลองนี้ใช้โทรลอกซ์ (Trolox) ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-0.10 (0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10) มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.8. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลจากการทดลองทั้งหมดแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±SD (n=3) และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics version 26 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) การวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดลองใช้ One way ANOVA และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระใช้การวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation)

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1. ร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบจากไลเคน

จากการสกัดไลเคน *P. gardneri* ด้วยวิธีการต่าง ๆ พบว่าการสกัดด้วยการต้มในน้ำเป็นเวลา 30 นาทีให้ร้อยละของผลผลิต (% Yield) มากที่สุด รองลงมาคือ การสกัดด้วยการแช่ในอะซิโตน เอทานอลร้อยละ 95 และเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ (Table 1) การสกัดด้วยการต้มในน้ำนอกจากจะให้ร้อยละผลผลิตมากที่สุดแล้ว ยังเป็นตัวทำละลายที่มีความปลอดภัย และไม่เป็นพิษ

Table 1 Percent yields of the lichen crude extracts from different extraction methods

Extraction methods	Color of crude extracts	Yields (%)
Maceration		
95% Ethanol	Brownish green	7.55
Ethyl acetate	Brownish yellow	3.83
Acetone	Brownish green	15.41
Decoction	Pale yellow	36.70

3.2. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากไลเคน *P. gardneri* ที่สกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ การแช่ในเอทานอลร้อยละ 95 เอทิลอะซิเตท อะซิโตน และการต้มในน้ำ เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก จากสมการ $y = 29.35x - 0.063$ ค่า $R^2 = 0.9873$ (Figure 2) และรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด พบว่าสารสกัดด้วยอะซิโตนมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด เท่ากับ 199.05±0.54 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด รองลงมาคือสารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 เอทิลอะซิเตท และการต้ม ตามลำดับ (Table 2) การที่สารสกัดด้วยอะซิโตนมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติการเป็นตัวทำละลายที่ดีของอะซิโตน ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีทั้งส่วนที่มีขั้ว (C=O) และส่วนที่ไม่มีขั้ว ($-CH_3$) จึงทำให้สามารถสกัดได้ทั้งสารที่มีขั้ว และไม่มีขั้ว ในขณะที่ตัวทำละลายทั่วไปมักจะสกัดได้เพียงสารที่มีขั้ว หรือไม่มีขั้วอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการสกัด Foliose lichen 2 ชนิด คือ *Pseudevernia furfuracea* และ *Evernia prunastri* จากประเทศโมร็อกโก (Morocco) ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ แล้วพบว่าสารสกัดด้วยอะซิโตนมีปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด [12]

3.3. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากไลเคน *P. gardneri* ที่สกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ การแช่ในเอทานอลร้อยละ 95 เอทิลอะซิเตท อะซิโตน และการต้มในน้ำ เทียบกับกราฟมาตรฐานของเควอร์ซิติน จากสมการ $y = 30.206x - 0.0603$ ค่า $R^2 = 0.993$ (Figure 3) และรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเควอร์ซิตินต่อกรัมของสารสกัด พบว่าสารสกัดด้วยอะซิโตนมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด เท่ากับ 170.60±0.88 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์ซิตินต่อกรัมของสาร รองลงมาคือสารสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 เอทิลอะซิเตท และการต้ม ตามลำดับ (Table 2) การทดลองนี้ให้ผลไปในทางเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากไลเคนที่พบว่าการสกัดด้วยการแช่ในอะซิโตนทำให้ได้ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะอะซิโตนจัดเป็นตัวทำละลายที่ดีตามเหตุผลที่ได้กล่าวมาข้างต้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าการสกัด Foliose lichen 2 ชนิด คือ *Pseudevernia furfuracea* และ *Evernia prunastri* ด้วยอะซิโตนให้ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณ ฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น [12]

3.4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของไลเคนที่สกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ ด้วยวิธี FRAP assay เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต จากสมการ $y = 0.1497x + 0.0826$ ค่า $R^2 = 0.9914$ (Figure 4) แล้วรายงานผลเป็นค่า FRAP value ในหน่วยมิลลิกรัมของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด พบว่าสารสกัดไลเคนด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดด้วยอะซิโตน การต้ม และเอทิลอะซิเตท (Table 2) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของไลเคน *Parmotrema grayanumhas* [13] และไลเคน *Parmotrema reticulatum* [14] มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดจากการทดสอบด้วยวิธี FRAP assay โดยไลเคนทั้งสองชนิดดังกล่าวเป็นไลเคนกลุ่มโฟลิโอสเช่นเดียวกับไลเคนที่ใช้ในการศึกษานี้

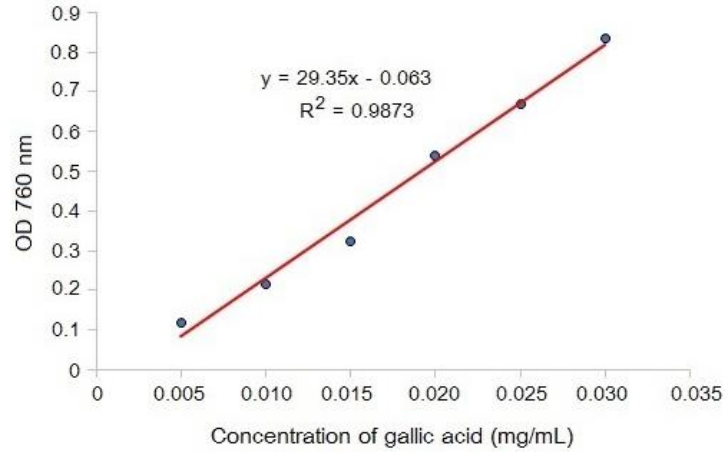

Figure 2 Standard curve of gallic acid

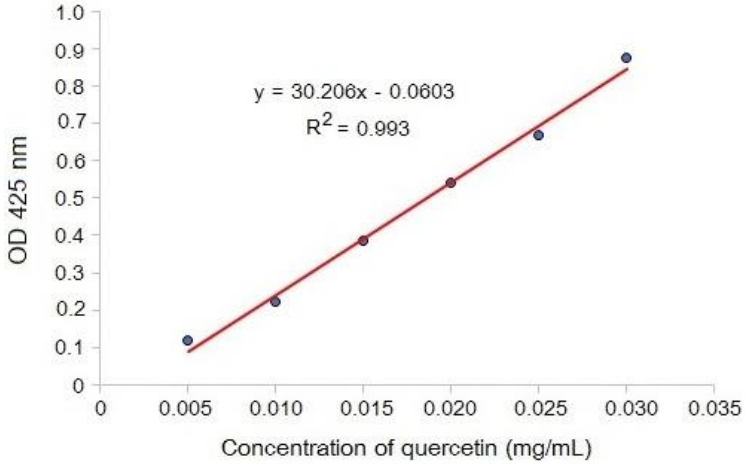

Figure 3 Standard curve of quercetin

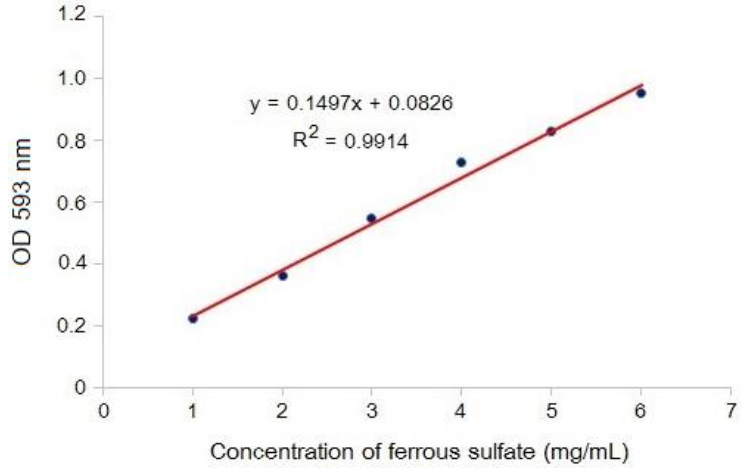

Figure 4 Standard curve of ferrous sulfate

Table 2 Total phenolic contents (TPC), total flavonoid contents (TFC) and antioxidant activity analyzed by ABTS, DPPH and FRAP assays of the lichen crude extracts from different extraction methods

Extraction methods	TPC (mg GAE/ g extract)	TFC (mg QE/ g extract)	IC_{50} ABTS (mg/mL)	IC_{50} DPPH (mg/mL)	FRAP values (mg $FeSO_4$/ g extract)
Maceration					
95% Ethanol	112.10±0.34^{b}	144.55±0.83^{b}	0.97±0.00^{d}	0.85±0.08^{c}	4411.49±24.09^{a}
Ethyl acetate	89.04±1.04^{c}	3.75±0.03^{c}	4.68±0.03^{a}	ND	523.36±2.78^{d}
Acetone	199.05±0.54^{a}	170.60±0.88^{a}	2.53±0.00^{c}	3.81±0.02^{a}	4349.14±16.81^{b}
Decoction	1.81±0.01^{d}	0.46±0.01^{d}	3.70±0.04^{b}	3.41±0.00^{b}	1053.75±3.36^{c}
Ascorbic acid	-	-	-	0.015±0.00	-
Trolox	-	-	0.055±0.00	-	-

Means in the same column with different superscript letters are significantly different at the significance level of 0.05.
ND = not detected

3.5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดจากไลเคน *P. gardneri* ด้วยเอทานอลร้อยละ 95 เอทิลอะซิเตท อะซิโตน และการต้ม พบว่าสารสกัดจากไลเคนที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.85±0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ สารสกัดด้วยการต้ม และอะซิโตน ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทไม่สามารถวัดค่าได้ (Table 2) ค่า IC_{50} คำนวณได้จากสมการ Linear regression equation ที่แสดงใน Table 3 โดยแทนค่า y ด้วย 50 ในการทดลองนี้ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งเป็นสารที่ได้รับการยืนยันว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงใช้เป็นสารควบคุมเชิงบวก (Positive control) ของการทดลองนี้ จากการทดลองพบว่ากรดแอสคอร์บิกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Figure 5, Table 2) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของไลเคน *Parmotrema grayanumhas* [13] ของไลเคน *Parmotrema reticulatum* [14] และของไลเคน *Xanthoparmelia conspersa* [15] มีฤทธิ์ต้านอนุมูลที่สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม Pavan et al. [16] รายงานผลการทดลองที่แตกต่างออกไป โดยพบว่าสารสกัดด้วยอะซิโตนจากไลเคน *Parmotrema tinctorum* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น

3.6. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ของสารสกัดจากไลเคน *P. gardneri* ด้วยเอทานอลร้อยละ 95 เอทิลอะซิเตท อะซิโตน และการต้ม พบว่าสารสกัดจากไลเคนที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.97±0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ สารสกัดด้วยอะซิโตน การต้ม และเอทิลอะซิเตท (Table 2) ค่า IC_{50} คำนวณได้จากสมการ Linear regression equation ที่แสดงใน Table 4 โดยแทนค่า y ด้วย 50 ในการทดลองนี้ใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งเป็นสารที่ได้รับการยืนยันว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงใช้เป็นสารควบคุมเชิงบวก (Positive control) ของการทดลองนี้ จากการทดลองพบว่าโทรลอกซ์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.055 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Figure 6, Table 2)

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจะเห็นได้ว่าไม่ว่าจะใช้วิธีใดในการทดสอบ สารสกัดด้วยเอทานอลจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมักจะถูกสกัดได้ดีด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูง เช่น น้ำ และเอทานอล หากเรียงตามคุณสมบัติการมีขั้ว (Polarity) น้ำเป็นสารที่มีขั้วสูงสุด รองลงมาเป็นเอทานอล อะซิโตน และเอทิลอะซิเตท [17] แต่ในการทดลองนี้อุณหภูมิที่สูงขึ้นจากการต้มในน้ำอาจมีผลเชิงลบต่อสารต้านอนุมูลอิสระ จึงทำให้สารสกัดด้วยน้ำ (ซึ่งมีขั้วสูงกว่า) กลับมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล [18]

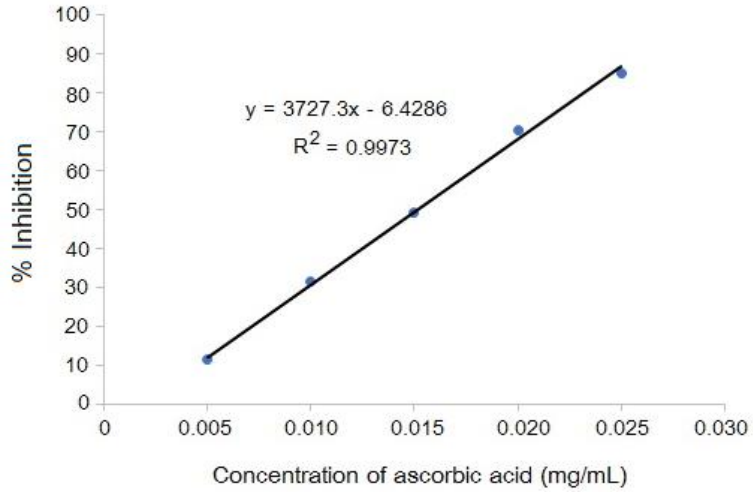

Figure 5 Graphical representation of antioxidant activity of ascorbic acid

Table 3 Linear regression equations showing the relationship between % inhibition (from DPPH assay) and concentrations of the lichen crude extracts from different extraction methods

Extraction methods	Linear regression equations*
Maceration	
95% Ethanol	$y = 63.16x - 3.4632$; $R^2 = 0.9916$
Ethyl acetate	N
Acetone	$y = 13.593x - 1.7489$; $R^2 = 0.9908$
Decoction	$y = 15.791x - 3.8148$; $R^2 = 0.9908$

*y = % inhibition; x = concentration of the lichen crude extract

N = no linear regression equation

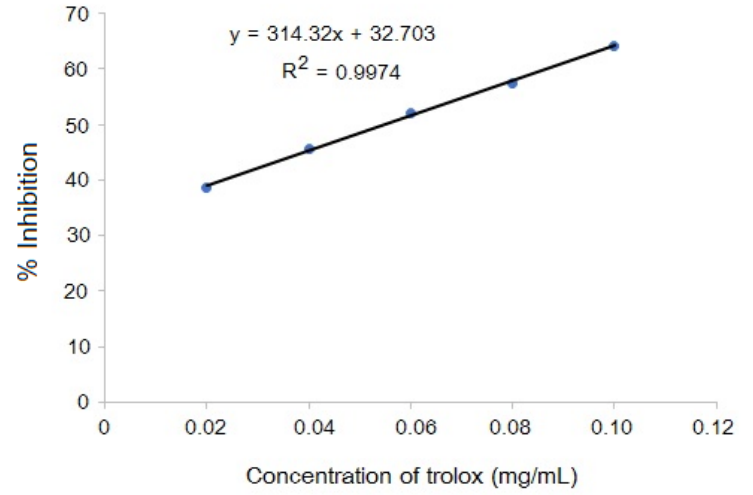

Figure 6 Graphical representation of antioxidant activity of trolox

Table 4 Linear regression equations showing the relationship between % inhibition (from ABTS assay) and concentrations of the lichen crude extracts from different extraction methods

Extraction methods	Linear regression equations*
Maceration	
95% Ethanol	$y = 44.115x + 7.0729$; $R^2 = 0.8681$
Ethyl acetate	$y = 14.773x - 19.083$; $R^2 = 0.9723$
Acetone	$y = 12.657x + 18.006$; $R^2 = 0.9971$
Decoction	$y = 6.8824x + 24.49$; $R^2 = 0.9766$

*y = % inhibition; x = concentration of the lichen crude extract

3.7. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของไลเคน *P. gardneri* โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นำมาวิเคราะห์ได้มาจากการทดสอบด้วยวิธีการ 3 วิธี คือ ABTS assay DPPH assay และ FRAP assay จาก Table 5 พบว่าปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม นอกจากจะมีความสัมพันธ์แปรผันตรงซึ่งกันและกันแล้ว โดยมีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.837 (p-value เท่ากับ 0.001) ยังมีความสัมพันธ์แปรผันตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP assay (ค่า FRAP value) โดยมีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.740 (p-value เท่ากับ 0.006) และ 0.987 (p-value เท่ากับ 0.000) ตามลำดับ ซึ่งค่า p-value ทั้งสองค่าดังกล่าวมีค่าน้อยกว่า 0.01 แสดงให้เห็นว่าทั้งสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีส่วนสำคัญที่ทำให้สารสกัดของไลเคนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ค่า FRAP value) จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้จาก Table 5 ยังพบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมีความสัมพันธ์แปรผกผันกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS assay (ค่า IC_{50}) โดยมีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ -0.826 (p-value เท่ากับ 0.001) ซึ่งค่า p-value ดังกล่าวมีค่าน้อยกว่า 0.01 แสดงให้เห็นว่าค่า IC_{50} ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS assay จะลดลง (ซึ่งหมายถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น) ตามปริมาณของฟลาโวนอยด์ที่เพิ่มขึ้น

Table 5 Pearson correlation between bioactive compounds contents (TPC and TFC) and antioxidant activity analyzed by ABTS, DPPH and FRAP assays of the lichen crude extracts

		TPC	TFC	ABTS	DPPH	FRAP
TPC	Pearson correlation[a]	1	0.837**	-0.408	0.057	0.740**
	Sig. (2-tailed)[b]		0.001	0.187	0.885	0.006
	N[c]	12	12	12	12	12
TFC	Pearson correlation[a]	0.837**	1	-0.826**	-0.253	0.987**
	Sig. (2-tailed)[b]	0.001		0.001	0.511	0.000
	N[c]	12	12	12	12	12

**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

[a]Pearson correlation = Correlation between two variables (one listed in the row, the other in the column)

[b]Sig. (2-tailed) = p-value associated with the correlation

[c]N = number of cases used in the correlation

4. บทสรุป

การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารสกัดไลเคนที่สกัดด้วยอะซิโตนมีปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดเท่ากับ 199.05±0.54 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และ 170.60±0.88 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์ซิตินต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่าสารสกัดไลเคนด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยการทดสอบด้วยวิธี DPPH assay ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.85±0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก การทดสอบด้วยวิธี ABTS assay ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.97±0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ และการทดสอบด้วยวิธี FRAP assay ได้ค่า FRAP value เท่ากับ 4411.49±24.09 มิลลิกรัมของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมของสารสกัด ด้วยเหตุที่ไลเคน *P. gardneri* มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายชนิด และสารแต่ละชนิดก็มีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน นอกจากนี้สารเหล่านี้ก็ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายที่หลากหลายชนิด และใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลายวิธี เพื่อที่จะได้ข้อมูลพื้นฐานที่หลากหลายสำหรับใช้เป็นทางเลือกในการนำสารสกัดจากไลเคน *P. gardneri* ไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา) สนับสนุนค่าใช้จ่ายบางส่วนสำหรับรายวิชา Special problem และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือในการปฏิบัติการทดลองทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

6. References

[1] Zhao, Y., Wang, M. and Xu, B. 2021. A comprehensive review on secondary metabolites and health-promoting effects of edible lichen. **Journal of Functional Foods.** 80: 104283.

[2] Naksuwankul, K. 2015. **Lichen Taxonomy.** Khon Khaen: Siripun Offset Printing**.** (*in Thai*)

[3] Gaikwad, S. and et al. 2014. Growth promoting effects of some lichen metabolites on probiotic bacteria. **Journal of Food Science and Technology.** 51(10): 2624-2631.

[4] Marcelli, M.P., Benatti, M.N. and Elix, J.A. 2008. New species of *Parmotrema* containing protocetraric or stictic acid from the coast of Sao Paulo State, southeastern Brazil. **Mycotaxon.** 105: 235-240.

[5] Kukwa, M. and et al. 2012. Thirty-six species of the lichen genus *Parmotrema* (Lecanorales, Ascomycota) new to Bolivia. **Polish Botanical Journal.** 57(1): 243-257.

[6] Mongkolsuk, P. and et al. 2011. Lichen in Mangrove forest at Ban Pak Klong Num Chiew Mueng district, and Black Sand Beach Laem Ngob District, Trat Province. In: **Proceedings of the 37th Congress of Science and Technology of Thailand,** 10-12 October 2011. Bangkok, Thailand. (*in Thai*)

[7] Dunkhunthod, B. and Sittisart, P. 2022. Antioxidant activity and cytotoxicity against human cancer cell lines of the aqueous leaf extracts of *Smilax luzonensis*, *Hoya kerrii* and *Derris elliptica*. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University.** 24(2): 1-11. (*in Thai*)

[8] Yayinie, M. and et al. 2022. Polyphenols, flavonoids, and antioxidant content of honey coupled with chemometric method: geographical origin classification from Amhara region, Ethiopia. **International Journal of Food Properties.** 25(1): 76-92.

[9] Youn, J.S. and et al. 2018. Antioxidant activity and contents of leaf extracts obtained from *Dendropanax morbifera* LEV are dependent on the collecting season and extraction conditions. **Food Science and Biotechnology.** 28(1): 201-207.

[10] Wannawet, R. and Thiangphet, P. 2017. Determination antioxidant activity and total phenolic compounds of Bean sprouts. In: **Proceedings of the 4th National Conference Kamphaengphet Rajabhat University,** 22 December 2017. Kamphaengphet, Thailand. (*in Thai*)

[11] Lertcanawanichakul, M., Chawawisit, K. and Hiransai, P. 2019. Biological activities of extracts from some local plants in Pakpanang, Nakhon Si Thammarat province: Antioxidant and antibacterial activity. **Rajamangala University of Technology Srivijaya Research Journal.** 11(2): 279-289. (*in Thai*)

[12] Aoussar, N. and et al. 2017. Chemical composition and antioxidant activity of two lichens species (*Pseudevernai furfuracea* L and *Evernia prunastri* L) collected from Morocco**. Journal of Materials and Evironmental Science.** 8(6): 1968-1976.

[13] Suganya, S. 2015. A study of in-vitro antioxidant activity of *Parmotrema grayanum* and its bioactive compounds. **International Journal of Engineering Sciences and Research Technology.** 4(1): 2277-9655.

[14] Sharma, B.C. and Kalikotay, S. 2012. Screening of antioxidant activity of lichens *Parmotrema reticulatum* and *Usnea* sp. from Darjeeling hills, India. **Journal of Pharmacy.** 2(6): 54-60.

[15] Karaahmet, Z., Kinalioglu, K. and Aydin, S. 2019. Antioxidant and antibacterial potencies of *Xanthoparmelia conspersa* (Ehrh. ex Ach.) Hale and *Dermatocarpon miniatum* (L.) W. Mann. Lichens from Black Sea Region in Turkey. **Gumushane University Journal of Science and Technology.** 9(3): 415-424.

[16] Pavan, K.P. and et al. 2020. Isolation, semi-synthesis, free-radicals scavenging, and advanced glycation end products formation inhibitory constituents from *Parmotrema tinctorum*. **Journal of Asian Natural Products Research.** 22(10): 976-988.

[17] Wakeel, A. and et al. 2019. Solvent polarity mediates phytochemical yield and antioxidant capacity of *Isatis tinctoria*. **PeerJ.** 7: e7857.

[18] Reblova, Z. 2012. Effect of temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. **Czech Journal of Food Sciences.** 30(2): 171-177.