

การพัฒนาการใช้สารสกัดจากต้นฮว่านง็อกเป็นสารปฏิชีวนะในปลาชนิด
Development of extract from *Pseuderatherum platiferum* for antimicrobial in
Tilapia, Oreochromis niloticus



ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรา 2552
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การพัฒนาการใช้สารสกัดจากต้นฮวานง็อกเป็นสารปฏิชีวนะในปลาไนล

Development of extract from *Pseuderatherum platiferum* for antimicrobial in Tilapia, *Oreochromis niloticus*

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ 2552 จำนวนเงิน 60,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2551 ถึง 30 กันยายน 2552

หน่วยงานและผู้ดำเนินการวิจัย รศ.ดร. สุรินทร์น์ เรืองสมบุรณ์

ผศ.ดร.ปวีณา ทวีกิจการ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะ

เทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โทร. 02-326-4099



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	7
Abstract	8
บทที่ 1 บทนำ	9
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและการทบทวนวรรณกรรม	10
อนุกรมวิธาน (Taxonomy) ของสมุนไพรรพญาวานร	10
ลักษณะทั่วไปของสมุนไพรรพญาวานร	10
สรรพคุณพื้นบ้านของสมุนไพรรพญาวานร	11
องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรรพญาวานร	12
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรรพญาวานร	15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย	20
การทดลองที่ 1	20
การทดลองที่ 2	23
การทดลองที่ 3	24
บทที่ 4 อภิปรายผลการวิจัยและวิจารณ์	27
ผลการศึกษาดังกล่าวจะเหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นฮวงฉิงหรือโสมพญาวานร เพื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารปฏิชีวนะ	27
ผลการศึกษาค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในปลานิล	31
ผลของสารสกัดต่อการเจริญเติบโตในปลานิล	32
บทที่ 5 สรุปและขอเสนอแนะ	37
เอกสารอ้างอิง	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณใบของสมุนไพรพญาวานรที่กินต่อวัน เพื่อป้องกันและรักษาโรคในคน	12
2	องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรพญาวานร	15
3	ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบใบพญาวานร	16
4	ผลของสมุนไพรพญาวานรกับยาปฏิชีวนะในการรักษาอาการท้องเสียในลูกสุกร	18
5	คุณค่าทางโภชนาการของอาหารผงสำเร็จรูปที่ใช้ในการทดลอง	25
6	ความเข้มข้นของสารสกัดที่สกัดจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ	27
7	ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>Streptococcus agalactiae</i> ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (C 30)	29
8	ความสามารถของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>Aeromonas hydrophila</i> ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (C 30)	30
9	ค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรด้วยตัวทำละลายเมทานอล เปรียบเทียบกับ Oxytetra cycline ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 512 ppm (positive control) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>A. hydrophila</i> และ <i>S. agalactiae</i>	31
10	ค่า MBC ของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรด้วยตัวทำละลายเมทานอล เปรียบเทียบกับ Oxytetra cycline ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 512 ppm (positive control) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>A. hydrophila</i> และ <i>S. agalactiae</i>	32
11	เปอร์เซ็นต์โปรตีน ไขมัน ความชื้น เยื่อใย และเถ้าของอาหารที่ใช้ทำการทดลอง	32
12	น้ำหนักเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์ของการทดลอง (หน่วยเป็นกรัม)	33
13	ความยาวเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์ของการทดลอง (หน่วยเป็นเซนติเมตร)	34
14	ค่าอัตราการการเจริญเติบโตจำเพาะในแต่ละช่วงสัปดาห์ (หน่วยเป็นกรัม)	35
15	ค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อในแต่ละช่วงสัปดาห์	35

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะใบของสมุนไพรหวานจอกหรือพญาवानร ซึ่งมีสีเขียวเข้มและมัน	11
2	การขยายพันธุ์สมุนไพรพญาवानรด้วยวิธีการปักชำ	11
3	Stigmasterol (C ₂₉ H ₄₈ O)	13
4	β – Sitosterol (C ₂₉ H ₄₈ O)	13
5	β – Apigenin-7-O-Glucoside (C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀)	14
6	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่แสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญ ของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดสดจากใบพญาवानร (0 = control , 1 คือ ความเข้มข้น 1:10 ; 2 คือ ความเข้มข้น 1:100 ; 3 คือ ความเข้มข้น 1:1,000 ; 4 คือ ความเข้มข้น 1:10,000 ; 5 คือ ความเข้มข้น 1:100,000 ; 6 คือ ความเข้มข้น 1:1,000,000)	16
7	ลักษณะของเซลล์เมื่อได้รับสารสกัดสดจากใบพญาवानร ซึ่ง A คือ เซลล์มะเร็งตับ B คือเซลล์มะเร็งปากมดลูก และ C คือเซลล์ปกติจากเซลล์ไตของลิง	19
8	เครื่องสกัดแบบแยกสกัด (extraction unit) ที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร	21
9	เครื่อง Rotary evaporator ที่ใช้ในการระเหยตัวทำละลายของสารสกัดสมุนไพร	21
10	การวางแผนทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA	22
11	น้ำหนักเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์ของการทดลอง (หน่วยเป็นกรัม)	33
12	ความยาวเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์ของการทดลอง (หน่วยเป็นเซนติเมตร)	34
13	ค่าอัตราการการเจริญเติบโตจำเพาะในแต่ละช่วงสัปดาห์ (หน่วยเป็นกรัม)	35
14	ค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อในแต่ละช่วงสัปดาห์	36

บทคัดย่อ

การประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบสมุนไพรพญาพานในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลา 2 ชนิด คือ *Streptococcus agalactiae* และ *Aeromonas hydrophila* โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิดคือน้ำกลั่น อะซิโตน เมทานอล และเอทิลอะซิเตท ด้วยวิธี disc diffusion method พบว่า สารที่สกัดด้วยเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 25,000 $\mu\text{g}/\text{disc}$ โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 18.6 และ 25.7 มิลลิเมตรตามลำดับ และความเข้มข้นต่ำสุดที่มีประสิทธิภาพในการทำละลายเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสารที่สกัดด้วยเมทานอลต่อเชื้อ มีค่าเท่ากันคือ 25,000 ppm และเมื่อนำสมุนไพรบดแห้งผสมอาหารที่ระดับ 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พร้อมกลุ่มควบคุมเลี้ยงปลานิลขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 52.6 ± 1.9 กรัม เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองค่าอัตราแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) และค่าการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) ไม่มีความแตกต่างกันทุกกลุ่มทดลอง ส่วนน้ำหนักเฉลี่ยมีค่าสูงสุดในกลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากกลุ่มที่ได้สมุนไพร 3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ มีการเติบโตน้อยสุดแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 92.01 ± 6.19 86.98 ± 7.78 และ 81.74 ± 6.90 กรัม ตามลำดับ

Abstract

The crude extract of *Pseuderanthemum palatiferum* was assessed for its antimicrobial activity against *Streptococcus agalactiae* and *Aeromonas hydrophila*, a major fish pathogen. The herb was extracted with 4 solvents: water, acetone, methanol and ethyl acetate. Using disc diffusion assay, the most effective was methanol extracts which produced 18.6 and 25.7 mm. inhibition zones respectively at concentration 25,000 µg/disc. Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) of herb extracts showed that the MIC value against both of bacteria were the same concentration (25,000 ppm.). To evaluation of the herb powder for growth performance, supplements of 0, 3 and 5 % leaf powder were singularly added to the commercial diet. Each diet was fed to three replicate groups of tilapia (initially averaging 52.6±1.9 g/fish) for 8 weeks. At the end of the feeding trial, fish fed all three diets had no significant difference in FCR and specific growth rate. However fish fed 5 % leaf powder had significant lower average final weight than fish fed other diets which were 92.01 ± 6.19, 86.98 ± 7.78 and 81.74±6.90 g. respectively.

Keywords Antimicrobial activity; Minimal bactericidal concentration; *Pseuderanthemum palatiferum* ; medicinal plant extracts

บทที่ 1 บทนำ

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกำลังเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายและเติบโตเป็นธุรกิจขนาดใหญ่ ซึ่งมีปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของไทย โดยในปี พ.ศ. 2551 ประเทศไทยส่งออกปลานิล ได้ประมาณ 16,733 ตัน มูลค่าประมาณ 1,014.6 ล้านบาท ส่งออกประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิตทั้งหมด ปัจจุบันปริมาณการเลี้ยงปลานิลคิดเป็นร้อยละ 30.0 ของปริมาณการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดทั้งหมดของไทย ส่วนมูลค่าของปลานิลนั้นคิดเป็นร้อยละ 20.0 ของมูลค่าการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดทั้งหมด (<http://news.enterfarm.com>) ส่งผลให้ธุรกิจการเลี้ยงปลานิลทั่วไปทั้งประเทศ มีฟาร์มเพาะลูกพันธุ์ปลานิลและมีการพัฒนาสายพันธุ์ แต่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นจะประสบความสำเร็จได้จะต้องมีระบบการเลี้ยงและการจัดการที่ดี ซึ่งการเกิดโรคกับสัตว์น้ำนั้นเป็นสาเหตุของความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยแบคทีเรียที่สร้างความเสียหายในอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลานิล ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* และ *Aeromonas hydrophila* โดยทำให้สัตว์น้ำตายเป็นจำนวนมาก จึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการป้องกันและรักษา แต่ยาปฏิชีวนะจะถ่ายถอดและสะสมในสิ่งแวดล้อมและในสัตว์น้ำ ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Divyagnaneswari *et al.*, 2006 ; Abutbul *et al.*, 2004) เนื่องด้วยเหตุผลเหล่านี้จึงมีผู้ศึกษาหาสารสกัดจากธรรมชาติไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสมุนไพรชนิดต่างๆ เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งเป็นทางเลือกที่เป็นที่ยอมรับ (Christybapita *et al.*, 2007; Divyagnaneswari *et al.*, 2006; Abutbul *et al.*, 2004)

สมุนไพรพญาวานร *Pseuderanthemum palatiferrum* เป็นสมุนไพรที่มีต้นกำเนิดมาจากประเทศเวียดนาม ปัจจุบันสามารถปลูกได้เองในประเทศไทย ลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-3 เมตร ลำต้นเป็นรูปสี่เหลี่ยม เปลือกต้นมีสีเขียว ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม รูปใบหอก ขอบใบเรียบ มีเส้นแขนงใบ 8 -11 คู่ ขยายพันธุ์โดยการปักชำลงดิน ซึ่งกำลังเป็นที่นิยมกันมากในการทำวิจัยถึงองค์ประกอบทางเคมีและผลกระทบต่อมนุษย์และสัตว์ โดยผลจากการวิจัยนั้นยืนยันได้ว่า สมุนไพรพญาวานรนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย รักษาการอักเสบและเสริมระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์บกและในมนุษย์ จึงมีความเป็นไปได้ว่า การใช้สารสกัดจากสมุนไพรพญาวานรนี้ สามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันและต้านทานเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำ เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะเนื่องจากมีผลกระทบต่อสัตว์น้ำ และการส่งออกสัตว์น้ำของไทย

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและการทบทวนวรรณกรรม

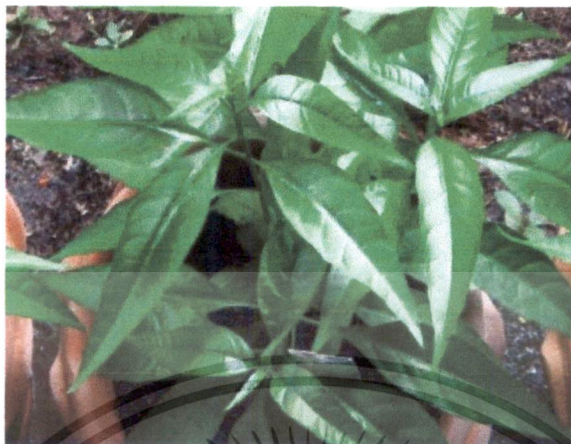
สมุนไพรพญาวัน หรือ ฮวานจ็อก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. ชื่อพ้อง *Eranthemum palatiferum* Nees. เป็นสมุนไพรที่กำลังนิยมกันในปัจจุบัน เนื่องจากมีการวิจัยแล้วสามารถนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ มากมาย ซึ่งจริงๆ แล้วพญาวันไม่ใช่พืชสมุนไพรของไทย แต่มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ประเทศเวียดนาม เป็นพืชชนิดใหม่ที่ถูกค้นพบในป่าแถบตอนเหนือของประเทศเวียดนามเมื่อประมาณปี ค.ศ. 1990 ต่อมาได้มีการปลูกขยายใช้เป็นพืชสมุนไพรกระจายไปทั่วประเทศ (Dieu et al., 2005) และยังมีรายงานการวิจัยถึงองค์ประกอบทางเคมี เช่น flavonoid, β -sitosterol และยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอีกด้วย

อนุกรมวิธาน (Taxonomy) ของสมุนไพรพญาวัน



ลักษณะทั่วไปของสมุนไพรพญาวัน

สมุนไพรพญาวันเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-3 เมตร ลำต้นเป็นรูปสี่เหลี่ยม เปลือกต้นผิวเรียบสีเขียว ใบเดี่ยวรูปรีหรือรูปหอกเรียงตรงข้าม กว้าง 3-5 เซนติเมตร ยาว 5-15 เซนติเมตร โคนใบสอบ ปลายใบแหลมเรียว ขอบใบเรียบ มีเส้นแขนงใบ 8-11 คู่ ผิวใบมีขนยาวห่าง (pilose) ดอกช่อแยกแขนงแบบช่อเชิงลด ใบประดับรูปแถบหรือไม่มีใบประดับ มีก้านดอกย่อยยาวประมาณ 0.5 มิลลิเมตร มีขนสั้นที่ใบประดับ ก้านดอกย่อยและกลีบเลี้ยง กลีบเลี้ยงรูปแถบมี 5 กลีบ วงกลีบดอกมีสีชมพู น้ำเงิน ม่วงหรือเกือบดำ หลอดดอกรูปทรงกระบอก ดอกปากแตร รูปห้าแฉก เกสรสมบูรณ์เพศและเป็นหมัน รังไข่มีลักษณะเรียบ ขยายพันธุ์ได้งายด้วยวิธีการปักชำ (ภาพที่ 1 และ 2)



ภาพที่ 1 ลักษณะใบของสมุนไพรชวานังหรือพญาवानร ซึ่งมีสีเขียวเข้มและมีมัน

ที่มา : http://www.igetweb.com/www/hoanngocsamunpai/private_folder/img_0121.jpg



ภาพที่ 2 การขยายพันธุ์สมุนไพรพญาवानรด้วยวิธีการปักชำ

สรรพคุณพื้นบ้านของสมุนไพรพญาवानร

ในประเทศเวียดนามจะใช้ใบพญาवानรในการรักษาโรคต่างๆ ในคน ได้แก่ ท้องเสีย ไซซ้อ อักเสบ คออักเสบ ความดันโลหิตสูง ภาวะอาหารอักเสบ เนื้อเยื่อ ลำไส้อักเสบ ตกเลือด รักษาบาดแผล ท้องผูก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคในสัตว์เลี้ยง ได้แก่ แก้วท้องเสียในสุกรและสุนัข (Dieu *et al.* 2005 , 2006 ; Dieu and Hoa , 2008; Giang , 2008) โดยอัตราการบริโภครักษาจะขึ้นอยู่กับประเภทของโรคต่างๆ ดังตารางที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ปริมาณโบของสมุนไพรพญาวานรที่กินต่อวัน เพื่อป้องกันและรักษาโรคในคน

โรค	ความถี่ (ครั้งที่กิน)	ปริมาณโบที่กินต่อวัน			
		1-3	4-30	>30	Continuous
ความดันโลหิต	42				x
ท้องเสีย	38	x			
ข้อต่ออักเสบ	16		x		
คอหอยอักเสบ	15			x	
กระเพาะอาหารอักเสบ	12			x	
มะเร็ง	8			x	
ลำไส้อักเสบ	7			x	
เลือดไหลไม่หยุด	5	x			
บาดแผล	4	x			
ท้องผูก	3	x			
เต้านมอักเสบ	1	x			
เยื่อจมูกอักเสบ	1		x		
หัวใจ	1			x	
ไตอักเสบ	1				x

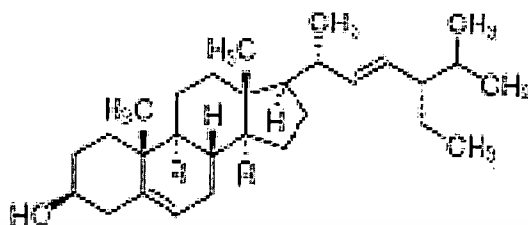
ที่มา : ดัดแปลงจาก Dieu *et al.* (2005)

องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรพญาวานร

โบสมุนไพรพญาวานรประกอบด้วยสารต่างๆ มากมาย ซึ่งจะเห็นได้จากการทดลองของ Dieu (2008) ที่ได้ทำการทดลองสกัดสารประกอบทางเคมีจากโบพญาวานร โดยใช้ตัวทำละลาย คือ ปิโตรเลียมอีเทอร์และคลอโรฟอร์ม ซึ่งสกัดสารประกอบทางเคมีได้หลายชนิด เช่น

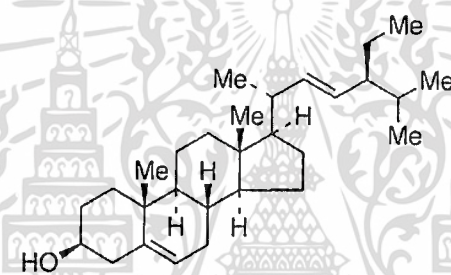
- Stigmasterol ($C_{29}H_{48}O$) เป็นสารประกอบทางเคมีประเภท sterols มีลักษณะเป็นของเหลวสีขาวที่อุณหภูมิห้อง มีจุดเดือด คือ 160 - 164 องศาเซลเซียส ไม่ละลายน้ำแต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยมีองค์ประกอบคล้ายกับซีมีงและคอเรสเตอรอลที่ได้จากสิ่งมีชีวิตและพืช ซึ่งมีความสำคัญโดยใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตและสังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน โดยมีความสำคัญในลักษณะทางสรีระวิทยาของฮอร์โมนในเพศหญิง และยังช่วยในการฟื้นฟูร่างกาย ซึ่งมีสาเหตุมาจากการเกิดระยะ Luteal Phase อันเนื่องมาจากฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ในวัฏจักร Menstrual ให้คงอยู่ในสภาพเดิม (ภาพที่ 3)

- β - Sitosterol - 3 - O - Glucoside ($C_{35}H_{60}O_6$) เป็นสารประกอบเคมีประเภท Triterpenoids (Shen *et al*, 2005) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 Stigmasterol ($C_{29}H_{48}O$)

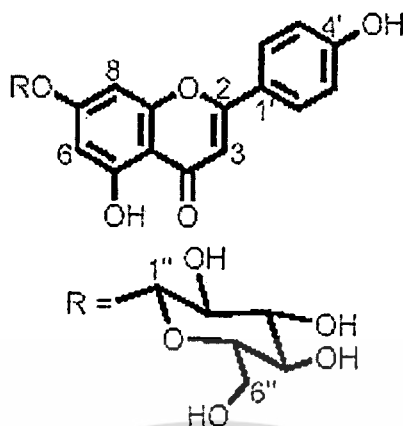
ที่มา : <http://www.trc-canada.com/Structures/S686750.png>



ภาพที่ 4 β - Sitosterol ($C_{29}H_{48}O$)

ที่มา : <http://www.trc-canada.com/Structures/S686750.png>

- β - Sitosterol ($C_{29}H_{48}O$) เป็นสารประกอบทางเคมีประเภท sterols มีลักษณะทางเคมีคล้ายกับ Stigmasterol ซึ่งมีความสำคัญในการช่วยลดอาการต่อมลูกหมากโต (BPH) ซึ่งจะลดปริมาณการดูดซึมของคอเรสเตอรอลและแก้อาการขัดเบาในการถ่ายปัสสาวะ และสามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันและระดับน้ำตาลในเลือด ลดอาการอักเสบ รักษาแผลเปื่อย แผลพุพอง มีหนอง กระชับมดลูก และบรรเทาอาการปวดท้องเนื่องจากการมีประจำเดือน (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 β - Apigenin-7-O-Glucoside ($C_{21}H_{20}O_{10}$)

ที่มา : <http://www.springerlink.com/content/j08tg25128p7g7m2/fulltext.pdf?page=1>

- β - Apigenin - 7 - O - Glucoside ($C_{21}H_{20}O_{10}$) เป็นสารประกอบเคมีประเภทฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีความสำคัญในการคลายอาการเครียดโดยไม่ต้องมีการคลายกล้ามเนื้อหรือระงับประสาท นอกจากนี้ยังแสดงผลการต้านทานการเสริมการเกิดเนื้องอก ต่อต้านการกลายพันธุ์และลดการเกิดเนื้องอกบริเวณผิวหนังอันเนื่องมาจากการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Sanja *et al.*, 2005)

นอกจากนี้ยังพบว่าสมุนไพรรพญาวานยังประกอบด้วยสารอื่นๆ อีก เช่น 1-triacontanol , salicylic acid , glycerol 1-hexadecanoate , palmitic acid (Hung *et al.*, 2008) และ pseuderantin ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนได้ (Dieu *et al.*, 2006) และยังประกอบด้วยสารอาหารต่างๆ ได้แก่ โปรตีน (ซึ่งพบในปริมาณ 30.8% ของน้ำหนักแห้ง) กรดอะมิโน ได้แก่ ไลซีน เมทไทโอนีน และทรีโอนีน และยังมีเกลือแร่ ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และทองแดง (Dieu *et al.*, 2005) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรพญาวานร

น้ำหนักแห้ง (%)	13.4
โปรตีน (% น้ำหนักแห้ง)	30.8
แร่ธาตุ (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของใบสด)	
แคลเซียม	875.5
แมกนีเซียม	837.6
เหล็ก	38.8
ทองแดง	0.43
กรดอะมิโน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของใบสด)	
ไลซีน	30.6
เมทไอโอนีน	29.7
ทีโอนีน	61.0

ที่มา : Dieu *et al.* (2005)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรพญาวานร

1. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท และบิวทานอลจากใบสมุนไพรพญาวานร ซึ่งมีฟลาโวนอยด์ เป็นองค์ประกอบหลัก มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ โดยทำการทดลองโดยใช้ human blood peroxidase model (Giang, 2008)

2. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท และบิวทานอลจากใบสมุนไพรพญาวานร จะมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย 10 ชนิด โดยเฉพาะการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทจะมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhi* 158 ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องร่วง, *Shigella flexneri* ทำให้เกิดโรคบิด, *Proteus* ทำให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ซึ่งทำให้กระเพาะปัสสาวะอักเสบ, *Pseudomonas* และ *E. coli* ได้ดี (Giang, 2008)

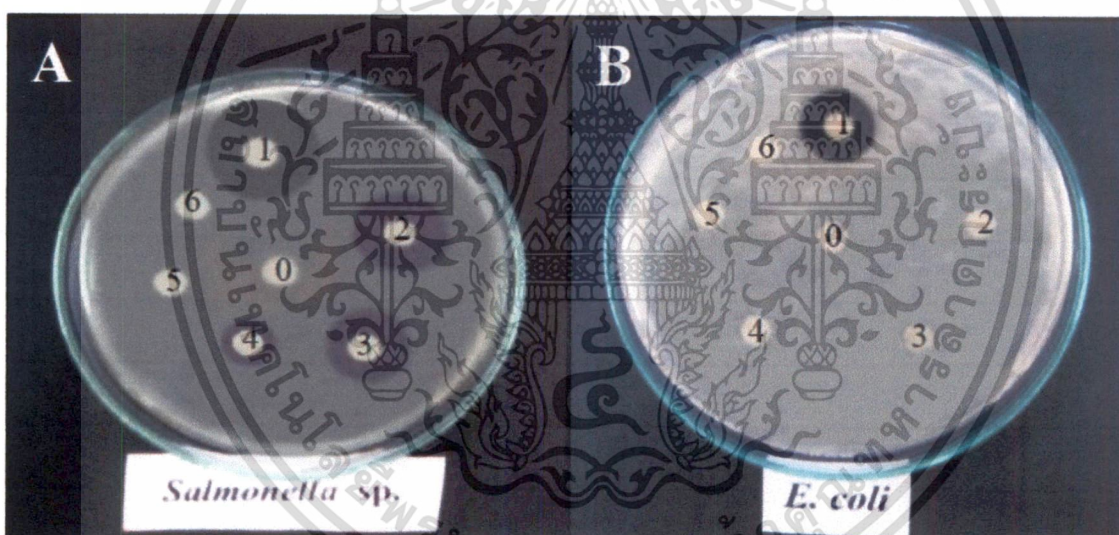
เบญจพร และคณะ (2551) รายงานว่า สารสกัดหยาบจากใบพญาวานรหลายความเข้มข้นได้ถูกทดสอบโดยวิธีวงกระดาษกรองกับเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ *Salmonella spp.*, *E.coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Shigella sp.* ซึ่งพบว่า สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1:10 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella spp.* และ *E. coli* ได้ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าน

ศูนย์กลางของ clear zone เท่ากับ 25 มิลลิเมตร และ 20 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 6

ตารางที่ 3 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาดไพบูลญาณ

ความเข้มข้น ของสารสกัด	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)			
	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Shigella</i> sp.
0:0	-	-	-	-
1:10	25	20	-	-
1:100	20	-	-	-
1:1,000	15	-	-	-

ที่มา : เบญจพร และคณะ (2551)



ภาพที่ 6 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่แสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดสดจากไพบูลญาณ (0 = control , 1 คือ ความเข้มข้น 1:10 ; 2 คือ ความเข้มข้น 1:100 ; 3 คือ ความเข้มข้น 1:1,000 ; 4 คือ ความเข้มข้น 1:10,000 ; 5 คือ ความเข้มข้น 1:100,000 ; 6 คือ ความเข้มข้น 1:1,000,000)

ที่มา : เบญจพร และคณะ (2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ฤทธิ์ต้านเชื้อรา

ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท และบิวทานอลจากใบสมุนไพรรพญาวานร จะมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Candida albicans* และ *Candida stellatoidea* ซึ่งทำให้เกิดโรคในช่องปาก (Giang , 2008)

4. ผลต่อสัตว์

Dieu *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาผลของสมุนไพรรพญาวานรที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและแก้ท้องเสียในลูกสุกรเล็ก โดยแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ทดลองในลูกสุกรที่ยังไม่ได้หย่านม โดยให้กินใบสดขนาด 1 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 30 วัน การทดลองที่ 2 ทดลองในลูกสุกรที่ยังไม่ได้หย่านม โดยให้กินใบสดขนาด 0.5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน และผงใบแห้ง ขนาด 0.1 และ 0.2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 30 วัน และการทดลองที่ 3 ทดลองในลูกสุกรที่หย่านมแล้ว โดยให้กินใบสดขนาด 0.5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน และผงใบแห้ง ขนาด 0.1 และ 0.2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ในการทดลองที่ 1 ลูกสุกรที่กินสมุนไพรรพญาวานร จะมีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มควบคุม จำนวนเม็ดเลือดแดง packed cell และฮีโมโกลบินสูงกว่า ไม่พบการตายและการท้องเสีย เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 และ 3 ลูกสุกรที่กินใบสมุนไพรรพญาวานร จะมีน้ำหนักตัว จำนวนเม็ดเลือดแดง packed cell และฮีโมโกลบินมากกว่ากลุ่มควบคุม ลูกสุกรมีอาการท้องเสียและตายน้อยกว่า โดยผงแห้งที่ขนาด 0.2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมจะให้ผลที่ดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตและแก้ท้องเสียในลูกสุกร และยังมีการศึกษาผลของใบสมุนไพรรพญาวานรกับสัตว์ชนิดอื่นด้วย ซึ่งจะเห็นได้จากการรายงานของ Dieu *et al.* (2008) ที่ทำการทดลองกับหนู ซึ่งพบว่าผลของใบสมุนไพรรพญาวานรไม่มีพิษต่อเซลล์ของหนู

Dieu and Hoa (2008) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบผลของสมุนไพรรพญาวานรกับยาปฏิชีวนะ Coli-norgent (ประกอบด้วย Colistine sulfate 125,000,000 UI, Norfloxacin 2,000 มิลลิกรัม , Gentamicin sulfate 1,000 มิลลิกรัม Trimethoprim 1,000 มิลลิกรัม และ excipient q.s. 100 กรัม) และ Cotrimxazol (ประกอบด้วย Trimethoprim 160 มิลลิกรัม และ Sulfamethoxazol 800 มิลลิกรัม) ในการรักษาอาการท้องเสียในลูกสุกร โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่กินผงใบชวานง็อกแห้ง ขนาด 1 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม กลุ่มที่ได้รับยา Coli-norgent และ Cotrimxazol ขนาด 0.1 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน พบว่าสมุนไพรรพญาวานรให้ผลดีเทียบเท่ากับยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นจึงสามารถใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะในการรักษาอาการท้องเสียในลูกสุกรได้ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลของสมุนไพรวานรกับยาปฏิชีวนะในการรักษาอาการท้องเสียในลูกสุกร

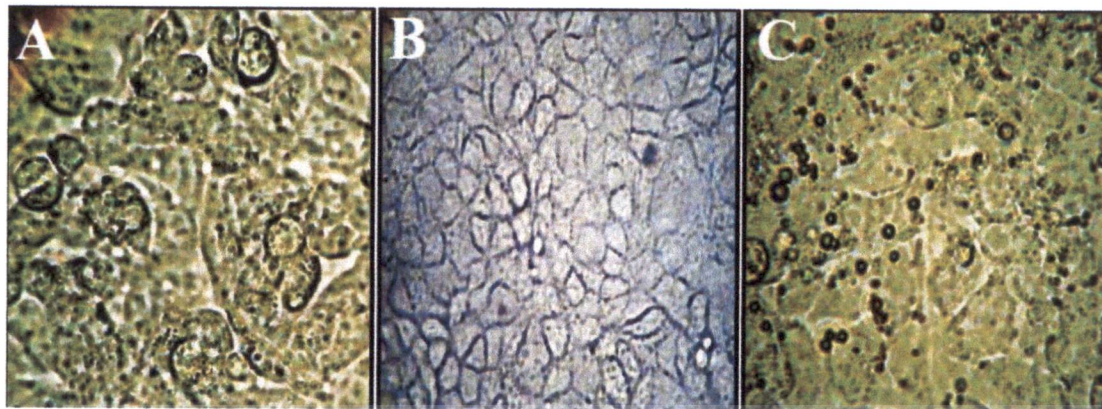
Treatment	No. of piglets	No. of recovered piglets after treatment					
		1 st day		2 nd day		3 rd day	
		No.	%	No.	%	No.	%
P. powder	42	10	23.81a	29	69.05a	39	92.86a
Coli norgent	42	10	23.81a	25	59.52a	38	90.48a
Cotrimxazol	42	15	35.71a	28	66.67a	35	83.33a

ที่มา : Dieu and Hoa (2008)

5. พิษต่อเซลล์

Nam (2003) ได้ทำการทดลองสกัดใบสมุนไพรพญาวัน พบว่าสารสกัดเมทานอล จากใบของสมุนไพรพญาวันเป็นพิษอย่างอ่อนต่อเซลล์มะเร็ง B16 melanoma โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ครึ่งหนึ่ง (GI_{50}) คือ มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และยังได้รายงานผลของการสกัดใบสมุนไพรพญาวันอีกว่า สารสกัดเมทานอลจากใบสมุนไพรพญาวัน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม มีฤทธิ์อย่างอ่อน (น้อยกว่า 25%) ในการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดในเซลล์ human umbilical venous

เบญจพร และคณะ (2551) ได้รายงานถึงการใส่สารสกัดสดจากใบพญาวัน แล้วหาค่า LC_{50} กับเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด (เซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งปากมดลูก) และเซลล์ปกติจากไตของลิง โดยวิธีทดสอบในหลอดแก้ว พบว่า ค่า LC_{50} ของสารสกัดสดจากสมุนไพรชนิดนี้ คือ 0.9 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ต่อเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งปากมดลูก และไม่มีผลต่อเซลล์ปกติจากเซลล์ไตของลิง ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ลักษณะของเซลล์เมื่อได้รับสารสกัดสดจากใบพญาวานร ซึ่ง A คือ เซลล์มะเร็งตับ B คือเซลล์มะเร็งปากมดลูก และ C คือเซลล์ปกติจากเซลล์ไตของลิง
ที่มา : เบญจพร และคณะ (2551)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองย่อยดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบของสมุนไพรพญาพานร เพื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารปฏิชีวนะ

การทดลองที่ 2 หาค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในปลานิล

การทดลองที่ 3 หาผลของใบพญาพานรแห้งบดละเอียดผสมอาหารต่อการเจริญเติบโตในปลานิล

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 : ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นส่วนกิ่งอกหรือใบพญาพานร เพื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารปฏิชีวนะ แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 1.1 การสกัดสมุนไพรพญาพานร (*Pseuderanthemum palatiferrum*) จะใช้ใบสดของสมุนไพรที่มีลักษณะสีเขียวสด สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น อะซิโตน เมทานอล และเอทิลอะซิเตท ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายละ 3 ชั่วโมง

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรพญาพานร (*Pseuderanthemum palatiferrum*) ในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ ตามวิธีของ Zakaria *et al.* (2006) โดยทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี disc diffusion method ที่ 5 ระดับความเข้มข้น ละ 3 ชั่วโมงต่อตัวทำละลายแต่ละชนิด

การดำเนินการทดลอง

1. การสกัดสมุนไพรพญาพานร

1.1 ตัดใบสมุนไพรออกจากต้น โดยนับจากยอดลงมาเป็นใบคู่ที่ 3 ใช้เฉพาะใบที่มีลักษณะเขียวสมบูรณ์

1.2 ใช้ผ้าสะอาดเช็ดทำความสะอาดใบ

1.3 ชั่งน้ำหนักทั้งหมดของใบสด

1.4 ตัดใบให้มีขนาดเล็ก เพื่อเพิ่มพื้นที่ในการสกัด

1.5 นำใบสมุนไพรน้ำหนัก 25 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 125.0 มิลลิเมตร) แล้วใส่ลงในทิมเบล (thimble)

1.6 นำทิมเบลใส่ในชุดสกัดแยกสกัด (extraction unit) ของเครื่องสกัด เติมตัวทำละลายปริมาตร 160 มิลลิเมตร ลงใน soxhlet flask (ภาพที่ 8)

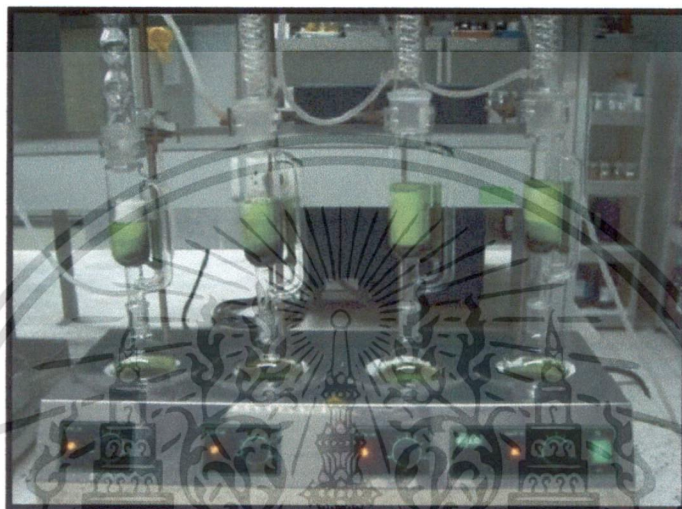
1.7 ต่อชุดแยกสกัดเข้ากับคอนเดนเซอร์ สกัดเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

1.8 แยกเอทิลอะซิเตท และคอนเดนเซอร์ออกจากชุดแยกสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.9 นำทิมเบิลออกมา เทเอาใบสมุนไพรม้วนรอก

1.10 นำสารสกัดที่อยู่ใน soxhlet flask มาระเหยสูญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้เหลือปริมาตร 20 มิลลิลิตร(ภาพที่ 9) จากนั้นใส่ในขวดสีชาแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำสารละลายสกัดไประเหยแห้งเพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 8 เครื่องสกัดแบบแยกสกัด (extraction unit) ที่ใช้ในการสกัดสมุนไพรม้วน



ภาพที่ 9 เครื่อง Rotary evaporator ที่ใช้ในการระเหยตัวทำละลายของสารสกัดสมุนไพรม้วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรพญาพาน ในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ

2.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ โดยวิธี disc diffusion method

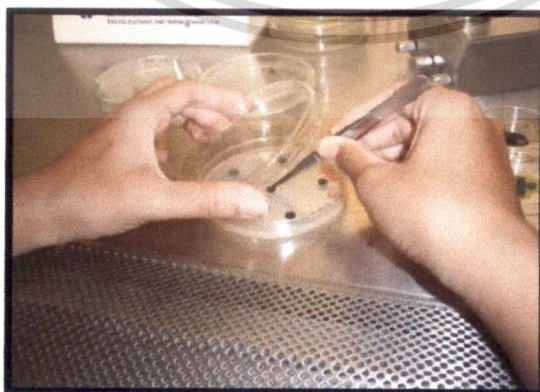
2.1.1 นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาเลี้ยงในอาหารเหลว (Nutrient broth) ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มด้วย Shaking incubator ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อที่เจริญเติบโตเร็ว และ 24 – 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อที่เจริญเติบโตช้า

2.1.2 ทำการปั่นล้างเชื้อแบคทีเรียในสารละลาย NaCl 0.85% ด้วยเครื่อง Vortex mixture และเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 ซึ่งจะมีเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นประมาณ $1 - 2 \times 10^8$ CFU/ml

2.1.3 นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาทำการ spread บน plate อาหาร Muller Hinton Agar (MHA) ทิ้งไว้ 15 นาที

2.1.4 นำแผ่นทดสอบมาตรฐาน (paper disc) ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วหยดสารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ที่เจือจางโดยใช้ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 50, 500, 5,000, 50,000 และ 500,000 ppm ปริมาตร 50 μ l/disc ลงไป พร้อมแผ่นทดสอบควบคุมที่หยดเฉพาะตัวทำละลาย (negative control) และแผ่นยาทดสอบ คือ Chloramphenicol (positive control) ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำต่อเชื้อแบคทีเรีย ทิ้งไว้ให้แห้ง

2.1.5 นำ paper disc วางบน MHA ที่ spread เชื้อแบคทีเรียไว้ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ 31 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (clear zone) บริเวณที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียซึ่งมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร



ภาพที่ 10 การวางแผ่นทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การบันทึกข้อมูล

การทดลองที่ 1.1 การสกัดสมุนไพร จะบันทึกปริมาณและความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้ จากตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น อะซิโตน เมทานอล และเอทิลอะซิเตท

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งและทำลายเชื้อ แบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ

ทำการบันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (clear zone) บริเวณที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียซึ่งมีหน่วย เป็นมิลลิเมตร

การทดลองที่ 2 : หาค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในปลาชนิด

ทำการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรที่ได้จากตัวทำละลายที่เหมาะสมและดีที่สุด จากการทดลองที่ 1 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ (Minimal Inhibitory Concentration : MIC) โดยทำการทดสอบ 2 ซ้ำต่อเชื้อแบคทีเรีย

การดำเนินการทดลอง

1. ละลายสารสกัดสมุนไพร โดยเจือจางในตัวทำละลายที่ใช้สกัด จากนั้นเจือจางต่อด้วย Muller Hinton Broth (MHB)
2. เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ $1 - 2 \times 10^8$ CFU/ml (McFarland No. 0.5) หรือวัดค่าการดูดกลืนแสง OD = 0.08 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร
3. เจือจางเชื้อแบคทีเรียด้วย MHB ให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^7 CFU/ml เพื่อใส่ใน well plate หลุมละ 5 μ l (ประมาณเชื้อ 10^4 CFU/well)
4. เติม 100 μ l ของ MHB ลงในทุกหลุม
5. เติม 100 μ l ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 200,000 ppm ลงใน column ที่ 1 เฉพาะ แถว B, C, F และ G จากนั้นเจือจางแบบ two fold dilution จาก column ที่ 1 ไปเรื่อยๆ โดยใช้ micropipette ไปจนถึง column สุดท้าย (1-12)
6. เติม 100 μ l ของตัวทำละลายลงใน column ที่ 1 เฉพาะแถว A และ E ซึ่งเป็น negative control ซึ่งความเข้มข้นจะเหมือนกับข้อ 7
7. เติม 100 μ l ของยาปฏิชีวนะ Oxytetra cycline ความเข้มข้น 512 ppm ลงใน column ที่ 1 เฉพาะแถว D และ H ซึ่งเป็น positive control
8. นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียในข้อที่ 4 ปริมาตร 5 μ l เติมลงในทุกหลุม
9. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 10 นาทีหลังเตรียมเสร็จ
10. ตรวจสอบดูความขุ่นของเชื้อด้วยตาเปล่า หลังจากบ่มนาน 24-48 ชั่วโมง

11. บันทึก end point เป็นหลุมสุดท้ายที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ (โดยดูที่ความขุ่นซึ่งแสดงว่าเชื้อมีการเจริญเติบโต) = MIC (minimal inhibitory concentration)
12. ในกรณีที่สารสกัดมีสี ไม่สามารถแยกความขุ่นในแต่ละหลุมได้ชัดเจน ให้ใช้ loop เขี่ยเชื้อจุ่มลงในหลุม แล้วเขี่ยเชื้อลงบน MHA เพื่อดูการเจริญเติบโต โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบเชื้อขึ้นจะรายงานผลเป็นค่า MBC (minimal bactericidal concentration)

การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึกหลุมสุดท้ายที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (โดยดูที่ความขุ่นซึ่งแสดงว่ามีเชื้อเจริญเติบโต) อ่านปริมาณของสารสกัดของหลุมนี้เป็นค่า MIC และความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่น้อยที่สุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้บน MHA จะรายงานผลเป็นค่า MBC (minimal bactericidal concentration)

การทดลองที่ 3 : หาผลของสารสกัดต่อการเจริญเติบโตในปลานิล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete randomized design : CRD) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ใช้ปลานิลทดลองขนาดเฉลี่ย 52.6 ± 1.9 กรัม ป่อละ 20 ตัว ดังนี้ ชุดทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุม ปลานิลกินอาหารที่ไม่ผสมไบสมุนไพรวานร ชุดทดลองที่ 2 กลุ่ม ปลานิลกินอาหารที่ผสมไบสมุนไพรวานร 3 เปอร์เซ็นต์ ชุดทดลองที่ 3 ปลานิลที่กินอาหารผสมไบสมุนไพรวานร 5 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนการเตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลามาพักไว้ก่อนทำการทดลอง ในบ่อซีเมนต์ทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด $200 \times 200 \times 50$ เซนติเมตร จำนวน 2 บ่อ ที่ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างทำความสะอาดและเติมน้ำสูงประมาณ 25-30 เซนติเมตร พักไว้ประมาณ 3-5 วัน โดยให้ออกซิเจนตลอด 24 ชั่วโมงผ่านหัวทราย โดยให้อาหารวันละ 2 เวลา (09.00 และ 16.00 นาฬิกา) ถ่ายน้ำทุก 3 วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์เพื่อให้ปลาแข็งแรง จากนั้นเตรียมบ่อเพื่อทำการทดลอง โดยใช้บ่อซีเมนต์ทรงกลมขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 90 เซนติเมตรจำนวน 9 บ่อ ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนเป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ล้างทำความสะอาดและเติมน้ำสูงประมาณ 30-40 เซนติเมตร พักไว้ประมาณ 3-5 วันโดยให้ออกซิเจนตลอด 24 ชั่วโมงผ่านหัวทราย

ขั้นตอนการเตรียมสมุนไพรแห้งบดและอาหารที่ใช้ในการทดลอง

เตรียมสมุนไพรแห้งบดและอาหารที่ใช้ในการทดลอง โดยนำส่วนยอดของต้นสมุนไพรพญาวานร ปักชำลงในกระบะคอนกรีตใส่ทราย รดน้ำ 2 เวลา (11.30 และ 15.45 นาฬิกา ตามลำดับ) เป็นเวลา 30-45 วัน เมื่อต้นเจริญเติบโตจึงตัดบริเวณส่วนยอดของต้นเพื่อนำไปใช้ในการทดลอง ซึ่งและบันทึกน้ำหนักใบสด จากนั้นอบในตู้อบด้วยความร้อน 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักแห้งและบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบดผลไม้ ในส่วนของอาหารที่ใช้ในการทดลองจะเตรียมอาหารใหม่ทุกสัปดาห์ นำอาหารปลาผงสำเร็จรูป ผสมกันกับสมุนไพรพญาวานรบดแห้งให้เข้ากัน โดยสูตรควบคุม ใช้อาหารปลาผง 1,000 กรัม เติมน้ำ 1 ลิตร สูตร 3 เปอร์เซ็นต์ ใช้สมุนไพร 30 กรัม และอาหารปลาผง 970 กรัม เติมน้ำ 1 ลิตร และสูตร 5 เปอร์เซ็นต์ ใช้สมุนไพร 50 กรัม และอาหารปลาผง 950 กรัม เติมน้ำ 1 ลิตร แล้วบดเป็นเส้น ตากให้แห้งในที่ร่มนาน 1 คืน เมื่อแห้งแล้วนำมาหักเป็นชิ้นเล็กๆ ตามขนาดของปากปลาที่เลี้ยงและนำไปวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีของอาหารแต่ละสูตร ซึ่งอาหารปลาผงสำเร็จรูปมีคุณค่าทางโภชนาการดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 คุณค่าทางโภชนาการของอาหารผงสำเร็จรูปที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของโภชนาการอาหาร	เปอร์เซ็นต์
โปรตีน	28.5 %
ไขมัน	4.63 %
เยื่อใย	0.21 %
ความชื้น	7.22 %

ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

1. การหาค่าการเจริญเติบโต นำปลาลงในบ่อคอนกรีตกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 เซนติเมตร จำนวน 9 บ่อๆละ 20 ตัว โดยวัดความยาวและชั่งน้ำหนักปลาทุกตัวทั้ง 9 บ่อ โดยในการทดลองใช้ปริมาณของใบสมุนไพรพญาวานรบดละเอียดผสมในอัตราส่วนทั้งหมด 3 ระดับ ได้แก่ 0 (สูตรควบคุม) 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหาร ให้อาหารผสมกินจนอิ่มวันละ 2 ครั้งเช้าเย็นเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโตโดยสุ่มวัดความยาวและชั่งน้ำหนักปลาทุก 2 สัปดาห์ ทำการคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตอัตราแลกเปลี่ยน (feed conversion ratio, FCR) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, SGR) (Iwama and Tautz, 1981) ในแต่ละช่วงที่สุ่มวัดความยาวและน้ำหนัก ด้วยสูตร

$$\text{อัตราแลกเนื้อ (FCR)} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่ให้}}{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น}}$$

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR)} = \frac{(\ln \text{ น้ำหนักสิ้นสุด} - \ln \text{ น้ำหนักเริ่มต้น}) \times 100}{\text{จำนวนวันที่ทำการทดลอง}}$$

การบันทึกข้อมูล

บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดตาย ค่าการเจริญเติบโตอัตราแลกเนื้อและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ของแต่ละชุดการทดลอง นำมาเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนจากโปรแกรมสำเร็จรูปด้วยวิธี One-Way ANOVA ตามแผนการทดลองแบบ CRD และ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 อภิปรายผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการศึกษาดำทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นฮว่านง็อกหรือใบพญาวานร เพื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารปฏิชีวนะ

1. การศึกษาดำทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสาร

การสกัดสารจากใบสดของสมุนไพรพญาวานรน้ำหนัก 25 กรัม ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น อะซิโตน เมทานอล และเอทิลอะซิเตท ปริมาตร 160 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการสกัดแบบแยกสกัด (extraction unit) จะได้สารสกัดปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อตัวทำละลายแต่ละชนิด ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิดจะแตกต่างกัน โดยสารสกัดสมุนไพรด้วยเมทานอลจะมีความเข้มข้นมากที่สุด คือ 0.0623 ± 0.0029 กรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นน้ำกลั่น อะซิโตน และเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของสารสกัดที่สกัดจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ชนิดตัวทำละลาย	น้ำหนักใบสด (กรัม)	ปริมาตรสารสกัด (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารสกัด (กรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ย
น้ำกลั่น	25	20	0.0539	0.0507 ± 0.0062
	25	20	0.0546	
	25	20	0.0436	
อะซิโตน	25	20	0.0363	0.0386 ± 0.0024
	25	20	0.0382	
	25	20	0.0412	
เมทานอล	25	20	0.0589	0.0623 ± 0.0029
	25	20	0.0637	
	25	20	0.0642	
เอทิลอะซิเตท	25	20	0.0035	0.0034 ± 0.0002
	25	20	0.0036	
	25	20	0.0031	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

สารสกัดจากสมุนไพรพญาวานรเมื่อนำมาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Streptococcus agalactiae* และ *Aeromonas hydrophila* ด้วยวิธี disc diffusion method ที่ระดับความเข้มข้นเชื้อแบคทีเรีย 10^8 CFU/ml พบว่าสารสกัดสมุนไพรด้วยเมทานอลและอะซิโตน เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้โดยสารสกัดด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 25,000 μg /disc จะแสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* มากที่สุด คือ ให้ clear zone ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 18.60 ± 0.10 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (C 30) ที่มีค่าเท่ากับ 21.49 ± 0.30 มิลลิเมตร และความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยสารสกัดจากเมทานอลจะให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุด คือ 25.70 ± 0.10 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (C 30) ที่มีค่าเท่ากับ 33.05 ± 0.56 มิลลิเมตร ซึ่งจะเห็นได้ว่า สารสกัดสมุนไพรด้วยเมทานอลจะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ได้ดีที่สุด ดังตารางที่ 11 และ 12 โดยเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* จะมีความไวต่อสารสกัดจากสมุนไพรพญาวานรมากกว่าเชื้อ *S. agalactiae* ซึ่งจากการรายงานของ Giang (2008) พบว่าสารสกัดจากเอทิลอะซิเตทและบิวทานอลจากใบสมุนไพรพญาวานร จะมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย 10 ชนิด โดยเฉพาะการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทจะมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่พบในมนุษย์ คือ *Salmonella typhi* 158 และเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องร่วง (*Shigella flexneri*) โรคบิด (*Proteus*) โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ซึ่งทำให้กระเพาะปัสสาวะอักเสบ (*Pseudomonas*) และ *E. coli* ได้ดี และจากการทดลองของเบญจพร และคณะ (2551) รายงานว่า สารสกัดหยาบจากใบพญาวานรที่ความเข้มข้น 1:10 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella spp.* และ *E. coli* ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone เท่ากับ 25 มิลลิเมตร และ 20 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่สารสกัดจาก เอทิลอะซิเตทไม่มีความสามารถในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* และยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* ได้น้อยกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล

ตารางที่ 7 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (C 30)

ชนิดตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของสารสกัด ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)				
		C 30	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
น้ำกลั่น	0	21.6	-	-	-	-
	2.5	21.2	-	-	-	-
	25	21.5	-	-	-	-
	250	21.4	-	-	-	-
	2,500	21.0	-	-	-	-
	25,000	21.2	-	-	-	-
อะซิโตน	0	21.2	-	-	-	-
	2.5	21.0	-	-	-	-
	25	21.6	-	-	-	-
	250	21.8	-	-	-	-
	2,500	21.5	-	-	-	-
	25,000	21.0	10.2	10.3	10.5	10.33 ± 0.15
เมทธานอล	0	21.3	-	-	-	-
	2.5	21.8	-	-	-	-
	25	21.0	-	-	-	-
	250	21.7	-	-	-	-
	2,500	21.7	14.3	14.2	14.4	14.30 ± 0.10
	25,000	21.9	18.6	18.5	18.7	18.60 ± 0.10
เอทิลอะซิเตท	0	21.7	-	-	-	-
	2.5	21.6	-	-	-	-
	25	21.8	-	-	-	-
	250	21.6	-	-	-	-
	2,500	21.7	-	-	-	-
	25,000	21.3	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 ความสามารถของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (C 30)

ชนิด ตัวทำละลาย	ความเข้มข้น ของสารสกัด (μg /disc)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)				
		C 30	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
น้ำกลั่น	0	33.3	-	-	-	
	2.5	33.2	-	-	-	
	25	32.9	-	-	-	
	250	33.1	-	-	-	
	2,500	33.4	8.5	8.4	8.6	8.50 \pm 0.10
	25,000	32.8	10.3	10.2	10.5	10.33 \pm 0.15
อะซิโตน	0	32.3	-	-	-	
	2.5	32.5	-	-	-	
	25	32.1	-	-	-	
	250	33.4	8.5	8.4	8.4	8.43 \pm 0.05
	2,500	32.7	9.2	9.2	9.3	9.23 \pm 0.05
	25,000	33.1	12.3	12.4	12.5	12.40 \pm 0.10
เมทธานอล	0	32.8	-	-	-	
	2.5	32.0	-	-	-	
	25	33.9	-	-	-	
	250	32.5	14.3	14.2	14.5	14.33 \pm 0.15
	2,500	33.8	21.6	21.5	21.7	21.60 \pm 0.14
	25,000	33.4	25.7	25.8	25.6	25.70 \pm 0.10
เอทิลอะซิเตท	0	32.9	-	-	-	
	2.5	33.1	-	-	-	
	25	33.8	-	-	-	
	250	33.4	-	-	-	
	2,500	33.7	10.3	10.5	10.8	10.53 \pm 0.25
	25,000	32.1	12.6	12.7	12.5	12.60 \pm 0.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการศึกษาค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในปลานิล

เมื่อนำสารสกัดสมุนไพรด้วยเมทธานอลมาหระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ คือ *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* จำนวน 2 ครั้ง พบว่าสารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยเมทธานอล มีค่า MIC เท่ากับ 25,000 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดและเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ Oxytetracycline (positive control) พบว่า มีค่า MIC เท่ากับ 64 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* และ 32 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ดังตารางที่ 9 และพบว่า สารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยเมทธานอล มีค่า MBC เท่ากับ 50,000 และ 25,000 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ Oxytetracycline (positive control) พบว่า มีค่า MBC เท่ากับ 64 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* และ 128 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ดังตารางที่ 10 ซึ่งจะเห็นว่าค่า MIC มีค่าค่อนข้างสูงทั้งนี้อาจเนื่องจากการสกัดจากใบสดจึงมีคลอโรฟิลล์รวมอยู่ด้วย จึงทำให้มีค่าความเข้มข้นสูง

ตารางที่ 9 ค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรด้วยตัวทำลายเมทธานอลเปรียบเทียบกับ Oxytetra cycline ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 512 ppm (positive control) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* และ *S. agalactiae*

	ความเข้มข้นของสารสกัดและออกซีเตตราไซคลิน (ppm)											
	200,000	100,000	50,000	25,000	12,500	6,250	3,125	1,562.5	781.3	390.6	195.3	97.6
	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
Negative control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>					+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>					+	+	+	+	+	+	+	+
Positive control							+	+	+	+	+	+
Negative control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. agalactiae</i>					+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. agalactiae</i>					+	+	+	+	+	+	+	+
Positive control					+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ เครื่องหมาย + หมายถึง เกิดความขุ่น แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโต

ตารางที่ 10 ค่า MBC ของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรด้วยตัวทำลายเมทาบอลเปรียบเทียบ กับ Oxytetracycline ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 512 ppm (positive control) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* และ *S. agalactiae*

	ความเข้มข้นของสารสกัด(ppm)											
	200,000	100,000	50,000	25,000	12,500	6,250	3,125	1,562.5	780.1	390.6	195.3	97.6
	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
Negative control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>					+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. hydrophila</i>					+	+	+	+	+	+	+	+
Positive control					+	+	+	+	+	+	+	+
Negative control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. agalactiae</i>					+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. agalactiae</i>					+	+	+	+	+	+	+	+
Positive control					+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ เครื่องหมาย + หมายถึง มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

ผลของสารสกัดต่อการเจริญเติบโตในปลานิล

1. ผลของสารสกัดต่อการเจริญเติบโต

ในการทดลองได้นำอาหารที่ใช้ในการทดลองไปทำการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร ซึ่งได้ค่าตามตารางที่ 11 โดยอาหารทุกสูตรมีค่าโปรตีนและไขมัน แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ค่าเยื่อใยและ เถ้าจะมีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณของสมุนไพรที่ผสม

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์โปรตีน ไขมัน ความชื้น เยื่อใย และเถ้าของอาหารที่ใช้ทำการทดลอง

สูตรอาหาร	โปรตีน %	ไขมัน %	เยื่อใย %	เถ้า %
กลุ่มควบคุม	28.50 ± 0.22 ^a	4.63 ± 1.31 ^a	0.21 ± 0.13 ^a	7.87 ± 0.18 ^a
พญาวานร 3%	28.67 ± 0.03 ^a	4.24 ± 0.63 ^a	0.38 ± 0.06 ^b	8.77 ± 0.22 ^b
พญาวานร 5%	28.58 ± 0.39 ^a	3.97 ± 0.07 ^a	0.62 ± 0.01 ^c	8.75 ± 0.09 ^b

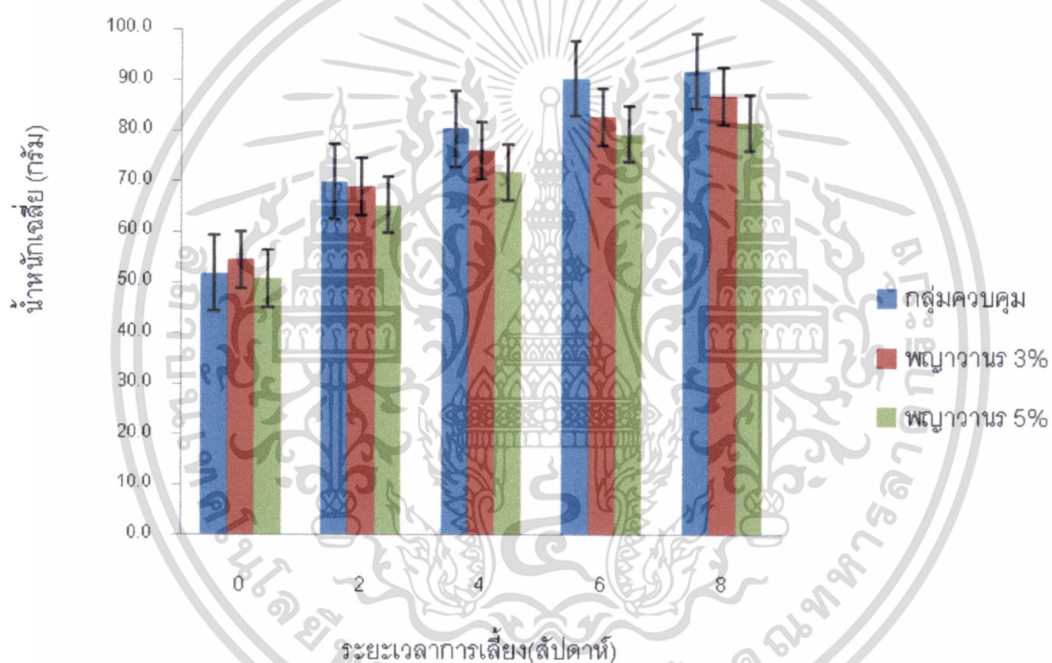
หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P < 0.05

เมื่อทดลองให้อาหารปลาและชั่งวัดปลาเพื่อหาค่าการเจริญเติบโตที่เวลา 2 4 6 และ 8 สัปดาห์ พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 จนถึงสัปดาห์ที่ 8 ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ไม่ได้ผสมใบพญาวานรมี

น้ำหนักและความยาวเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับไบพัญจาวานร 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยแตกต่างจากระดับ 5 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 12 (ภาพที่ 11) และ ตารางที่ 13 (ภาพที่ 12)

ตารางที่ 12 น้ำหนักเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์ของการทดลอง (หน่วยเป็นกรัม)

week	0	2	4	6	8
กลุ่มควบคุม	51.85 ± 1.23 ^a	70.01 ± 2.65 ^b	80.48 ± 0.77 ^b	90.47 ± 3.37 ^b	92.01 ± 6.19 ^b
พญาวานร 3%	54.49 ± 3.83 ^b	68.98 ± 5.57 ^{ab}	76.16 ± 6.44 ^{ab}	82.80 ± 6.42 ^a	86.98 ± 7.78 ^{ab}
พญาวานร 5%	50.74 ± 1.41 ^a	65.35 ± 4.77 ^a	71.88 ± 6.09 ^a	79.42 ± 7.61 ^a	81.74 ± 6.90 ^a

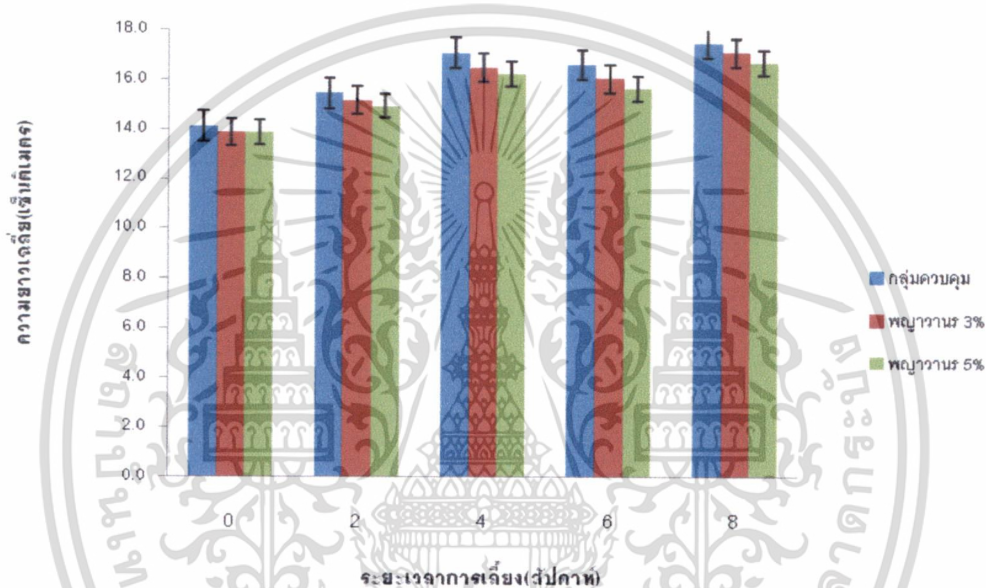


ภาพที่ 11 น้ำหนักเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์ของการทดลอง (หน่วยเป็นกรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 ความยาวเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์ของการทดลอง (หน่วยเป็นเซ็นติเมตร)

week	0	2	4	6	8
กลุ่มควบคุม	14.11 ±0.08 ^a	15.46 ±0.06 ^b	17.08 ±0.10 ^a	16.61 ±0.06 ^a	17.47 ±0.40 ^b
พญาวานร 3%	13.87 ±0.09 ^a	15.16±0.12 ^{ab}	16.49 ±0.45 ^b	16.04 ±0.39 ^b	17.09±0.57 ^{ab}
พญาวานร 5%	13.88 ±0.11 ^a	14.94 ± 0.44 ^a	16.23 ± 0.49 ^b	15.65 ± 0.71 ^b	16.68 ± 0.48 ^a



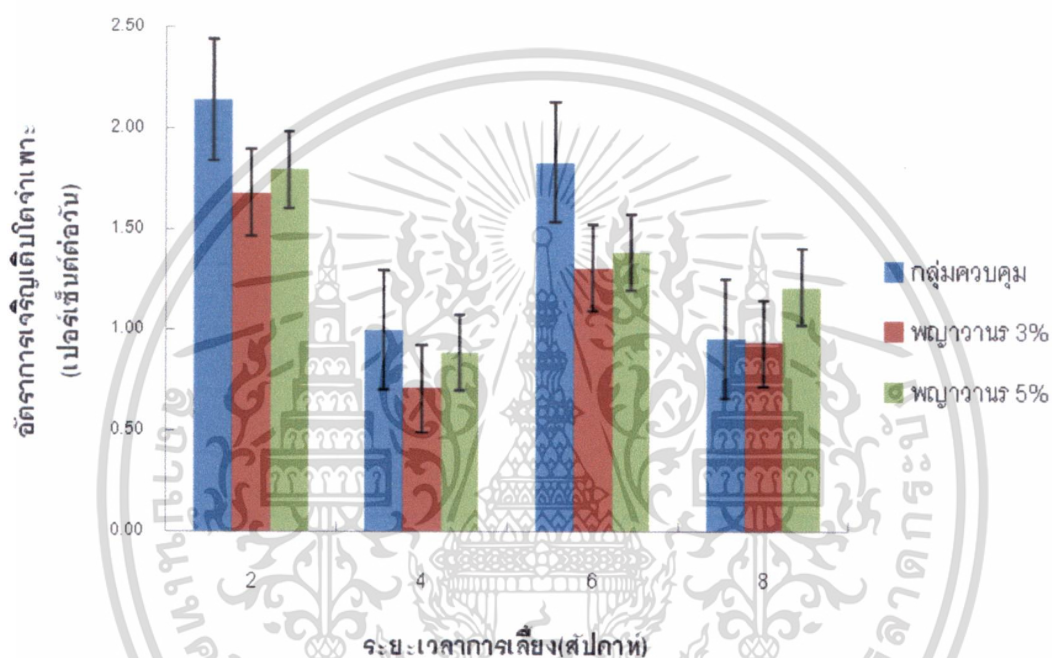
ภาพที่ 12 ความยาวเฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์ของการทดลอง (หน่วยเป็นเซ็นติเมตร)

ในขณะที่ค่าการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) ในกลุ่มที่ไม่ได้รับใบพญาวานรมีค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 ส่วน แต่ในสัปดาห์ที่ 4 ถึง 8 เริ่มลดลง มีค่า 2.14 ± 0.10 1.00 ± 0.21 1.83 ± 0.31 และ 0.96 ± 0.37 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมใบพญาวานร 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดที่ เวลา 8 สัปดาห์ มีค่า 1.21 ± 0.36 ซึ่งในทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทุกช่วงสัปดาห์ ดังตาราง 14 และ ภาพที่ 13 ส่วนค่าอัตราแลกเนื้อ (FCR) ที่เวลา 8 สัปดาห์ ในกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารผสมสมุนไพรพญาวานร ต่ำสุด มีค่า 1.45 แสดงถึงการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีที่สุด ลำดับต่อมาเป็นกลุ่มได้รับอาหารผสมสมุนไพรพญาวานร 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่า 1.68 และกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสมุนไพรพญาวานร 3 เปอร์เซ็นต์ มีค่า 1.94 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังตาราง 15 และ ภาพที่ 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 ค่าอัตราการการเจริญเติบโตจำเพาะในแต่ละช่วงสัปดาห์ (หน่วยเป็นกรัม)

	2 สัปดาห์	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์
กลุ่มควบคุม	2.14 ± 0.10^a	1.00 ± 0.21^a	1.83 ± 0.31^a	0.96 ± 0.37^a
พญาวานร 3%	1.68 ± 0.16^a	0.71 ± 0.17^a	1.31 ± 0.14^a	0.93 ± 0.30^a
พญาวานร 5%	1.80 ± 0.49^a	0.88 ± 0.23^a	1.38 ± 0.24^a	1.21 ± 0.36^a

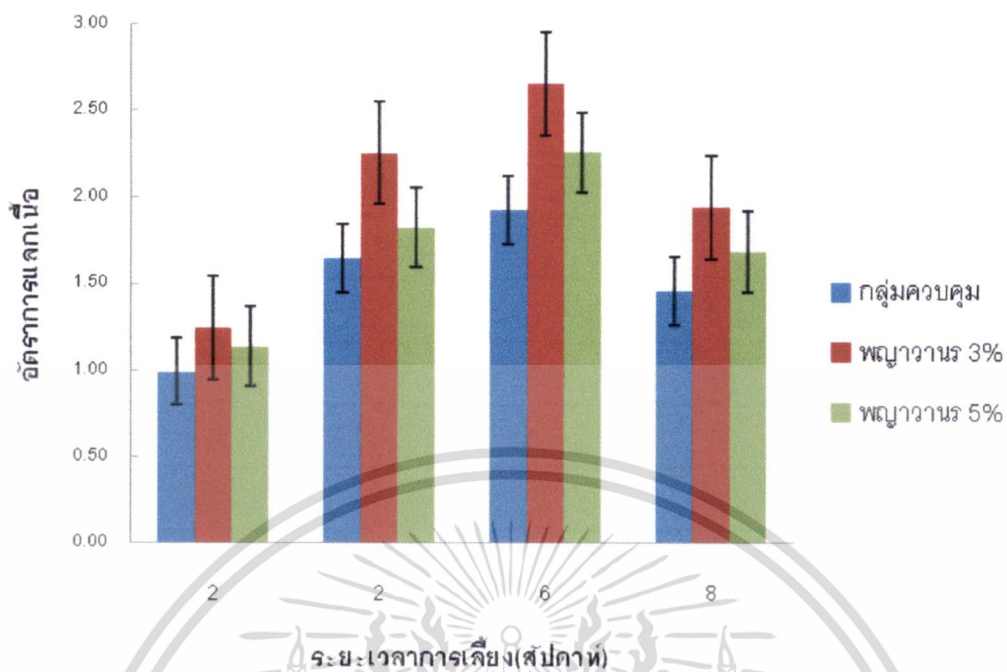


ภาพที่ 13 ค่าอัตราการการเจริญเติบโตจำเพาะในแต่ละช่วงสัปดาห์ (หน่วยเป็นกรัม)

ตารางที่ 15 ค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อในแต่ละช่วงสัปดาห์

	2 สัปดาห์	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์
กลุ่มควบคุม	0.99 ± 0.10^a	1.64 ± 0.27^a	1.92 ± 0.70^a	1.45 ± 0.26^a
พญาวานร 3%	1.24 ± 0.15^a	2.25 ± 0.43^a	2.65 ± 0.22^a	1.94 ± 0.13^a
พญาวานร 5%	1.14 ± 0.29^a	1.82 ± 0.48^a	2.26 ± 0.66^a	1.68 ± 0.37^a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 14 ค่าอาหารการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อในแต่ละช่วงสัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ

การสกัดสมุนไพรพญาวานรที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น อะซิโตน เมทานอล และเอทิลอะซิเตท ด้วยวิธีการสกัดแบบแยกสกัด (extraction unit) พบว่า สารสกัดสมุนไพรด้วยเมทานอลจะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 25,000 µg /disc ซึ่งความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* ให้เส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone มีค่า 18.60 ± 0.10 มิลลิเมตร และ 25.70 ± 0.10 มิลลิเมตร ตามลำดับ และค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรด้วยเมทานอลต่อทั้ง 2 เชื้อ มีค่าเท่ากับ 25,000 ppm และค่า MBC เท่ากับ 50,000 ppm 25,000 ppm. ตามลำดับแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. agalactiae* มีความต้านทานต่อสารสกัดได้ดีกว่าเชื้อ *A. hydrophila*

จากการทดลองเลี้ยงปลาฉีดด้วยอาหารผสมสมุนไพรพญาวานรชนิดทั้ง 3 สูตร คือ อาหารปกติ (ควบคุม) อาหารผสมสมุนไพรพญาวานร 3 เปอร์เซ็นต์และ อาหารผสมสมุนไพรพญาวานร 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มควบคุมมีการเจริญเติบโตดีที่สุด มีน้ำหนักเฉลี่ย 92.01 ± 6.19 กรัมแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม 3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าอัตราแลกเนื้อ (FCR) และค่าการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) ไม่มีความแตกต่างกันทุกกลุ่มการทดลอง จึงสรุปได้ว่าสารสกัดสมุนไพรพญาวานรด้วยเมทานอลมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ แต่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตจึงควรมีการศึกษาผลของสมุนไพรต่อระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อเพิ่มความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดที่ได้มีน้ำหนักมากและมีสีเขียวเข้มของคอลโรฟิล ทำให้ค่า MIC มีค่าสูง จึงควรหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมต่อไป
2. ในการทดลองนำไปเลี้ยงปลาพบว่าที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์กลิ่นของอาหารมีความชวนกินน้อยลง ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปควรมีการปรับปรุงอาหารให้สามารถกระตุ้น หรือเพิ่มความอยากกินอาหารในปลาเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโต เช่น การใช้สารสกัดฉีดพ่น หรือเคลือบน้ำมันปลา ฯลฯ

เอกสารอ้างอิง

- เบญจพร ศรีสุวรรณาศ อาตุลย์ จงรักษ์ นิคม จันทรมังกร และ อนุพงษ์ ทิมอุบล. 2551 . "ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และต้านมะเร็งของสมุนไพรพญาवानร(ฮวานจ็อก)". [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.scisoc.or.th/stt/35/sec_p/paper/STT35_P_P0010.pdf
- Abutbul,S., A. Golan-Goldhirsh, O. Barazani, and D. Zilberg. 2004. Use of *Rosmarinus officinaris* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis sp.*). *Aquaculture*. 9 : 97-105.
- Christybapita, D., M. Divyagnaneswari and R. D. Michael. 2007. Oral Administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non - specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 10 : 249-259.
- Dieu, H. K., Loc, C.B., Yamasakt, S. and Hirata, Y. 2006. " The effects of *Pseuderan themumpalatiferum*, a new medicinal plant, on growth performances and diarrhea of piglets " .JARQ40 (1) : 85 – 91.
- Dieu, H. K. and Hoa, T. V. 2008. Efficacy of *Pseuderanthemum palatiferum* powder against Diarrhea of piglets. [Online].Available :[http://www.ctu.edu.vn/institutes/mdi/jircas/JIRCAS/research/workshop/pro03/C12-Livestock%2012%20\(Ms.%20Dieu\).pdf](http://www.ctu.edu.vn/institutes/mdi/jircas/JIRCAS/research/workshop/pro03/C12-Livestock%2012%20(Ms.%20Dieu).pdf)
- Dieu, H. K., Loc, C. B., Yamasakt, S. and Hirata, Y. 2005. " The Ethnobotanical and botanical study on *Pseuderanthemum palatiferumas* a new medicinal plant in the Mekong Delta of Vietnam". JARQ 39 (3) : 191 – 196
- Divyagnaneswari, M., D. Christybapita, and R. D. Michael. 2006. Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum* left fraction. *Fish & Shellfish Immunology* 12 : 840-852.
- Giang, P. M. 2008. " Study on anti - oxydative activities and preliminary investigation onantibacterial, antifungal of *Pseuderanthemum palatiferum* extracted fraction rich in flavonoides from leavesof (Nees) Radlk". [Online].Available :<http://www.english.vista.gov.vn>.

- Hung, N. V., Tuan, L. A. and Chien, N. Q. 2008. " Studyon chemical constituents of *Pseuderanthemum platiferum* (Nees) Radlk" . [Online]. Available :<http://www.english.vista.gov.vn>.
- Nam, N. H., H. M. Kim, K. H. Bae and B. Z. Ahn. 2003. Inhibitory Effects of Vietnamese Medicinal Plants on Tube-like Formation of Human Umbilical Venous Cells. *Phytotherapy Research* (17) : 107–111.
- Shen, Y. Shen, S. Goldsmith-Fischman, H. S. Atreya, T. Acton, L. Ma, R. Xiao, B. Honig, G. T. Montelione and T. Szyperski. 2005. NMR structure of the 18 kDa protein CC1736 from *Caulobacter crescentus* identifies a member of the START domain superfamily and suggests residues mediating substrate specificity *Proteins*. Wiley-Liss Inc 58 : 747–750.
- Sanja, M. I., S. D. Đakovic, J. H. Cvejic, M. G. Antov and Z. P. Zekovic. 2005. Bioconversion of Apigenin-7-O- β - glucose in aqueous two phase system. *APTEFF36* : 1-266.
- Zakaria, Z. A., M. N. Somchit, H. Zaiton, A. M. Mat, M. R. Sulaiman, W. O. Farah, R. Nazaratulmawarina and C. A. Fatimah. 2006. The *in vitro* antibacterial activity of *Corchorus olitorius* extracts. *International Journal of Pharmocology* 2 (2) : 213 – 215.