สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลาของสารสกัดสมุนไพรพญาวานร (*Pseuderanthemum palatiferum*)

Antibacterial activity of *Pseuderanthemum palatiferum* extract on pathogenic bacteria in fish

T104608

โดย

นางสาวภัทราภรณ์ สีบสำราญ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....104608
วัน,เดือน,ปี.....- 5 พ.ย. 2552

.b.....
.i.....

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร 10520

ปีการศึกษา 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลา
ของสารสกัดสมุนไพรพญาวานร (*Pseuderanthemum palatiferum*)
Antibacterial activity of *Pseuderanthemum palatiferum* extract
on pathogenic bacteria in fish

ชื่อนักศึกษา นางสาว ภัทราภรณ์ สืบสำราญ

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปวีณา ทวีกิจการ
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย
อาจารย์ที่ปรึกษา .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปวีณา ทวีกิจการ)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปวีณา ทวีกิจการ)
หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
วันที่ 25 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลา ของสารสกัดสมุนไพรพญาวานร (*Pseuderanthemum palatiferum*)

Antibacterial activity of *Pseuderanthemum palatiferum* extract on pathogenic bacteria in fish

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น อะซิโตน เมทธานอล และเอทิลอะซิเตท ด้วยวิธีการสกัดแบบแยกสกัด (extraction unit) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ 2 ชนิด คือ *Streptococcus agalactiae* และ *Aeromonas hydrophila* ด้วยวิธี disc diffusion method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Ager (MHA) พบว่า สารสกัดสมุนไพรพญาวานรที่สกัดด้วยเมทธานอลจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 500,000 µg/disc การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรที่สกัดด้วยเมทธานอลต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* มีค่าเท่ากับ 25,000 ppm ส่วนความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) *Aeromonas hydrophila* เท่ากับ 25,000 ppm และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* เท่ากับ 50,000 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

การทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. ปวีณา ทวีกิจการ และ ผศ.ดร. สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษา เป็นอย่างยิ่งที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนดูแลเอาใจใส่และผลักดันให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่านที่ให้ความรู้และอบรมสั่งสอนข้าพเจ้าตลอดมา

ขอขอบคุณคุณบุปผา จงพัฒน์ คุณนพพล เผ่าพนัส และเจ้าหน้าที่ภาควิชาการประมงทุกท่านที่กรุณาให้ความสะดวกและคำแนะนำในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และเทคนิคต่างๆในการทำปัญหาพิเศษ

ขอบคุณเพื่อนๆประมงรุ่นที่ 12 เพื่อนที่คอยช่วยเหลือ ห่วงใยและเป็นกำลังใจให้กันตลอด 4 ปีที่อยู่ด้วยกันมา

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ป้าและน้าที่ให้กำลังทรัพย์ในการศึกษา ให้การเลี้ยงดูและอบรมบ่มนิสัยให้ข้าพเจ้าเป็นคนดีของสังคม ขอบใจน้องชายของข้าพเจ้าที่คอยให้กำลังใจและเป็นเด็กดี

สุดท้ายนี้ประโยชน์ของการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ ขอมอบให้แก่ผู้ที่มีพระคุณที่สุดในชีวิตของข้าพเจ้า คือ บิดา และมารดา

นางสาวภัทราภรณ์ สืบสำราญ

เมษายน 2552

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	13
ผลการทดลองและวิจารณ์	19
สรุป	24
เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณใบของสมุนไพรพญาวานรที่กินต่อวัน เพื่อป้องกันและรักษาโรคในคน	5
2	องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรพญาวานร	6
3	ผลของสมุนไพรพญาวานรกับยาปฏิชีวนะในการรักษาอาการท้องเสียในลูกสุกร	8
4	ความเข้มข้นของสารสกัดที่สกัดจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ	19
5	ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (C 30)	21
6	ความสามารถของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (C 30)	22
7	ค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรด้วยตัวทำละลายเมทธานอล เปรียบเทียบกับ Oxytetra cycline ที่ระดับความเข้มข้น 512 ppm (positive control) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* และ *S. agalactiae*	23
8	ค่า MBC ของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรด้วยตัวทำละลายเมทธานอล เปรียบเทียบกับ Oxytetra cycline ที่ระดับความเข้มข้น 512 ppm (positive control) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* และ *S. agalactiae*	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะใบของสมุนไพรฮวานง็อกหรือพญาวานร ซึ่งมีสีเขียวเข้มและมัน	4
2	การขยายพันธุ์สมุนไพรพญาวานรด้วยวิธีการปักชำ	4
3	ลักษณะรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก	9
4	อาการของสัตว์น้ำเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. พบการเกิดแผลบริเวณผิวหนัง (A) และตกเลือดในช่องท้อง (B)	9
5	ลักษณะรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ	10
6	ลักษณะโคโลนีสีเหลืองของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	11
7	อาการของสัตว์น้ำเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* พบเกิดแผลและการบวมช้ำบริเวณรอบปาก (A) เกิดแผลตามลำตัวและครีบหางกร่อน (B) เกล็ดตั้ง (C) และท้องบวมน้ำ (D)	12
8	เครื่องสกัดแบบแยกสกัด (extraction unit) ที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร	15
9	เครื่อง Rotary evaporator ที่ใช้ในการระเหยตัวทำละลายของสารสกัดสมุนไพร	15
10	การวางแผ่นทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพผนวกที่		หน้า
1	การระเหยตัวทำละลายในการสกัดสมุนไพรด้วยเครื่อง Rotary evaporator	27
2	แผ่นทดสอบมาตรฐานที่หยดสารสกัดสมุนไพร	27
3	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 500,000 µg/disc ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* เปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (P) (N คือ Negative control)	28
4	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 500,000 µg/disc ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* เปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (P) (N คือ Negative control)	28
5	การเจริญของเชื้อแบคทีเรียใน 96 U shaped well plate ที่ใช้ในการศึกษาหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดสมุนไพร	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกำลังเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายและเติบโตเป็นธุรกิจขนาดใหญ่ แต่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นจะประสบความสำเร็จได้จะต้องมีระบบการเลี้ยงและการจัดการที่ดี ซึ่งการเกิดโรคกับสัตว์น้ำนั้นเป็นสาเหตุของความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ ได้แก่ สกุล *Aeromonas* , *Escherichia* , *Pseudomonas* , *Plesiomonas* , *Micrococcus* , *Staphylococcus* และ *Streptococcus* โดยทำให้สัตว์น้ำตายเป็นจำนวนมาก จึงต้องหาแนวทางการป้องกันและรักษาที่เหมาะสม การใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับวิตามินในการป้องกันเป็นวิธีที่ได้ผลดีและนิยมอย่างมาก ซึ่งยาปฏิชีวนะนั้นเป็นสารเคมีสังเคราะห์ขึ้นที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งแล้วไปมีผลทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และยาปฏิชีวนะนั้นก็มีมากมายหลายประเภทซึ่งมีการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน โดยยาปฏิชีวนะที่ดีนั้นจะต้องมีการออกฤทธิ์ที่จำเพาะต่อเชื้อและไม่ทำลายเซลล์ร่างกายของสัตว์น้ำ อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะนั้นจะมีข้อจำกัดหลายอย่างและมีราคาที่ค่อนข้างแพง เมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานก็จะเกิดการสะสมและตกค้างของสารเคมีเพราะต้องรอเวลาในการสลายตัว และเกิดการดื้อยาของเชื้อ ซึ่งมีผลกระทบโดยตรงต่อสัตว์น้ำและผู้บริโภค จึงมีผู้ศึกษาหาสารสกัดจากธรรมชาติไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสมุนไพรชนิดต่างๆ เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งเป็นทางเลือกที่เป็นที่ยอมรับ

สมุนไพร *Pseuderanthemum palatiferum* วงศ์ *Acanthaceae* ที่คนส่วนใหญ่รู้จักกันในชื่อว่า พญาวานร หรือ ฮวานง็อก เป็นสมุนไพรที่มีต้นกำเนิดมาจากประเทศเวียดนาม ปัจจุบันสามารถปลูกได้เองในประเทศไทย ลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-3 เมตร ลำต้นเป็นรูปสี่เหลี่ยม เปลือกต้นผิวเรียบสีเขียว ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม รูปใบหอก ขอบใบเรียบ มีเส้นแขนงใบ 8-11 คู่ ขยายพันธุ์โดยปักชำลงดิน ซึ่งกำลังเป็นที่นิยมกันมากในการทำวิจัยถึงองค์ประกอบทางเคมีและผลกระทบต่อมนุษย์และสัตว์ โดยผลจากการวิจัยนั้นยืนยันได้ว่า สมุนไพรพญาวานรนี้มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย รักษาการอักเสบและเสริมระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์บกและในมนุษย์ จึงมีความเป็นไปได้ว่า การใช้สารสกัดจากสมุนไพรพญาวานรนี้ สามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันและต้านทานเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำ เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะเนื่องจากมีผลกระทบโดยตรงต่อสัตว์น้ำ และการส่งออกสัตว์น้ำของไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์และเป้าหมาย

1. เพื่อศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสมุนไพรพญาวานร
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรพญาวานร ที่สามารถยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ
3. เพื่อศึกษาหาระดับความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรพญาวานร ในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงตัวทำละลายและระดับความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรจากตัวทำละลายที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในสัตว์น้ำ
2. สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในระบบการจัดการในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
3. เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรใช้สารสกัดจากธรรมชาติที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

สมุนไพรพญาวานร หรือ ฮวานง็อก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. ชื่อพ้อง *Eranthemum palatiferum* Nees. เป็นสมุนไพรที่กำลังนิยมกันในปัจจุบัน เนื่องจากมีการวิจัยแล้วสามารถนำมาใช้รักษาโรคต่างๆมากมาย ซึ่งจริงๆ แล้วพญาวานร ไม่ใช่พืชไทย แต่มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ประเทศเวียดนาม เป็นพืชใหม่ถูกค้นพบในป่าแถบตอนเหนือของประเทศเวียดนามเมื่อประมาณปี ค.ศ.1990 ต่อมาได้มีการปลูกขยายใช้เป็นพืชสมุนไพรกระจายไปทั่วประเทศ (Dieu *et al.* 2005) และยังมีรายงานการวิจัยถึงองค์ประกอบทางเคมี เช่น flavonoid , β-sitosterol และยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอีกด้วย

อนุกรมวิธาน (Taxonomy) ของสมุนไพรพญาวานร

อาณาจักร Plantae
ไฟลัม Monocotyledon
อันดับ Sapindales
วงศ์ Acanthace
สกุล *Pseuderanthemum*
สปีชี่ส์ *P. palatiferum*

ลักษณะทั่วไปของสมุนไพรพญาวานร

สมุนไพรพญาวานรเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก 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 ขยายพันธุ์ได้ง่ายด้วยวิธีการปักชำ (ภาพที่ 1,2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 1 ลักษณะใบของสมุนไพรฮวานง็อกหรือพญาวานร ซึ่งมีสีเขียวเข้มและมัน

ที่มา : http://th.wikipedia.org/ (December, 2008)

ภาพที่ 2 การขยายพันธุ์สมุนไพรพญาวานรด้วยวิธีการปักชำ

สรรพคุณพื้นบ้านของสมุนไพรพญาวานร

ในประเทศเวียดนามจะใช้ใบพญาวานรในการรักษาโรคต่างๆ ในคน ได้แก่ ท้องเสีย ความดันโลหิตสูง ไขข้ออักเสบ คออักเสบ กระเพาะอาหารอักเสบ เนื้องอก ลำไส้อักเสบ ตกเลือด รักษาบาดแผล ท้องผูก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคในสัตว์เลี้ยง ได้แก่ แก้ท้องเสียในสุกรและสุนัข (Dieu *et al.* 2005 , 2006 ; Dieu and Hoa , 2008; Giang , 2008) โดยอัตราการบริโภคจะขึ้นอยู่กับประเภทของโรคต่างๆ ดังตารางที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ปริมาณใบของสมุนไพรพญาวานรที่กินต่อวัน เพื่อป้องกันและรักษาโรคในคน

โรค	ความถี่ (ครั้งที่กิน)	ปริมาณใบที่กินต่อวัน			
		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

ใบของพญาวานรประกอบด้วย flavonoid (Giang , 2008) , β - sitosterol , phytol , 3–O-D (β – glucopyranosyl) – sitosterol , สารผสมระหว่าง stigmasterol และ poriferasterol , n-pentacosan-1-ol และสารผสมระหว่าง kaemperol-3-methyl ether–7-O-β-glucoside และ apigenin–7-O-β-glucoside , 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 และเกลือแร่ ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และทองแดง (Dieu *et al.* 2005) (ตารางที่ 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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
เมทไธโอนีน	29.7
ทีโอนีน	61.0

ที่มา : Dieu *et al.* (2005)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรพญาวานร

1. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท และบิวทานอลจากใบสมุนไพรพญาวานร ซึ่งมีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบหลัก 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)

3. ฤทธิ์ต้านเชื้อรา

ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท และบิวทานอลจากใบสมุนไพรพญาวานร จะมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Candida albicans* และ *Candida stellatoides* ซึ่งทำให้เกิดโรคในช่องปาก (Giang , 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ผลต่อสัตว์

Dieu *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาผลของสมุนไพรพญาวานรที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และแก้ท้องเสียในลูกสุกรเล็ก 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 ลูกสุกรที่กินสมุนไพรพญาวานร จะมีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มควบคุม จำนวนเม็ดเลือดแดง packed cell และฮีโมโกลบินสูงกว่า ไม่พบการตายและการท้องเสีย เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 และ 3 ลูกสุกรที่กินใบสมุนไพรพญาวานร จะมีน้ำหนักตัว จำนวนเม็ดเลือดแดง packed cell และฮีโมโกลบินมากกว่ากลุ่มควบคุม ลูกสุกรมีอาการท้องเสียและตายน้อยกว่า โดยผงแห้งที่ขนาด 0.2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมจะให้ผลที่ดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตและแก้ท้องเสียในลูกสุกร และยังมีการศึกษาผลของใบสมุนไพรพญาวานรกับสัตว์ชนิดอื่นด้วย ซึ่งจะเห็นได้จากการรายงานของ Dieu *et al.* (2008) ที่ทำการทดลองกับหนู ซึ่งพบว่าผลของใบสมุนไพรพญาวานรไม่มีพิษต่อเซลล์ของหนู

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ผลของสมุนไพรวานรกับยาปฏิชีวนะในการรักษาอาการท้องเสียในลูกสุกร

Treatment	No. of piglets	No. of recovered piglets after treatment					
		1st day		2nd day		3rd 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) ได้ทำการทดลองสกัดใบสมุนไพรพญาวานร พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบของสมุนไพรพญาวานรเป็นพิษอย่างอ่อนต่อเซลล์มะเร็ง B16 melanoma โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ครึ่งหนึ่ง (GI_{50}) คือ มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

6. การยับยั้งการสร้างหลอดเลือด

Nam (2003) ยังได้รายงานผลของการสกัดใบสมุนไพรพญาวานรอีกว่า สารสกัดเมทานอลจากใบสมุนไพรพญาวานรความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม มีฤทธิ์อย่างอ่อน (น้อยกว่า 25%) ในการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดในเซลล์ human umbilical venous

แบคทีเรียบางชนิดที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ

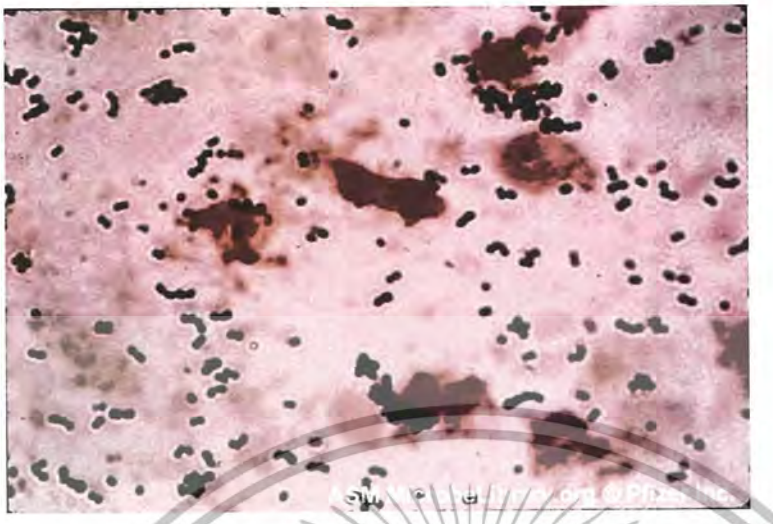
1. *Streptococcus* sp.

Streptococcus sp. เป็นสาเหตุการตายอย่างมากของปลาน้ำจืด เช่น ปลา carp ปลา salmon ปลานิล เป็นสาเหตุของโรค Streptococcosis ที่มีรายงานครั้งแรกในปี 1957 ในการเลี้ยงปลา rainbow trout ที่ญี่ปุ่น (Hoshina *et al.* 1958)

1.1 รูปร่าง – ลักษณะ (shape and characteristic)

Streptococcus sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม (coccus) เรียงตัวเป็นเส้นสาย ไม่เคลื่อนที่ (ภาพที่ 3) เป็น facultatively anaerobic เจริญเติบโตในอาหาร brain – heart infusion agar และ nutrient agar (Woo and Bruno ,1998) สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ pH 9.6 แต่ไม่เจริญในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส หรือที่สูงกว่า 45 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 ลักษณะรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

ที่มา : http://aqua.intervet.com/news/2006-06-20_-_streptococcosis_in_tilapia.asp

1.2 แหล่งที่อยู่ (habitat)

พบได้ตามทั่วไปในธรรมชาติ อยู่ในแหล่งน้ำที่มีธาตุอาหารสูง ก่อให้เกิดโรคได้ถ้ามีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

1.3 อาการ (symptoms)

ถ้ามีการติดเชื้ออย่างเฉียบพลันจะแสดงอาการใน 3 - 4 วัน ผิวหนังจะเป็นแผลว่ายน้ำไร้ทิศทาง เนื่องจากมีการติดเชื้อที่สมอง ประสาทการมองเห็น และเนื้อเยื่อไขมันบริเวณตา ตกเลือดในช่องท้อง ท้องบวมน้ำ (ภาพที่ 4)

A B

ภาพที่ 4 อาการของสัตว์น้ำเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. พบเกิดแผลบริเวณผิวหนัง (A) และตกเลือดในช่องท้อง (B)

ที่มา : http://aqua.intervet.com/news/2006-06-20_-_streptococcosis_in_tilapia.asp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 การป้องกันและรักษา (prevention and treatment)

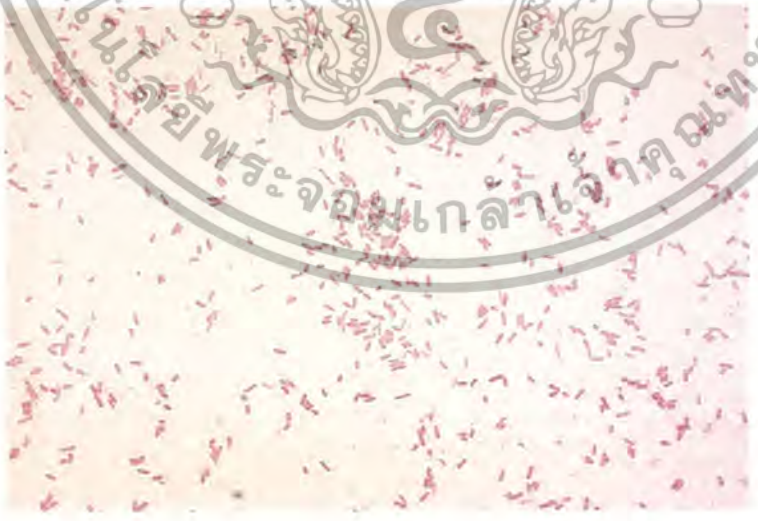
การป้องกันที่ดีที่สุดควรจะต้องควบคุมคุณภาพน้ำให้ดี อาหาร สภาพแวดล้อมให้สะอาด ก่อนนำปลาใหม่เข้ามาในฟาร์มต้องตรวจสอบให้แน่ใจก่อนว่า จะไม่มีโรคติดต่อ การรักษาอาการของโรคนั้นจะใช้ Erythromycin 1.5 กรัมต่อปอนด์ของน้ำหนักปลา เป็นเวลา 10-14 วัน (Woo and Bruno ,1998)

2. *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Motile aeromonas septicemia (MAS) ในปลา (White and Swann , 1991)

2.1 รูปร่าง – ลักษณะ (shape and characteristic)

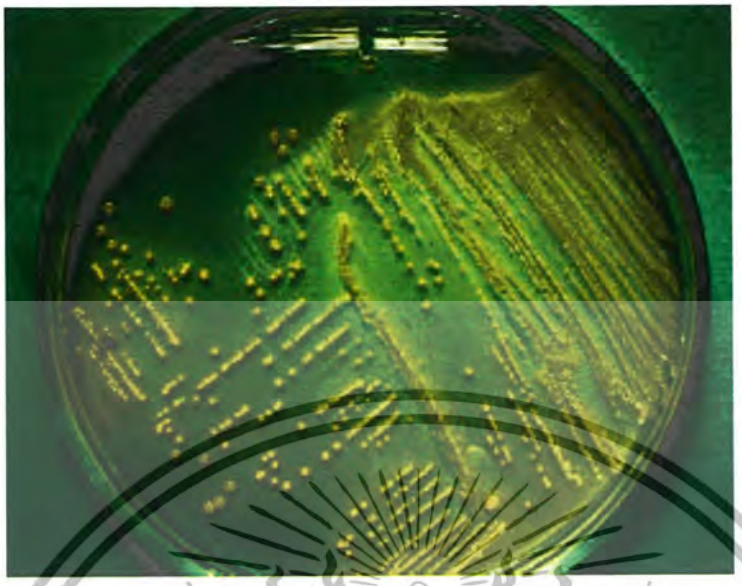
Aeromonas hydrophila เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) มีรูปร่างเป็นแท่งแบบสั้นๆ ไม่สร้างสปอร์ (ภาพที่ 5) สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ sing polar flagella (monotrichus polar flagellum) สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ (glucose fermantation) เกิดแก๊ส ลักษณะโคโลนีที่เจริญบน nutrient agar (NA) มีสีขาวจนถึงสีชมพูอ่อน กลม ขอบเรียบ มีความนูนโค้งขึ้นเล็กน้อย (ภาพที่ 6) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 28 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญในอุณหภูมิที่ต่ำว่า 4 องศาเซลเซียสและสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส (Hayes , 2000)



ภาพที่ 5 ลักษณะรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

ที่มา : www.websters-online-dictionary.org

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีสีเหลืองของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ที่มา : Cipriano *et al.* (1984)

2.2 แหล่งที่อยู่ (habitat)

เชื้อชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ตามแหล่งน้ำ ตะกอนบริเวณก้นบ่อที่มีสารอินทรีย์สูง หรืออยู่ในทางเดินอาหารของปลา (White and Swann , 1991)

2.3 อาการ (symptoms)

ปลาที่มีการติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* อาจมีอาการแตกต่างกันขึ้นกับปริมาณเชื้อและปัจจัยที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรค ปลาที่ติดเชื้อนี้จะมีอาการตกเลือดบริเวณเหงือก รูทวาร และผิวหนัง ตาโปน ท้องบวมน้ำ อันเนื่องมาจากการสะสมน้ำในช่องท้อง (Ardo *et al.* 2008 ; Hayes , 2000) (ภาพที่ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A

B

C

D

ภาพที่ 7 อาการของสัตว์น้ำเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* พบเกิดแผลและบวมช้ำบริเวณรอบปาก (A) เกิดแผลตามลำตัวและครีบหางกร่อน (B) เกล็ดตั้ง (C) และท้องบวมน้ำ (D)

ที่มา : www.vet.uga.edu/VPP/Undergrad/Siegel/index.php

2.4 การป้องกันและรักษา (prevention and treatment)จะต้องลดความเครียดที่เกิดกับปลา โดยจัดสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมในการเลี้ยง เช่น ปริมาณอาหาร คุณภาพน้ำ ความหนาแน่นในการเลี้ยง (Hayes , 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อาหาร Nutrient broth (NB) , Muller Hinton Ager (MHA) , Muller Hinton broth (MHB) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
2. เครื่องแก้ว เช่น หลอดทดสอบ บีกเกอร์ แท่งแก้วคนสาร plate flask กระบอกตวง แท่งแก้วคนสาร แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม
3. ภาชนะเตรียมอาหาร
4. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
5. ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven)
6. ตู้เขี่ยเชื้อแบบลมเป่า (Larminar flow)
7. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
8. Shaking incubator
9. Spectophotometer
10. Vortex mixture
11. Micropipette และ tip
12. Centrifuge
13. Rotary evaporator
14. 96 U shaped well plate
15. เครื่องสกัดไขมันแบบ soxhlet
16. เครื่องชั่งน้ำหนัก
17. กระดาษไขรองชั่ง
18. ช้อนตักสาร
19. ถุงมือ
20. กระดาษกรองเบอร์ 1 (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125.0 มิลลิลิตร)
21. แผ่นทดสอบ (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.0 มิลลิลิตร
22. กระดาษวัด pH สำลี ยางรัดของ
23. NaCl 0.85% ที่ฆ่าเชื้อแล้ว
24. น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

แผนการทดลอง

การทดลองที่ 1 การสกัดสมุนไพรพญาวานร (*Pseuderanthemum palatiferum*) จะใช้ใบสดของสมุนไพรที่มีลักณษะสีเขียวสด สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น อะซิโตน เมทธานอล และเอทิลอะซิเตท ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายละ 3 ซ้ำ

การทดลองที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรพญาวานร *(Pseuderanthemum palatiferum*) ในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ ตามวิธีของ Zakaria *et al.* (2006)

2.1 ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ ด้วยวิธี disc diffusion method โดยนำสารสกัดที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น อะซิโตน เมทธานอล และเอทิลอะซิเตท มาทดสอบที่ 5 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำต่อตัวทำละลายแต่ละชนิด

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

วิธีการทดลอง

1. การสกัดสมุนไพรพญาวานร

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 มิลลิลิตร) แล้วใส่ลงในทิมเบิล (thimble)

1.6 นำทิมเบิลใส่ในชุดสกัดแยกสกัด (extraction unit) ของเครื่องสกัด เติมตัวทำละลายปริมาตร 160 มิลลิลิตร ลงใน soxhlet flask

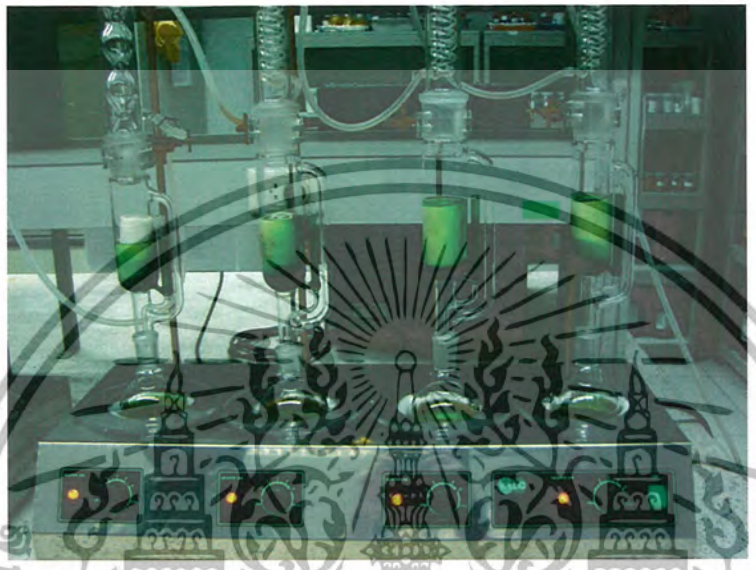
1.7 ต่อชุดแยกสกัดเข้ากับคอนเดนเซอร์ สกัดเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

1.8 แยกเอาฟลาสต์ และคอนเดนเซอร์ออกจากชุดแยกสกัด

1.9 นำทิมเบิลออกมา เทเอาใบสมุนไพรพญาวานรออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.10 นำสารสกัดที่อยู่ใน soxhlet flask มาระเหยสูญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้เหลือปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ในขวดสีชาแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 8 เครื่องสกัดแบบแยกสกัด (extraction unit) ที่ใช้ในการสกัดสมุนไพร

ภาพที่ 9 เครื่อง Rotary evaporator ที่ใช้ในการระเหยตัวทำละลายของสารสกัดสมุนไพร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรพญาวานร 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 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วหยดสารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ปริมาตร 50 µl/disc ลงไป ซึ่งเจือจางโดยใช้ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 50 , 500 , 5,000 , 50,000 และ 500,000 µg/disc พร้อมแผ่นทดสอบควบคุมที่หยดเฉพาะตัวทำละลาย (negative control) และแผ่นยาทดสอบ คือ Chloramphenicol (positive control) ทำการทดลองความเข้มข้นละ 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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.2 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรที่ได้จากตัวทำละลายที่เหมาะสมและดีที่สุด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ (Minimal Inhibitory Concentration : MIC)

2.2.1 ละลายสารสกัดสมุนไพร โดยเจือจางในตัวทำละลายที่ใช้สกัด จากนั้นเจือจางต่อด้วย Muller Hinton Broth (MHB)

2.2.2 เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ $1 - 2 \times 10^8$ CFU/ml (McFarland No. 0.5) หรือวัดค่าการดูดกลืนแสง OD = 0.08 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร

2.2.3 เจือจางเชื้อแบคทีเรียด้วย MHB ให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^7 CFU/ml เพื่อใส่ใน well plate หลุมละ 5 µl (ประมาณเชื้อ 10^4 CFU/well)

2.2.4 เติม 100 µl ของ MHB ลงในทุกหลุม

2.2.5 เติม 100 µl ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 200,000 ppm ลงใน columnที่ 1 เฉพาะแถว B , C , F และ G จากนั้นเจือจางแบบ two fold dilution จาก column ที่ 1 ไปเรื่อยๆ โดยใช้ micropipette ไปจนถึง column สุดท้าย (1-12)

2.2.6 เติม 100 µl ของตัวทำละลายลงใน column ที่ 1 เฉพาะแถว A และ E ซึ่งเป็น negative control ซึ่งความเข้มข้นจะเหมือนกับข้อ 2.2.7

2.2.7 เติม 100 µl ของยาปฏิชีวนะ Oxytetra cycline ความเข้มข้น 512 ppm ลงใน column ที่ 1 เฉพาะแถว D และ H ซึ่งเป็น positive control ซึ่งความเข้มข้นจะเหมือนกับข้อ 2.2.7

2.2.8 นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียในข้อที่ 2.2.4 ปริมาตร 5 µl เติมลงในทุกหลุม

2.2.9 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 10 นาทีหลังเตรียมเสร็จ

2.2.10 ตรวจดูความขุ่นของเชื้อด้วยตาเปล่า หลังจากบ่มนาน 24-48 ชั่วโมง

2.2.11 บันทึก end point เป็นหลุมสุดท้ายที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ (โดยดูที่ความขุ่นซึ่งแสดงว่าเชื้อมีการเจริญเติบโต) = MIC (minimal inhibitory concentration)

2.2.12 ในกรณีที่สารสกัดมีสี ไม่สามารถแยกความขุ่นในแต่ละหลุมได้ชัดเจน ให้ใช้ loop เขี่ยเชื้อจุ่มลงในหลุม แล้วเขี่ยเชื้อลงบน MHA เพื่อดูการเจริญเติบโต โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบเชื้อขึ้นจะรายงานผลเป็นค่า MBC (minimal bactericidal concentration)

104608

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การบันทึกข้อมูล

การทดลองที่ 1 การสกัดสมุนไพร จะบันทึกปริมาตรและความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น อะซิโตน เมทานอล และเอทิลอะซิเตท

การทดลองที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ

2.1 ทำการบันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (clear zone) บริเวณที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียซึ่งมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

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

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์และประเมินผลทางสถิติ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Microsoft Office Excel version 2003

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาในการทดลอง

เดือนธันวาคม พ.ศ. 2551 - เมษายน พ.ศ. 2552

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสาร

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

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของสารสกัดที่สกัดจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

สารสกัดจากสมุนไพรพญาวานรเมื่อนำมาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Streptococcus agalactiae* และ *Aeromonas hydrophila* ด้วยวิธี disc diffusion method ที่ระดับความเข้มข้นเชื้อแบคทีเรีย 10^8 CFU/ml พบว่าสารสกัดสมุนไพรด้วยเมทธานอลและอะซิโตนเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้โดยสารสกัดด้วยเมทธานอลที่ระดับความเข้มข้น 500,000 µg /disc จะแสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* มากที่สุด คือ ให้ clear zone ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 18.60 ± 0.10 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (C 30) นั้นจะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 21.49 ± 0.30 มิลลิเมตร และความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิดนั้น มีเพียงเมทธานอลและอะซิโตนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ โดยสารสกัดจากเมทธานอลจะให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุด คือ 25.70 ± 0.10 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (C 30) นั้นจะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 33.05 ± 0.56 มิลลิเมตร ซึ่งจะเห็นได้ว่า สารสกัดสมุนไพรด้วยเมทธานอลจะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุด ดังตารางที่ 5 และ 6 โดยเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* จะมีความไวต่อสารสกัดจากสมุนไพรพญาวานรมากกว่าเชื้อ *S. agalactiae* และเมื่อนำสารสกัดสมุนไพรด้วยเมทธานอลมาหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และทำลายเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ คือ *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* จำนวน 2 ครั้ง พบว่า สารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยเมทธานอล มีค่า MIC เท่ากับ 25,000 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ Oxytetra cycline ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 512 ppm (positive control) พบว่า มีค่า MIC เท่ากับ 390.6 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* และ 195.3 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* ดังตารางที่ 7 และพบว่า สารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยเมทธานอล มีค่า MBC เท่ากับ 25,000 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* และ 50,000 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ Oxytetra cycline ที่ระดับความเข้มข้น 512 ppm (positive control) พบว่า มีค่า MBC เท่ากับ 32 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* และ 64 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ดังตารางที่ 8 ซึ่งจากการรายงานของ Giang (2008) พบว่าสารสกัดจากเอทิลอะซีเตทและบิวทานอลจากใบสมุนไพรพญาวานร จะมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย 10 ชนิด โดยเฉพาะการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทจะมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่พบในมนุษย์ คือ *Salmonella typhi* 158 ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องร่วง , *Shigella flexneri* ทำให้เกิดโรคบิด ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Proteus ทำให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ซึ่งทำให้กระเพาะปัสสาวะอักเสบ , *Pseudomonas* และ *E. coli* ได้ดี ซึ่งมีความแตกต่างกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่สารสกัดจากเอทิลอะซีเตทไม่มีความสามารถในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรีย *S.agalactiae* และ *A. hydrophila* ได้เลย

ตารางที่ 5 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (C 30)

ชนิดตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของสารสกัด (µg /disc)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)				
		C 30	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
น้ำกลั่น	0	21.6	-	-	-	-
	50	21.2	-	-	-	-
	500	21.5	-	-	-	-
	5,000	21.4	-	-	-	-
	50,000	21.0	-	-	-	-
	500,000	21.2	-	-	-	-
อะซิโตน	0	21.2	-	-	-	-
	50	21.0	-	-	-	-
	500	21.6	-	-	-	-
	5,000	21.8	-	-	-	-
	50,000	21.5	-	-	-	-
	500,000	21.0	10.2	10.3	10.5	10.33 ± 0.15
เมทธานอล	0	21.3	-	-	-	-
	50	21.8	-	-	-	-
	500	21.0	-	-	-	-
	5,000	21.7	-	-	-	-
	50,000	21.7	14.3	14.2	14.4	14.30 ± 0.10
	500,000	21.9	18.6	18.5	18.7	18.60 ± 0.10
เอทิลอะซิเตท	0	21.7	-	-	-	-
	50	21.6	-	-	-	-
-	500	21.8	-	-	-	-
	5,000	21.6	-	-	-	-
	50,000	21.7	-	-	-	-
	500,000	21.3	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ความสามารถของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด เปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (C 30)

ชนิดตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของสารสกัด (µg /disc)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) C 30	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
น้ำกลั่น	0	33.3	-	-	-	
	50	33.2	-	-	-	
	500	32.9	-	-	-	
	5,000	33.1	-	-	-	
	50,000	33.4	8.5	8.4	8.6	8.50 ± 0.10
	500,000	32.8	10.3	10.2	10.5	10.33 ± 0.15
อะซิโตน	0	32.3	-	-	-	
	50	32.5	-	-	-	
	500	32.1	-	-	-	
	5,000	33.4	8.5	8.4	8.4	8.43 ± 0.05
	50,000	32.7	9.2	9.2	9.3	9.23 ± 0.05
	500,000	33.1	12.3	12.4	12.5	12.40 ± 0.10
เมทธานอล	0	32.8	-	-	-	
	50	32.0	-	-	-	
	500	33.9	-	-	-	
	5,000	32.5	14.3	14.2	14.5	14.33 ± 0.15
	50,000	33.8	21.6	21.5	21.7	21.60 ± 0.14
	500,000	33.4	25.7	25.8	25.6	25.70 ± 0.10
เอทิลอะซิเตท	0	32.9	-	-	-	
	50	33.1	-	-	-	
	500	33.8	-	-	-	
	5,000	33.4	-	-	-	
	50,000	33.7	10.3	10.5	10.8	10.53 ± 0.25
	500,000	32.1	12.6	12.7	12.5	12.60 ± 0.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรด้วยตัวทำละลายเมทธานอลเปรียบเทียบกับ Oxytetra cycline 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
Negative control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. hydrophila					+	+	+	+	+	+	+	+
A. hydrophila					+	+	+	+	+	+	+	+
Positive control										+	+	+
Negative control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. agalactiae					+	+	+	+	+	+	+	+
S. agalactiae					+	+	+	+	+	+	+	+
Positive control											+	+

หมายเหตุ เครื่องหมาย + หมายถึง เกิดความขุ่น แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโต

ตารางที่ 8 ค่า MBC ของสารสกัดสมุนไพรพญาวานรด้วยตัวทำละลายเมทธานอลเปรียบเทียบกับ Oxytetra cycline 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
Negative control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. hydrophila					+	+	+	+	+	+	+	+
A. hydrophila					+	+	+	+	+	+	+	+
Positive control					+	+	+	+	+	+	+	+
Negative control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. agalactiae				+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. agalactiae				+	+	+	+	+	+	+	+	+
Positive control				+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ เครื่องหมาย + หมายถึง มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

การสกัดสมุนไพรพญาวานรที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น อะซิโตน เมทธานอล และเอทิลอะซิเตท ด้วยวิธีการสกัดแบบแยกสกัด (extraction unit) พบว่า สารสกัดสมุนไพรด้วยเมทธานอลจะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 500,000 µg /disc ซึ่งความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* คือ 18.60 ± 0.10 มิลลิเมตร และความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* คือ 25.70 ± 0.10 มิลลิเมตร และค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรด้วยเมทธานอลต่อทั้ง 2 เชื้อ มีค่าเท่ากับ 25,000 ppm และค่า MBC เท่ากับ 25,000 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* และ 50,000 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร , พิทัย กาญบุตร และสาธร พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ. เอกสารประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ครั้งที่ 9.

วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล และ นนทวิทย์ อารีย์ชน. ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากัดและความเป็นพิษของสารสกัดใบหูกวางต่อปลากัด.http://www.kucon.lib.ku.ac.th/FullText/KC4404014.pdf.

Cappuccino, J.G. and N. Sherman.1992. Microbiology A Laboratory Manual. Rackland Community College Suffern New York. 70 – 75.

Cipriano, R. C., G. L. Bullock and S. W. 1984. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. Fish Disease Leaflet 68.

Dieu, H. K., C. B. Loc, S. Yamasakt and Y. Hirata . 2005. The ethnobotanical and botanical study on *Pseuderanthemum palatiferum* as a new medicinal plant in the Mekong Delta of Vietnam. JARQ 39 (3) : 191 – 196.

Dieu, H. K., C. B. Loc, S. Yamasakt and Y.Hirata 2006. The effects of *Pseuderanthemum palatiferum* , a new medicinal plant , on growth performances and diarrhea of piglets. JARQ 40 (1) : 85 – 91.

Evans, J. J., P. H. Klesius, P. M. Gilbert, C. A. Shoemaker, M .A. Sarawi4, J. Landsberg, R. Duremdez, A. Marzouk and S. Zenki. 2002. Characterization of b-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. Journal of Fish Diseases 25 : 505–513.

Giang, P.M. 2008. Study on anti - oxydative activities and preliminary investigation on antibacterial , antifungal of *Pseuderanthemum palatiferum* extracted fraction rich in flavonoides from leaves of (Nees) Radlk. Available from www.english.vista.gov.vn

Gibbons , S., B. Ohlendorf and I. Johnsen. 2002. The genus *Hypericum*_a valuable resource of anti - Staphylococcal leads. Fitoterapia 73 : 300 – 304.

Hayes , J. 2000. *Aeromonas hydrophila*. http://www.hmsc.oregonstate.edu /classes / MB492 / *hydrophila*hayes/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Neto, C. C., C. W. Owens, R. D. Langfield, A. B. Comeau, J. S. Onge, A. J. Vaisberg and G. B. Hammond. 2002. Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas. Journal of Ethnopharmacology 79 : 133 – 138.

Peng, S.C., C.Y. Cheng, F. Sheu and C.H. Su. 2008. The antimicrobial activity of heyneanol a extracted from the root of taiwanese wild grape. Journal of Applied Microbiology 105 : 485–491.

White, R. and L. Swann. 1991. Diagnosis of *Aeromonas hydrophila* infection in fish. Animal disease diagnosis laboratory. Aquaculture Extension . 80 – 90.

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.

http://th.wikipedia.org/ (December, 2008)

http://www.nuigalway.ie/microbiology/eusu/methods/htm#Method1

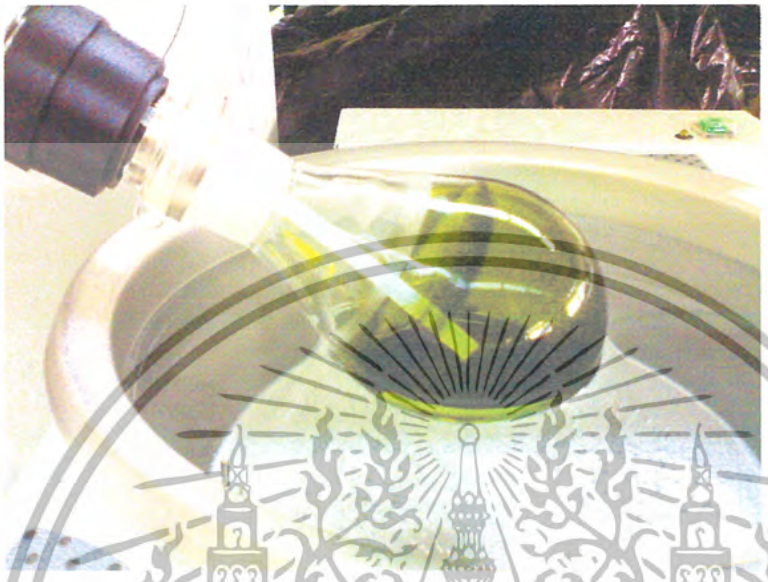
http://www.ctu.edu.vn/departments/dra/journal/inter/ds2/10.pdf

http://aqua.intervet.com/news/2006-06-20_-_streptococcosis_in_tilapia.asp

www.vet.uga.edu/VPP/Undergrad/Siegel/index.php

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

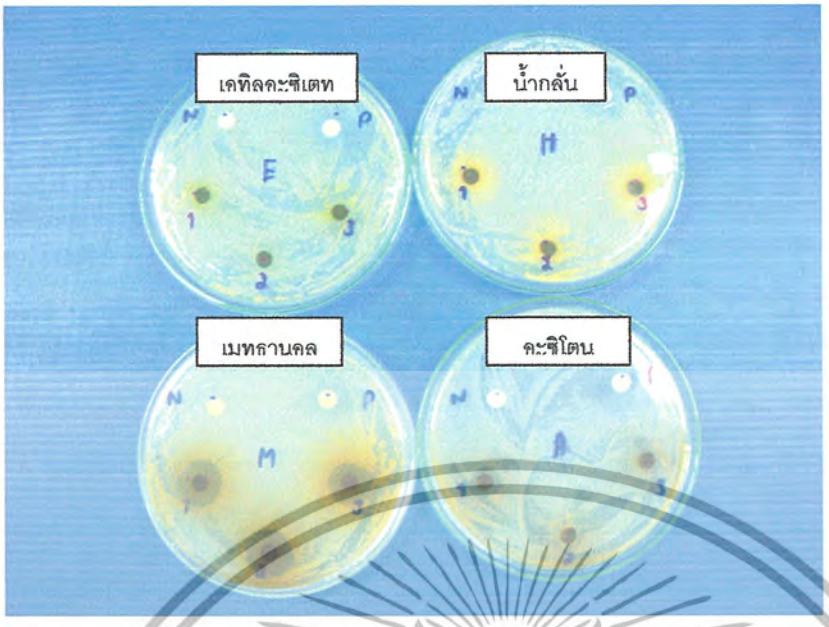
ภาคผนวก



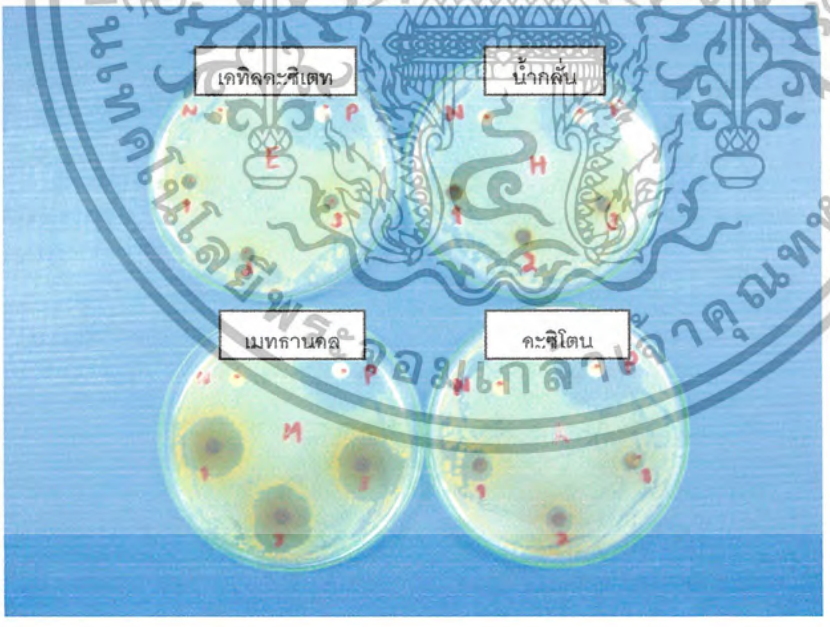
ภาพผนวกที่ 1 การระเหยตัวทำละลายในการสกัดสมุนไพรด้วยเครื่อง Rotary evaporator

ภาพผนวกที่ 2 แผ่นทดสอบมาตรฐานที่หยดสารสกัดสมุนไพร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

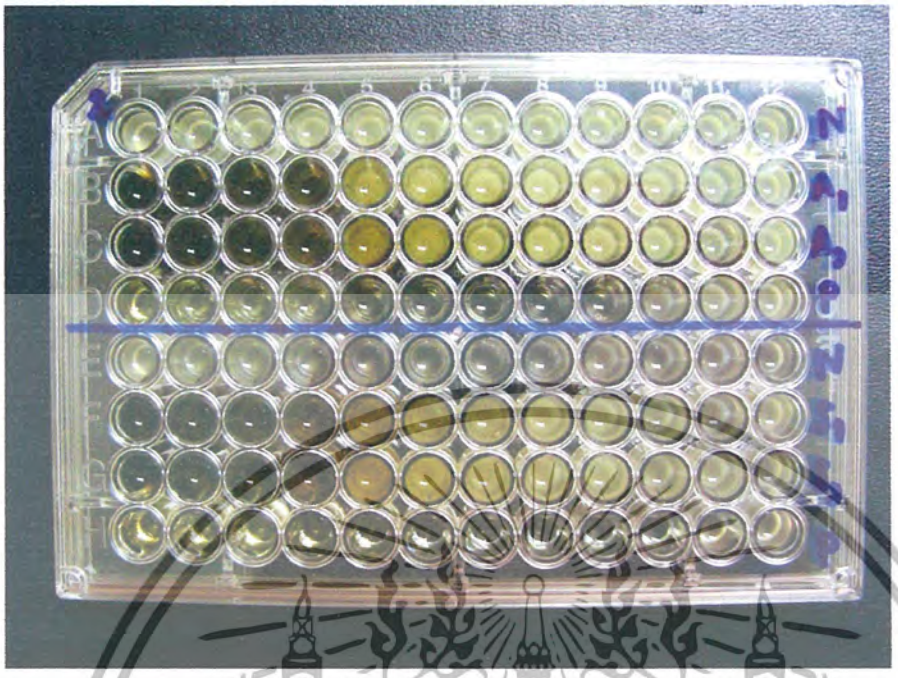


ภาพผนวกที่ 3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 500,000 µg/disc ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* เปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (P) (N คือ Negative control)



ภาพผนวกที่ 4 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 500,000 µg/disc ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* เปรียบเทียบกับ Chloramphenicol (P) (N คือ Negative control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 5 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียใน 96 U shaped well plate ที่ใช้ในการศึกษาหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดสมุนไพร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้