สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดจากพญาวานร

Antibacterial Activity of Hoan-Ngoc Extracts

จารุวรรณ ชนะมาร

ปิยนุช ศุภเกษตร

บุษบา ฉายสอน

เลขหมู่
เลขทะเบียน 117229
วัน,เดือน,ปี 1 9 ก.ค. 2554
b 12340104
i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANTIBACTERIAL
ACTIVITY OF HOAN-NGOC EXTRACTS

JARUWAN CHANAMARN

BUDSABA CHAISORN

PIYANUCH SUPPAKASET

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดจากพญาวานร

Antibacterial Activity of Hoan-Ngoc Extracts

ชื่อนักศึกษา จารุวรรณ ชนะมาร รหัส 50050797

บุษบา ฉายสอน รหัส 50050830

ปิยนุช ศุภเกษตร รหัส 50050835

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ	รศ. ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ	ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดจากพญาวานร Antibacterial Activity of Hoan-Ngoc Extracts
ชื่อนักศึกษา	จารุวรรณ ชนะมาร รหัส 50050797 บุษบา ฉายสอน รหัส 50050830 ปิยนุช ศุภเกษตร รหัส 50050835
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2553
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี

บทคัดย่อ

การทดสอบการยับยั้งของสารสกัดจากใบพญาวานรจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* *Bacillus subtilis* *Salmonella rissen* และ *Klebsiella pneumoniae* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Agar-well diffusion พบว่าสารสกัดที่ละลายในชั้นเมทานอล สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* ได้ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขึ้นไป และค่าผลได้ของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบสดของพญาวานรจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีค่าเท่ากับ 5.0826 เปอร์เซ็นต์ และ 1.2889 เปอร์เซ็นต์ โดยมวล ตามลำดับ

สูตรอาหาร MS ทั้ง 9 สูตร ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ในปริมาณที่แตกต่างกัน สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ชิ้นส่วนของใบเกิดการพัฒนาไปเป็นต้น คือสูตรอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ,NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ตามลำดับ

คำสำคัญ : พญาวานร การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย สารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Antibacterial Activity of Hoan-Ngoc Extracts
Students	JARUWAN CHANAMARN ID 50050797
	BUDSABA CHAISORN ID 50050830
	PIYANUCH SUPPAKASET ID 50050835
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2010
Advisor	Asst.Prof.Dr. Pana Lohasupthawee

ABSTRACT

The antibacterial activity of Hoan-Ngoc extracts from natural and tissue culture against *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* *Bacillus subtilis* *Salmonella rissen* and *Klebsiella pneumoniae* were tested at different concentrations by Agar-well diffusion . The result showed that the methanol extract at concentration more than 100 mg/ml inhibited the growth of *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. The yield of crude extract from fresh leaves of Hoan-Ngoc from natural and tissue culture were 5.0826% and 1.2889% w/w ,respectively.

Nine different MS media were tested for shoot regeneration from leaves explants of Hoan-Ngoc. The result showed that MS medium contained 2.0 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA gave the highest number of shoot formation per explant.

Keywords : Hoan-Ngoc , antimicrobial activity , extract

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดจากพญาวานร จะสำเร็จลุล่วงมิได้หากขาดความร่วมมือ ความช่วยเหลือ ตลอดจนคำแนะนำที่ดีต่างๆ ซึ่งล้วนแต่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ในโอกาสนี้คณะผู้จัดทำจึงขอกล่าวขอบคุณบุคคลดังต่อไปนี้ที่ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับโครงงานพิเศษฉบับนี้ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษเป็นอย่างสูงที่ได้สละเวลาอันมีค่า มาให้ความรู้และให้คำปรึกษา ตลอดการดำเนินงานโครงงานพิเศษนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณประธานกรรมการ ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และกรรมการ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ที่สละเวลาชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหาโครงงานพิเศษ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของเล่มรายงานจนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกและให้ความอนุเคราะห์ในการยืม-คืนอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการสาขาชีววิทยา ที่ช่วยเป็นธุระประสานงานอย่างดีทุกครั้งเมื่อมาติดต่อ

ขอขอบคุณพี่ๆ นักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอกทุกท่านที่ให้คำปรึกษาและสอนการใช้เครื่องมือเฉพาะทางบางชนิด ตลอดจนเพื่อนนักศึกษาสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมรุ่น 6 ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจ ถามไถ่ความคืบหน้าของโครงงานอยู่เสมอ

และที่สำคัญที่สุด ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ผู้ให้กำเนิด เลี้ยงดู สั่งสอน รวมทั้งทุกๆ คนในครอบครัว ซึ่งเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งสำหรับการทำโครงงานพิเศษนี้

สำหรับคุณค่าและประโยชน์ที่ก่อเกิดจากโครงงานพิเศษฉบับนี้ คณะผู้จัดทำขอมอบไว้แด่บิดามารดา และครูบาอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดี และประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้จนเติบโตอย่างสมภาคภูมิมาถึงทุกวันนี้

จารุวรรณ ชนะมาร

บุษบา ฉายสอน

ปิยนุช ศุภเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูปภาพ	IX
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ต้นพญาวานร , วานลิง หรือ ฮ่านง็อก	3
2.1.1 ลักษณะของต้นพญาวานร	3
2.1.2 สรรพคุณของต้นพญาวานร	4
2.1.3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	4
2.1.3.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	4
2.1.3.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย	4
2.1.3.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา	4
2.1.3.4 ผลต่อสัตว์	4
2.1.3.5 พิษต่อเซลล์	5
2.1.3.6 ยับยั้งการสร้างหลอดเลือด	5
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	5
2.2.1 ปัจจัยที่มีผลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	6
2.2.2 ประโยชน์การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	7
2.2.2.1 เพื่อการขยายพันธุ์	7
2.2.2.2 เพื่อการปรับปรุงพันธุ์	7
2.2.2.3 เพื่อการผลิตพืชที่ปราศจากเชื้อไวรัส (Virus-free plant propagation)	7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.2.2.4 เพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) 8

2.2.2.5 เพื่อการศึกษาทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช (Biochemical and Physiology study) 8

2.2.2.6 เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช (Germplasm conservation, gene bank) 8

2.3 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร 8

2.3.1 น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลาย 9

2.3.1.1 น้ำ 9

2.3.1.2 แอลกอฮอล์ 9

2.3.1.3 น้ำผสมแอลกอฮอล์ (hydroalcoholic mixture) 9

2.3.2 การเลือกน้ำยาสกัด 10

2.3.3 วิธีการสกัด 11

2.3.3.1 Maceration 11

2.3.3.2 Soxhlet Extraction 11

2.3.3.3 Extraction of volatile oil 12

2.4 การทดสอบความไวของเชื้อต่อผลิตภัณฑ์ต้านจุลชีพ 12

2.4.1 Dilution test 12

2.4.1.1 Broth dilution method 12

2.4.1.2 Agar dilution method 13

2.4.2 Diffusion test 13

2.5 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ 14

2.5.1 *Escherichia coli* 14

2.5.2 *Staphylococcus aureus* 14

2.5.3 *Salmonella* 15

2.5.4 *Bacillus subtilis* 16

2.5.5 *Klebsiella pneumoniae* 17

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 พืชที่ใช้ 19

3.2 เชื้อแบคทีเรีย 19

3.3 สารเคมี 19

3.4 อุปกรณ์ 19

3.5 วิธีการทดลอง 20

3.5.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพญาวานรในสูตรอาหารแข็ง Murashige & Skoog (MS) 20

3.5.2 ศึกษาการเพิ่มปริมาณต้นพืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารแข็ง Murashige & Skoog (MS) โดยมีสัดส่วนของฮอร์โมนที่แตกต่างกัน 21

3.5.3 การสกัดสารจากใบพญาวานรด้วยตัวทำละลาย 22

3.5.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรโดยวิธี Agar – well diffusion 23

3.5.5 การศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรโดยวิธี Micro dilution method 24

3.5.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ 28

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการเพิ่มปริมาณต้นพืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารแข็ง Murashige & Skoog (MS) โดยมีสัดส่วนของฮอร์โมนที่แตกต่างกัน 29

4.2 ผลการศึกษาผลได้ (yield) ของปริมาณของสารสกัดหยาบจากใบสดพญาวานรทั้งจากธรรมชาติและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 35

4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรด้วยวิธี Agar – well diffusion 35

4.4 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรโดยวิธี Micro dilution method 46

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 50

เอกสารอ้างอิง 51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี 53
ภาคผนวก ข. ผลการทดลองไม่เป็นทางการ 55
ภาคผนวก ค. การวิเคราะห์ทางสถิติ 66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

3.1 สัดส่วนของฮอร์โมน BA และ NAA ในอาหารทั้ง 9 สูตร (A-I) 22

4.1 แสดงผลการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของชิ้นส่วนใบพญาวานรใน สูตรอาหารแข็ง Murashige & Skoog (MS) โดยมีสัดส่วนของฮอร์โมนที่แตกต่างกัน 29

4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม spss ซึ่งใช้สารสกัดหยาบจากของใบพญาวานรจากธรรมชาติที่ความเข้มข้น 100 50 25 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 40

4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม spss ซึ่งใช้สารสกัดหยาบจากของใบพญาวานรจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ความเข้มข้น 100 50 25 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 41

4.4 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม spss ซึ่งใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 1,000 800 600 400 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 42

4.5 แสดงดัชนีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น ซึ่งสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป็นสารสกัดหยาบของใบพญาวานรจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 47

4.6 แสดงดัชนีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น ซึ่งสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เป็นสารสกัดหยาบของพญาวานรจากธรรมชาติ 48

ข - 1 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพญาวานรสดจากธรรมชาติที่อยู่ในตัวทำละลายเมทานอล และเฮกเซน 55

ข - 2 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพญาวานรสดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่อยู่ในตัวทำละลายเมทานอลและเฮกเซน 57

ข - 3 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพญาวานรสดจากธรรมชาติที่อยู่ในตัวทำละลายเมทานอล 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่

2.1 ต้นพญาวานร, ว่านลิง หรือ ฮว่านง็อก 3

2.2 ภาพโดยรวมของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 6

2.3 แสดงการสกัดสมุนไพรโดยวิธี Maceration 11

2.4 แสดงเครื่อง Soxhlet Extraction 12

2.5 แสดงค่าMIC และ MBC 13

2.6 แสดงลักษณะของ *Escherichia coli* 14

2.7 แสดงลักษณะของ *Staphylococcus aureus* 15

2.8 แสดงลักษณะของ *Salmonella* 16

2.9 แสดงลักษณะของ *Bacillus subtilis* 16

2.10 แสดงลักษณะของ *Klebsiella pneumoniae* 17

3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพญาวานรด้วย
วิธี Agar-well diffusion 24

3.2 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรจากธรรมชาติ
และ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยวิธี Micro dilution method 26

3.3 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรจากธรรมชาติ โดยวิธี
Micro dilution method 27

4.1 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร A 30

4.2 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร B 30

4.3 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร C 31

4.4 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร D 31

4.5 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร E 32

4.6 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร F 32

4.7 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร G 33

4.8 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร H 33

4.9 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร I 34

4.10 การยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบของพญาวานรจากธรรมชาติ (ก)
และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ข) ที่ความเข้มข้นต่างๆ 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้า

4.11 การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบของพญาวานรจากธรรมชาติ (ก) และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ข) ที่ความเข้มข้นต่างๆ 37

4.12 การยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบของพญาวานรจากธรรมชาติ (ก) และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ข) ที่ความเข้มข้นต่างๆ 38

4.13 การยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบธรรมชาติของพญาวานร โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1,000 800 600 400 และ 200 มก.ต่อมล. 43

4.14 การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบธรรมชาติของพญาวานร โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1,000 800 600 400 และ 200 มก.ต่อมล. 44

4.15 การยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบธรรมชาติของพญาวานร โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1,000 800 600 400 และ 200 มก.ต่อมล. 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

พลังในการรักษาหรือเยียวยาที่อยู่ในพืชพบได้จากวิธีการรักษาที่สืบต่อกันมาแต่โบราณ ในช่วงคริสตศักราช 1950-1959 ได้มีการผลิตสารต้านจุลชีพขึ้น แต่ยังไม่ปรากฏสารต้านจุลชีพที่ทำจากพืช แต่เมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมานี้พบว่าการสกัดสารจากพืชกลายมาเป็นที่นิยม สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการรักษาโรค หรือการนำไปใช้ในการต้านแบคทีเรีย สารสกัดจากพืชนี้จัดเป็นของขวัญจากธรรมชาติที่มีประโยชน์อย่างมาก ส่วนมากไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม จึงสามารถใช้แทนสารเคมีอื่นที่อาจมีผลกระทบทางลบต่อสิ่งมีชีวิตหรือสิ่งแวดล้อมได้

ถ้าเอ่ยชื่อสมุนไพรที่มีผู้กล่าวถึงมากในขณะนี้ คงจะหนีไม่พ้น "ฮว่านง็อก" หรือที่คนไทยเรียกว่า “พญาวานร” มีการกล่าวอ้างและนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ มากมาย และฮว่านง็อกไม่ใช่พืชไทย แต่มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ประเทศเวียดนาม เป็นพืชใหม่ถูกค้นพบในป่าแถบเวียดนามเหนือเมื่อประมาณปี ค.ศ.1990 ต่อมาได้มีการปลูกเพื่อเพิ่มจำนวน ใช้เป็นพืชสมุนไพรและไม้ประดับกระจายไปทั่วประเทศ (Dieu HK และคณะ ,2005) ฮว่านง็อกถูกนำเข้ามาในไทย โดยกลุ่มทหารผ่านศึกสมัยสงครามเวียดนาม เมื่อเริ่มแรกมีราคาสูงมาก ขนาดนับใบขายเลยทีเดียว แต่ปัจจุบันมีราคาถูกลงเนื่องจากสามารถเพาะพันธุ์ได้ในประเทศไทย สามารถขยายพันธุ์ด้วยการตัดยอดปักชำลงดินก็เกิดรากตั้งตัวได้เร็วย้ายลงปลูกในกระถาง ใส่ปุ๋ย พรวนดิน รดน้ำก็จะเจริญงอกงาม ในเวียดนามจะใช้ใบในการรักษาโรคต่างๆ ในคน ได้แก่ ความดันโลหิต ท้องเสีย ไขข้ออักเสบ คออักเสบ กระเพาะอาหารอักเสบ เนื้องอก ลำไส้อักเสบ ตกเลือด รักษาแผล ท้องผูก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคในสัตว์เลี้ยง ได้แก่ แก้ท้องเสียในสุกรและสุนัข รักษาแผล และอหิวาต์ในไก่และเป็ด เป็นต้น (Dieu HK และคณะ ,2005) ในใบของฮว่านง็อก ประกอบด้วยสารอาหารต่างๆ ได้แก่ โปรตีน (ซึ่งพบในปริมาณ 30.8% ของน้ำหนักแห้ง) กรดอะมิโน ได้แก่ ไลซีน เมทไทโอนีน และทรีโอนีน และเกลือแร่ ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และทองแดง (Dieu HK และคณะ ,2005) แต่อย่างไรก็ตามการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของใบพญาวานรเป็นเรื่องที่น่าสนใจ แต่ยังมีการศึกษาวิจัยน้อย

ดังนั้นในโครงงานพิเศษนี้จึงมุ่งเน้นที่การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารที่สกัดมาจากใบพญาวานร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพญาวานร
2. ศึกษาการเพิ่มปริมาณต้นพืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารแข็ง Murashige & Skoog (MS) โดยมีสัดส่วนของฮอร์โมนที่แตกต่างกัน

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดใบพญาวานรที่ได้จากธรรมชาติกับใบพญาวานรที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. ศึกษาอัตราส่วนของฮอร์โมน NAA : BA ที่เหมาะสมต่อการเจริญของใบพญาวานรที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
3. ศึกษาผลได้(yield) ของปริมาณของสารสกัดที่สกัดได้จากใบพญาวานรทั้งจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณต้นพญาวานรโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. นำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาที่ใช้ในการรักษาโรคทางเดินอาหารแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ต้นพญาวานร , ว่านลิง หรือ ฮว่านง็อก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Pseuderatherum platiferum* (Nees) Radlk.

วงศ์ : Acanthaceae

ต้นกำเนิด : ต้นพญาวานรมีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ประเทศเวียดนาม เป็นพืชใหม่ถูกค้นพบในป่าแถบเวียดนามเหนือ เมื่อประมาณ ปี ค.ศ. 1990 ต่อมาได้มีการปลูกขยายใช้เป็นพืชสมุนไพรและไม้ประดับกระจายไปทั่วประเทศ ถูกนำเข้ามาในไทยโดยกลุ่มทหารผ่านศึกสมัยสงครามเวียดนาม เมื่อเริ่มแรกมีราคาสูงมาก ขนาดนับใบขายเลยทีเดียว กระถางแรกที่ถูกนำเข้ามา มีราคาถึงกระถางละ 70,000 บาท แต่ปัจจุบันมีราคาถูกลง เนื่องจากสามารถเพาะพันธุ์ได้ง่ายในบ้านเรา

2.1.1 ลักษณะของต้นพญาวานร

เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-3 เมตร ลำต้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมมน เปลือกต้นผิวเรียบสีเขียว ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม รูปรีถึงรูปใบหอก โคนใบสอบ ปลายใบแหลม มีดอกสีขาวชมพู จนถึงน้ำเงินหรือม่วง (รูปที่ 2.1)

รูปที่ 2.1 ต้นพญาวานร, ว่านลิง หรือ ฮว่านง็อก

ที่มา :http://www.phibun.com/knowledge/knowledge_name=hounngoc/images/hoanngoc.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 ลักษณะของต้นพญาวานร

เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-3 เมตร ลำต้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมมน เปลือกต้นผิวเรียบสีเขียว ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม รูปรีถึงรูปใบหอก โคนใบสอบ ปลายใบแหลม มีดอกสีขาวชมพู จนถึงน้ำเงินหรือม่วง

2.1.2 สรรพคุณของต้นพญาวานร

ในเวียดนามจะใช้ใบในการรักษาโรคต่างๆ ในคน ได้แก่ ความดันโลหิต ท้องเสีย ไขข้ออักเสบ คออักเสบ กระเพาะอาหารอักเสบ เนื้องอก ลำไส้อักเสบ ตกเลือด รักษาแผล ท้องผูก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคในสัตว์เลี้ยง ได้แก่ แก้ท้องเสียในสุกรและสุนัข รักษาแผล และ อหิวาต์ในไก่ และ เป็ด เป็นต้น

2.1.3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

2.1.3.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท และบิวทานอลจากใบ ซึ่งมีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบหลักมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทดลองโดยใช้ human blood peroxidase model (Giang PM. ,2008)

2.1.3.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท และบิวทานอลจากใบ มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 10 ชนิด โดยเฉพาะส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทจะมีฤทธิ์แรงต่อเชื้อ *Salmonella typhi* 158, *Shigella flexneri* และ *E.coli* (Giang PM. ,2008)

2.1.3.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา

ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท และ บิวทานอลจากใบมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* และ *C. stellatoides* (Giang PM. ,2008)

2.1.3.4 ผลต่อสัตว์

มีการศึกษาผลของต้นพญาวานรที่มีต่อการเจริญเติบโตและแก้ท้องเสียในลูกสุกรเล็ก โดยแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ทดลองในลูกสุกรที่ยังไม่ได้หย่านม โดยให้กินใบสดขนาด 1 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 30 วัน การทดลองที่ 2 ทดลองในลูกสุกรที่ไม่ได้หย่านม โดยให้กินใบสดขนาด 0.5 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน และผงใบแห้ง ขนาด 0.1 และ 0.2 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 30 วัน และการทดลองที่ 3 ทดลองในลูกสุกรที่หย่านมแล้ว โดยให้กินใบสด ขนาด 0.5 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน และผงใบแห้งขนาด 0.1 และ 0.2 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน นาน 30 วัน พบว่าในการทดลองที่ 1 ลูกสุกรที่กินต้นพญาวานร จะมีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มควบคุม จำนวนเม็ดเลือดแดง packed cell และฮีโมโกลบินสูงกว่า ไม่พบการตายและอาการท้องเสีย เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 และ 3 ลูกสุกรที่กินใบต้นพญาวานร จะมีน้ำหนักตัว จำนวนเม็ดเลือดแดง packed cell และฮีโมโกลบินมากกว่ากลุ่มควบคุม ลูกสุกรมีอาการท้องเสียและตายน้อยกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัม) ในการรักษาอาการท้องเสียในลูกสุกร โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่กินผงใบฮวานง็อกแห้ง ขนาด 1 กรัมต่อกิโลกรัม กลุ่มที่ได้รับยา Coli-norgent และ Cotrimxazol ขนาด 0.1 กรัมต่อกิโลกรัม วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน พบว่าต้นพญาวานรให้ผลดีเทียบเท่ายาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นจึงสามารถใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะในการรักษาอาการท้องเสียในลูกสุกรได้ (Dieu HK และคณะ, 2008)

2.1.3.5 พิษต่อเซลล์

สารสกัดเมทานอลจากใบ เป็นพิษอย่างอ่อนต่อเซลล์มะเร็ง B16 melanoma โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ครึ่งหนึ่ง (GI50) คือ มากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Nam NH และคณะ, 2003)

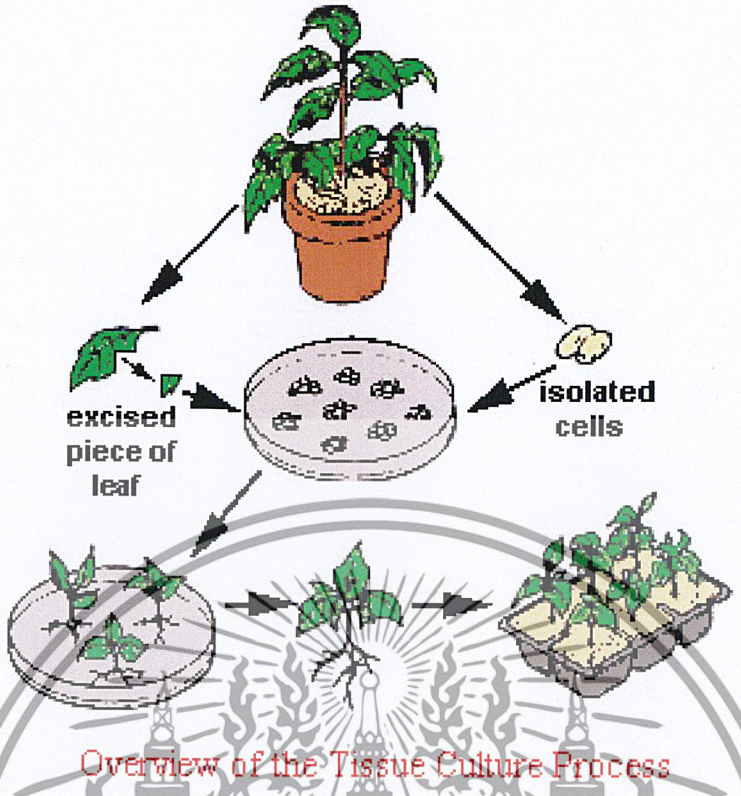
2.1.3.6 ยับยั้งการสร้างหลอดเลือด

สารสกัดเมทานอลจากใบ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์อย่างอ่อน (น้อยกว่า 25%)ในการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดในเซลล์ human umbilical venous (Nam NH และคณะ, 2003)

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) หมายถึง การนำชิ้นส่วนพืช (เช่น ลำต้น ใบ ดอก ตา เป็นต้น) มาทำให้สะอาดปราศจากเชื้อโรค แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ในสภาพปลอดเชื้อ ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (รูปที่ 2.2) การเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคหนึ่งในกลุ่มของเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ โดยการนำเอาชิ้นส่วนของพืชที่มีขนาดเล็ก เช่น อวัยวะต่างๆ เซลล์ หรือ โปรโตพลาสต์ (Protoplast) มาเลี้ยงในสภาพหลอดทดลอง (in vitro) เช่น ในขวดแก้วที่บรรจุอาหารสังเคราะห์ซึ่งมีองค์ประกอบคือ ธาตุอาหารต่างๆ แหล่งคาร์บอน วิตามิน และ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และนำไปเลี้ยงในสภาพที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และควบคุมสภาพแวดล้อมได้แก่ แสง และ อุณหภูมิ ชิ้นส่วนของพืชเหล่านี้จะมีการเจริญเป็นต้นพืชโดยตรง หรือ เจริญเป็นแคลลัส (callus) หรือ เอมบริออยด์ (embryoid) แล้วพัฒนาเป็นต้นต่อไปได้เนื่องจากพืชมีคุณสมบัติที่เรียกว่า “Totipotency” คุณสมบัตินี้ก็คือ เซลล์พืชมีความสามารถที่จะเจริญเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งนักวิทยาศาสตร์สามารถบังคับได้ จึงได้นำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆหลายด้านเช่น การขยายพันธุ์พืช การปรับปรุงพันธุ์พืช การทำให้พืชปลอดโรคหรือใช้ในทางเภสัชกรรมเพื่อผลิตยาเป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 ภาพโดยรวมของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ที่มา :http://www.cpbhisar.org/biotechniques.aspx

2.2.1 ปัจจัยที่มีผลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ อาหารเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยอาหารเพาะเลี้ยงนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง อาหารเพาะเลี้ยงมีมากมายหลายสูตรให้เลือกใช้งาน เช่น สูตร Murashige & Skoog (MS) เป็นสูตรพื้นฐานที่นิยมใช้กับพืชทั่วๆไป สูตร Vacin and Went เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้สกุลต่างๆ สูตร Woody Plant Medium (WPM) เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงพืชพวกไม้เนื้อแข็ง โดยทั่วไปสูตรอาหารเหล่านี้จะประกอบไปด้วย ธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแตสเซียม (K) ธาตุอาหารรองที่พืชต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อย เช่น โบรอน (B) โมลิบดินัม (Mo) แมงกานีส (Mn) โคบอลต์ (Co) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) ไอโอดีน(I) และอาหารอื่นๆ เช่น วิตามิน กรดอะมิโน และน้ำตาล นอกจากนี้อาจจะมีส่วนประกอบอื่นๆ เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หรือที่เรียกว่าฮอร์โมนพืช หรือสารจากธรรมชาติอื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าว มันฝรั่ง กล้วยหอม สารสกัดจากยีสต์ ซึ่งจะมีสารช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืชรวมอยู่ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ประโยชน์การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.2.2.1 เพื่อการขยายพันธุ์

โดยอาศัยอาหารสูตรที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นเป็นทวีคูณจากไดอะแกรมประกอบ จะเห็นว่าจากที่เราเริ่มต้นทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพืชเพียงต้นเดียว และทำการย้ายเนื้อเยื่อเดือนละครั้ง และแต่ละเดือนต้นพืชสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้ 10 ต้น เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 6 เดือน เราสามารถผลิตต้นพืชในหลอดทดลองได้ถึง 1 ล้านต้น ซึ่งไม่มีวิธีอื่นใดที่จะผลิตต้นกล้าพืชให้ได้ปริมาณมากและรวดเร็วเช่นนี้

2.2.2.2 เพื่อการปรับปรุงพันธุ์

ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถคัดเลือกสายพันธุ์พืช เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน (resistant plant) สามารถที่จะชักนำให้เกิดความต้านทานขึ้นในต้นพืช โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเงื่อนไขต่าง ๆ เช่น การสร้างพันธุ์ต้านทานต่อสารพิษของโรค ต้านทานต่อแมลง หรือต้านทานต่อยากำจัดวัชพืช เป็นต้น หรือเพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน (tolerance plant) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถที่จะคัดสายพันธุ์ทนทานได้จากการจัดเงื่อนไขของอาหารและสภาวะแวดล้อม เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดเลือกสายพันธุ์ทนต่อดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดสายพันธุ์ที่ทนร้อน โดยการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง เป็นต้น โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แล้วคัดเลือกเอาสายพันธุ์ดีไว้ ซึ่งอาจทำได้โดยการใช้สารเคมี การฉายรังสี การตัดต่อยีน (DNA ricombination) และการย้ายยีน (gene transformation) ยังเปิดโอกาสให้สามารถใช้ประโยชน์ในการสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ (transgenic plants) ที่ต้องการในพืชบางชนิด

2.2.2.3 เพื่อการผลิตพืชที่ปราศจากเชื้อไวรัส (Virus-free plant propagation)

ปัญหาสำคัญประการหนึ่งของการผลิตพืช คือ โรค ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย หรือ ไวรัส ต้นพืชที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากเชื้อราและแบคทีเรียเป็นอันดับแรก เพราะถ้าหากว่ามีอนุภาคของเชื้อเหล่านั้นตกลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก็จะแสดงอาการปนเปื้อนของเชื้อ (contamination) เพราะทั้งอนุภาคของแบคทีเรียและสปอร์ของราสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วบนอาหารและจะปรากฏกลุ่มโคโลนีของจุลินทรีย์เหล่านั้นที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า เราจึงสามารถเก็บออกมาขจัดทิ้งได้ ส่วนในกรณีของการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กมาก และจะสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ก็ต่อเมื่ออาศัยอยู่ในเซลล์ชนิดอื่น ฉะนั้นต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสจึงไม่แสดงอาการปนเปื้อนให้เห็น สามารถทราบได้ก็ต่อเมื่อเกิดอาการบนต้นพืช ดังนั้นก่อนทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องคัดเลือกและตรวจสอบเนื้อเยื่อ ชิ้นส่วนของพืชที่นับว่ามีความปลอดจากเชื้อไวรัสมากที่สุด คือ apical meristem ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่บริเวณปลายยอดของลำต้น และเนื้อเยื่อของคัพภะ (embryo) ที่อยู่ในเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากอนุภาคของไวรัสสามารถเคลื่อนย้ายได้ทางท่ออาหาร (phloem) และ ท่อน้ำ (xylem) แต่เนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีท่อน้ำและท่ออาหารที่จะติดต่อกับ ส่วนอื่น ๆ ของต้นพืช

2.2.2.4 เพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite)

พืชบางชนิดสามารถให้สารที่มีคุณสมบัติทางยา หรือมีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม แต่ในบางครั้งปริมาณเนื้อสารที่ต้องการมีอยู่ในปริมาณน้อยมาก จะต้องใช้ชิ้นส่วนพืชจำนวนมากนำมาสกัดแยก การเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อของพืชเหล่านั้นในสภาพแวดล้อมและอาหารที่เหมาะสม ก็อาจชักนำให้เกิดการสังเคราะห์สารที่เราต้องการได้มากขึ้น

2.2.2.5 เพื่อการศึกษาทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช (Biochemical and Physiology study)

ต้นพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลองนั้น สามารถที่จะติดตามการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงได้ง่ายและอย่างใกล้ชิด เช่น การศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อพืชต่อยาฆ่าแมลง ยาปราบศัตรูพืช หรือต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และการควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ในหลอดทดลองทำได้ง่ายกว่าแปลงทดลอง

2.2.2.6 เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช (Germplasm conservation, gene bank)

ปัจจุบันพืชพรรณหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไปหรือกำลังจะสูญพันธุ์ไปอย่างน่าเป็นห่วง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมหรือเกิดจากการทำลายของมนุษย์เอง ด้วยเหตุนี้นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงได้พยายามคิดหาวิธีที่จะเก็บรักษาพืชพรรณต่างๆ ไว้ในหลอดทดลอง โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของสารชะลอการเจริญเติบโตบางชนิดหรือมีสารที่ทำให้เกิดความเครียดของน้ำขึ้นในหลอดทดลอง ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามาก ๆ เพื่อเป็นการประหยัดแรงงาน เวลา และอาหาร ในการที่จะต้องทำการย้ายเนื้อเยื่อบ่อย ๆ จนกว่าที่จะต้องการเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อนั้น สามารถย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชชนิดนั้น ๆ อีกวิธีหนึ่งก็คือ การเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ในไนโตรเจนเหลวที่ อุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส ในสภาพเช่นนี้เซลล์และเนื้อเยื่อจะคงสภาพและมีชีวิตอยู่ได้ยาวนาน

2.3 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีการใดหรือใช้ตัวทำละลายใด ก็จะได้องค์ประกอบเป็นของผสมหรือสารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดออกมาจากพืชสมุนไพร โดยใช้น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลาย (solvent) สารสกัดอย่างหยาบนี้เป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร โดยจะมีทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทั้งทางเภสัชวิทยา (pharmacologically active constituents) ซึ่งมักเรียกว่า สารสำคัญ (active constituents) องค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacologically inactive constituents) ซึ่งเรียกว่าสารเฉื่อย (inert substances) ชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบในสารสกัดจะแปรเปลี่ยนไปตามสภาพของสมุนไพรที่ใช้และสภาวะที่ใช้ในการสกัด วัตถุประสงค์ของการสกัดพืชสมุนไพร คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เพื่อสกัดเอาสารสำคัญออกจากสมุนไพร
- เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นของสารสำคัญสูง
- เพื่อลดขนาด (dose) ของการใช้สมุนไพรลงให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม

2.3.1 น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการเตรียมการสกัด ได้แก่ น้ำ แอลกอฮอล์ หรือสารละลายผสมของสารละลายทั้งสองชนิดนี้ นอกจากนี้อาจใช้กรด ด่าง เติมลงในน้ำยาสกัดเพื่อปรับความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาสกัดให้เหมาะสมยิ่งขึ้น ส่วนสารละลายอื่นๆ เช่น อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม มีใช้บ้างเฉพาะบางกรณี

2.3.1.1 น้ำ

จัดเป็นตัวทำละลายที่ดี หาง่าย ราคาถูก แต่การใช้น้ำอย่างเดียวเป็นตัวทำละลายในการสกัดพืชสมุนไพรมีข้อเสียหลายประการ คือ สามารถละลายองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออกมาได้มาก เช่นเดียวกับสารสำคัญที่ต้องการ สารเฉื่อยที่ละลายออกมากับน้ำ เช่น น้ำตาล แป้ง ล้วนเป็นอาหารที่ดีของเชื้อจุลินทรีย์ จึงทำให้เกิดการบูดเสียของสารสกัดเนื่องจากจุลินทรีย์ได้ ถ้าไม่ใส่สารกันบูด (preservative) นอกจากนี้น้ำระเหยได้ที่อุณหภูมิสูง ถ้าต้องการทำให้สารสกัดในน้ำเข้มข้นจะต้องใช้อุณหภูมิสูงในการระเหยไล่น้ำออกไป ซึ่งอาจจะเกิดความเสียหายกับสารสำคัญได้ ดังนั้นจึงไม่ค่อยใช้น้ำเดี่ยวๆ เป็นน้ำยาสกัด แต่ใช้ร่วมกับตัวทำละลายอื่นๆ เช่น แอลกอฮอล์หรือกรด หากเติมกรดเล็กน้อยลงในน้ำใช้สกัดองค์ประกอบสำคัญในพืชสมุนไพรที่มีสารประกอบแอล-คาลอยด์ ส่วนน้ำที่เติมด่างลงไปเล็กน้อย (alkanised water) จะใช้สกัดสมุนไพรบางชนิด เช่น เปลือกคาสคารา (Cascara bark) เป็นต้น

2.3.1.2 แอลกอฮอล์

จัดเป็นตัวทำละลายที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ แอลกอฮอล์มีข้อดีกว่าดังนี้ มีความจำเพาะ (selectivity) ในการทำละลายมากกว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ หากต้องการทำให้สารสกัดเข้มข้นจะระเหยได้ง่ายแต่ราคาของแอลกอฮอล์จะแพงกว่าน้ำ

2.3.1.3 น้ำผสมแอลกอฮอล์ (hydroalcoholic mixture)

เป็นน้ำยาสกัดที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถละลายสารสำคัญในพืชสมุนไพรได้ใกล้เคียงกับแอลกอฮอล์ แต่ราคาถูกกว่า และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้อีกด้วย นอกจากนี้การใช้น้ำผสมแอลกอฮอล์ ยังช่วยป้องกันการแยกตัวของสารต่างๆในสารสกัดเมื่อตั้งทิ้งไว้ ซึ่งมักเกิดในกรณีที่ใช้น้ำอย่างเดียวในการสกัด

นอกจากน้ำยาสกัดต่างๆที่กล่าวมาข้างต้น ตัวทำละลายอินทรีย์ก็อาจใช้ในการสกัดพืชสมุนไพรได้ เช่น เฮกเซน (hexane) และปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) ใช้สกัดพืชสมุนไพรในขั้นต้น เพื่อขจัดสารพวกไขมันออกไปก่อนที่จะทำการสกัดสารสำคัญ แต่ต้องระเหยเอาน้ำยาสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหล่านี้ออกไปจนหมดก่อนทำการสกัดขั้นต่อไป ตัวทำละลายเหล่านี้ใช้สกัดองค์ประกอบที่ไม่มีขั้ว (non polar component) เช่น ไขมัน (lipid) สเตียรอยด์ (steroids) เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) เป็นต้น

คลอโรฟอร์ม (chloroform) และอีเทอร์ (ether) จัดเป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว (polarity) ปานกลาง ใช้สกัดองค์ประกอบที่ไม่มีขั้ว (non-polar component) ไปจนถึงสารที่มีขั้วปานกลาง

เมทานอล (methanol) เป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารสำคัญที่มีขั้ว (polar active constituent) เช่นเดียวกับแอลกอฮอล์ แต่นิยมใช้แอลกอฮอล์มากกว่า เพราะราคาถูกกว่า และมีความเป็นพิษน้อยกว่า

2.3.2 การเลือกน้ำยาสกัด

หลังจากทำการเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพรสำหรับการสกัดแล้วควรเลือกน้ำยาสกัดให้เหมาะสมกับชนิดของสารที่ต้องการสกัด โดยน้ำยาสกัดดังกล่าวควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. มีความสามารถในการละลายสารสำคัญมากที่สุดและไม่ละลายหรือละลายองค์ประกอบอื่นๆได้น้อย เนื่องจากสารสำคัญส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งอาจมีโครงสร้างสลับซับซ้อนมากน้อยต่างกัน และมีอยู่ในพืชทั้งสภาพอิสระและรวมตัวกับสารอื่นๆในสภาพเกลือหรือสารประกอบเชิงซ้อน ดังนั้นจึงควรพิจารณาสภาพหรือรูปแบบของสารสำคัญที่ต้องการสกัด นอกเหนือจากความมีขั้วของสาระสำคัญดังกล่าว ในการเลือกน้ำยาสกัดมีกฎทั่วไปว่าสิ่งที่เหมือนกันย่อมละลายในกันและกัน (like dissolve like) เช่น คุณสมบัติสารสำคัญมีขั้ว ก็ควรเลือกน้ำยาสกัดหรือตัวทำละลายที่มีขั้วเช่นเดียวกับในสารสกัด

2. มีความคงตัวดี และหาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย

3. ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป

4. สภาพของพืชสมุนไพรที่ทำการสกัด เช่น เมล็ด เป็นส่วนที่มีไขมันอยู่มาก ควรขจัดไขมันพวกนี้ออกก่อนโดยสารสกัดตัวทำละลายอินทรีย์ไม่มีขั้ว เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นต้น แล้วจึงนำกากพืชที่เหลือไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

ตัวทำละลายแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆตามโครงสร้าง เช่น นอน-โพลาร์ โพลาร์ อะโพรติก และโพลาร์โพรติก ซึ่งอธิบายได้ดังนี้

1. ชนิดโพรติก (Protic Solvent) เป็นตัวทำละลายที่มีโฮโดรเจนอะตอม ชนิดที่มีความเป็นกรดสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้ เช่น น้ำ แอลกอฮอล์ กรดคาร์บอกซิลิก จะเห็นว่ามักจะมีหมู่ OH อยู่ในโมเลกุล

2. ชนิดอะโพรติก (Aprotic Solvent) เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีโฮโดรเจนอะตอมชนิดที่มีความเป็นกรดไม่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้ เช่น เบนซีน ไซโคลเฮกเซน คลอโรฟอร์ม อะซีโตน อีเธอร์ ถ้าพิจารณาจากสมบัติทางกายภาพ คือจากค่าไดโพลโมเมนต์ หรือ ไดอิเล็กตริกคอนสแตนส์ จะแบ่งเป็น

2.1 ชนิดมีขั้ว (Polar Solvent) จะมีค่าไดโพลโมเมนต์ และ ไดอิเล็กตริกคอนสแตนส์ สูง

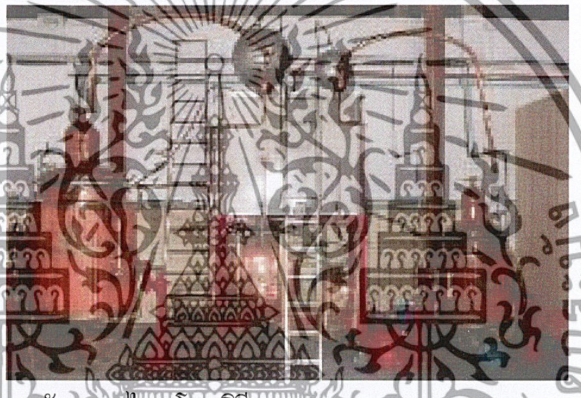
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ชนิดไม่มีขั้ว (Non-polar Solvent) จะมีค่าไดโพลโมเมนต์ และ ไดอิเล็กตริกคอนส-แตนส์ ต่ำหรือเป็นศูนย์

2.3.3 วิธีการสกัด

สามารถทำได้ 3 วิธีด้วยกัน คือ

2.3.3.1 Maceration (รูปที่ 2.3) วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด โดยทำการคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารในพืชสมุนไพรแล้วนำพืชสมุนไพรไปใส่ไว้ในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่หรือโถ ทำการเขย่าเป็นเวลา และแช่ไว้อย่างน้อย 7 วัน จากนั้นนำมากรองแล้วบีบเอาสารสกัดออกมาจากกากสมุนไพรให้ได้มากที่สุด นำสารละลายสมุนไพรที่ได้ไปทำการกรองเอาเศษสมุนไพรที่ติดออกให้หมด แล้วจึงนำสารที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อ วิธีนี้มีข้อดีคือ สารสกัดจะไม่ถูกความร้อน ทำให้โอกาสในการสลายตัวของสารสกัดลดลง ข้อเสียของวิธีนี้คือจะสิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

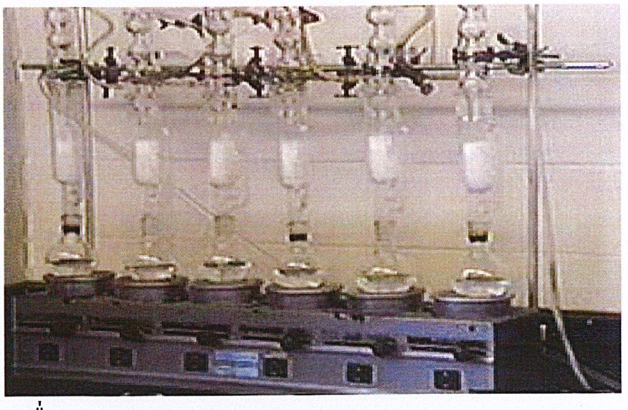


รูปที่ 2.3 แสดงการสกัดสมุนไพรโดยวิธี Maceration

ที่มา :http://www.oknation.net/blog/buzz

2.3.3.2 Soxhlet Extraction (รูปที่ 2.4) เป็นวิธีที่ใช้ความร้อนในการสกัดและต้องอาศัยการควบแน่นเข้าช่วย เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง ตัวทำละลายจะต้องมีจุดเดือดต่ำ เมื่อระเหยจะนำสารจากพืชสมุนไพรไปด้วยจากนั้นเมื่อถูกความเย็นก็จะกลั่นตัวลงใน Thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อทำตัวละลายใน extracting chamber สูงขึ้นถึงระดับกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับไปในขวดรูปชมพู่ด้วยวิธีกาลักน้ำ ตัวทำละลายก็ระเหยขึ้นแล้วกลั่นตัวกลับมาเป็นตัวทำละลายสกัดสารใหม่วนเวียนไป การใช้ความร้อนอาจทำให้สารที่ระเหยง่ายระเหยออกไป จึงไม่เหมาะกับการสกัดสารจากพืชสมุนไพรที่มีสารที่ระเหยง่ายเป็นองค์ประกอบ วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสำหรับการสกัดสารองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อน และใช้ตัวทำละลายน้อยไม่สิ้นเปลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 แสดงเครื่อง Soxhlet Extraction

ที่มา :http://www.oknation.net/blog/buzz

2.3.3.3 Extraction of volatile oil ใช้สำหรับการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีการต่าง ๆ หลายวิธี เลือกใช้ตามความเหมาะสมของพืชแต่ละชนิด เช่นการดูดซับ การใช้ตัวทำละลาย วิธีการบีบ การกลั่นโดยน้ำหรือไอน้ำ

2.4 การทดสอบความไวของเชื้อต่อผลิตภัณฑ์ต้านจุลชีพ

การทดสอบความไวของเชื้อต่อผลิตภัณฑ์ต้านจุลชีพสามารถทำได้หลายวิธี โดยมีวิธีการหลัก 2 ประการคือ Dilution test และ Diffusion test ซึ่งในการทดสอบจำเป็นต้องคำนึงถึงผลกระทบจากสิ่งต่อไปนี้ ได้แก่ การเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิ และชนิดของเชื้อที่ต้องการทดสอบ

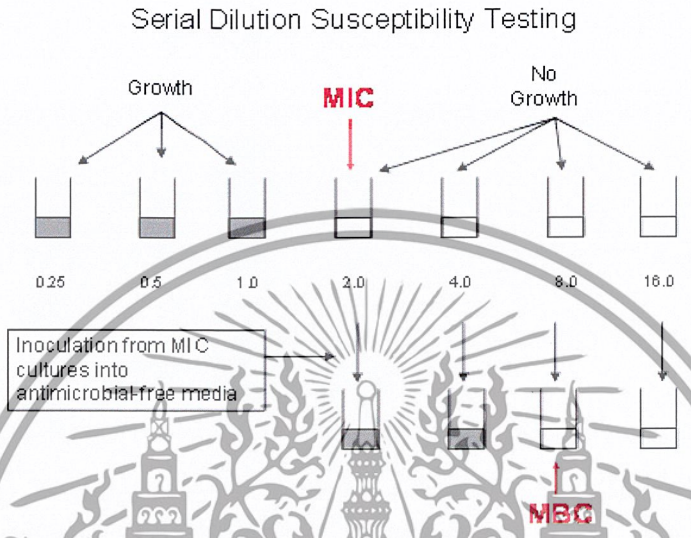
2.4.1 Dilution test

เป็นการทดสอบหาปริมาณ เพราะสามารถทราบค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ทำลายเชื้อได้ นิยมใช้กับเชื้อที่เจริญได้ช้า ใช้ทดสอบยืนยันผลวิธี Diffusion test ที่ให้ผลความไวปานกลางหรือดื้อยา เพื่อว่าจะสามารถใช้ยานั้นในจำนวนสูงๆได้ และใช้ทดสอบความไวของเชื้อ anaerobe การทดสอบวิธีนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น

2.4.1.1 Broth dilution method ทำได้โดยการเจือจางผลิตภัณฑ์ในอาหารเหลวให้ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ลดลงทีละครึ่งตามลำดับ (รูปที่ 2.5) จนมีความเข้มข้นสุดท้ายตามที่ต้องการ แล้วเติมเชื้อที่ต้องการทดสอบลงไปเท่าๆกันทุกหลอด (ปริมาณเชื้อประมาณ 10^5-10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง แล้วนำมาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration = MIC) โดยดูจากหลอดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่เจริญเมื่อดูด้วยตาเปล่า และนำไปหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration = MBC) โดยนำหลอดที่เชื้อไม่เจริญทุกหลอดไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ปริมาณผลิตภัณฑ์ในหลอดที่มีความเข้มข้นต่ำสุด ที่ไม่มีเชื้อขึ้นคือ MBC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบวิธีนี้สิ้นเปลือง ใช้เวลามาก แต่สามารถอ่านค่าได้ละเอียด ผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจะมีค่า MIC และ MBC ใกล้เคียงกัน ส่วนผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมักมีค่า MIC และ MBC แตกต่างกัน



รูปที่ 2.5 แสดงค่าMIC และ MBC

ที่มา :http://www.jameslunsford.com/microunknown2

2.4.1.2 Agar dilution method ทำได้โดยการเจือจางผลิตภัณฑ์ให้มีความเข้มข้นต่างๆกัน แล้วผสมกับอาหารวุ้นขณะที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส แล้วเทลงจานแก้ว ให้ผลิตภัณฑ์และวุ้นผสมเข้าด้วยกัน จะสามารถผสมผลิตภัณฑ์กับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นตามต้องการ เมื่อวุ้นแข็งแล้ว นำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาแตะเป็นจุดๆ ให้ห่างกันพอสมควร โดยใช้ loop หรือ multiple inoculators ให้เริ่มเพาะเชื้อจานที่มีความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ต่ำก่อน

ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนจานอาหารเดียวกันได้ และถ้ามีเชื้ออื่นๆปนเปื้อนก็สามารถมองเห็นได้ แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถหาค่า MBC ได้

2.4.2 Diffusion test

วิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุดคือ disk diffusion method ทว่าเป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพเท่านั้น สามารถบอกผลได้เพียงว่าเชื้อมีความไวต่อผลิตภัณฑ์ มีความไวปานกลาง หรือไม่ตอบสนองต่อผลิตภัณฑ์ ไม่อาจทราบค่า MIC หรือ MBC ได้ ไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญช้า และแอนแอโรบ แต่อย่างไรก็ตามเป็นวิธีการทดสอบประจำห้องปฏิบัติการที่ดีที่สุด

หลักการทั่วไปคือ การทำให้ผลิตภัณฑ์ต้านจุลชีพจากที่หนึ่งซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อแบคทีเรียจำนวนพอเหมาะไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยวัดขนาดของบริเวณยับยั้ง (zone of inhibition) ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสรอบ disk วิธีนี้อาจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่อ่านผลเป็นค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อโดยตรง เนื่องจากขนาดบริเวณยับยั้งนอกจากจะขึ้นอยู่กับความไวของเชื้อต่อผลิตภัณฑ์ต้านจุลชีพแล้ว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของผลิตภัณฑ์ต้านจุลชีพ ปริมาณและอัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรดด่าง และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อเหล่านี้เป็นต้น

2.5 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

2.5.1 *Escherichia coli*

รูปร่างเป็นแท่งตรง อยู่เดี่ยว ๆ หรือ เป็นคู่ เคลื่อนที่โดยใช้ peritrichous flagella (รูปที่ 2.6) หรือไม่เคลื่อนที่ก็ได้ ขึ้นได้บนอาหารง่ายๆ โคโลนีบนอาหาร NA ผิวเรียบ ชื้น ผิวมัน สีเทา และเกิดการอิมัลซิไฟล์ง่ายในน้ำเกลือ อาจมีลักษณะหยาบ แห้ง ไม่อิมัลซิไฟล์ง่ายในน้ำเกลือ สามารถใช้แอซีเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่สามารถใช้ซิเตรท กลูโคสและคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ จะถูกหมักเกิดกรดแลกติก แอซีติก และฟอร์มิก พบเชื้อ *E. coli* ครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1885 และจัดเป็นเชื้อที่ไม่เป็นอันตราย (harmless) มีรูปท่อน แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ ต้องการอากาศแบบ แฟคัลเททีฟ แอนแอโรบ มีถิ่นที่อยู่ในลำไส้ของมนุษย์ สัตว์เลือดอุ่น และสัตว์ปีก โดยพบในปริมาณสูง (ประมาณล้านเซลล์ต่อกรัม) ใช้เชื้อชนิดนี้เป็นจุลินทรีย์ดัชนีบ่งชี้ (index microorganisms) การปนเปื้อนของอุจจาระในอาหารและน้ำ ประมาณกลางปี 1940 พบว่าเชื้อ *E. Coli* ทำให้ทารกท้องเสีย โดยตั้งชื่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคนี้ว่า enteropathogenic *E. Coli* ในปัจจุบันพบว่ามีเชื้อที่ก่อโรคดังนี้ Enteropathogenic *E. Coli* (EPEC) , Enterotoxigenic *E. Coli* (ETEC) , Enteroinvasive *E. Coli* (EIEC) และ Enterohaemorrhagic *E. Coli* (EHEC)

รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะของ *Escherichia coli*

ที่มา :http://www.zdravstvena.info

2.5.2 *Staphylococcus aureus*

เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น หรือเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ (รูปที่ 2.7) ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีมีสีเหลืองหรือสีทองเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศที่มีออกซิเจน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตคือ 35-40 องศาเซลเซียส ช่วง pH หรือความเป็นกรด-ด่างที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

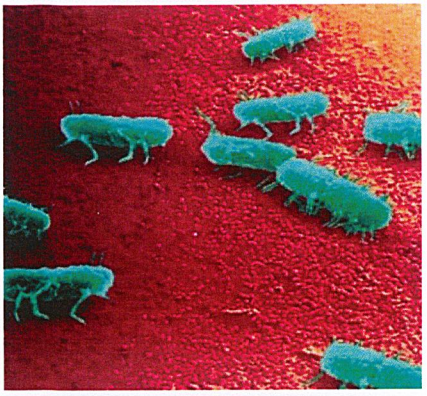
เหมาะสมในการเติบโตอยู่ที่ 7-7.5 ส่วนค่า A_w (ปริมาณน้ำอิสระในอาหารที่จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเติบโต) ต่ำสุดสำหรับการเติบโตในสภาพมีออกซิเจนประมาณ 0.86 สภาพไม่มีออกซิเจน 0.90 บางสายพันธุ์ผลิตสารพิษที่เรียกว่า เอนเทอโรทอกซิน ทำให้อาหารเป็นพิษ ซึ่งเอนเทอโรทอกซินที่ผลิตมีหลายชนิด แต่ชนิดที่พบว่าทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ ซึ่งเอนเทอโรทอกซินที่ผลิตมีหลายชนิด แต่ชนิดที่พบว่าทำให้เกิดอาหารเป็นพิษบ่อย คือ ชนิดเอ และดี โดยช่วงอุณหภูมิที่เชื้อชนิดนี้จะผลิตเอน-เทอโรทอกซินอยู่ระหว่าง 15.6 และ 46.1 องศาเซลเซียส และผลิตได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศา-เซลเซียส จะมีชีวิตอยู่ได้ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำ อาหารและนม หรืออาหารบรรจุเสร็จ สภาวะแวดล้อมภายนอกมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมนุษย์และสัตว์นั้นเป็นแหล่งของเชื้อชนิดนี้โดยจะพบอยู่ตามทางเดินหายใจ ลำคอ หรือ เส้นผมและผิวหนังถึง 50% หรือมากกว่านี้ในคนที่มีสุขภาพดี และอาจพบเชื้อชนิดนี้ 60-80% ในผู้ที่สัมผัสโดยตรงกับผู้ป่วยหรือผู้ที่สัมผัสกับสภาพแวดล้อมในโรงพยาบาล ตลอดจนผู้ประกอบอาหาร รวมทั้งในขั้นตอนของการบรรจุและสภาพแวดล้อมภายนอกนั้นก็เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน

รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะของ *Staphylococcus aureus*
ที่มา :http://www.zdravstvena.info

2.5.3 *Salmonella*

เชื้อสกุลนี้เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ รูปท่อนสั้น มีแฟลกเจลลา (รูปที่ 2.8) โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร ลักษณะขอบกลม ขอบเรียบ และเป็นมัน ไม่มีสี (ไม่หมักย่อยน้ำตาลแลคโตส) ไม่ทึบแต่ไม่โปร่งแสง บางสายพันธุ์มีโคโลนีลักษณะเป็นเมือก สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ดีที่ 37 องศาเซลเซียส จึงสามารถก่อโรคในคนได้ *Salmonella* ก่อให้เกิดโรคในคน และสัตว์ได้ เช่น *Salmonella* Typhimurium ก่อโรคเฉพาะในคนเท่านั้นโรคที่เกิดขึ้นมี Enteric fever โรคทางเดินอาหารอักเสบเฉียบพลัน การติดเชื้อในกระแสโลหิต และการติดเชื้อในอวัยวะเพศชายในเฉพาะที่ แบคทีเรียสกุล *Salmonella* เป็นแบคทีเรียสกุลใหญ่ สามารถจำแนกโดยใช้ คุณสมบัติแอนติเจน และแบคทีริโอฟาจ ได้กว่า 1,900 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

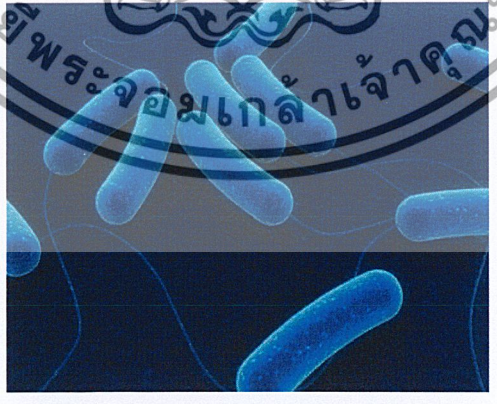


รูปที่ 2.8 แสดงลักษณะของ *Salmonella*

ที่มา :http://www.unitynature.com

2.5.4 *Bacillus subtilis*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ผลทดสอบ catalase เป็นบวก มี flagella แบบ peritrichous (รูปที่ 2.9) สามารถสร้าง capsule ได้ อยู่ในกลุ่ม obligate aerobe สามารถสร้าง endospore ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดี แหล่งที่อยู่อาศัยพบได้ทั่วไปในดิน สืบพันธุ์โดยการแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสอง (binary fission) โดยการแบ่งเป็นแบบไม่สมมาตร นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อมีสภาวะในการเจริญที่ไม่เหมาะสม เช่น ขาดอาหาร หรือขาดน้ำ แบคทีเรียชนิดนี้จะมีการสร้าง endospore ซึ่งเป็นโครงสร้างพิเศษที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญนั้นได้ เป็นระยะเวลานาน และจะงอกออกมาเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์ได้เมื่อมีสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญอีกครั้ง ในบางครั้งอาจไม่ถือว่า endospore เป็นโครงสร้างสืบพันธุ์เนื่องจากไม่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ มีการนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายประการ กล่าวคือ สามารถใช้ในการทดลองเรื่องสงครามชีวภาพเป็นประการแรก และยังสามารถใช้เป็นโมเดลการศึกษาในห้องทดลอง นอกจากนี้ยังใช้ในด้านการอาหาร



รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะของ *Bacillus subtilis*

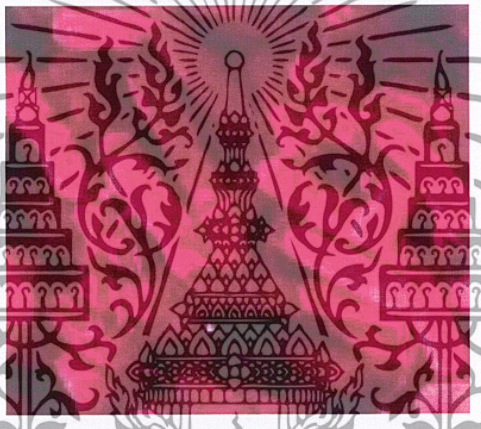
ที่มา :http://www.anupriti.blogspot.com/2009/07/data-storage-in-bacteria-astonishing.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.5.5 *Klebsiella pneumoniae*

เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (Gram-negative) รูปแท่ง (รูปที่ 2.10) สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสได้และ เป็นแบคทีเรียชนิด facultative anaerobic เป็นเชื้อที่ไม่เคลื่อนที่ และยังสามารถสร้างแคปซูลได้ เชื้อนี้จัดเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการปอดบวม นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการติดเชื้อในอวัยวะส่วนอื่นนอกจากทางเดินหายใจได้ เช่น เยื่ออ่อนในช่องปาก ผิวหนัง ลำไส้ เชื้อชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 12-43 องศาเซลเซียส สามารถทนความแห้งได้เป็นเวลาหลายๆเดือน เป็นสาเหตุหนึ่งของโรคปอดบวมและยังสามารถพบได้ทั่วไปตามโรงพยาบาล ซึ่งอาจทำให้เกิดการติดเชื้อที่แผล โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นเชื้อประจำถิ่นใน ปาก ลำไส้ และ ผิวหนังตามธรรมชาตินั้นเราสามารถพบเชื้อได้ในดิน และประมาณ 30% ของเชื้อที่อยู่ในดินนั้น สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน



รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะของ *Klebsiella pneumoniae*
ที่มา :http://www.technoinhome.com/vspcite/front/board/show.php

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จันทนา กาญจน์กมล (2551) ศึกษาการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพญาวานร โดยการทดสอบกับเชื้อ จำนวน 4 ชนิด อยู่ใน Gram positive bacteria ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Vibrio cholerae* ส่วนใน Gram negative bacteria ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium และ *Escherichia coli* จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดใบพญาวานร โดยวิธี Disc – diffusion Assay ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด โดยใช้สารสกัดใบพญาวานรที่ใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ บิวทานอล ไดคลอโรมีเทน เอทานอล เอทิลอะซีเตต เฮกเซน เมทานอล และ น้ำ ในการทดสอบ พบว่า สารสกัดเกือบทุกชนิด ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ยกเว้นสารสกัดใบสดในเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ได้เล็กน้อย วัดขนาดของบริเวณยับยั้งได้ประมาณ 1 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
117229

Dieu HK และ Hoa TV. (2008) ศึกษาประสิทธิภาพของผงใบพญาวานรในการรักษาโรคท้องร่วงในลูกหมูโดยเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะสองชนิดที่ใช้ในการรักษาโรคท้องร่วงในลูกสุกรอย่างแพร่หลาย ได้แก่ ยา Coli-norgent และ ยา Cotrimxazol ในการทดลองจะให้ลูกสุกรกินวันละสองครั้ง เป็นเวลา 3 วัน โดยจะแบ่งกลุ่มการรักษาออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่หนึ่งที่ใช้ผงใบพญาวานร โดยให้ปริมาณ 1 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว กลุ่มที่สองที่ใช้ยา Coli-norgent โดยให้ปริมาณ 0.1 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวและ กลุ่มที่ใช้ยา Cotrimxazol โดยให้ปริมาณ 0.1 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว โดยดำเนินการกับลูกสุกรจากหลายครัวเรือนในหมู่บ้าน My Thuan และหมู่บ้าน Thuan An จากการทดลองพบว่า หลังจากการรักษาโรคท้องร่วงที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* เป็นระยะเวลา 3 วัน การรักษาด้วยผงของใบพญาวานรพบว่ามีจำนวนเชื้อ *E. coli* ในอุจจาระของลูกหมูลดลง 88.06 เปอร์เซ็นต์ การรักษาด้วย Coli-norgent พบว่ามีจำนวนเชื้อลดลง 66.41 เปอร์เซ็นต์ และการรักษาด้วย Cotrimxazol พบว่ามีจำนวนเชื้อลดลง 97.28 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการผลการทดลองสรุปได้ว่า ผงของใบพญาวานรมีประสิทธิภาพเหมือนกับยา Coli-norgent และ Cotrimxazol แสดงว่าสามารถนำผงใบพญาวานรมาใช้ในการรักษาโรคท้องร่วงที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* แทนยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 พืชที่ใช้

3.1.1 พญาวานร (*Pseuderatherum platiferum*)

3.2 เชื้อแบคทีเรีย

3.2.1 *Escherichia coli* ATCC 25922

3.2.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3.2.3 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

3.2.4 *Salmonella rissen*

3.2.5 *Klebsiella pneumoniae*

3.3 สารเคมี

3.3.1 เอทิลแอลกอฮอล์ 95%

3.3.2 เอทิลแอลกอฮอล์ 70%

3.3.3 เมธิลแอลกอฮอล์

3.3.4 เฮกเซน

3.3.5 โซเดียมคลอไรด์

3.3.6 น้ำกลั่น

3.3.7 อาหาร Mueller Hinton agar

3.3.8 อาหาร Murashige & Skoog (MS)

3.3.9 ยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน

3.4 อุปกรณ์

3.4.1 ขวดเพาะเลี้ยงพร้อมฝาทนไฟ

3.4.2 จานแก้ว (petri dish)

3.4.3 ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อแบบลามินาร์แอร์โฟลว์ (laminar air flow)

3.4.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์อลูมิเนียม (alcohol burner)

3.4.5 ที่ตั้งหลอดทดลอง (rack for tube)

3.4.6 มีดผ่าตัด และ ใบมีด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.7 ปากคีบ (forcept)

3.4.8 กระบอกตวง (cylinder)

3.4.9 บีกเกอร์ (beaker)

3.4.10 ช้อนตักสาร (spatula)

3.4.11 แท่งแก้วคน (stirring rod)

3.4.12 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance)

3.4.13 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)

3.4.14 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)

3.4.15 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

3.4.16 กรวยแยก (separatory funnel)

3.4.17 ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)

3.4.18 เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)

3.4.19 ที่เจาะจุกก๊อก (cork borer)

3.4.20 คิวเวตแก้ว (cuvette)

3.4.21 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

3.4.22 ชุดกรองสุญญากาศ (suction)

3.4.23 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator)

3.4.24 ไมโครปิเปตต์ (micropipette)

3.4.25 เดซิเคเตอร์ (desiccator)

3.4.26 ปิเปตต์แก้ว (pipette)

1.4.27 เวอร์เนียร์แคลิปเปอร์ (vernier)

1.4.28 เพลท 96 หลุมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (sterile 96-well microtiter plates)

1.4.29 เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพญาวานรในสูตรอาหารแข็ง Murashige & Skoog (MS)

3.5.1.1 การเตรียมอาหารแข็ง MS

ชั่งอาหารสำเร็จรูป MS 4.43 กรัมต่อลิตร และ น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร นำไปละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตรก่อน แล้วค่อยปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปปรับพีเอชให้มีช่วงอยู่ระหว่าง 5.6-5.8 และชั่งผงวุ้นใส่ลงไป 8 กรัม และนำไปให้ความร้อนด้วยเตาไมโครเวฟ เพื่อให้ผงวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับอาหาร จากนั้นเทอาหารที่เตรียมได้ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงให้มีความสูงของอาหารเลี้ยงเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประมาณ 1.5 เซนติเมตร และทำการปิดฝาขวดให้แน่น จากนั้นนำขวดอาหารเพาะเลี้ยงทั้งหมดที่ได้เตรียมไว้ไปทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สุดท้ายนำขวดอาหารเพาะเลี้ยงที่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนั้น ไปเก็บไว้ที่ชั้นวางอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อนที่จะมีการนำขวดอาหารเพาะเลี้ยงไปใช้ในขั้นตอนการถ่ายเนื้อเยื่อพืชต่อไป

3.5.1.2 ขั้นตอนการถ่ายเนื้อเยื่อพืช

ก่อนลงมือปฏิบัติ ให้ทำความสะอาดบริเวณภายในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อให้สะอาดโดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ให้ทั่ว จากนั้นทำการเปิดไฟยูวีที่มีอยู่ในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อโดยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อทำการฆ่าเชื้อ นำขวดอาหารและขวดเพาะเลี้ยงเข้าไปในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ โดยทำความสะอาดภายนอกขวดให้ทั่วด้วยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 % วิธีการถ่ายเนื้อเยื่อเริ่มจากทำความสะอาดปากคีบและมีดก่อน ใช้วิธีจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 %แล้วลนไฟ เปิดฝาจานแก้วที่ปราศจากเชื้อวางไว้บริเวณพื้นตู้ถ่ายเนื้อเยื่อโดยให้อยู่บริเวณด้านหน้า ลนปากขวดที่เพาะเลี้ยงแล้ว เปิดฝาขวด แล้วใช้ปากคีบดึงต้นพญาวานรออกมาวางบนจานแก้วที่เปิดวางรอไว้บริเวณด้านหน้าแล้ว ปิดฝาขวดเพาะเลี้ยงนำไปวางทางซ้ายมือ ทำการตัดแบ่งต้นพญาวานร โดยตัดบริเวณส่วนของลำต้นโดยแบ่งออกเป็นท่อนสั้น มีการเหลือส่วนของกิ่งทิ้งไว้แต่มีการตัดใบทิ้งไป จากนั้นลนปากขวดอาหารใหม่และเปิดฝาออก ใช้ปากคีบคีบส่วนของลำต้นท่อนสั้นใส่ลงในอาหารลนปากขวดอีกครั้ง แล้วปิดฝาขวดให้สนิท จากนั้นทำการเขียนวันที่ที่ทำการถ่ายเนื้อเยื่อไว้ที่ขวดเพาะเลี้ยงใหม่ สุดท้ายนำขวดเพาะเลี้ยงไปบ่มในห้องเพาะเลี้ยง

3.5.2 ศึกษาการเพิ่มปริมาณต้นพืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารแข็งสูตร MS โดยมีสัดส่วนของฮอร์โมนที่แตกต่างกัน

ทำการทดลองสูตรอาหาร 9 สูตร (A-I) ซึ่งสูตรอาหารจะประกอบด้วย

- Murashige & Skoog basal medium (MS)
- ฮอร์โมน 6-benzylamino – purine (BA)
- ฮอร์โมน α-Naphthalene acetic acid (NAA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยที่ทุกสูตรจะมีส่วนผสมของ MS ผสมอยู่ และจะแตกต่างกันที่สัดส่วนของฮอร์โมน ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สัดส่วนของฮอร์โมน BA และ NAA ในอาหารทั้ง 9 สูตร (A-I)

BA / NAA	0.1 mg/l	1.0 mg/l	2.0 mg/l
0.1 mg/l	A	B	C
1.0 mg/l	D	E	F
2.0 mg/l	G	H	I

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ปริมาตร 900 มิลลิลิตรต่อสูตร โดย

1. ชั่ง MS 3.987 กรัม และ น้ำตาล 27 กรัม ละลายในน้ำคลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร
2. แบ่งใส่ขวด 9 ขวด ขวดละ 90 มิลลิลิตร (สำหรับ 9 สูตร)
3. เติมฮอร์โมนตามสัดส่วนในตารางที่ 3.1 หนึ่งขวดต่อหนึ่งสูตรใช้อาหารที่เหลือจากการแบ่งใส่ขวดในข้อ 2 (90 มิลลิลิตร) ในการปรับปริมาตรในแต่ละขวด เป็น 100 มิลลิลิตรต่อขวด จะทำให้ได้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 9 สูตร สูตรละ 100 มิลลิลิตร
4. ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 5.6-5.8
5. เติมวุ้น ขวดละ 0.8 กรัม (ทำให้วุ้นละลายในตู้ไมโครเวฟ)
6. เทวุ้นใส่ขวดอาหารขวดเล็กที่จะทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขวดละประมาณ 10 มิลลิลิตร

เมื่อได้อาหารทั้ง 9 สูตรแล้ว นำไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นจึงตัดเอาชิ้นส่วนของใบพญาวานร ให้มีขนาดประมาณ 0.5-0.8 เซนติเมตร มาวางลงบนอาหารทุกสูตร โดยจะทำภายในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อด้วยวิธีปลอดเชื้อ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน สังเกตดูการเจริญของเนื้อเยื่อดังกล่าว

3.5.3 การสกัดสารจากใบพญาวานรด้วยวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย

นำใบสดที่ทำการล้างทำความสะอาดและทำให้สะเด็ดน้ำมาชั่งน้ำหนักใบสด แล้วนำไปปั่นละเอียดกับเมทานอลให้มีอัตราส่วนใบต่อปริมาตรเมทานอลเป็น 1:9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำไปหมักไว้เป็นเวลา 5 วันในขวดสีชา (การ maceration) จากนั้นนำมากรองกากออกด้วยชุดกรองสุญญากาศ นำไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) จนได้สารสกัดหยาบ นำเมทานอลลงไปกลั้วจนหมด แล้วนำมาแยกสารด้วยการผสมด้วยเฮกเซน ในกรวยแยก ตั้งทิ้งไว้ จะได้เป็นชั้นเมทานอล และ ชั้นเฮกเซนแยกกัน ชั้นเฮกเซนอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนชั้นเมทานอลอยู่ล่าง ค่อยๆปล่อยชั้นเมทานอลลงทางด้านล่าง และเทชั้นเฮกเซนออกทางด้านบน จากนั้นจึงนำไประเหยตัวทำละลายออกอีกครั้งจนเหลือแต่สารสกัดหยาบ นำสารสกัดหยาบไปทิ้งไว้ให้แห้งในเดซิเคเตอร์ แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักสารสกัดหยาบ

3.5.4 ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรด้วยวิธี Agar-well diffusion

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ ได้แก่

1. *Escherichia coli* ATCC 25922
2. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
3. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
4. *Salmonella rissen*
5. *Klebsiella pneumoniae*

ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรด้วยวิธี Agar-well diffusion โดย

3.5.4.1 นำห่วงเขี่ยเชื้อแตะส่วนบนของโคโลนีเชื้อมาใส่ลงในน้ำเกลือที่เข้มข้น 0.85% เพื่อทำเซลล์แขวนลอยที่มีเชื้อปริมาณ 1.5×10^8 CFU/ml

3.5.4.2 นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร โดยกำหนดให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.13 (McFarland standard N0. 0.5)

หมายเหตุ : การทำข้อ 3.5.4.1 และ 3.5.4.2 ต้องทำภายใน 15 นาที

3.5.4.3 จุ่มไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในสารละลายเซลล์แขวนลอยที่เตรียมไว้ และแตะปลายสำลีที่ด้านข้างของหลอดทดลองเพื่อเป็นการกดเอาน้ำออกไปบางส่วน

3.5.4.4 ทำการสวอบเชื้อลงบนอาหาร MHA ในลักษณะ 4 ระนาบ โดยทำการหมุนเพลทประมาณ 60 องศาทุกครั้ง ที่จะทำการสวอบระนาบใหม่ เมื่อทำการสวอบครบทั้ง 4 ระนาบแล้ว ให้ลากบนวุ้นบริเวณที่อยู่ติดขอบเพลทโดยรอบด้วย

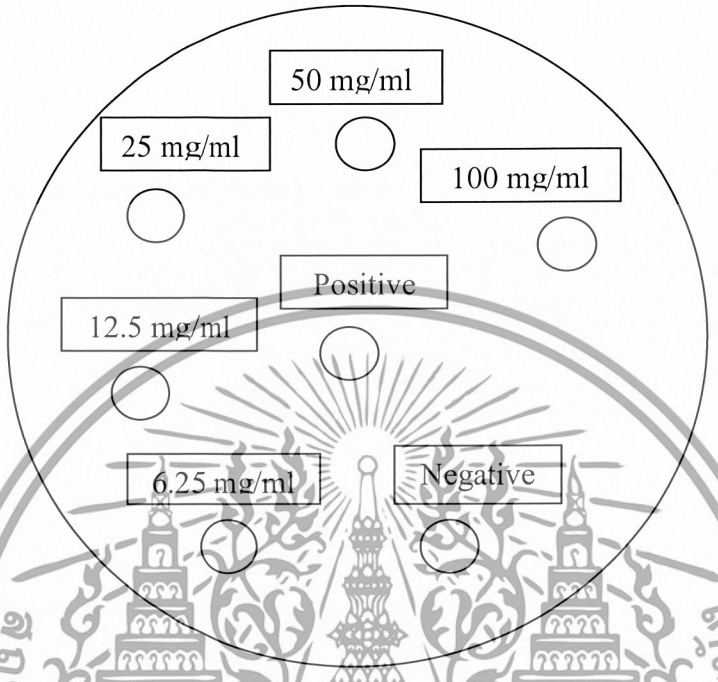
3.5.4.5 ทิ้งไว้ 3-5 นาที แต่ไม่เกิน 15 นาที เพื่อให้เชื้อซึมลงในอาหารก่อนที่จะทำการเจาะหลุม

3.5.4.6 เจาะวุ้นด้วยที่เจาะจุกก๊อก (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เป็นจำนวน 7 หลุมต่อหนึ่งเพลท

3.5.4.7 ใส่สารสกัดหยาบของใบพญาวานรจากธรรมชาติ และ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น (100, 50 , 25 , 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงในหลุมที่เจาะ (หนึ่งหลุมต่อหนึ่งระดับความเข้มข้น) , สารละลายยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลุมที่อยู่ตรงกลางเพื่อเป็น Positive control และ ตัวทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการสกัดสารซึ่งก็คือ เมทานอล เป็น Negative control ลงในหลุมที่เหลือ โดยสารดังกล่าวจะใส่หลุมละ 40 ไมโครลิตร และทำเชื้อละสามซ้ำ ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพญาวานรด้วยวิธี Agar-well diffusion

3.5.4.8 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารสกัดหยาบแพร่สู่วุ้น จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.4.9 ทำการบันทึกผลการทดลอง โดยการวัดโซนใสที่เกิดขึ้นรอบๆหลุมที่ใส่สารสกัดหยาบและสารละลายยาปฏิชีวนะด้วยเวอร์เนียร์แคลิปเปอร์

3.5.4.10 จากการทดลองข้างต้นจะนำมาศึกษาต่อ โดยเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้นไปอีกเพื่อยืนยันผลอีกครั้ง ทำการทดลองเหมือนกับข้อ 3.5.4.1-3.5.4.9 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบธรรมชาติเป็น (1000, 800 , 600 , 400 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และใช้ความเข้มข้นของสารละลายยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.5 การศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration หรือ MIC) ของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานร โดยวิธี Micro dilution method

3.5.5.1 นำสารสกัดหยาบของใบพญาวานรในชั้นเมทานอลทั้งจากธรรมชาติ และ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ให้ผลการยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดจากวิธี Agar-well diffusion ทำการเจือจางแบบสองเท่า (2 fold serial dilution) ซึ่งมี 4 ระดับความเข้มข้น (100, 50 , 25 และ 12.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

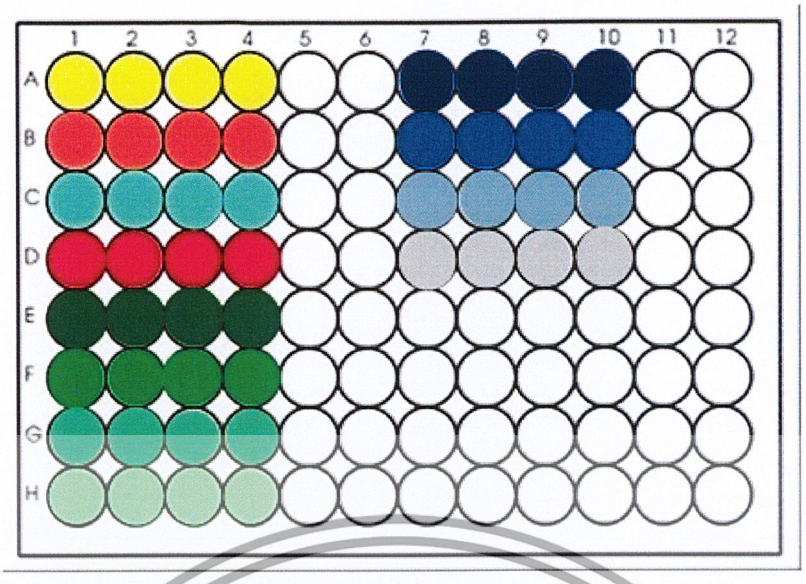
มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยขั้นแรกนำสารสกัดที่ได้ปิเปตลงหลุมละ 20 ไมโครลิตรก่อน ในเพลท 96 หลุมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (sterile 96-well microtiter plates) จากนั้นทำการปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Broth ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร และสุดท้ายปิเปตเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 1.5×10^8 CFU/ml ลงไปหลุมละ 30 ไมโครลิตร โดยจะมีชุดควบคุมทางบวกและทางลบ กล่าวคือ ชุดควบคุมทางบวกได้แก่ ยาเตตร้าซัยคลิน ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชุดควบคุมทางลบได้แก่ น้ำกลั่น, เมทานอล และ ชุดควบคุม ได้แก่ อาหารเพียงอย่างเดียวลงไปหลุม 150 ไมโครลิตร โดยแต่ละหลุมจะทำ 4 ซ้ำ ดังภาพที่ 3.2 เมื่อเสร็จแล้วนำไปนำไปทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์(microplate reader)ก่อน ซึ่งค่าที่ได้นี้จะเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในวันที่หนึ่ง (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำไปทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ซึ่งค่าที่ได้นี้จะเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในวันที่สอง เมื่อได้ผลการทดลองทั้งหมดแล้ว นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาค่าดัชนีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และดูว่าความเข้มข้นต่ำสุดเท่าใดของสารสกัดที่ให้การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยจะมีการเปรียบเทียบระหว่างค่าดัชนีของการเจริญเติบโตของเชื้อที่ความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ ซึ่งค่าที่ได้นั้นก็คือค่า MIC

$$\text{ค่าดัชนีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย} = \frac{OD2 - OD1}{OD1}$$

เมื่อ OD 1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในวันที่หนึ่ง (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น)

OD 2 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในวันที่สอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรจากธรรมชาติ และ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยวิธี Micro dilution method

หมายเหตุ : -แถว A1-A4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อMuller Hinton Broth อย่างเดียว ลงไป 150 ไมโครลิตร

-แถว B1-B4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร

-แถว C1-C4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, เมทานอล 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร

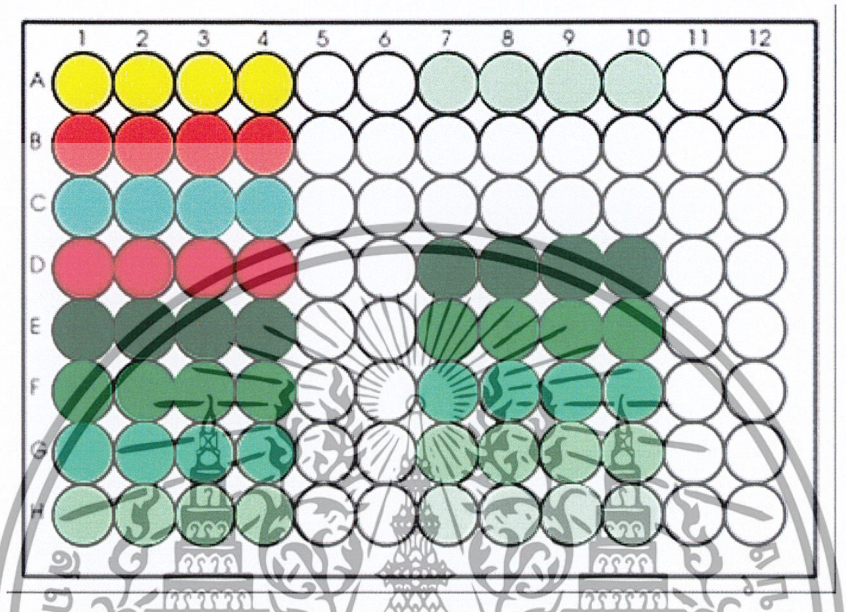
-แถว D1-D4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, ยาเตตร้าซัยคลิน 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร

-แถว E1-E4,F1-F4,G1-G4 และ H1-H4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, สารสกัดหยาบจากใบธรรมชาติ 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร (ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมี 4 ความเข้มข้น คือ100, 50 , 25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

-แถว A7-A10,B7-B10,C7-C10 และ D7-D10 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, สารสกัดหยาบจากใบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร (ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมี 4 ความเข้มข้น คือ100, 50 , 25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5.2 จากการทดลองข้างต้นจะนำมาศึกษาต่อ โดยเพิ่มความเข้มข้นให้สูงขึ้นไปอีกเพื่อยืนยันผลอีกครั้ง ทำการทดลองเหมือนกับข้อ 3.5.5.1 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบธรรมชาติและจากใบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็น (1000, 800 , 600 , 400 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรจากธรรมชาติ โดยวิธี Micro dilution method

หมายเหตุ : -แถว A1-A4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อMuller Hinton Broth อย่างเดียว ลงไป 150 ไมโครลิตร

-แถว B1-B4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร

-แถว C1-C4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, เมทานอล 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร

-แถว D1-D4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, ยาเตตร้าซัยคลิน 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร

-แถว E1-E4, F1-F4, G1-G4 , H1-H4 และ A7-A10 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100ไมโครลิตร, สารสกัดหยาบจากใบธรรมชาติ 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร (ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมี 4 ความเข้มข้น คือ1000, 800 , 600 ,400 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-แถว D7-D10, E7-E10, F7-F10, G7-G10 และ H7-H10 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, สารสกัดหยาบจากใบธรรมชาติ 20 ไมโครลิตร และเชื้อ แบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร (ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมี 4 ความเข้มข้น คือ 1000, 800 , 600, 400 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

3.5.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) โดยมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างด้วยวิธี Duncan โดยใช้โปรแกรม SPSS 14.0 for Windows Evaluation version ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาการเพิ่มปริมาณต้นพืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารแข็งสูตร Murashige & Skoog (MS) โดยมีสัดส่วนของฮอร์โมนที่แตกต่างกัน

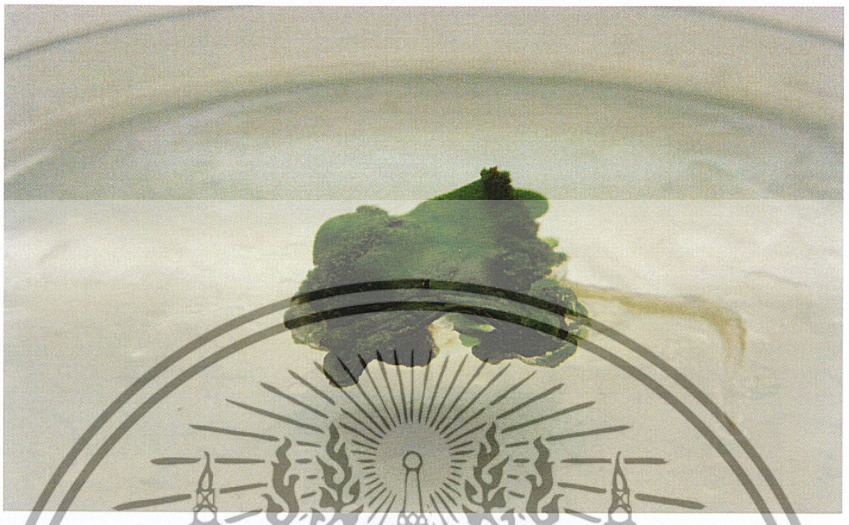
ทำการทดลองสูตรอาหาร 9 สูตร (A-I) ซึ่งสูตรอาหารจะประกอบด้วย Murashige & Skoog basal medium (MS) , ฮอร์โมน 6-benzylamino – purine (BA) และ ฮอร์โมน α-Naphthalene acetic acid (NAA) โดยที่จะแตกต่างกันที่สัดส่วนของฮอร์โมน ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นทำการตัดเอาชิ้นส่วนของใบพญาวานร ซึ่งมีขนาดประมาณ 0.5-0.8 เซนติเมตร มาวางลงบนอาหารทุกสูตร แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน สังเกตการเจริญของเนื้อเยื่อดังกล่าวได้ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของชิ้นส่วนใบพญาวานรในอาหารแข็งสูตร MS โดยมีสัดส่วนของฮอร์โมนที่แตกต่างกัน

สูตร	ผลการทดลอง
A	มีต้นเล็กๆขึ้นด้านล่างของใบใหญ่จำนวน 20 ต้น(มีต้นใหญ่ 5 ต้น) มีรากขึ้นทุกขวดๆละหนึ่งราก (รูปที่ 4.1)
B	มีต้นเล็กๆขึ้นด้านบนของใบใหญ่จำนวน 10 ต้น (รูปที่ 4.2)
C	มีต้นขึ้นด้านบนของใบใหญ่จำนวน 17-20 ต้น(ต้นมีขนาดใหญ่ และขึ้นทุกขวด) มีแคลลัสเล็กๆเกิดขึ้นทางด้านล่างของใบ (รูปที่ 4.3)
D	มีต้นเล็กๆขึ้นด้านบนของใบใหญ่จำนวน 4-8 ต้น มีรากเกิดขึ้นทั้งด้านบนและด้านล่าง บางขวดมีการแตกแขนงเล็กๆ (รูปที่ 4.4)
E	มีต้นเล็กๆขึ้นด้านบนของใบใหญ่จำนวน 3 ต้น มีรากขึ้นจำนวนเล็กน้อย และมีแคลลัสขึ้นเป็นจำนวนมากรอบๆใบที่นำมาวางบนอาหาร (รูปที่ 4.5)
F	มีต้นขึ้น 1 ต้น และมีแคลลัสเล็กๆแย่งกันขึ้น ทำให้ดูมีขนาดเล็กติดกันเป็นพื้นผิวด้าน (รูปที่ 4.6)
G	มีแคลลัสที่คล้ายจะเจริญเป็นรากเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก แต่มีที่เจริญไปเป็นรากได้น้อยมาก (รูปที่ 4.7)
H	มีรากเจริญในทิศตรงข้ามกับแรงโน้มถ่วงของโลก 1 ราก(ขวดเดียว) และมีแคลลัสเกิดขึ้นรอบๆใบ (รูปที่ 4.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

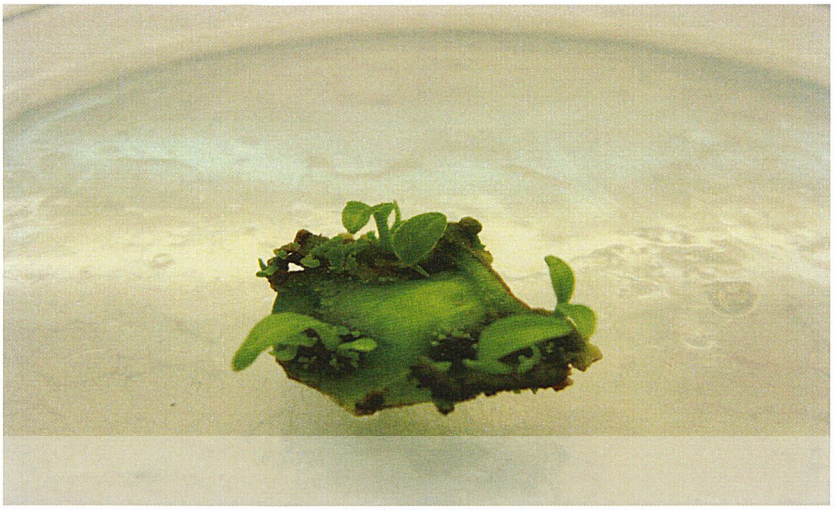
I	มีลำต้นขึ้นจำนวน 4 ต้น ลักษณะใบเล็กและลีบมาก และมีแคลลัสขึ้นเล็กน้อย บริเวณรอบใบ (รูปที่ 4.9)



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร A

รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร B

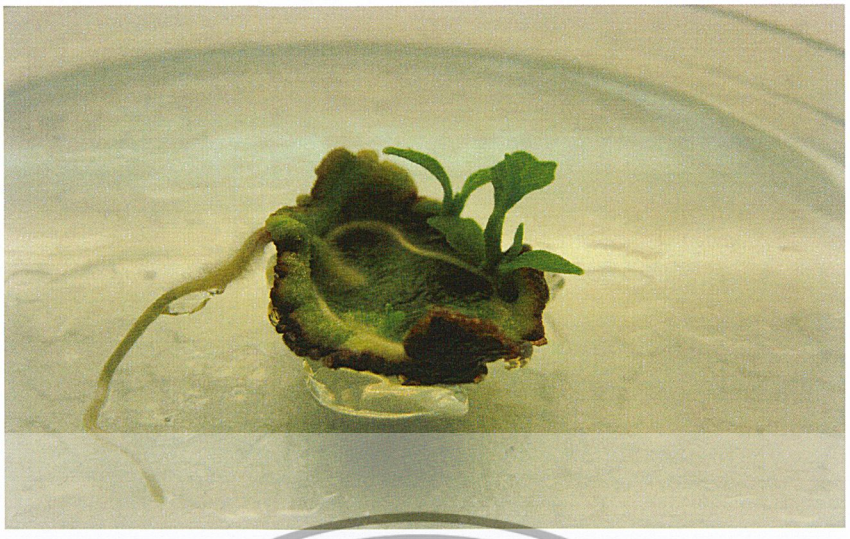
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร C

รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร D

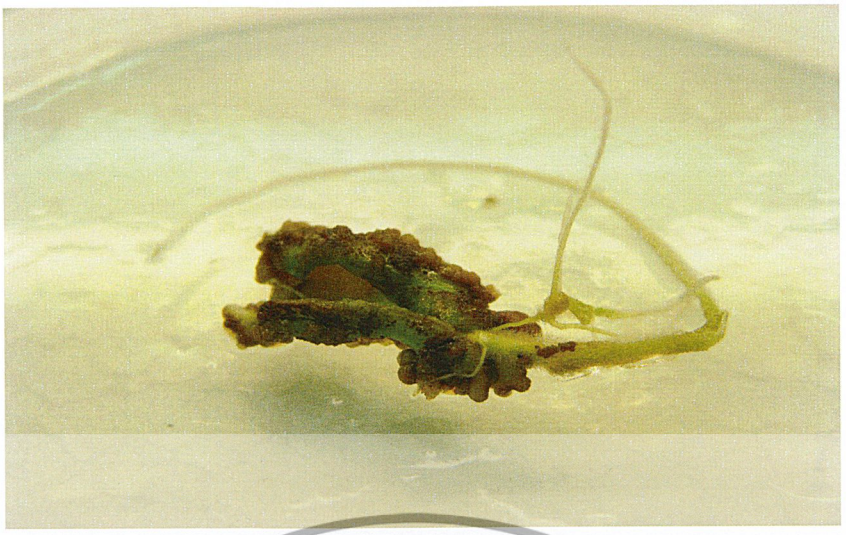
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร E

รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร F

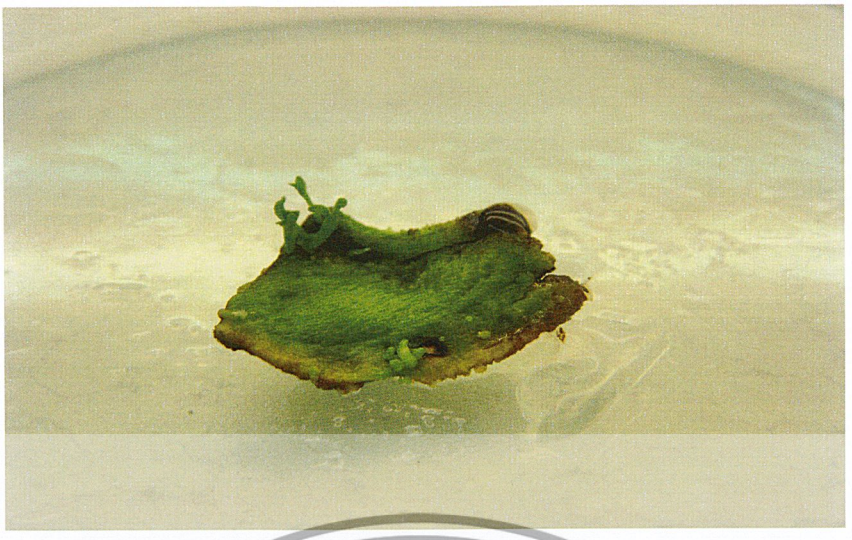
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร G

รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร H

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร I

จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่าสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้ในการเพิ่มปริมาณต้นพืช ก็คือ สูตรอาหาร C ซึ่งมีสัดส่วนของฮอร์โมน BA ต่อ ฮอร์โมน NAA เท่ากับ 2.0 มก.ต่อลิตร ต่อ 0.1 มก.ต่อลิตร เนื่องจากสูตรอาหารสูตรนี้มีการเปลี่ยนแปลงสภาพเนื้อเยื่อเป็นอวัยวะและชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ ให้การเจริญของเนื้อเยื่อ โดยมีต้นพืชต้นเล็กๆเจริญขึ้นบนชิ้นส่วนของใบพญาวานรเป็นจำนวนมากประมาณ 17-20 ต้นได้ต่อหนึ่งชิ้นส่วน โดยจากการศึกษาครั้งนี้จะนำสูตรอาหารสูตรนี้ไปเป็นสูตรอาหารที่ใช้ในเพิ่มปริมาณต้นพืชพญาวานรให้ได้ปริมาณมาก แล้วจะนำใบพญาวานรที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ไปทำการสกัดสารสำคัญออกมาเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาผลได้(yield) ของปริมาณของสารสกัดที่สกัดได้จากใบสดพญาวานรทั้งจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ซึ่งได้ผลการทดลอง ได้ดังนี้

- ผลได้ของสารสกัดหยาบจากใบสดพญาวานรที่ได้จากธรรมชาติ

น้ำหนักใบสด 239.8457 กรัม

น้ำหนักสารสกัดหยาบที่ละลายในเมทานอล 5.8556 กรัม

น้ำหนักสารสกัดหยาบที่ละลายในเฮกเซน 6.3347 กรัม

ดังนั้น ค่าผลได้ของสารสกัดหยาบคิดเป็น $\frac{5.8556+6.3347}{239.8457} \times 100 = 5.0826$ % โดยมวล

- ผลได้ของสารสกัดหยาบจากใบสดพญาวานรที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

น้ำหนักใบสด 285.1717 กรัม

น้ำหนักสารสกัดหยาบที่ละลายในเมทานอล 1.7524 กรัม

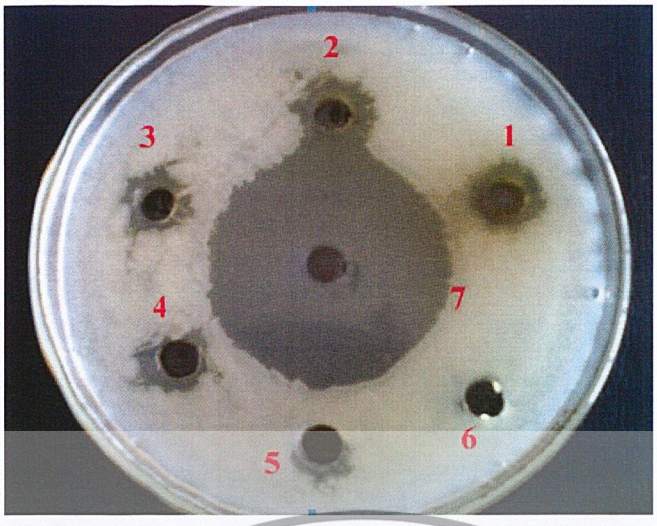
น้ำหนักสารสกัดหยาบที่ละลายในเฮกเซน 1.9230 กรัม

ดังนั้น ค่าผลได้ของสารสกัดหยาบคิดเป็น $\frac{1.7524+1.9230}{285.1717} \times 100 = 1.2889$ % โดยมวล

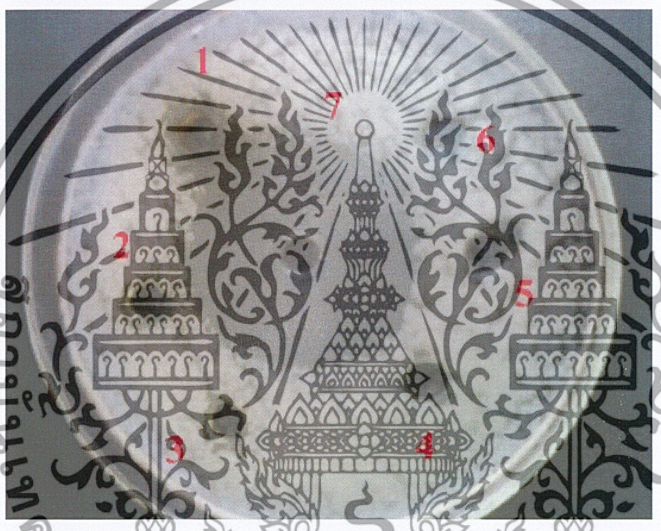
4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพญาวานรด้วยวิธี Agar-well diffusion

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Salmonella rissen* และ *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งวิธีการทดสอบคือ Agar-well diffusion ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบธรรมชาติและใบจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้ง 5 ระดับความเข้มข้นได้แก่ 100 50 25 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.10 ถึง 4.12) และมีการศึกษาต่ออีก 5 ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นไปเพื่อยืนยันผลอีกครั้ง โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบธรรมชาติเป็น 1,000 800 600 400 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.13 ถึง 4.15)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก.

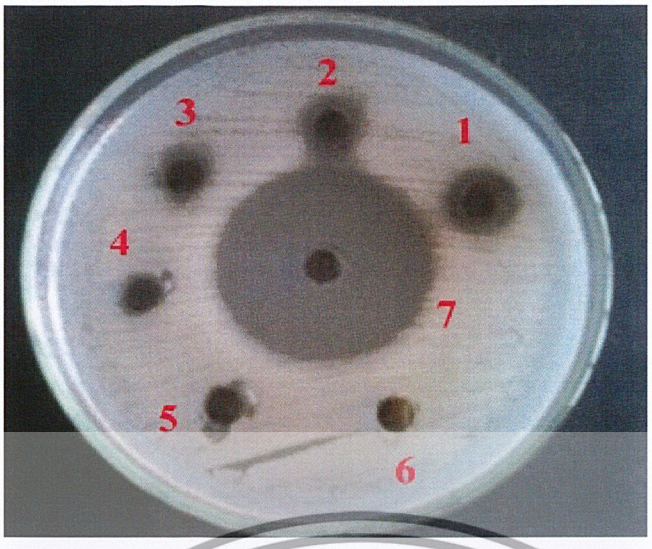


ข.

รูปที่ 4.10 การยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบของพญาวานรจากธรรมชาติ (ก) และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ข) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

หมายเหตุ : หมายเลข 1 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 100 มก.ต่อมล.
หมายเลข 2 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 50 มก.ต่อมล.
หมายเลข 3 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 25 มก.ต่อมล.
หมายเลข 4 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 12.5 มก.ต่อมล.
หมายเลข 5 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 6.25 มก.ต่อมล.
หมายเลข 6 คือ ตัวทำลายเมทานอล
หมายเลข 7 คือ สารละลายยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน ความเข้มข้น 0.50 มก.ต่อมล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



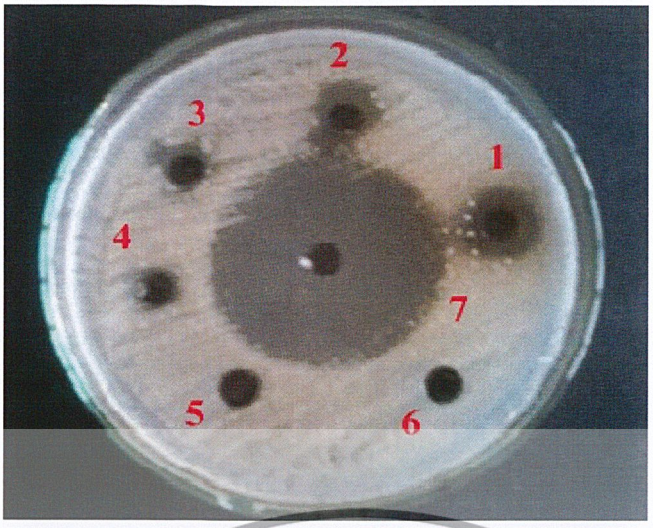
ก.

ข.

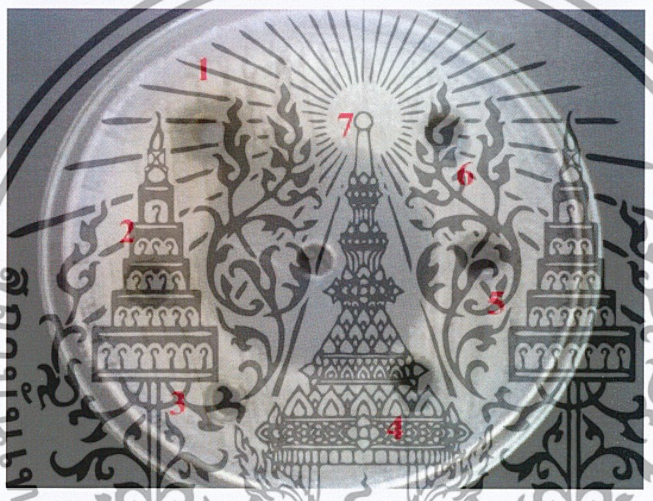
รูปที่ 4.11 การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบของพญาวานรจากธรรมชาติ (ก) และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ข) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

หมายเหตุ : หมายเลข 1 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 100 มก.ต่อมล.
หมายเลข 2 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 50 มก.ต่อมล.
หมายเลข 3 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 25 มก.ต่อมล.
หมายเลข 4 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 12.5 มก.ต่อมล.
หมายเลข 5 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 6.25 มก.ต่อมล.
หมายเลข 6 คือ ตัวทำลายเมทานอล
หมายเลข 7 คือ สารละลายยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน ความเข้มข้น 0.50 มก.ต่อมล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก.



ข.

รูปที่ 4.12 การยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบของพญาวานรจากธรรมชาติ (ก) และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ข) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

หมายเหตุ : หมายเลข 1 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 100 มก.ต่อมล.
หมายเลข 2 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 50 มก.ต่อมล.
หมายเลข 3 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 25 มก.ต่อมล.
หมายเลข 4 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 12.5 มก.ต่อมล.
หมายเลข 5 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 6.25 มก.ต่อมล.
หมายเลข 6 คือ ตัวทำลายเมทานอล
หมายเลข 7 คือ สารละลายยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน ความเข้มข้น 0.50 มก.ต่อมล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดพญาวานรที่สกัดด้วยเมทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ จันทนา กาญจน์กมล (2551) ที่ว่าสารสกัดพญาวานรที่สกัดด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ และการที่ใช้ใบสดพญาวานรมาสกัดแล้วให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียนั้นได้สอดคล้องกับ Dieu HK และ Hoa TV (2008) ได้ทำการทดลองโดยการนำใบสดของพญาวานรมาทำเป็นผง แล้วให้ลูกหมูบริโภควันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน พบว่าสามารถรักษาอาการท้องร่วงที่เกิดจากเชื้อ *Escherichia coli* ได้ แสดงให้เห็นว่ามีสารสำคัญอยู่ที่ใบของพญาวานร โดยความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรสดจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 3 ชนิดได้แก่ *E. coli B. subtilis* และ *S. aureus* (รูปที่ 4.10 ถึง 4.12) ซึ่งผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบพญาวานรสดจากธรรมชาติ เมื่อทำการวัดขนาดของบริเวณยับยั้งของเชื้อ *E. coli B. subtilis* และ *S. aureus* ได้เป็น 7.12 4.99 และ 2.52 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2 และ 4.3) และสำหรับผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบพญาวานรสดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อทำการวัดขนาดของบริเวณยับยั้งของเชื้อ *E. coli B. subtilis* และ *S. aureus* ได้เป็น 5.14 1.89 และ 3.09 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2 และ 4.3) ส่วนสารสกัดหยาบที่ละลายในเฮกเซนนั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดังตารางที่ 4.2 และตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม spss ซึ่งใช้สารสกัดหยาบจากของใบพญาวานรจากธรรมชาติที่ความเข้มข้น 100 50 25 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชนิดของสาร	ความเข้มข้นของสาร (มก./มล.)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (มม.)				
		E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*	*S. rissen*	*K. pneumoniae*
ยาเตตร้าซัยคลิน	0.50	34.05 [a]	29.44 [a]	29.03 [a]	9.11 [a]	7.11 [a]
สารสกัดที่ละลายในชั้นเมทานอล	100.00	7.12 [b]	4.99 [b]	2.52 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]
	50.00	2.20 [c]	4.04 [b]	1.58 [c]	0.00 [b]	0.00 [b]
	25.00	1.02 [d]	2.73 [bc]	1.32 [c]	0.00 [b]	0.00 [b]
	12.50	0.59 [d]	1.73 [bc]	0.92 [cd]	0.00 [b]	0.00 [b]
	6.25	0.28 [d]	0.89 [cd]	0.99 [cd]	0.00 [b]	0.00 [b]
เมทานอล	0.00	0.00 [d]	0.00 [d]	0.00 [d]	0.00 [b]	0.00 [b]
สารสกัดที่ละลายในชั้นเฮกเซน	100.00	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]
	50.00	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]
	25.00	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]
	12.50	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]
	6.25	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]
เฮกเซน	0.00	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]	0.00 [b]

เมื่อ a b c และ d มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ : ขนาดของบริเวณยับยั้ง (zone of inhibition; มิลลิเมตร) = (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม และ บริเวณยับยั้งของเชื้อ) – (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม (6มิลลิเมตร))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม spss ซึ่งใช้สารสกัดหยาบจากของใบพญาวานรจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ความเข้มข้น 100 50 25 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชนิดของสาร	ความเข้มข้นของสาร (มก./มล.)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (มม.)				
		E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*	*S. rissen*	*K. pneumoniae*
ยาเตตร้าซัยคลิน	0.50	34.05 ^{a}	29.44 ^{a}	29.03 ^{a}	9.11 ^{a}	7.11 ^{a}
สารสกัดที่ละลายในชั้นเมทานอล	100.00	5.14 ^{b}	1.89 ^{b}	3.09 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}
	50.00	0.35 ^{c}	1.29 ^{b}	6.12 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}
	25.00	0.00 ^{c}	1.64 ^{bc}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}
	12.50	0.00 ^{c}	1.27 ^{bc}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}
	6.25	0.00 ^{c}	0.85 ^{bc}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}
เมทานอล	0.00	0.00 ^{c}	0.00 ^{c}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}
สารสกัดที่ละลายในชั้นเฮกเซน	100.00	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}
	50.00	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}
	25.00	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}
	12.50	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}
	6.25	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}
เฮกเซน	0.00	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}	0.00 ^{b}

เมื่อ a b และ c มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ : ขนาดของบริเวณยับยั้ง (zone of inhibition; มิลลิเมตร) = (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม และ บริเวณยับยั้งของเชื้อ) – (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม (6มิลลิเมตร))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้างต้นเป็นการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรที่ได้จากธรรมชาติและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเท่ากับ 100 50 25 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงมีการศึกษาต่ออีก 5 ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นไปเพื่อยืนยันผลที่ว่า สารสกัดหยาบจากใบพญาวานรที่ได้จากธรรมชาติสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ จึงใช้สารสกัดหยาบจากใบพญาวานรที่ได้จากธรรมชาติที่ละลายในชั้นเมทานอลเท่านั้นในการทดสอบ โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบธรรมชาติที่ 1,000 800 600 400 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.4

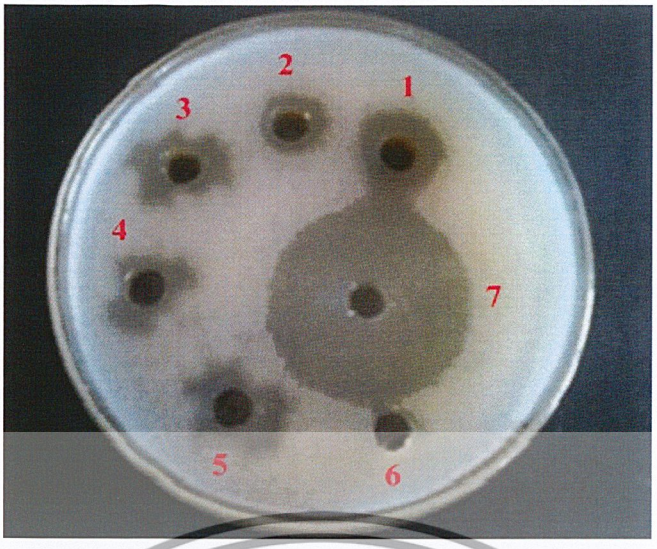
ตารางที่ 4.4 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม spss ซึ่งใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 1,000 800 600 400 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชนิดของสาร	ความเข้มข้นของสาร(มก./มล.)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (มม.)		
		E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*
ยาเตตร้าซัยคลิน	0.25	25.44[a]	27.98[a]	21.54[a]
เมทานอล	0.00	0.00[e]	0.00[d]	0.00[f]
สารสกัดหยาบที่ได้จากธรรมชาติที่ละลายในชั้นเมทานอล	1,000	7.79[b]	9.44[b]	3.06[b]
	800	5.27[bc]	6.85[b]	1.72[c]
	600	3.84[cd]	3.43[c]	1.32[cd]
	400	2.41[de]	2.72[cd]	0.87[de]
	200	1.74[de]	1.51[cd]	0.46[ef]

เมื่อ a b c d e และ f มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ : ขนาดของบริเวณยับยั้ง (zone of inhibition; มิลลิเมตร) = (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม และ บริเวณยับยั้งของเชื้อ) – (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม (6มิลลิเมตร))

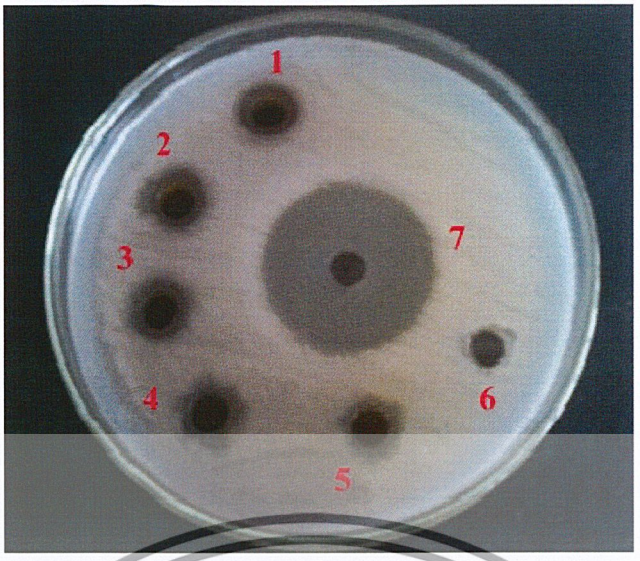
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 การยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบธรรมชาติของพญาวานร โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1,000 800 600 400 และ 200 มก.ต่อมล.

หมายเหตุ : หมายเลข 1 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อมล.
หมายเลข 2 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 800 มก.ต่อมล.
หมายเลข 3 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 600 มก.ต่อมล.
หมายเลข 4 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 400 มก.ต่อมล.
หมายเลข 5 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 200 มก.ต่อมล.
หมายเลข 6 คือ ตัวทำละลายเมทานอล
หมายเลข 7 คือ สารละลายยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน ความเข้มข้น 0.25 มก.ต่อมล.

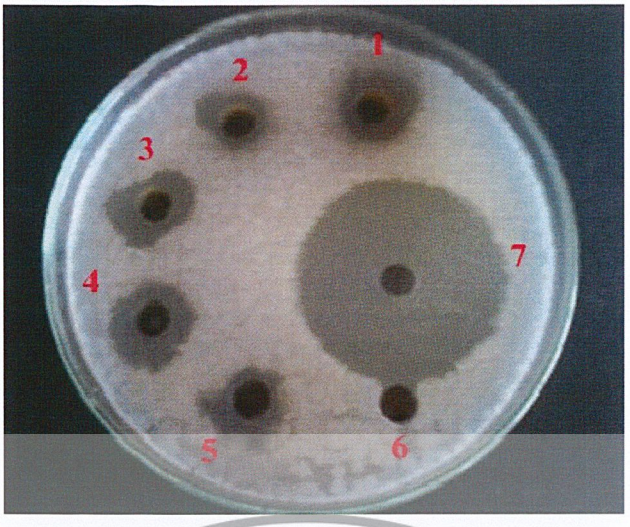
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบธรรมชาติของพญาวานร โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1,000 800 600 400 และ 200 มก.ต่อมล.

หมายเหตุ : หมายเลข 1 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อมล.
หมายเลข 2 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 800 มก.ต่อมล.
หมายเลข 3 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 600 มก.ต่อมล.
หมายเลข 4 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 400 มก.ต่อมล.
หมายเลข 5 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 200 มก.ต่อมล.
หมายเลข 6 คือ ตัวทำลายเมทานอล
หมายเลข 7 คือ สารละลายยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน ความเข้มข้น 0.25 มก.ต่อมล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 การยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบธรรมชาติของพญาวานร โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1,000 800 600 400 และ 200 มก.ต่อมล.

หมายเหตุ : หมายเลข 1 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อมล.
หมายเลข 2 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 800 มก.ต่อมล.
หมายเลข 3 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 600 มก.ต่อมล.
หมายเลข 4 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 400 มก.ต่อมล.
หมายเลข 5 คือ สารสกัดหยาบของใบพญาวานร ความเข้มข้น 200 มก.ต่อมล.
หมายเลข 6 คือ ตัวทำลายเมทานอล
หมายเลข 7 คือ สารละลายยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน ความเข้มข้น 0.25 มก.ต่อมล.

จากผลการทดลองพบว่า สำหรับทุกระดับความเข้มข้น (1,000 800 600 400 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จะสังเกตเห็นบริเวณยับยั้งเกิดขึ้น (รูปที่ 4.13 ถึง 4.15) แสดงว่าสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 100 มิลลิกรมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ และเมื่อวัดขนาดของบริเวณยับยั้งพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งผลแสดงดังตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุด(Minimum Inhibitory Concentration หรือ MIC) ของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานร โดยวิธี Micro dilution method

สำหรับการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (MIC) จะทำการทดสอบสองสภาวะด้วยกัน คือ ขั้นตอนแรก จะทำการทดสอบกับสารสกัดหยาบของใบพญาวานรจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ละลายในเมทานอลเท่านั้น เนื่องจากผลการทดสอบด้วยวิธี Agar-well diffusion พบว่าสารสกัดที่ละลายในเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ โดยให้สารสกัดหยาบมีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขั้นตอนที่สอง จะทำการทดสอบกับสารสกัดหยาบของใบพญาวานรจากธรรมชาติที่ละลายในเมทานอลเพียงอย่างเดียว โดยให้สารสกัดหยาบมีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบจะแสดงด้วยค่าดัชนีการเจริญของเชื้อ (Growth index) ซึ่งจะสัมพันธ์กับความสามารถของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังตารางที่ 4.5 และ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงดัชนีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น ซึ่งสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป็นสารสกัดหยาบของใบพญาวานรจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ชนิดของสาร	ดัชนีการเจริญเติบโตของเชื้อ (Growth index)					
	สารสกัดหยาบของใบพญาวานรจากธรรมชาติ			สารสกัดหยาบของใบพญาวานรจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ		
	E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*B. subtilis*	*S. aureus*
อาหารMHB	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
อาหารMHB น้ำกลั่น และเชื้อ	0.9830	3.7000	2.3220	0.9830	3.7000	2.3220
อาหารMHB เมทานอล และเชื้อ	0.9340	4.3000	3.0330	0.9340	4.3000	3.0330
อาหารMHB ยา และเชื้อ	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
อาหารMHB สารสกัดหยาบ และเชื้อ โดยแบ่งความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเป็น 5 ระดับ (มก./มล.)						
100	2.021	2.240	2.141	2.574	2.339	3.620
50	2.011	2.371	1.200	2.235	3.057	2.882
25	1.750	2.896	2.657	1.149	2.145	2.461
12.5	1.537	3.448	1.585	0.451	2.797	2.294

$$\text{ค่าดัชนีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย} = \frac{OD2 - OD1}{OD1}$$

เมื่อ OD 1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในวันที่หนึ่ง (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น)

OD 2 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในวันที่สอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงดัชนีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น ซึ่งสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป็นสารสกัดหยาบของพญาวานรจากธรรมชาติ

ชนิดของสาร	ดัชนีการเจริญเติบโตของเชื้อ (Growth index)		
	E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*
อาหาร	0.0000	0.0000	0.0000
อาหาร น้ำกลั่น และเชื้อ	1.2586	2.2007	1.6298
อาหาร เมทานอล และเชื้อ	1.3617	2.3629	1.7972
อาหาร ยา และเชื้อ	0.0000	0.0000	0.0000
อาหาร สารสกัดหยาบ และเชื้อ โดยแบ่งความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเป็น 5 ระดับ (มก./มล.)			
1,000	3.1653	2.1733	2.5136
800	3.0232	2.2687	2.9993
600	2.8463	2.6602	2.8321
400	2.5047	3.2907	2.3289
200	1.6362	0.9528	1.9401

$$\text{ค่าดัชนีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย} = \frac{OD2 - OD1}{OD1}$$

เมื่อ OD 1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในวันที่หนึ่ง (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น)

OD 2 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในวันที่สอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.5 และ 4.6 พบว่ามีการเจริญได้ของเชื้อแบคทีเรีย ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเท่ากับ 12.5 25 50 100 200 400 600 800 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงทำให้ดัชนีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียมีค่ามากกว่าศูนย์ แสดงว่ามีการเจริญได้ของเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นการหาค่า MIC โดยวิธี Micro dilution method จึงพบว่าสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ เนื่องจากมีค่าดัชนีการเจริญเติบโตของเชื้อเพิ่มขึ้น

ข้างต้นเป็นผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้เพลท 96 หลุม (96-well plate) โดยสัดส่วนของอาหารต่อสารสกัดต่อสารละลายเชื้อเป็น 100:20:30 (ในหน่วย µl) ต่อหลุม เมื่อเทียบกับหลุมของ Agar-well (มีการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้) จะมีขนาดเล็กกว่ามาก มีผลให้เชื้อสามารถแพร่กระจายได้เต็มหลุม ทำให้มีความหนาแน่นของเชื้อมากว่าการทดสอบแบบ Agar-well และด้วยการที่มีสัดส่วนของสารสกัดน้อยกว่าเชื้อร่วมกับการที่สารสกัดมีฤทธิ์ค่อนข้างอ่อนมาก จึงทำให้สารสกัดจากพญาวานรไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ แต่ในการทดสอบแบบ Agar-well พบว่าสารสกัดจากพญาวานรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั่นแสดงว่าสารสกัดจากพญาวานรมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้เพลท 96 หลุม (96-well plate) ก็อาจยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้เช่นกัน หากเปลี่ยนสัดส่วนของสารสกัดให้เพิ่มมากขึ้น หรือเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดให้มากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณต้นพืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหารแข็ง Murashige & Skoog (MS) โดยมีสัดส่วนของฮอร์โมนที่แตกต่างกัน โดยทำการทดลองสูตรอาหาร 9 สูตร (A-I) พบว่า สูตร C (BA 2.0 มก.ต่อลิตร : NAA 0.1 มก.ต่อลิตร) ให้ผลการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด และจากการศึกษาหาค่าผลได้ของใบพญาวานรทั้งจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ค่าเท่ากับ 5.0826 เปอร์เซ็นต์ และ 1.2889 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากใบพญาวานรต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* *Bacillus subtilis* *Salmonella rissen* และ *Klebsiella pneumoniae* โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน และ เมทานอล นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ด้วยวิธี Agar-well diffusion พบว่า สารสกัดใบพญาวานรทั้งจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สกัดด้วยเมทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวัดขนาดของบริเวณยับยั้งได้ 7.12 4.99 และ 2.52 มิลลิเมตร ตามลำดับ (สำหรับผลการทดสอบผลของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบพญาวานรจากธรรมชาติ) และ 5.14 1.89 และ 3.09 มิลลิเมตร ตามลำดับ (สำหรับผลการทดสอบผลของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดใบพญาวานรจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) ส่วนสารสกัดหยาบที่ละลายในชั้นของเฮกเซนนั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้

นอกจากนี้ยังมีการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบที่ได้จากใบของพญาวานรจากธรรมชาติ ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ได้ โดยเมื่อทำการวัดขนาดของบริเวณยับยั้งได้เท่ากับ 7.79 9.44 และ 3.06 มิลลิเมตร ตามลำดับ

จากการศึกษาการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานร โดยวิธี Micro dilution method พบว่า ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้แก่ *Escherichia coli* *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*

ข้อเสนอแนะ : ในการศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยใช้สารสกัดจากพืช ควรเลือกตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติในการละลายสารสกัดให้เป็นเนื้อเดียวกันกับตัวทำละลายได้ดี ตัวทำละลายจะต้องไม่เป็นพิษต่อผู้ปฏิบัติงาน และตัวทำละลายไม่ควรมีผลกระทบต่องานวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จันทนา กาญจน์กมล. 2551. การตรวจสอบความเป็นพิษและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพญาวานรเพื่อเป็นแนวทางการผลิตยาจากธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

รัตนา อิทรานุปกรณ์. 2550. การตรวจสอบและการสกัดแยกสาระสำคัญจากสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คู่มือพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ ชุดที่3 พืชสมุนไพรน้ำมันหอมระเหย.2545. กรมส่งเสริมการเกษตร.หน้า 168-179

Dieu HK, Loc CB,Yamasaki S, Hirata Y. 2005. The rthnobotanical and botanical study on *Pseuderanthemum palatiferum* as a new medicinal plant in the Mekhong delta of Vietnam. JARQ. 39(3): 191-196.

Giang PM. 2008. Study on anti-oxidative activities and preliminary investigation on antibacterial, antifungal of extracted fraction rich in flavonoids from leaves of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk.
[Online].Available : www.english.vista.gov.vn. Access on 20/2/2008.

Dieu HK, Loc CB, Yamasaki S, Hirata Y. JARQ 2006. The effects of *Pseuderanthemum*, a new medicinal plant, on growth performances and diarrhea of piglets. JARQ. 40(1): 85-91.

Dieu HK and Hoa TV. 2008. Efficacy of *Pseuderanthemum palatiferum* powder against diarrhea of piglets.
[Online].Available : www.ctu.edu.vn/institutes/mdi/jircas/JIRCAS/research/workshop/pro3/C12-Livestock%2012%20(Ms.%20Dieu).pdf. Access on 20/2/2008.

Nam N-H,Kim H-M,Bae K-H,Ahn B-Z. 2003. Inhibitory effects of Vietnamese medicinal plants on tube-like formation of human umbilical venous cells. Phytother Res. 17, 107-111. (อ้างอิง : จุลสารข้อมูลสมุนไพร ของม.มหิดล ปีที่ 25/เมษายน 2551)

[Online].Available : http://www.hoanngoc th.com/index.php?lay=show

[Online].Available : http://www.hoanngocth.com/index.php?lay=show

[Online].Available : http:// www.scisoc.or.th/stt/35/sec_p/.../STT35_P_P0010.pdf

[Online].Available : http://www.lks.ac.th/student/kroo_su/chem11/sub10.html

[Online].Available : http://www.cpbhisar.org/biotechniques.aspx

[Online].Available : http://www.th.wikipedia.org/wiki

[Online].Available : http://www.oknation.net/blog/buzz

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online].Available : http://www.jameslunsford.com/microunknown2

[Online].Available : http://www.zdravstvena.info

[Online].Available : http://www.unitynature.com

[Online].Available : http://www.technoinhome.com/vspcite/front/board/show.php

[Online].Available : http://www.anupriti.blogspot.com

[Online].Available : http://www.technoinhome.com/vspcite/front/board/show.php

[Online].Available : http://www.squidoo.com/Hoanngoc?utm_campaign=directdiscovery

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

สูตรอาหาร

1. Murashige & Skoog (1962)

$NH_4 NO_3$	1,650	มิลลิกรัม
KNO_3	1,900	มิลลิกรัม
$CaCl_2. 2H_2O$	440	มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	370	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	170	มิลลิกรัม
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	มิลลิกรัม
$ZnSO_4.5H_2O$	8.6	มิลลิกรัม
H_3BO_3	6.2	มิลลิกรัม
KI	0.33	มิลลิกรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	มิลลิกรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	มิลลิกรัม
$CoCl_2.H_2O$	0.025	มิลลิกรัม
$FeSO_4.7H_2O$	27.85	มิลลิกรัม
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.25	มิลลิกรัม
Nicotinic acid	0.5	มิลลิกรัม
Thiamine-HCl	0.1	มิลลิกรัม
Pyridoxine-HCl	0.5	มิลลิกรัม
Glycine	2.0	มิลลิกรัม
Myo-inosital	100	มิลลิกรัม
Agar	8,000	มิลลิกรัม
Sucrose	30,000	มิลลิกรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 5.7 ± 0.1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Mueller Hinton Agar

Beef extract powder	2.0	กรัม
Acid digest casein	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ พีเอช 7.3 ± 0.1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Mueller Hinton Broth

Beef extract powder	2.0	กรัม
Acid digest casein	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ พีเอช 7.3 ± 0.1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการเตรียมสารละลาย 0.5 McFarland Standard

เตรียมจาก สารละลาย แบเรียมคลอไรด์ 1 % 0.05 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย กรดซัลฟูริก 1% 9.95 มิลลิลิตร จากนั้นใส่หลอดฝาเกลียว เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่ง 0.5 McFarland Standard มีปริมาณเชื้อ 1.5×10^8 CFU/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ผลการทดลองไม่เป็นทางการ

ตารางที่ ข - 1 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพญาวานรสดจากธรรมชาติ ที่อยู่ในตัวทำละลายเมทานอล และเฮกเซน (ทำการทดลองวันที่ 1/12/2553 ตรวจผลวันที่ 2/12/2553)

	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (mm.)						
ความเข้มข้น / เชื้อ	P	N	100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml	12.5 mg/ml	6.25 mg/ml
สารสกัดที่ละลายในเมทานอล							
E. coli							
1	30.68	-	6.08	5.98	1.73	-	-
2	31.36	-	4.67	1.67	1.27	0.98	0.53
3	31.57	-	7.56	2.76	1.13	-	-
B. subtilis							
1	34.23	-	2.73	2.33	2.17	1.08	0.87
2	30.53	-	3.19	2.83	2.17	2.18	0.46
3	33.61	-	5.15	4.07	3.15	2.96	0.92
S. aureus							
1	31.06	-	2.14	0.81	0.68	0.54	0.48
2	31.07	-	2.78	0.70	0.92	0.89	0.38
3	31.79	-	3.54	1.99	1.06	0.54	0.48
S. rissen							
1	9.24	-	-	-	-	-	-
2	9.18	-	-	-	-	-	-
3	8.97	-	-	-	-	-	-
K. pneumoniae							
1	7.32	-	-	-	-	-	-
2	7.09	-	-	-	-	-	-
3	7.56	-	-	-	-	-	-
สารสกัดที่ละลายในเฮกเซน							

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

E. coli							
1	39.01	-	-	-	-	-	-
2	38.97	-	-	-	-	-	-
3	39.12	-	-	-	-	-	-
B. subtilis							
1	30.21	-	-	-	-	-	-
2	29.14	-	-	-	-	-	-
3	30.01	-	-	-	-	-	-
S. aureus							
1	30.43	-	-	-	-	-	-
2	31.01	-	-	-	-	-	-
3	30.45	-	-	-	-	-	-
S. rissen							
1	9.19	-	-	-	-	-	-
2	9.12	-	-	-	-	-	-
3	9.14	-	-	-	-	-	-
K. pneumoniae							
1	7.17	-	-	-	-	-	-
2	7.28	-	-	-	-	-	-
3	7.15	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข - 2 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพญาวานรสดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่อยู่ในตัวทำละลายเมทานอลและเฮกเซน (ทำการทดลองวันที่ 18/3/2554 ตรวจผลวันที่ 21/3/2554)

	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (mm.)						
ความเข้มข้น / เชื้อ	P	N	100 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml	12.5 mg/ml	6.25 mg/ml
สารสกัดที่ละลายในเมทานอล							
E. coli							
1	33.06	-	1.44	0.35	-	-	-
2	34.30	-	9.01	-	-	-	-
3	31.35	-	4.96	-	-	-	-
B. subtilis							
1	25.59	-	1.68	1.36	1.15	0.40	0.25
2	28.68	-	1.65	1.43	1.62	1.16	0.88
3	27.89	-	2.34	1.09	2.15	2.30	1.43
S. aureus							
1	26.50	-	6.08	6.12	-	-	-
2	28.48	-	-	-	-	-	-
3	26.74	-	0.10	-	-	-	-
S. rissen							
1	9.15	-	-	-	-	-	-
2	9.07	-	-	-	-	-	-
3	9.13	-	-	-	-	-	-
K. pneumoniae							
1	7.02	-	-	-	-	-	-
2	7.03	-	-	-	-	-	-
3	7.07	-	-	-	-	-	-
สารสกัดที่ละลายในเฮกเซน							
E. coli							
1	33.23	-	-	-	-	-	-
2	32.60	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3	33.35	-	-	-	-	-	-
B. subtilis							
1	27.54	-	-	-	-	-	-
2	27.61	-	-	-	-	-	-
3	28.35	-	-	-	-	-	-
S. aureus							
1	26.60	-	-	-	-	-	-
2	27.50	-	-	-	-	-	-
3	26.75	-	-	-	-	-	-
S. rissen							
1	9.32	-	-	-	-	-	-
2	8.76	-	-	-	-	-	-
3	9.12	-	-	-	-	-	-
K. pneumoniae							
1	7.44	-	-	-	-	-	-
2	6.23	-	-	-	-	-	-
3	7.08	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข - 3 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพญาวานรสดจากธรรมชาติ ที่อยู่ในตัวทำละลายเมทานอล (ทำการทดลองวันที่ 29/3/2554 ตรวจผลวันที่ 30/3/2554)

	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (mm.)						
ความเข้มข้น / เชื้อ	P	N	1000 mg/ml	800 mg/ml	600 mg/ml	400 mg/ml	200 mg/ml
E. coli							
1	25.93	-	8.25	5.22	3.73	1.26	0.93
2	25.12	-	5.55	2.47	2.92	2.40	1.29
3	25.28	-	9.58	8.11	4.88	3.56	3.01
B. subtilis							
1	27.11	-	11.75	8.88	4.56	4.19	1.19
2	28.34	-	6.95	4.11	1.17	0.87	1.89
3	28.49	-	9.63	7.55	4.55	3.11	1.45
S. aureus							
1	21.67	-	3.48	1.11	0.99	0.72	0.58
2	20.62	-	3.04	2.05	1.86	0.87	0.41
3	22.33	-	2.67	1.99	1.11	1.02	0.39
S. rissen							
1	7.34	-	-	-	-	-	-
2	7.23	-	-	-	-	-	-
3	7.41	-	-	-	-	-	-
K. pneumoniae							
1	5.32	-	-	-	-	-	-
2	5.43	-	-	-	-	-	-
3	5.34	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลค่าการดูดกลืนแสงของการศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุด(Minimum Inhibitory Concentration หรือ MIC) ของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรจากธรรมชาติที่ความเข้มข้น 200 400 600 800 และ 1000 มก.ต่อมล. โดยวิธี Micro dilution method

1. *E.coli*

ค่าโอดีของวันแรก

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.052	0.052	0.053	0.053	0.044	0.045	0.370	0.447	0.452	0.543
B	0.116	0.109	0.109	0.110	0.067	0.087	0.362	0.378	0.244	0.319
C	0.117	0.114	0.110	0.109	0.093	0.035	0.206	0.179	0.161	0.148
D	0.061	0.058	0.060	0.186	0.083	0.081	0.131	0.124	0.116	0.130
E	0.413	0.492	0.487	0.501	0.079	0.046	0.048	0.056	0.045	0.045
F	0.282	0.355	0.271	0.287	0.070	0.045	0.045	0.045	0.046	0.045
G	0.237	0.197	0.207	0.184	0.051	0.043	0.043	0.044	0.043	0.043
H	0.151	0.165	0.202	0.153	0.042	0.042	0.043	0.043	0.041	0.042

ค่าโอดีของวันที่สอง (มีสองซ้ำ)

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.054	0.056	0.054	0.063	0.045	0.044	0.105	0.137	0.124	0.095
B	0.059	0.060	0.058	0.059	0.044	0.044	0.077	0.083	0.078	0.086
C	0.060	0.061	0.061	0.060	0.046	0.045	0.071	0.145	0.088	0.070
D	0.058	0.057	0.057	0.058	0.045	0.046	0.064	0.078	0.111	0.132
E	0.109	0.185	0.179	0.107	0.048	0.045	0.055	0.045	0.045	0.045
F	0.094	0.064	0.117	0.085	0.045	0.045	0.045	0.046	0.046	0.045
G	0.067	0.069	0.071	0.076	0.041	0.042	0.041	0.043	0.043	0.043
H	0.067	0.068	0.066	0.067	0.043	0.043	0.044	0.043	0.044	0.042

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.323	0.064	0.052	0.052	0.043	0.044	0.329	0.364	0.450	0.346
B	0.116	0.124	0.125	0.126	0.043	0.043	0.231	0.106	0.118	0.288
C	0.129	0.120	0.112	0.129	0.045	0.045	0.242	0.167	0.269	0.244
D	0.058	0.058	0.059	0.062	0.046	0.045	0.141	0.183	0.140	0.140
E	0.434	0.309	0.424	0.445	0.044	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045
F	0.263	0.263	0.271	0.294	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045
G	0.203	0.214	0.197	0.233	0.041	0.043	0.043	0.042	0.043	0.043
H	0.168	0.216	0.158	0.150	0.042	0.043	0.043	0.043	0.041	0.042

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. *B. subtilis*

ค่าโอดีของวันแรก

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.053	0.054	0.055	0.053	0.044	0.044	0.097	0.138	0.102	0.100
B	0.058	0.060	0.061	0.060	0.044	0.044	0.077	0.101	0.088	0.082
C	0.059	0.060	0.060	0.059	0.045	0.045	0.079	0.085	0.070	0.069
D	0.059	0.060	0.063	0.062	0.045	0.044	0.064	0.061	0.065	0.065
E	0.105	0.116	0.090	0.106	0.045	0.045	0.044	0.044	0.044	0.044
F	0.080	0.109	0.081	0.084	0.045	0.045	0.044	0.045	0.045	0.045
G	0.071	0.079	0.072	0.086	0.041	0.042	0.042	0.043	0.044	0.044
H	0.066	0.068	0.066	0.066	0.043	0.042	0.043	0.043	0.044	0.043

ค่าโอดีของวันที่สอง (มีสองซ้ำ)

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.051	0.050	0.051	0.069	0.046	0.046	0.359	0.198	0.367	0.261
B	0.313	0.301	0.296	0.296	0.044	0.045	0.285	0.230	0.326	0.254
C	0.320	0.316	0.307	0.309	0.046	0.046	0.276	0.292	0.070	0.290
D	0.064	0.067	0.069	0.062	0.047	0.046	0.195	0.238	0.256	0.301
E	0.406	0.301	0.301	0.315	0.047	0.045	0.045	0.045	0.047	0.044
F	0.300	0.486	0.289	0.238	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046
G	0.272	0.351	0.377	0.416	0.043	0.044	0.045	0.047	0.045	0.045
H	0.419	0.240	0.312	0.380	0.044	0.044	0.045	0.044	0.043	0.043

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.050	0.052	0.255	0.052	0.045	0.045	0.576	0.425	0.362	0.366
B	0.332	0.343	0.049	0.329	0.044	0.044	0.446	0.478	0.409	0.344
C	0.320	0.339	0.311	0.319	0.045	0.045	0.327	0.251	0.206	0.200
D	0.061	0.140	0.062	0.137	0.045	0.046	0.325	0.204	0.215	0.210
E	0.497	0.333	0.285	0.250	0.045	0.045	0.044	0.043	0.043	0.044
F	0.246	0.386	0.233	0.208	0.257	0.045	0.044	0.044	0.045	0.044
G	0.243	0.268	0.214	0.226	0.042	0.041	0.041	0.042	0.043	0.043
H	0.248	0.262	0.220	0.313	0.042	0.042	0.040	0.042	0.042	0.041

3. *S. aureus*

ค่าโอดีของวันแรก

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.054	0.052	0.052	0.053	0.044	0.044	0.089	0.075	0.081	0.078
B	0.059	0.059	0.061	0.058	0.043	0.044	0.085	0.082	0.091	0.080
C	0.059	0.063	0.061	0.059	0.045	0.046	0.067	0.085	0.075	0.078
D	0.059	0.060	0.061	0.068	0.045	0.045	0.067	0.063	0.062	0.078
E	0.120	0.136	0.145	0.112	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.045
F	0.108	0.106	0.095	0.081	0.044	0.045	0.044	0.045	0.044	0.045
G	0.067	0.064	0.066	0.070	0.042	0.041	0.041	0.041	0.042	0.042
H	0.068	0.065	0.065	0.062	0.041	0.042	0.040	0.042	0.042	0.041

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าโอดีของวันที่สอง (มีสองซ้ำ)

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.328	0.051	0.051	0.052	0.044	0.044	0.325	0.394	0.326	0.480
B	0.147	0.160	0.174	0.165	0.043	0.043	0.307	0.462	0.270	0.205
C	0.174	0.342	0.152	0.343	0.045	0.045	0.243	0.287	0.346	0.280
D	0.061	0.057	0.058	0.058	0.044	0.045	0.298	0.370	0.292	0.236
E	0.494	0.290	0.453	0.442	0.044	0.045	0.044	0.044	0.044	0.053
F	0.505	0.421	0.315	0.240	0.045	0.045	0.044	0.044	0.044	0.045
G	0.164	0.426	0.144	0.289	0.041	0.043	0.043	0.043	0.043	0.044
H	0.268	0.173	0.170	0.164	0.042	0.043	0.043	0.043	0.041	0.042

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.052	0.051	0.051	0.053	0.045	0.047	0.397	0.345	0.371	0.370
B	0.151	0.227	0.360	0.185	0.043	0.043	0.456	0.271	0.296	0.370
C	0.172	0.313	0.274	0.197	0.044	0.045	0.290	0.199	0.183	0.276
D	0.058	0.058	0.057	0.057	0.046	0.045	0.191	0.120	0.157	0.124
E	0.434	0.403	0.388	0.386	0.045	0.045	0.044	0.044	0.044	0.044
F	0.231	0.213	0.204	0.191	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045
G	0.182	0.448	0.162	0.148	0.041	0.043	0.043	0.043	0.043	0.042
H	0.143	0.129	0.168	0.129	0.041	0.042	0.043	0.043	0.042	0.042

หมายเหตุ : -แถว A1-A4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อMuller Hinton Broth อย่างเดียว ลงไป 150 ไมโครลิตร

-แถว B1-B4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร

-แถว C1-C4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, เมทานอล 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร

-แถว D1-D4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, ยาเตตร้าซัยคลิน 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร

-แถว E1-E4,F1-F4,G1-G4 และ H1-H4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, สารสกัดหยาบจากใบธรรมชาติ 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร (ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมี 4 ความเข้มข้น คือ100, 50 , 25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

-แถว A7-A10,B7-B10,C7-C10 และ D7-D10 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, สารสกัดหยาบจากใบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร(ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมี 4 ความเข้มข้น คือ100, 50 , 25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลค่าการดูดกลืนแสงของการศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration หรือ MIC) ของสารสกัดหยาบจากใบพญาวานรจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ความเข้มข้น 12.5 25 50 และ 100 มก.ต่อมล.โดยวิธี Micro dilution method

1. *E.coli*

ค่าโอดีของวันแรก

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.052	0.053	0.053	0.056	0.045	0.044	0.078	0.080	0.078	0.080
B	0.064	0.063	0.063	0.066	0.044	0.045	0.062	0.044	0.043	0.043
C	0.064	0.064	0.064	0.064	0.044	0.045	0.044	0.044	0.045	0.045
D	0.061	0.061	0.061	0.064	0.045	0.045	0.165	0.172	0.165	0.165
E	0.169	0.177	0.174	0.187	0.044	0.044	0.143	0.142	0.137	0.141
F	0.140	0.142	0.146	0.145	0.045	0.045	0.104	0.107	0.112	0.109
G	0.108	0.106	0.105	0.102	0.042	0.043	0.083	0.087	0.085	0.088
H	0.084	0.087	0.085	0.083	0.042	0.047	0.074	0.076	0.078	0.076

ค่าโอดีของวันที่สอง (มีสองซ้ำ)

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.050	0.051	0.051	0.050	0.045	0.044	0.090	0.098	0.090	0.089
B	0.141	0.147	0.141	0.152	0.044	0.044	0.044	0.047	0.044	0.045
C	0.131	0.151	0.148	0.136	0.075	0.077	0.052	0.052	0.047	0.045
D	0.067	0.068	0.071	0.078	0.099	0.111	0.840	0.776	0.837	0.691
E	0.840	0.828	0.804	0.755	0.090	0.406	0.553	0.587	0.555	0.622
F	0.591	0.581	0.514	0.590	0.047	0.145	0.392	0.474	0.419	0.471
G	0.490	0.431	0.374	0.372	0.061	0.083	0.293	0.321	0.320	0.288
H	0.313	0.332	0.330	0.515	0.041	0.042	0.210	0.309	0.267	0.270

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.050	0.051	0.051	0.051	0.044	0.044	0.208	0.237	0.235	0.226
B	0.149	0.135	0.143	0.148	0.044	0.044	0.043	0.043	0.043	0.043
C	0.161	0.159	0.165	0.156	0.045	0.045	0.045	0.045	0.047	0.045
D	0.066	0.067	0.090	0.084	0.045	0.045	0.837	0.893	0.756	0.723
E	0.750	0.799	0.807	0.750	0.044	0.046	0.528	0.535	0.604	0.578
F	0.598	0.608	0.586	0.515	0.042	0.045	0.368	0.399	0.380	0.350
G	0.436	0.426	0.373	0.411	0.041	0.041	0.295	0.136	0.251	0.321
H	0.271	0.245	0.274	0.278	0.043	0.042	0.211	0.240	0.244	0.224

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. *B. subtilis*

ค่าโอดีของวันแรก

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.052	0.052	0.053	0.051	0.044	0.044	0.094	0.097	0.095	0.095
B	0.071	0.074	0.074	0.073	0.043	0.044	0.051	0.050	0.050	0.050
C	0.073	0.075	0.081	0.073	0.045	0.045	0.045	0.045	0.044	0.045
D	0.067	0.066	0.067	0.068	0.046	0.046	0.161	0.186	0.169	0.164
E	0.164	0.172	0.185	0.181	0.046	0.045	0.121	0.120	0.148	0.151
F	0.142	0.148	0.143	0.151	0.045	0.045	0.115	0.120	0.113	0.113
G	0.104	0.112	0.107	0.112	0.042	0.042	0.098	0.088	0.096	0.098
H	0.083	0.087	0.084	0.084	0.043	0.043	0.091	0.101	0.095	0.095

ค่าโอดีของวันที่สอง (มีสองซ้ำ)

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.050	0.052	0.051	0.050	0.046	0.044	0.092	0.093	0.095	0.095
B	0.220	0.229	0.252	0.202	0.060	0.073	0.492	0.516	0.476	0.455
C	0.227	0.264	0.261	0.256	0.097	0.121	0.131	0.110	0.111	0.048
D	0.109	0.160	0.114	0.159	0.125	0.131	0.636	0.619	0.612	0.613
E	0.495	0.499	0.543	0.539	0.116	0.113	0.479	0.430	0.492	0.485
F	0.413	0.448	0.437	0.461	0.109	0.070	0.461	0.488	0.492	0.467
G	0.307	0.291	0.194	0.225	0.041	0.041	0.373	0.418	0.373	0.384
H	0.328	0.391	0.324	0.383	0.043	0.042	0.310	0.281	0.260	0.256

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.050	0.051	0.051	0.052	0.044	0.044	0.091	0.094	0.096	0.094
B	0.240	0.244	0.232	0.250	0.044	0.043	0.043	0.043	0.044	0.044
C	0.236	0.283	0.266	0.278	0.044	0.046	0.043	0.043	0.044	0.047
D	0.113	0.110	0.120	0.120	0.045	0.045	0.541	0.505	0.537	0.547
E	0.560	0.513	0.499	0.514	0.045	0.045	0.483	0.459	0.462	0.504
F	0.423	0.449	0.503	0.449	0.045	0.045	0.411	0.456	0.447	0.456
G	0.468	0.446	0.475	0.480	0.041	0.043	0.350	0.377	0.490	0.382
H	0.392	0.370	0.426	0.403	0.042	0.042	0.244	0.256	0.244	0.379

3. *S. aureus*

ค่าโอดีของวันแรก

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.207	0.050	0.050	0.051	0.044	0.044	0.351	0.312	0.381	0.213
B	0.353	0.321	0.112	0.116	0.044	0.043	0.042	0.042	0.043	0.043
C	0.280	0.110	0.303	0.109	0.045	0.045	0.043	0.044	0.044	0.044
D	0.063	0.060	0.087	0.105	0.044	0.045	0.626	0.799	0.552	0.598
E	0.565	0.561	0.578	0.665	0.044	0.045	0.537	0.688	0.656	0.595
F	0.656	0.605	0.541	0.505	0.046	0.045	0.420	0.480	0.406	0.702
G	0.432	0.494	0.439	0.376	0.041	0.043	0.270	0.268	0.333	0.234
H	0.387	0.434	0.344	0.328	0.042	0.043	0.164	0.194	0.268	0.188

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าโอดีของวันที่สอง (มีสองซ้ำ)

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.050	0.054	0.050	0.051	0.044	0.043	0.251	0.296	0.205	0.169
B	0.159	0.120	0.129	0.173	0.046	0.052	0.103	0.112	0.089	0.043
C	0.140	0.113	0.415	0.130	0.086	0.112	0.098	0.100	0.081	0.044
D	0.067	0.062	0.060	0.089	0.109	0.117	0.651	0.657	0.618	0.748
E	0.582	1.067	0.500	0.565	0.111	0.120	0.638	0.581	0.574	0.499
F	0.657	0.550	0.592	0.602	0.115	0.097	0.395	0.420	0.414	0.508
G	0.538	0.291	0.408	0.431	0.048	0.046	0.339	0.264	0.340	0.289
H	0.238	0.313	0.428	0.204	0.046	0.042	0.175	0.349	0.262	0.187

Measurement count: 1 Filter: 620

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.050	0.054	0.050	0.051	0.044	0.043	0.251	0.296	0.205	0.169
B	0.159	0.120	0.129	0.173	0.046	0.052	0.103	0.112	0.089	0.043
C	0.140	0.113	0.415	0.130	0.086	0.112	0.098	0.100	0.081	0.044
D	0.067	0.062	0.060	0.089	0.109	0.117	0.651	0.657	0.618	0.748
E	0.582	1.067	0.500	0.565	0.111	0.120	0.638	0.581	0.574	0.499
F	0.657	0.550	0.592	0.602	0.115	0.097	0.395	0.420	0.414	0.508
G	0.538	0.291	0.408	0.431	0.048	0.046	0.339	0.264	0.340	0.289
H	0.238	0.313	0.428	0.204	0.046	0.042	0.175	0.349	0.262	0.187

หมายเหตุ : -แถว A1-A4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อMuller Hinton Broth อย่างเดียว ลงไป 150 ไมโครลิตร

-แถว B1-B4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, น้ำคลั่น 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร

-แถว C1-C4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, เมทานอล 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร

-แถว D1-D4 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, ยาเตตร้าซัยคลิน 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร

-แถว E1-E4, F1-F4, G1-G4 , H1-H4 และ A7-A10 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100ไมโครลิตร, สารสกัดหยาบจากใบธรรมชาติ 20 ไมโครลิตร และ เชื้อแบคทีเรีย 30 ไมโครลิตร (ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมี 4 ความเข้มข้น คือ1000, 800 , 600 ,400 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

-แถว D7-D10, E7-E10, F7-F10, G7-G10 และ H7-H10 คือ หลุมที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร, สารสกัดหยาบจากใบธรรมชาติ 20 ไมโครลิตร และ เชื้อ แบคทีเรีย30 ไมโครลิตร(ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมี 4 ความเข้มข้น คือ 1000, 800 , 600, 400 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) โดยมีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างด้วยวิธี Duncan โดยใช้โปรแกรม SPSS 11.0 for Windows Evaluation version ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพญาวานรสดจากธรรมชาติ ที่อยู่ในตัวทำละลายเมทานอล และเฮกเซน (ทำการทดลองวันที่ 1/12/2553 ตรวจผลวันที่ 2/12/2553) (จากตารางที่ 4.1) ด้วยวิธี Duncan

1. สารกัดที่ละลายในเมทานอล

1.1 *E.coli*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2285.061	6	380.843	340.853	.000
Within Groups	15.643	14	1.117		
Total	2300.704	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
2.00	3	.0000			
7.00	3	.1767			
6.00	3	.3267			
5.00	3	1.3767			
4.00	3		3.4700		
3.00	3			6.1033	
1.00	3				31.1367
Sig.		.162	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 *B. subtilis*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2464.975	6	410.829	375.583	.000
Within Groups	15.314	14	1.094		
Total	2480.289	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
2.00	3	.0000			
7.00	3	.7500	.7500		
6.00	3		2.0733	2.0733	
5.00	3		2.4967	2.4967	
4.00	3			3.0767	
3.00	3			3.6900	
1.00	3				32.7900
Sig.		.395	.072	.101	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 *S. aureus*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2376.779	6	396.130	2202.528	.000
Within Groups	2.518	14	.180		
Total	2379.297	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
2.00	3	.0000			
7.00	3	.4467	.4467		
6.00	3	.6567	.6567		
5.00	3		.8867		
4.00	3		1.1667		
3.00	3			2.8200	
1.00	3				31.3067
Sig.		.092	.074	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 *S. rissen*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	214.346	6	35.724	12441.328	.000
Within Groups	.040	14	.003		
Total	214.387	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	.0000	
3.00	3	.0000	
4.00	3	.0000	
5.00	3	.0000	
6.00	3	.0000	
7.00	3	.0000	
1.00	3		9.1300
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 *K. pnuemoniae*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	137.909	6	22.985	2912.981	.000
Within Groups	.110	14	.008		
Total	138.019	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	.0000	
3.00	3	.0000	
4.00	3	.0000	
5.00	3	.0000	
6.00	3	.0000	
7.00	3	.0000	
1.00	3		7.3233
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สารสกัดที่ละลายในเฮกเซน

2.1 *E. coli*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3917.831	6	652.972	757591.713	.000
Within Groups	.012	14	.001		
Total	3917.843	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	.0000	
3.00	3	.0000	
4.00	3	.0000	
5.00	3	.0000	
6.00	3	.0000	
7.00	3	.0000	
1.00	3		39.0333
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 *B. subtilis*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2281.488	6	380.248	8224.544	.000
Within Groups	.647	14	.046		
Total	2282.136	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	.0000	
3.00	3	.0000	
4.00	3	.0000	
5.00	3	.0000	
6.00	3	.0000	
7.00	3	.0000	
1.00	3		29.7867
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 *S. aureus*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2412.506	6	402.084	25964.859	.000
Within Groups	.217	14	.015		
Total	2412.723	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	.0000	
3.00	3	.0000	
4.00	3	.0000	
5.00	3	.0000	
6.00	3	.0000	
7.00	3	.0000	
1.00	3		30.6300
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 *S. rissen*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	215.286	6	35.881	193205.769	.000
Within Groups	.003	14	.000		
Total	215.289	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	.0000	
3.00	3	.0000	
4.00	3	.0000	
5.00	3	.0000	
6.00	3	.0000	
7.00	3	.0000	
1.00	3		9.1500
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 *K. pnuemoniae*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	133.303	6	22.217	31738.776	.000
Within Groups	.010	14	.001		
Total	133.313	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	.0000	
3.00	3	.0000	
4.00	3	.0000	
5.00	3	.0000	
6.00	3	.0000	
7.00	3	.0000	
1.00	3		7.2000
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพญาวานรสดการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่อยู่ในตัวทำละลายเมทานอลและเฮกเซน (ทำการทดลองวันที่ 18/3/2554 ตรวจผลวันที่ 21/3/2554) (ตารางที่ 4.2) ด้วยวิธี Duncan

1. สารสกัดที่ละลายในเมทานอล

1.1 *E. coli*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2703.114	6	450.519	190.155	.000
Within Groups	33.169	14	2.369		
Total	2736.283	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
2.00	3	.0000		
5.00	3	.0000		
6.00	3	.0000		
7.00	3	.0000		
4.00	3	.1167		
3.00	3		5.1367	
1.00	3			32.9033
Sig.		.934	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 *B. subtilis*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1775.362	6	295.894	484.523	.000
Within Groups	8.550	14	.611		
Total	1783.911	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
2.00	3	.0000		
7.00	3	.8533	.8533	
6.00	3	1.2867	1.2867	
4.00	3	1.2933	1.2933	
5.00	3		1.6400	
3.00	3		1.8900	
1.00	3			27.3867
Sig.		.081	.162	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 *S. aureus*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1830.327	6	305.055	82.846	.000
Within Groups	51.550	14	3.682		
Total	1881.878	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	.0000	
5.00	3	.0000	
6.00	3	.0000	
7.00	3	.0000	
4.00	3	2.0400	
3.00	3	2.0600	
1.00	3		27.2400
Sig.		.256	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 *S. rissen*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	213.721	6	35.620	143850.481	.000
Within Groups	.003	14	.000		
Total	213.724	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	.0000	
3.00	3	.0000	
4.00	3	.0000	
5.00	3	.0000	
6.00	3	.0000	
7.00	3	.0000	
1.00	3		9.1167
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 *K. pneumoniae*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	127.444	6	21.241	212406.857	.000
Within Groups	.001	14	.000		
Total	127.446	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	.0000	
3.00	3	.0000	
4.00	3	.0000	
5.00	3	.0000	
6.00	3	.0000	
7.00	3	.0000	
1.00	3		7.0400
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สารสกัดที่ละลายในเฮกเซน

2.1 *E.coli*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2810.478	6	468.413	20202.654	.000
Within Groups	.325	14	.023		
Total	2810.802	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	.0000	
3.00	3	.0000	
4.00	3	.0000	
5.00	3	.0000	
6.00	3	.0000	
7.00	3	.0000	
1.00	3		33.0600
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 *B. subtilis*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1992.071	6	332.012	11537.730	.000
Within Groups	.403	14	.029		
Total	1992.474	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	.0000	
3.00	3	.0000	
4.00	3	.0000	
5.00	3	.0000	
6.00	3	.0000	
7.00	3	.0000	
1.00	3		27.8333
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 *S. aureus*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1867.635	6	311.273	9371.645	.000
Within Groups	.465	14	.033		
Total	1868.100	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	.0000	
3.00	3	.0000	
4.00	3	.0000	
5.00	3	.0000	
6.00	3	.0000	
7.00	3	.0000	
1.00	3		26.9500
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 *S.rissen*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	211.383	6	35.230	3062.252	.000
Within Groups	.161	14	.012		
Total	211.544	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	.0000	
3.00	3	.0000	
4.00	3	.0000	
5.00	3	.0000	
6.00	3	.0000	
7.00	3	.0000	
1.00	3		9.0667
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 *K. pneumoniae*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	123.018	6	20.503	371.784	.000
Within Groups	.772	14	.055		
Total	123.790	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2.00	3	.0000	
3.00	3	.0000	
4.00	3	.0000	
5.00	3	.0000	
6.00	3	.0000	
7.00	3	.0000	
1.00	3		6.9167
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากใบพญาวานรสดจากธรรมชาติ ที่อยู่ในตัวทำละลายเมทานอล (ทำการทดลองวันที่ 29/3/2554 ตรวจผลวันที่ 30/3/2554) (ตารางที่ 4.3) ด้วยวิธี Duncan

1. *E. coli*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1336.778	6	222.796	99.073	.000
Within Groups	31.483	14	2.249		
Total	1368.261	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
2.00	3	.0000				
7.00	3	1.7433	1.7433			
6.00	3	2.4067	2.4067			
5.00	3		3.8433	3.8433		
4.00	3			5.2667	5.2667	
3.00	3				7.7933	
1.00	3					25.3100
Sig.		.082	.125	.264	.058	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. *B. subtilis*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1665.378	6	277.563	101.032	.000
Within Groups	38.462	14	2.747		
Total	1703.840	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
2.00	3	.0000			
7.00	3	1.5100	1.5100		
6.00	3	2.7233	2.7233		
5.00	3		3.4267		
4.00	3			6.8467	
3.00	3			9.4433	
1.00	3				27.9800
Sig.		.076	.200	.076	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. *S. aureus*

ANOVA

clearzone

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1077.357	6	179.560	872.394	.000
Within Groups	2.882	14	.206		
Total	1080.239	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

clearzone

Duncan[a]

concentrate	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
2.00	3	.0000					
7.00	3	.4600	.4600				
6.00	3		.8700	.8700			
5.00	3			1.3200	1.3200		
4.00	3				1.7167		
3.00	3					3.0633	
1.00	3						21.5400
Sig.		.235	.287	.245	.302	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้