การคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพร ไพลและกระชายดำ

Endophytic Actinomycetes isolated from Thai medicinal plants *Zingiber montanum* and *Kaempferia parviflora* Wallich.

ภัทรปภา ฐาปนภาคย์
วัชรพล ทิพย์สุวรรณพร
วัลวลีย์ ลิ้มประเสริฐ

โครงงานพิเศษเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรไพลและกระชายดำ

Endophytic Actinomycetes isolated from Thai medicinal plants *Zingiber montanum* and *Kaempferia parviflora* Wallich.

ภัทรปภา ฐาปนภาคย์
วัชรพล ทิพย์สุวรรณพร
วัลวลีย์ ลิ้มประเสริฐ

โครงงานพิเศษเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Endophytic Actinomycetes isolated from Thai medicinal plants *Zingiber montanum* and *Kaempferia parviflora* Wallich.

PHATARAPAPA THAPANAPARK
WATCHARAPON TIPSUWANPORN
VANVALEE LIMPRASERT

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพร ไพลและกระชายดำ

Endophytic Actinomycetes isolated from Thai medicinal plants *Zingiber montanum* and *Kaempferia parviflora* Wallich.

ชื่อนักศึกษา นางสาวภัทรปภา ฐาปนภาคย์ รหัสนักศึกษา 56051044
นายวัชรพล ทิพย์สุวรรณพร รหัสนักศึกษา 56051066
นางสาววัลวลีย์ ลิ้มประเสริฐ รหัสนักศึกษา 56051068

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2559

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.จิตติ ท่าไว ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการ	
ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

149667

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพร ไพลและกระชายดำ

ชื่อนักศึกษา นางสาวภัทรปภา ฐาปนภาคย์ รหัสนักศึกษา 56051044
นายวัชรพล ทิพย์สุวรรณพร รหัสนักศึกษา 56051066
นางสาววัลวลีย์ ลิ้มประเสริฐ รหัสนักศึกษา 56051068

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2559

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรท้องถิ่นจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ไพล และ กระชายดำ และทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ต่อเชื้อทดสอบ 7 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 , *Micrococcus luteus* ATCC 9341 , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 , *Methicillin resistance staphylococcus aureus*(MRSA) , *Bacillus subtilis* ATCC 6633 , *Candida albicans* ATCC 10231 ในการทดลองนี้ ผู้วิจัยได้ทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทหลังจากใช้วิธี Surface sterilization ผลการทดลองพบว่า เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้มีจำนวนทั้งสิ้น 101 ไอโซเลท ซึ่งพบในไพลและกระชายดำจำนวน 46 และ 55 ไอโซเลท ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการจัดกลุ่มเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทโดยดูจากฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นและลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า สามารถจัดจำแนกได้เป็น 12 กลุ่ม จากนั้นนำตัวแทนของแต่ละกลุ่ม ได้แก่ KPR2, KPR66, KPT75, KPT39, KPT48, KPT8, ZMR1, ZMR11, ZMR9, ZMRh12, ZMRh2 และ ZMRh25 มาทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่า มีเพียง 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทที่ KPT39 และ KPR2 (คัดแยกจากกระชายดำทั้งคู่) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเชื้อทดสอบ กล่าวคือ ไอโซเลทที่ KPT39 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 โดยแสดงบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ขนาด 9 มม. และ 6 มม. ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ต่ำสุด คือ 500 µg/ml และยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ โดยแสดงบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ขนาด 9 มม. และ 13 มม. ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ต่ำสุด คือ 125 µg/ml ส่วนไอโซเลทที่ KPR2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ โดยแสดงบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ขนาด 6 มม. และ 11 มม. ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ต่ำที่สุด คือ 125 µg/ml ผลจากการเทียบลำดับเบสจากยีน 16S rRNA พบว่า ไอโซเลท KPT39 และ KPR2 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงต่อเชื้อ *Streptomyces diasfatochromogenes* และ เชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Streptomyces adustus เท่ากับ 99.31 % และ 99.31 % ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากพืชทั้งสองชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ ผู้วิจัยวางแผนที่จะทำการคัดแยกหาเชื้อเอนโดไฟติคแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีและเป็นชนิดใหม่ต่อไป

คำสำคัญ : เอนโดไฟติคแอคติโนมัยซีท, สารสกัดหยาบ, ฤทธิ์ทางชีวภาพ, ไพล, กระชายดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title Endophytic Actinomycetes isolated from Thai medicinal plants *Zingiber montanum* and *Kaempferia parviflora* Wallich.

Students Miss. Phatarapapa Thapanapark Student ID 56051044
Mr. Watcharapon Tipsuwanporn Student ID 56051066
Miss. Vanvalee Limpresert Student ID 56051068

Degree Bachelor of Science (Industrial Microbiology)

Department Biology

Faculty Science

University King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)

Academic Year 2016

Advisor Dr.Wipawee Dejtisakdi

Abstract

The objective of this study is to isolate endophytic actinomycetes from two native medicinal plants such as *Zingiber montanum* and *Kaempferia parviflora* Wallich and test antimicrobial activity from endophytic actinomycetes crude extract to 7 pathogens, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Methicillin resistance *staphylococcus aureus* (MRSA), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Candida albicans* ATCC 10231. In the experiments, we isolated endophytic actinomycetes after surface sterilization and found that there were a total of 101 isolates of endophytic actinomycetes that were from *Zingiber montanum* and *Kaempferia parviflora* 46 and 55 isolates, respectively. After that we were grouping all 101 isolates into 12 groups of endophytic actinomycetes by using primary screening of antimicrobial activity and morphology. We then used a representative in each group such as KPR2, KPR66, KPT75, KPT39, KPT48, KPT8, ZMR1, ZMR11, ZMR9, ZMRh12, ZMRh2 and ZMRh25 to test antimicrobial activity by using agar disc diffusion. We found that only 2 out of 12 isolates were able to inhibit pathogens. To illustrate, KPT39 was able to inhibit *Micrococcus luteus* ATCC 9341 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 as shown by the inhibition zone at 9 and 6 mm, respectively with the minimum concentration concentration of crude extract at 500 µg/ml. and inhibit *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Candida albicans* ATCC 10231 as shown by the inhibition zone at 9 and 13 mm, respectively with the minimum concentration concentration of crude extract at 125 µg/ml. KPR2 was able to inhibit *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Candida albicans* ATCC 10231 as shown by the inhibition zone at 6 and 11 mm., respectively with the minimum concentration of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

crude extract at 125 µg/ml. After we blasted 16S rRNA of KPT39 and KPR2, we found that KPT39 had 99.31 % similarity to *Streptomyces diasfatochromogene*s and KPR2 had 99.31 % similarity to *Streptomyces adustu*s. From this study, we concluded that the endophytic actinomycetes isolated from both plants were able to inhibit some gram-positive bacteria. We further plan to do more endophytic actinomycetes isolation to find a better antimicrobial activity of crude extract and a new species of an endophytic actinomycetes.

Keywords : Endophytic Actinomycetes , Secondary metabolite , Primary screening, *Zingiber montanum* , *Kaempferia parviflora*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษางานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับการสนับสนุนและช่วยเหลือจากบุคลากรหลายๆฝ่าย ที่ได้มีความกรุณาชี้แนะแนวทางให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งยังช่วยเหลือแก้ไขและตรวจทานโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการให้ยืมเครื่องมืออุปกรณ์ในการทำการทดลองต่างๆ ซึ่งสะดวกและเป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ ที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและกรรมการ คอยให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษางานวิจัยนี้ รวมทั้งให้คำปรึกษาระหว่างการทำงานวิจัยและตรวจทางโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้เกิดความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.จิตติ ท่าไว ประธานกรรมการ และ ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำตรวจทานและพิจารณาโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการอาคารวิทย์เก่าและเจ้าหน้าที่ดูแลอาคาร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกอุปกรณ์ต่างๆ รวมทั้งการขอใช้สถานที่ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวที่ได้ให้การสนับสนุนในทุกๆด้าน ทั้งกำลังกายและกำลังใจกับคณะผู้จัดทำงานวิจัย รวมทั้งเพื่อนๆที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนตลอดมา จนคณะผู้จัดทำงานวิจัยประสบผลสำเร็จมาได้จนถึงวันนี้ จนโครงงานพิเศษสำเร็จได้ด้วยดี

ภัทรปภา ฐาปนภาคย์
วัชรพล ทิพย์สุวรรณพร
วัลวลีย์ ลิ้มประเสริฐ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขตของการดำเนินงาน 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมัยสีท
2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท 3
2.1.2 ประโยชน์ของแอคติโนแบคทีเรีย 8
2.2 ไพล
2.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 10
2.2.2 สรรพคุณและประโยชน์ของไพล 10
2.2.3 หลักฐานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับไพล 11
2.3 กระชายดำ
2.3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 15
2.3.2 สรรพคุณและประโยชน์ของกระชายดำ 15
2.3.3 หลักฐานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับกระชายดำ 16
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 18

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ 20
3.2 สารเคมี 21
3.3 เชื้อทดสอบ 22
3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน 23

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรตัวอย่า 27
4.2 ผลการคัดเลือกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้น 28
4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 41
4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Agar disc diffusion 54
4.5 ผลการศึกษาลักษณะทาง Genotype 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 62
เอกสารอ้างอิง 63
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก 67
ภาคผนวก ข 70
ภาคผนวก ค 107

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอคติโนมัยสีท..... 9
3.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส..... 25
4.1 แสดงจำนวนไอโซเลทของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากกระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wallich.) และไพล (*Zingiber montanum*)..... 27
4.2 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของกระชายดำกลุ่มที่ 1..... 28
4.3 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของกระชายดำกลุ่มที่ 2..... 30
4.4 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของกระชายดำกลุ่มที่ 3..... 31
4.5 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของกระชายดำกลุ่มที่ 4..... 32
4.6 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของกระชายดำกลุ่มที่ 5..... 33
4.7 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของกระชายดำกลุ่มที่ 6..... 34
4.8 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของไพลกลุ่มที่ 1..... 35
4.9 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของไพลกลุ่มที่ 2..... 36
4.10 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของไพลกลุ่มที่ 3..... 37
4.11 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของไพลกลุ่มที่ 4..... 38
4.12 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของไพลกลุ่มที่ 5..... 39
4.13 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของไพลกลุ่มที่ 6..... 40
4.14 แสดงฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท..... 41
4.15 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบของกระชายดำไอโซเลท KPR2..... 54
4.16 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบของกระชายดำไอโซเลท KPR39..... 56
4.17 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบโดยวิธี Agar disc diffusion..... 58
ตารางผนวก ข1 ตารางแสดงไอโซเลทของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท ของไพลและกระชายดำ..... 71
ตารางผนวก ข2 ตารางแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทของกระชายดำ.. 72
ตารางผนวก ข3 ตารางแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทของไพล..... 74
ตารางผนวก ข4 แสดงผลของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ชนิด ของกระชายดำ..... 76
ตารางผนวก ข5 แสดงผลของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ชนิด ของไพล..... 82
ตารางผนวก ข6 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ KPR66..... 87
ตารางผนวก ข7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ KPT75..... 89
ตารางผนวก ข8 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ KPT48..... 91
ตารางผนวก ข9 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ KPT8..... 93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ตารางผนวก ข10 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ ZMR1..... 95
ตารางผนวก ข11 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ ZMR11..... 96
ตารางผนวก ข12 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ ZMR9..... 99
ตารางผนวก ข13 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ ZMRh12..... 101
ตารางผนวก ข14 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ ZMRh2..... 103
ตารางผนวก ข15 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ ZMRh25..... 105
ตารางผนวก ค แสดงกระดาษสีมาตรฐาน..... 108

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็ง..... 3
2.2 การสร้างสปอร์เดี่ยว..... 5
2.3 ลักษณะสปอร์เป็นเส้นสาย..... 5
2.4 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ *Streptomyces*..... 6
2.5 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร..... 7
2.6 รูปทรงของอับสปอร์..... 7
3.1 แสดงวิธีการขีดเชื้อทดสอบจากวิธีการ primary screening..... 23
4.1 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท KPR2 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด..... 29
4.2 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท KPR66 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด..... 30
4.3 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท KPT75 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด..... 31
4.4 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท KPT739 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด..... 32
4.5 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท KPT48 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด..... 33
4.6 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท KPT8 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด..... 34
4.7 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท ZMR1 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด..... 35
4.8 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท ZMR11 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด..... 36
4.9 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท ZMR9 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด..... 37
4.10 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท ZMRh12 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด..... 38
4.11 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท ZMRh2 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด..... 39
4.12 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท ZMRh25 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด..... 40
4.13 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KPR2 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)..... 42
4.14 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KPR66 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)..... 43
4.15 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KPT8 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)..... 44
4.16 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KPT39 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)..... 45
4.17 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KPT48 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหาร และใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)..... 46
4.18 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KPT75 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)..... 47
4.19 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท ZMR1 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)..... 48
4.20 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท ZMR9 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)..... 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.21 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท ZMR11 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)..... 50
4.22 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท ZMRh1 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)..... 51
4.23 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท ZMRh12 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)..... 52
4.24 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท ZMRh25 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)..... 53
4.25 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบไอโซเลทที่ KPR2..... 55
4.26 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบไอโซเลทที่ KPT39..... 56
4.27 Phylogenetic tree แสดงสายวิวัฒนาการของไอโซเลท KPT39 (WD-1) โดยใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA..... 59
4.28 Phylogenetic tree แสดงสายวิวัฒนาการของไอโซเลท KPR2 (WD-2) โดยใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA..... 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีลักษณะคล้ายกับเชื้อรากล่าวคือ มีการเจริญเติบโตของเส้นใยที่ใช้ในการดูดอาหารเรียกว่า substrate mycelium และมีเส้นใยที่ใช้ในการสร้างสปอร์เรียกว่า aerial mycelium ส่วนของเส้นใยที่สัมผัสกับอากาศแบบไม่อาศัยเพศจะมีการเปลี่ยนรูปไปเป็นสปอร์เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์ แอคติโนมัยสีทดำรงชีวิตอยู่ในดิน ในปุ๋ยหมัก น้ำ โคลนตม และในเนื้อเยื่อพืช แอคติโนมัยสีทสามารถอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นแบบอิงอาศัย เรียกว่า เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท (Endophytic actinomycetes) เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่พบ เช่น ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืชได้แก่ส่วน ราก เหง้า ลำต้น และใบ ในพืชหลากหลายชนิด แอคติโนมัยสีทมีบทบาทสำคัญในการผลิตสารแอนตี้ไบโอติกและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทำให้มีความสำคัญอย่างยิ่งในโรงงานอุตสาหกรรม การเกษตร และอุตสาหกรรมการแพทย์ เช่น ผลิตยาปฏิชีวนะ เป็นต้น ปัจจุบันแอคติโนมัยสีทเป็นที่ได้รับความสนใจอย่างมาก เช่น *Streptomyces* sp. เนื่องจากสามารถผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ได้ ซึ่งจะผลิตในช่วงระยะคงที่ (stationary phase) เป็นระยะช่วงท้ายของการเจริญ สารทุติยภูมิที่ผลิตขึ้นมีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* (รัชนี, 2549)

เนื่องจากในประเทศไทยเป็นแหล่งของพืชสมุนไพรหลากหลายชนิดแอคติโนมัยสีทสามารถเจริญเติบโตแบบอิงอาศัยในพืชได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพร 2 ชนิด ได้แก่ ไพล (*Zingiber montanum*) และ กระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wallich) ไพลเป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์มากในด้านสรรพคุณทางยา เช่น ช่วยขับโลหิต ช่วยสมานแผลในลำไส้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพของไพล พบว่าสามารถยับยังแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* และสามารถต้านเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Rhizoctonia solani* ได้อ้างอิงจากงานวิจัย (www.medplant.mahidol.ac.th) ในส่วนของกระชายดำนั้น เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในการบำรุงกำลัง เช่น ช่วยบำรุงร่างกาย เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ ช่วยบำรุงหัวใจ และบำรุงโลหิตของสตรี เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ โดยกระชายดำนั้นสามารถต้านทานเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ (กีรติ, 2556)

การคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากไพลและกระชายดำครั้งนี้ ทำให้เราสามารถพบเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทซึ่งสามารถสร้างสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีผลต่อเชื้อจุลชีพทั้งทางด้านการยับยั้งหรือการฆ่าเชื้อจุลชีพนั้น และคาดหวังว่าจะได้ชนิดสายพันธุ์ของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทใหม่ๆ ซึ่งสามารถนำไปต่อยอดทางด้านการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพร 2 ชนิด ได้แก่ ไพลและกระชายดำ

1.2.2 เพื่อศึกษาดูฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากไพลและกระชายดำต่อเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัว

1.2.3 สามารถระบุสกุลของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์โดยการศึกษาลำดับเบสที่ 16s rRNA

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

โครงการพิเศษเรื่องนี้ ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับ การแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพร 2 ชนิด คือ ไพล (*Zingiber montanum*) และ กระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wallich) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่หาได้ง่ายตามเขตธรรมชาติในประเทศไทยและเป็นยารักษาโรคของคนไทยในสมัยโบราณจะทำการคัดแยกเชื้อโดยการ นำพืชสมุนไพรตัวอย่างมาทำการล้างด้วยน้ำกลั่นและทำการฟอกฆ่าเชื้อ จากนั้นนำมาบดและนำสารละลายมา spread ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้น 3-5 วันจึงทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจนได้โคโลนีเดี่ยวที่มีความบริสุทธิ์ จากนั้นเมื่อได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์แล้ว จึงนำไปทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต่อต้านสารต้านจุลชีพ ได้แก่ เชื้อทดสอบ 7 ตัว ศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ และอนุกรมวิธานโดยการทำสกัดดีเอนเอ ทำPCR และใช้ลำดับเบสของยีน 16s rRNA และจัดทำสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้เรียนรู้เทคนิคในการคัดแยกเชื้อและการจัดจำแนกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากสมุนไพรตัวอย่าง เช่น การฟอกฆ่าเชื้อ, การแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทให้บริสุทธิ์, การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ, การ streak plate, การสกัดดีเอ็นเอเพื่อหาลำดับเบส 16s rRNA และการจัดตำแหน่งใน phylogenetic tree เป็นต้น

1.4.2 ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท จากไพลและกระชายดำต่อเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

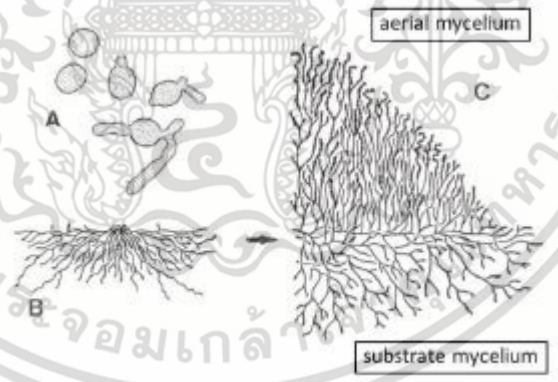
บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมัยสีท

แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีท เป็นแบคทีเรียที่ถูกแยกออกมาศึกษาจากแบคทีเรียทั่วไป เนื่องจากแอคติโนมัยสีทมีลักษณะพิเศษ คือ โคโลนีมีขนาดค่อนข้างใหญ่มีลักษณะผิวที่หยาบและรูปร่างฟิลาเมนต่อเป็นเส้นยาว ซึ่งทำให้แอคติโนมัยสีทมีลักษณะคล้ายเชื้อรา แต่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าเชื้อรา แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทค่อนข้างทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีความแห้งแล้งดังนั้นจึงสามารถดำรงชีวิตได้ในสภาวะที่มีความแห้งแล้งมาก เช่น ในดินทะเลทราย นอกจากนั้นยังชอบที่จะเจริญในสภาวะที่เป็นด่างหรือกลางแต่ไม่ทนกับสภาวะที่เป็นกรด แอคติโนมัยสีทได้รับความสนใจมากขึ้นเมื่อมีการค้นพบว่าบางสกุลของแอคติโนมัยสีท เช่น *Streptomyces* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ (สุบัณฑิต, 2549)

2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท (ยุวดี, 2546)

1. การสร้างโคโลนี ของแอคติโนมัยสีทเกิดจากการรวมกันของเส้นใยเป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น การสร้างโคโลนีบนอาหารแข็งเริ่มจากการลงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเป็นสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ส่วนของเส้นใยที่หัก หรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิมแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็ง
ที่มา: (Miyadoh, 1997)

A: อับสปอร์มีการพัฒนาเป็นเส้นใย B: สายใยอาหารเจริญแทงผ่านลงไปในอาหาร (substrate mycelium) C: เส้นใยเจริญเหนืออาหารและมีการสร้างสปอร์ (aerial mycelium)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ลักษณะของโคโลนี มีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์โดยพิจารณาจากลักษณะต่างๆ ดังนี้

1) ลักษณะของโคโลนี (configuration) รูปร่างของโคโลนีบนจานอาหารอาจมีรูปร่างกลม (round) รูปร่างไม่แน่นอนและแพร่กระจายไปบนจานอาหาร (irregular and spreading) หรือเจริญเป็นเส้นคล้ายรากไม้ (rhizoid) เป็นต้น

2) ขนาด (size) โคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์มีขนาดตั้งแต่เล็กเท่าปลายเข็ดหมุดจนถึงเส้นผ่านศูนย์กลางความยาวมิลลิเมตร

3) การยกตัวของโคโลนี (elevation) จานพื้นอาหารโคโลนีที่เจริญบนอาหารอาจแบนราบหรือนูน จึงทำให้โคโลนีที่ยกตัวมีหลายแบบ

4) ขอบของโคโลนีจุลินทรีย์ (margin) มีตั้งแต่ขอบเรียบหรือไม่เรียบ

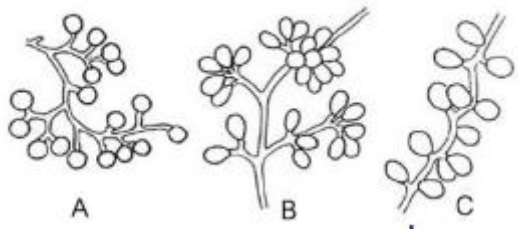
ตัวอย่างเช่นในสกุล *Streptomyces* มีการสร้างเส้นใยทั้ง aerial mycelium และ substrate mycelium ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของโคโลนี แต่ในสกุล *Micromonospora* และสกุล *Actinoplanes* ไม่มีการสร้างเส้นใย aerial mycelium ทำให้โคโลนีของแอคติโนมัยสีทมีลักษณะฟูหรือเรียบแบน บางครั้งมีลักษณะคล้ายหนังสัตว์และมีความหลากหลายตั้งแต่นูน,เหนียว จนถึงแข็ง ผิวหน้าโคโลนีอาจเรียบ, นูน, ขรุขระหรือ เป็นเกล็ด ขนาดโคโลนีขึ้นกับสปีชีส์ อายุและสภาวะการเจริญของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีซึ่งมีความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร

3. โครงสร้างภายในเส้นใย เส้นใยมีความหนาประมาณ 0.4 - 1.2 ไมโครเมตร เส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้นและเจริญออกทางด้านปลายสามารถแตกแขนงได้ โครงสร้างหลักในเส้นใยที่แสดงว่าเป็นโปรคาริโอต คือ ในไซโตพลาสซึม ประกอบไปด้วยสาย ดีเอ็นเอ ไรโบโซม และสารต่างๆ ที่รวมอยู่ด้วยกัน เช่น Polyphosphate, Lipid หรือ Polysaccharides ไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ อาจเกิดมีโซโซมซึ่งมักต่อกับโครงสร้างของผนังเซลล์

4. การสร้างสปอร์ แอคติโนมัยสีทมีการสร้างสปอร์โดยแบ่งเป็น 3 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้างภายนอกดังนี้

1) การสร้างสปอร์เดี่ยว การสร้างสปอร์เดี่ยวเรียกว่า Monosporous ตัวอย่างเช่นในสกุล *Micromonospora* จะมีก้านชูสปอร์ (Sporophore) เกิดขึ้นบนสายใยอาหาร โดยสปอร์จะติดอยู่ที่ฐานมีการสร้างผนังกั้นและผนังสปอร์ ในส่วนของสกุล *Thermomonospora* จะมีการสร้างสปอร์เดี่ยวบนสายใยอากาศที่ปลายก้านชูสปอร์ที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนง การแตกแขนงทำให้เกิดการสร้างเป็นกลุ่มของสปอร์สกุลอื่นๆ ในส่วนของสกุล *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายเส้นใยอากาศ ก้านชูสปอร์ไม่แตกแขนง แสดงดังรูปที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การสร้างสปอร์เดี่ยว

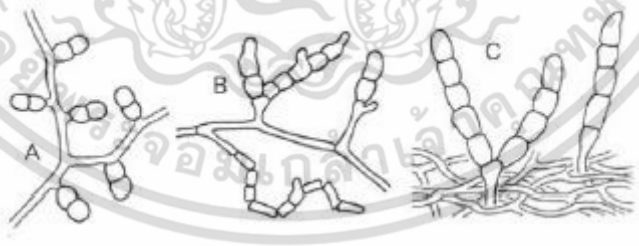
ที่มา: (Miyadoh, 1997)

A: สกุล *Micromonospora* B: สกุล *Thermomonospora* C: สกุล *Saccharomonospora*

2) การสร้างสปอร์เป็นเส้นสาย ในแอคติโนมัยสีทยังมีการสร้างสปอร์แบบนี้เป็นส่วนมาก สามารถแบ่งลักษณะของสายสปอร์โดยจะพิจารณาจากจำนวนของสปอร์แบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ

1. แบบbisporous โดยจะประกอบด้วยสปอร์คู่ต่อกันตามยาว พบในสกุล *Microbispora* เป็นการสร้างสปอร์ที่พบได้ยาก สปอร์ทรงรี 2 สปอร์มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร อาจเกิดขึ้นบนเส้นใยอากาศโดยตรงหรือเกิดบนก้านชูสปอร์สั้นๆ

2. แบบoligosporous จะมีการพัฒนามาจากสปอร์สายสั้นๆ ส่วนมากพบ 7-10 สปอร์ต่อสาย น้อยที่สุดคือ 3 สปอร์และบางสปีชีส์จะมีสปอร์มากถึง 30 สปอร์ ยกตัวอย่างในสปีชีส์ *Nocardia brevicatena* จะสร้างสายสปอร์สั้นๆ คือ 2-7 สปอร์บนสายใยอาหาร ในสปีชีส์ *Saccharopolyspora rectivirgula* ในสายสปอร์มีสปอร์ต่อกันน้อยกว่า 5 สปอร์ บนด้านข้างหรือปลายของก้านชูสปอร์ และในสกุลของ *Catellatospora* จะมีการสร้างสายสปอร์ที่มีลักษณะตรงจนโค้งงอ มีสปอร์ 5 – 30 สปอร์ ซึ่งแทงขึ้นมาจากอาหารเป็นสายสั้นไม่แตกแขนงหรือมีก้านชูสปอร์ที่แตกแขนง แสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ลักษณะสปอร์เป็นเส้นสาย

ที่มา: (Miyadoh, 1997)

A: การสร้างแบบ bisporous ของ *Microbispora*

B และ C: การสร้างสปอร์แบบ oligosporous ของ *Nocardia brevicatena* และ *Catellatospora* ตามลำดับ

3. แบบ polysporous มีการสร้างสปอร์เป็นสายมากกว่า 50 สปอร์ เช่นสกุลของ *Streptomyces* ที่มีสปอร์เรียกว่า Arthospores ซึ่งจะสอดคล้องกับ Arthospores ของกลุ่มรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกลุ่ม Deuteromycota ที่มีการสร้างสปอร์และมีการแตกหักของเส้นใย การสร้างสปอร์บนสายใยอากาศของ *Streptomyces* สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะคือ

1) Rectiflexbiles ลักษณะของสายสปอร์ตรง หรือโค้งงอ

2) Retinaculiaperti สายสปอร์คล้ายขอ (hook) เป็นวงเปิดหรือเป็นเกลียวซ้อนกัน 1–3 ชั้น

3) Spira สายสปอร์เป็นเกลียวแยกได้เป็น 2 แบบคือเป็นวงปิดเป็นเกลียวติดกันแน่นและเป็นเกลียวแบบวงเปิดเกลียวยาว ยืด ไม่ติดกันแน่น

4) Verticillati สายสปอร์ขดคล้ายก้นหอย และแตกแขนงกันแน่น

แสดงดังรูปที่ 2.4

รูปที่ 2.4 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ *Streptomyces*

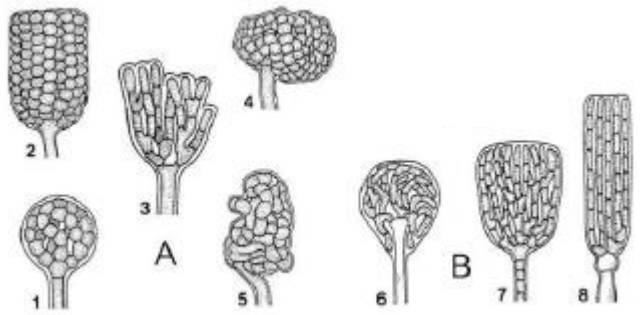
ที่มา: (Miyadoh, 1997)

1: Rectiflexbiles 2: Retinaculiaperti 3: Spira 4: Verticillati

5. การสร้างสปอร์ในอับสปอร์ การสร้างสปอร์ในอับสปอร์ ภายในอับสปอร์มีสปอร์อยู่มากสามารถแบ่งกลุ่มการสร้างอับสปอร์ได้เป็น 2 กลุ่ม

5.1) กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอาหาร ตัวอย่างเช่นสกุล *Actinoplans* อับสปอร์มีลักษณะทรงกลม หรือเกือบกลมจนไปถึงไม่เป็นรูปทรงที่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 – 15 ไมโครเมตร และอยู่บนเส้นใยอาหารโดยตรง มีสปอร์ต่อกันเป็นสายและแตกแขนงขดกันเป็นก้อนอยู่ภายในผนังห่อหุ้ม และสกุล *Atinoplans* ในสปีชีส์ *Ampullariella* จะสร้างอับสปอร์ที่มีรูปร่างแตกต่างกันไป คือ รูปทรงกระบอก ทรงขวด เป็นต้น ขนาดของอับสปอร์เฉลี่ยกว้าง 10 ไมโครเมตร ยาว 5 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่งต่อกันเป็นสาย ในส่วนของสกุล *Pilimelia* มีการสร้างอับสปอร์บนผิวของอาหาร มีรูปทรงกระบอก ทรงกลม ขนาดประมาณ 10 – 15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่ง มีการเรียงตัวกันเป็นแถวขนานกันหรือวกวนไม่เป็นระเบียบ แสดงดังรูปที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร

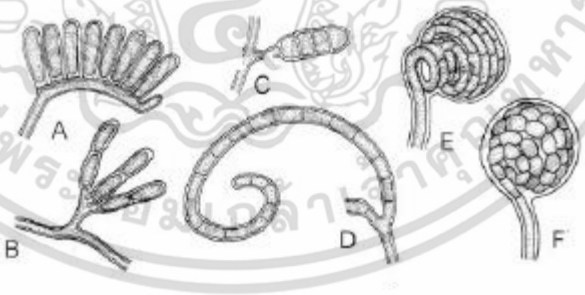
ที่มา: (Miyadoh, 1997)

A: สกุล *Actinoplanes* (รวมถึง *Ampullariella*) 1. ทรงกลม 2. ทรงกระบอก 3. เป็นพู

4. กึ่งทรงกลม 5. ไม่เป็นรูปทรง

B: สกุล *Pilimelia* 6. ทรงรี 7. รูปทรงระฆัง 8. ทรงกระบอก

5.2) กลุ่มที่มีการสร้างอับสปอร์บนเส้นใยอากาศ ตัวอย่างเช่นสกุล *Planomonospora* มีอับสปอร์รูปทรงกระบอก ภายในทรงกระบอกมีเพียง 1 สปอร์ ส่วนสกุล *Planobispora* มีสปอร์คู่ต่อกันอยู่ในอับสปอร์ ส่วนสกุล *Planotetraspora* มีอับสปอร์ทรงกระบอกยาวภายในมี 4 สปอร์ต่อกันเป็นหนึ่งแถว ส่วนสกุล *Planoplyspora* มีสปอร์จานวนมากภายในสปอร์อับสปอร์ เมื่อโตเต็มที่อับสปอร์จะเป็นแผ่นแบบยาวประมาณ 30ไมโครเมตรจะมีสปอร์จำนวนมากต่อกันเป็นแถวเดี่ยวอยู่ภายใน และในส่วนสกุล *Streptosporangium* ส่วนมากอับสปอร์เป็นทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกั้นเป็นสปอร์เดี่ยวๆต่อกันเป็นเส้นใยยาวขดเป็นวงอยู่ภายในอับสปอร์ แสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 รูปทรงของอับสปอร์

ที่มา: (Miyadoh, 1997)

A: สกุล *Planomospora* : monosporous, รูปกระบอง

B: สกุล *Planobispora*:disporous ทรงกระบอก

C: สกุล *Planotatraspora* :tetrasporous, ทรงกระบอก

D: สกุล *Planopolyspora* : polysporous, รูปทรงคล้ายท่อ

E: สกุล *Spirllspora* : polysporous,ทรงกลม

F: สกุล *Streptosporangium* : polysporous,ทรงกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ประโยชน์ของแอคติโนแบคทีเรีย

ประโยชน์ของแอคติโนมัยสีทที่รู้จักกันดี คือ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ เอนไซม์ สารสี หรือสารอื่นๆ ได้ จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยสีท 45% ของเชื้อทั้งหมดที่สร้างสารปฏิชีวนะ โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยสีททั้งหมด (McCarthy *et al.*, 1990) เอนไซม์ที่แอคติโนแบคทีเรียสามารถผลิตได้มีหลายชนิดได้แก่ xylanase, cellulose, amylase และ chitinase เป็นต้น เอนไซม์ amylase ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีหลายจีนัสที่สามารถผลิต amylase ได้ ได้แก่ *Micromonospora, Nocardia* และ *Streptomyces* (Das, 1996) เอนไซม์ amylase สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ เช่น การลดความหนืดของแป้งในอุตสาหกรรมทอผ้า การเพิ่มหรือการผลิตสารให้ความหวานในอุตสาหกรรมเบียร์ หรือเครื่องดื่ม เป็นต้น ส่วนเอนไซม์ chitinase ที่มีคุณสมบัติในการย่อยไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของรา หรือเป็นองค์ประกอบของ exoskeleton ของพวก arthropod จีนัสที่สามารถผลิต chitinase ได้ ได้แก่ *Streptomyces* (Dahiya, 2006) เอนไซม์ chitinase สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้เช่น นำมาทำ protoplast ของราเพื่อศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ของรา การสังเคราะห์สารต่างๆ การนำมาเป็นสารควบคุมทางชีวภาพเช่นใช้ควบคุมราที่ก่อโรคพืช และ การนำมาย่อยสลายของเสียทางอุตสาหกรรมการแช่แข็งอาหารทะเลเป็นการเพิ่มมูลค่าของของเสียในอุตสาหกรรม เป็นต้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอคติโนแบคทีเรียที่มีรายงานในช่วงปี ค.ศ. 2003-2005 แสดงดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอคติโนแบคทีเรีย

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	แอคติโนแบคทีเรีย	กิจกรรมการยับยั้ง
Abyssomicins	*Verrucosispora* sp.	Antibacterial
Aureoverticillactam	*Streptomyces aureoverticillatus*	Anticancer
Bonactin	*Streptomyces* sp.	Antibacterial; antifungal
Caprolactones	*Streptomyces* sp.	Anticancer
Chandrananimycins	*Actinomadura* sp.	Antialgal; antibacterial; Anticancer; antifungal
Chinikomycins	*Streptomyces* sp.	Anticancer
Chloro-dihydroquinones	*Novel actinobacteria*	Antibacterial; anticancer
Diazepinomicin	*Micromonospora* sp.	Antibacterial; anticancer; Antiflammatory
3,6-disubstituted indoles	*Streptomyces* sp.	Anticancer
Frigocyclinone	*Streptomyces* sp.	Antibacterial
Gutingimycin	*Streptomyces* sp.	Antibacterial
Helquinoline	*Janibacter limosus*	Antibacterial
Himalomycins	*Streptomyces* sp.	Antibacterial
Komodoquinone A	*Streptomyces* sp.	Neuritogenic activity
Lajollamycin	*Streptomyces nodosus*	Antibacterial
Marinomycins	*Marinispora* sp.	Antibacterial; anticancer
Mechercharmycins	*Thermoactinomyces* sp.	Anticancer
Salinosporamide A	*Salinispora tropica*	Anticancer
Sporalides	*Salinispora tropica*	Unknown biological activity
Trioxacarcins	*Streptomyces* sp.	Antibacterial; anticancer antimalarial

ที่มา: (Lam, 2006)

ในปัจจุบันนั้นมีจุลินทรีย์ที่ดื้อต่อสารปฏิชีวนะที่เพิ่มมากขึ้น แต่สารปฏิชีวนะนั้นผลิตได้น้อยลง ซึ่งสารปฏิชีวนะต่างๆในท้องตลาดนั้นไม่สามารถควบคุมจุลินทรีย์ดังกล่าวได้ทั้งหมด นักวิทยาศาสตร์จึงสนใจที่จะหาสารปฏิชีวนะในช่องทางใหม่ๆ ซึ่งอาจจะได้จากจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ไม่ว่าจะเป็นจากบ่อน้ำพุร้อน ดิน หรือจากพืชสมุนไพร เป็นต้น โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพร เนื่องจากประเทศไทยนั้นมีสมุนไพรที่แพร่หลายและหาง่ายตามท้องถิ่น ซึ่งสมุนไพรต่างๆ นั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป เราจึงได้ทำการเลือกสมุนไพรท้องถิ่นจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ไพลและกระชายดำ โดยนำส่วนต่างๆของพืชมาทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท เพื่อศึกษาดูฤทธิ์ทางชีวภาพที่ทดสอบกับเชื้อทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ไพล

ชื่อสามัญ (ชื่อภาษาอังกฤษ) : Phlai, Cassumunar ginger, Bengal root
ชื่อพ้อง : *Zingiber montanum (Koenig) Link ex Dietr., Z. purpureum* Roscoe
ชื่ออื่น : ปูขมิ้น มิ้นสะล่าง (ฉาน-แม่ฮ่องสอน), ว่านไฟ ไพลเหลือง (ภาคกลาง), ปูเลย ปูลอย (ภาคเหนือ), ว่านปอบ (ภาคอีสาน)
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Zingiber cassumunar Roxb.*
ชื่อวงศ์ : Zingiberaceae
ส่วนที่ใช้ : ต้น ดอก ใบ เหง้า ราก

2.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

- ต้นไพล เป็นไม้ล้มลุก สูง 0.7-1.5 เมตร มีลำต้นใต้ดินเป็นเหง้า เปลือกสีน้ำตาลแกมเหลือง เหง้าสดมีเนื้อในสีเหลืองถึงเหลืองแกมเขียว ฉ่ำน้ำ มีกลิ่นหอมเฉพาะ แทงหน่อหรือลำต้นเทียมขึ้นเป็นกอ ประกอบด้วยกาบหรือโคนใบหุ้มซ้อนกันเป็นลำกลม สีเขียวเข้ม โคนกาบสีแดง
- ใบเดี่ยว เรียงสลับ ออกระนาบเดียว รูปขอบขนานแกมใบหอก กว้าง 3.5-5.5 เซนติเมตร ยาว 18-35 เซนติเมตร ปลายใบเรียวแหลม โคนใบมน หรือเว้ารูปหัวใจ ผิวใบเรียบ ขอบใบเรียบ ไม่มีก้านใบ มีขนนุ่มที่เส้นกลางใบด้านท้องใบ แผ่นใบบาง หลังใบสีเขียวเข้มท้องใบสีอ่อนกว่า กาบใบมีลิ้นใบ
- ดอกช่อเชิงลด รูปไข่หรือยาวรี หรือรูปกระสวย แทงจากเหง้าใต้ดิน ดอกกว้าง 4-5 เซนติเมตร ยาว 7-15 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาว 15-30 เซนติเมตร ใบประดับจำนวนมากเรียงตัวเป็นระเบียบซ้อนกันแน่นคล้ายเกล็ดปลา มีขนประปราย ใบประดับย่อยม้วนหุ้มดอกย่อย ใบประดับมีสีแดงอมม่วง ขอบสีเขียว รูปเหมือนกลีบดอกบัว ข้างในใบประดับมีดอกย่อย 1 ดอก กลีบดอกเป็นหลอดเชื่อมติดกัน หลอดยาว 2.5 เซนติเมตร ส่วนปลายมี 3 กลีบ สีเหลืองนวล กลีบดอกบอบบาง เกสรเพศผู้ส่วนเป็นกลีบมี 3 หยัก สีขาวนวล หยักกลางขนาดใหญ่เป็นกลีบปาก รูปเกือบกลม เกสรเพศผู้ที่เป็นหมันมีสีเหลืองอมขาว ส่วนนี้มีขนาดใหญ่กว่ากลีบดอกและสวยสะดุดตา บริเวณกลางกลีบส่วนปลายจะเข้มกว่าเล็กน้อย หยักข้างมี 2 หยักติดกับกลีบปาก หรือหยักใหญ่ที่โคน เกสรเพศผู้ มีก้านสั้น อับเรณูสีเหลืองอ่อน มีส่วนปลายยื่นยาวออก เกสรเพศเมีย ยอดเกสรที่ส่วนปลายมีขนละเอียดสีขาวรังไข่ค่อนข้างแบนมีขน
- ผลเป็นผลแห้ง รูปทรงกลม ขนาดเล็ก แก่แตก 3 พู เมล็ดรูปไข่กลม ผิวเป็นมัน สีดำ
- มีเมล็ดจำนวนมาก ลำต้นจะเหี่ยวแห้งไปในฤดูแล้ง และจะผลิต้นใหม่ในฤดูฝน

2.2.2 สรรพคุณและประโยชน์ของไพล

- เหง้า ใช้เป็นยาแก้ท้องขึ้น ท้องอืดเฟ้อ ขับลม แก้บิด ท้องเดิน ขับประจำเดือนสตรี ทาแก้ฟกบวม แก้ผื่นคัน เป็นยารักษาหืด เป็นยากันเล็บถอด ใช้ต้มน้ำอาบหลังคลอด น้ำคั้นจากเหง้าช่วยรักษาอาการเคล็ดขัดยอก ฟกบวม แพลงช้ำเมื่อย
- หัว ช่วยขับระดู ประจำเดือนสตรี เลือดร้าย แก้มุตกิตระดูขาว แก้อาเจียน
- ดอก ขับโลหิตกระจายเลือดเสีย
- ต้น แก้ธาตุพิการ แก้อุจาระพิการ
- ใบ แก้ไข้ ปวดเมื่อย แก้ครั่นเนื้อครั่นตัว แก้เมื่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 หลักฐานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับไพล

1. ฤทธิ์ลดการอักเสบ การศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาของน้ำมันไพลทางด้านลดอาการอักเสบ พบว่าเฉพาะน้ำมันสกัดดิบเท่านั้นที่ให้ผลลดอาการบวมอุ้งเท้าหนู ส่วนสกัดย่อยอื่นๆ ไม่ได้ผล การศึกษาเบื้องต้นทางคลินิกพบว่าให้ผลในการรักษาอาการปวดกล้ามเนื้อ ปวดข้อและเคล็ดต่างๆ เช่นกัน มีรายงานฤทธิ์ลดการอักเสบของสารสกัดไพลด้วยเฮกเซนรวมถึงสารที่สกัดได้จากไพลหลายชนิด เช่น เคอร์คิวมิน ซึ่งเป็นสารสีเหลือง, น้ำมันหอมระเหย, และสารอื่นๆ เช่น สาร (E)-4(3′,4′-dimethylphenyl) but-3-en-l-ol ออกฤทธิ์ยับยั้ง prostaglandin นอกจากนี้สาร (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) but-3-en-2-ol ขนาด 2.5 มล./กก เมื่อป้อนเข้าสู่กระเพาะของหนูขาว พบว่าสามารถยับยั้งการอักเสบของอุ้งเท้าหนู ที่เหนี่ยวนำด้วย carrageenin ได้ โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการมารวมกันของเม็ดเลือดขาว และ การสร้าง prostaglandin

สาร (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene (DMPBD) มีฤทธิ์ยับยั้งอาการบวมของหูหนูขาวที่เกิดจาก dethyl phenylpropiolate และ arachidonic acid (AA) ได้ดีกว่ายา diclofenac DMPBD ยับยั้งการบวมที่เกิดจาก ethyl phenylpropiolate และ 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate ได้ดีกว่ายา oxyphenbutazone และ phenidone นอกจากนี้พบว่า DMPBD และ diclofenac มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันในการยับยั้งการอักเสบของเท้าหนูขาวที่เกิดจาก carrageenan แต่ที่เกิดจาก platelet activating factor (PAF) ไม่สามารถยับยั้งได้ เมื่อนำ DMPBD มาทดสอบการยับยั้ง platelet aggregation ที่เกิดจาก collagen, adenosine diphosphate, AA และ PAF พบว่าสาร DMPBD สามารถต้านทานฤทธิ์ของPAFได้ดีที่สุดสาร cassumunarins ที่พบในไพลมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่เกิดจาก 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate ที่หูของหนูถีบจักร สารดังกล่าวมีฤทธิ์ดีกว่า curcumin และทดสอบสารชนิดหนึ่งที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเมทานอลของไพล พบว่ามีฤทธิ์ลดการหลั่งสารที่ทำให้เกิดอาการแพ้และอักเสบจากเซลล์ fibroblast ของผิวหนังมนุษย์

เมื่อพัฒนาน้ำมันไพลให้อยู่ในรูปของเจล (ไพลเจล) แล้วนำมาทดสอบ พบว่าไพลเจลสามารถลดการอักเสบของอุ้งเท้าหนูได้ ในการศึกษาทางคลินิกพบว่าไพลเจลสามารถลดการบวมได้เทียบเท่ากับ piroxicam gel ทั้งยังลดความแดงและบรรเทาอาการปวดได้ผล เมื่อทดลองนำครีมไพล (ไพลจีซาล) ที่มีส่วนผสมของน้ำมันไพล 14 % ไปใช้ในผู้ป่วยข้อเท้าแพลง โดยให้ทาวันละสองครั้ง พบว่าสามารถลดการปวดบวมได้มากกว่ากลุ่มควบคุมเมื่อใช้ไปได้ 4 วัน โดยมีการกินยาแก้ปวด (paracetamol) ในสองวันแรกน้อยกว่ากลุ่มควบคุมด้วย ผู้ป่วยที่ได้รับไพลจีซาล สามารถงอข้อเท้าได้มากกว่ากลุ่มควบคุมแต่การงอของฝ่าเท้าไม่มีความแตกต่างกัน จากการทดลองฤทธิ์ของ DMPBD ต่อการยับยั้งการอักเสบพบว่า DMPBD มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase และ lipoxygenase ของกระบวนการเมทาบอลิสมของ arachidonic acid ที่ทำให้เกิดการอักเสบและการทดสอบสาร phenylbutenoids ในไพลจำนวน 7 ชนิด ต่อการยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการอักเสบ (cyclooxygenase-2) พบว่ามีสาร 4 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ได้แก่ สาร phenylbutenoid dimer 2 ชนิด มีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเอนไซม์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC50) เท่ากับ 2.71 และ 3.64 ไมโครโมลาร์ สาร phenylbutenoid monomer 2 ชนิด มีค่า IC50 เท่ากับ 14.97 และ 20.68 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

2. ฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่ น้ำคั้นหัวไพลมีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่ช่วยลดอาการปวดโดยน้ำคั้นของไพลความเข้มข้น 300 มก./มล. สามารถลดการนำไฟฟ้าในเส้นประสาท sciatic ของคางคก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ 84.46 % ในขณะที่ยา lidocaine ความเข้มข้น 0.2 มก./มล. ลดการนำไฟฟ้าได้ 93.09% หรือมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์มากกว่าน้ำคั้นของไพล 1500 เท่า

3. ฤทธิ์ต้านฮิสตามีนสารที่แยกได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของไพล เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านฮิสตามีนในกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูตะเภา พบว่าสามารถยับยั้งฤทธิ์ของฮิสตามีนได้ 100 % ที่ความเข้มข้น 0.533 มก./มล. สารดังกล่าวสามารถยับยั้งฤทธิ์ของฮิสตามีนที่กระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบหลอดลม ในตัวหนูตะเภาได้ด้วย นอกจากนี้ยังมีการทดสอบฤทธิ์ต้านฮิสตามีนของไพลในผู้ป่วยเด็กโรคหืด โดยฉีดฮิสตามีนที่แขนซ้ายก่อนได้รับยา และฉีดที่แขนขวาหลังการให้กินไพลแห้งบดในขนาด 11-25 มก./กก. 1 ชม.ครึ่ง วัดรอยนูนแดงหลังฉีดฮีสตามีน 15 นาที พบว่าไพลมีฤทธิ์ต้านฮิสตามีน โดยสามารถลดขนาดของตุ่มนูนที่เกิดจากการฉีดด้วยฮิสตามีน ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ยังมีประสิทธิภาพน้อยกว่ายาคลอเฟนิลามีน

4. ฤทธิ์แก้ปวดสาร (E)-4(3′,4′-dimethylphenyl) จากไพลมีฤทธิ์แก้ปวดเมื่อทดสอบในหนูขาว และไพลเจลมีฤทธิ์แก้ปวดเมื่อใช้เป็นยาทาภายนอก

5. การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์มีรายงานว่า การป้อนสาร B ที่แยกจากสารสกัดจากไพลด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ขนาด 25 มก./กก. และสารสกัดจากไพลด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ขนาด 2 ก./กก. (เทียบเท่าสาร D 15 มก./กก.) ให้หนูขาวครั้งเดียว พบว่า ค่าความเข้มข้นสูงสุดในเลือดของสาร B และสาร D เท่ากับ 1.92 มคก./มล. และ 0.75 มคก./มล. ที่เวลา 1.12 ชม. และ 1.04 ชม. หลังได้รับสารตามลำดับและเมื่อเปรียบเทียบการดูดซึมและการขับออกของสาร D และ Diol ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสาร D ที่สังเคราะห์ขึ้น พบว่าสาร D ดูดซึมเร็วกว่า แต่กำจัดออกจากร่างกายช้ากว่า

6. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย สารสกัดจากไพลด้วยไดคลอโรมีเทนแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus substilis* (แบคทีเรียแกรมบวก) และ *Pseudomonas aeruginosa* (แบคทีเรียแกรมลบ) โดยมีค่าความเข็มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ (MIC) เท่ากับ 250 และ 125 มคก./แผ่น แต่สารสกัดจากไพลด้วยเมทานอลไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้งสอง และสารสกัดทั้งสองชนิดไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อ methicillin และ *Escherichia coli* สารสกัดจากไพลด้วยเอทิลแอลกอฮอล์แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคของระบบทางเดินหายใจคือ b-streptococcus group A แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella pneumoniae* ได้ ส่วนสารสกัดจากไพลด้วย ไดเอทิลอีเทอร์ น้ำ และ ปิโตรเลียมอีเทอร์ ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis, E. coli, P. aeruginosa* และ *S. aureus* Terpinene-4-ol มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (9 ชนิด) โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 2 –5 มก./มล. แต่ sabinene ที่ความเข้มข้นแสดงฤทธิ์ยับยั้งเพียง 5 ชนิด โดยไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli, Salmonella typhimurium, Bacteroides fragilis*

7. ฤทธิ์ต้านเชื้อรา มีรายงานว่าสารสกัดจากไพลด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอลไม่มีผลยับยั้ง *Candida albicans* ขณะที่บางรายงานพบว่าสารสกัดไพลมีผลยับยั้งเชื้อราดังนี้ สารสกัดไพลสดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 2 มก./แผ่น เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชหลายชนิด ได้แก่ *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans, Wangiella dermatitidis, Alternaria alternata, Aspergillus fumigatus, Fusarium oxysporum, Microsporum gypseum, Pseudallescheria boydii, Rhizopus sp.* และ *Trichophyton mentagrophytes* เมื่อนำเชื้อรามาทดสอบกับสารสกัดจากน้ำ, เมทานอล, ได

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอโรมีเทนและเฮกเซน พบว่าสารสกัดจาก เมทานอล, ไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนเท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านยับยั้งการเจริญของรา *Epidermophyton floccousm, Microsporum gypseum, Trichophyton mentagrophytes* และ *Trichophyton rubrum* ซึ่งเป็นเชื้อราโรคผิวหนัง

น้ำมันหอมระเหยจากไพลมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา *Aspergillus flavus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่สร้างความเสียหายให้กับอาหาร นอกจากนี้สาร zerumbone ซึ่งเป็นสารพวก sesquiterpene ที่สกัดได้จากไพล มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคเน่าในพืช โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีผลฆ่าเชื้อราได้เท่ากับ 1000 มก./ลิตร ซึ่งได้ผลดีกว่ายาฆ่าเชื้อราบางชนิด ข้อดีของสารดังกล่าวคือเป็นพิษกับเชื้อราได้น้อยชนิดและไม่มีพิษต่อพืช โดยการทดลองใช้ป้องกันการเน่าของเมล็ดพืชที่เกิดเชื้อรา R. *solani* พบว่าสามารถป้องกันได้ถึง 85.7 %

เมื่อให้ครีมยาที่ผสมสารสกัดจากไพลด้วยแอลกอฮอล์กับผู้ป่วยที่เป็นโรคกลากที่ขาหนีบจำนวน 89 ราย แต่กลับมารับการตรวจประเมินเพียง 21 ราย พบว่าจำนวนผู้ป่วยที่กลับมาตรวจภายหลัง 6 ราย มี 2 รายที่รักษาได้ผล แต่ในผู้ป่วยที่ได้รับยา canesten กลับมาตรวจ 7 ราย มีเพียงรายเดียวที่รักษาไม่หาย และผู้ป่วยที่ได้รับยาหลอกกลับมาตรวจ 8 ราย มี 2 รายที่หายจากโรค

8. ฤทธิ์ต้านการหดเกร็งของกล้ามเนื้อเรียบ สาร D ที่แยกจากสารสกัดจากไพลด้วยเฮกเซน เมื่อนำมาทดสอบกับกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูตะเภา พบว่าสาร D สามารถยับยั้งฤทธิ์ของฮิสตามีน อะเซททิลโคลีน นิโคทีน และเซโรโทนิน ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 0.533, 0.533, 0.133 และ 0.533 มก./มล. ตามลำดับ และสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมที่ถูกกระตุ้นด้วยฮิสตามีนและกล้ามเนื้อกระบังลมที่ถูกระตุ้นด้วยไฟฟ้าได้ด้วยความเข้มข้น 0.133 มก./กก. และ 1.23 มก./กก. ตามลำดับ การทดลองในหนูตะเภา พบว่าสารดังกล่าวขนาด 8 มก./กก. สามารถยับยั้งฤทธิ์ของฮิสตามีนที่กระตุ้นให้หลอดลมหดตัวได้ เมื่อนำสารสกัดจากไพลด้วยน้ำมาทดสอบผลต่อกล้ามเนื้อเรียบของหนูขาว พบว่าสามารถยับยั้งการบีบตัวของมดลูก ลำไส้และกระเพาะอาหาร ได้ 100 % ที่ความเข้มข้น 0.09, 0.28 และ 0.64 ก./มล. ตามลำดับ แต่ฤทธิ์ดังกล่าวของน้ำสกัดไพลต่อมดลูกและลำไส้สามารถยับยั้งได้โดย syntocinon และ acetylcholine ตามลำดับ เมื่อทดสอบกับกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดงจากสายสะดือเด็กทารก ไม่พบการออกฤทธิ์ของน้ำสกัดไพลที่ชัดเจน การศึกษาเพื่อหากลไกการออกฤทธิ์ของน้ำสกัดไพล ในมดลูกและลำไส้ของหนูขาว พบว่าเมื่อให้ยากลุ่ม a และ b – adrenergic blocking agents ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของน้ำสกัดไพลได้ แต่ยาหรือสารที่มีผลโดยตรงต่อกล้ามเนื้อเรียบ เช่น calcium, syntocinon และ acetylcholine สามารถยับยั้งผลของสารสกัดได้ แสดงว่าน้ำสกัดไพลอาจจะไม่ได้ออกฤทธิ์กับ a – หรือ b – adrenergic receptor แต่ออกฤทธิ์โดยตรงกับกล้ามเนื้อเรียบโดยลดระดับหรือยับยั้ง calcium หรืออาจจะลดอัตราการเกิด spontaneous action potential ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบโดยตรง

9. หลักฐานความเป็นพิษและการทดสอบความเป็นพิษ การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน ไม่พบอาการเป็นพิษ แม้จะให้สารสกัดไพลด้วยแอลกอฮอล์ 50% ในขนาดเท่ากับไพล 10 ก./กก.ทั้งกรอกทางปาก และฉีดเข้าใต้ผิวหนังหนูถีบจักร และเมื่อให้สารสกัด D (แขวนตะกอนใน 2% tween 80) ในขนาดสูงเทียบเท่าไพล 30 ก./กก.ทั้งกรอกปาก และฉีดเข้าทางช่องท้อง แต่เมื่อให้เกลือโซเดียมของสาร D ที่ละลายในน้ำฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 450 มก./กก. จะทำให้หนูมีอาการหายใจลึกและถี่ เคลื่อนไหวน้อย และขาหลังมีอาการอ่อนเปลี้ยกว่าปกติ แต่หนูทั้งหมดยังมีชีวิตอยู่รอดภายหลังการทดลอง การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรัง ไม่พบอาการผิดปกติใดๆ ทั้งจากการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบลักษณะทั่วไป (gross examination) และจากการตรวจสอบทางชีวพยาธิวิทยา มีผู้ทดสอบความเป็นพิษในหนูขาว พบว่าขนาดที่ทำให้หนูขาวตายครึ่งหนึ่งมีค่าเท่ากับ 4.00 ก./กก. เมื่อให้ทางหลอดเลือด อาการที่พบคือ ตัวเย็นชืด ชัก หายใจขัด หยุดหายใจและตายในที่สุด การใช้ quinidine 5.6 มก./กก. ร่วมกับ propanolol 2 มก./กก. จะช่วยลดอัตราการตายลง ทำให้ขนาดที่ทำให้หนูตายครึ่งหนึ่งของจำนวนที่ทดลองเปลี่ยนเป็น 6.00 ก./กก. การศึกษาพิษเฉียบพลันของตำรับยาแก้หืดไพลในหนูขาว พบว่าขนาดของสารสกัดด้วย 50% แอลกอฮอล์ และเฮกเซน ที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง คือ 20 และ 80 ก./กก.ตามลำดับ การศึกษาพิษกึ่งเรื้อรัง โดยผสมไพล ขนาด 0.5, 3 และ 18% ในอาหารหนู ให้หนูกินเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าในขนาด 18% เท่านั้นที่ทำให้หนูโตช้า แต่ไม่พบความผิดปกติ ในค่าเคมีปัสสาวะและเลือด และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะส่วนขนาดของผงไพลที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งในหนูถีบจักร มีค่าสูงกว่า 10 ก./กก.และพบว่ามีพิษต่อตับเมื่อให้ไป 1 ปี และเมื่อให้ในลิง ในขนาด 50 เท่าของขนาดรักษาเป็นเวลา 6 เดือน ไม่พบพิษ

เมื่อกรอกสารสกัดไพลด้วยแอลกอฮอล์ 50% ในหนูถีบจักร 10 ก./กก. ซึ่งเป็นขนาด 250 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน และโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง 10 ก./กก. ยังไม่แสดงอาการพิษ เมื่อทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันไพลต่อสัตว์ทดลอง 3 ชนิด ได้แก่ หนูถีบจักร หนูขาว และกระต่าย โดยให้ทางปาก พบว่ามีค่าที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งเท่ากับ 2.15 ก./กก., 0.86 ก./กก. และ 0.825 ก./กก. ตามลำดับ จึงจัดว่าน้ำมันไพลเป็นสารที่มีความเป็นพิษเล็กน้อย มีการทดสอบความเป็นพิษของ terpinen-4-ol จากน้ำมันไพล กับกระต่ายในเวลา 1-24 ชั่วโมง พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงกับกระต่าย นอกจากนี้ทดสอบการระคายเคืองของ terpinen-4-ol กับกระต่าย โดยสอดครีมความเข้มข้น 3, 5 และ 7% ปริมาณ 1 มล./วัน เป็นเวลา 10 วัน พบว่าไม่มีผลต่อน้ำหนักกระต่าย แต่มีความผิดปกติกับช่องคลอด, กระเพาะปัสสาวะ, มดลูก, รังไข่, ไตและ ตับ ขนาดของ terpinen-4-ol ที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งในหนูตัวผู้คือ 3.55 ก./กก.และในหนูตัวเมียคือ 2.5 ก./กก. นอกจากนี้ terpinen-4-ol ที่ความเข้มข้น 0.016% ยังมีฤทธิ์ฆ่าเชื้ออสุจิของวัวเทียบเท่ากับยาสังเคราะห์ Nonyl phenoxy polyethoxy ethanol 0.025 เปอร์เซ็นต์ และ terpinen-4-ol ที่ความเข้มข้น 2.5% ยังมีฤทธิ์ฆ่าเชื้ออสุจิของวัวใกล้เคียงกับยาสังเคราะห์ Delfen ประสะไพลและน้ำสกัดจากประสะไพลที่ให้กับหนูขาว ในปริมาณ 2.5 ก/กก. และ 20 ก./กก. ตามลำดับ เมื่อสังเกตอาการใน 24 ชม.แรกไปจนถึง 14 วันถัดไป ไม่พบอาการพิษปกติและการตายในหนู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 กระชายดำ

ชื่อสามัญ (ชื่อภาษาอังกฤษ) : Black galingale, *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker.
ชื่อพ้อง : K. *rubromarginata* (S.Q. Tong) R.J. Searle และ *Stahlianthus rubromarginatus* S.Q. Tongl.)
ชื่ออื่น : ขิงทราย (มหาสารคาม), กะแอน ระแอน ว่านกั้นบัง ว่านกำบัง ว่านกำบังภัย ว่านจังงัง ว่านพญานกยูง (ภาคเหนือ)
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Kaempferia parviflora* Wallich. ex Baker
ชื่อวงศ์ : Zingiberaceae
ส่วนที่ใช้ : ต้น ดอก ใบ เหง้า ราก

2.3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

- ลำต้นและราก กระชายดำมีลำต้น 2 ชนิด คือ ลำต้นเหนือดิน (Aerial stem) และลำต้นใต้ดิน (Underground stem) ลำต้นเหนือดิน กลางลำต้นเป็นแกนแข็ง มีกาบใบล้อมรอบแน่น กาบใบหรือโคนใบมีสีแดง มีลักษณะอ่อนอวบ นุ่ม หุ้มแกนลำต้นไว้ ลักษณะคล้ายขมิ้นชันใบเดี่ยว แต่มีลำต้นเล็กกว่า และเตี้ยกว่าขมิ้นมาก ลำต้นใต้ดินหรือเรียก เหง้าหรือหัว มีลักษณะเป็นรูปวงกลมหรือวงรี เหง้ามีการเจริญเติบโตในแนวระนาบแผ่ขนานตามพื้นดิน เหง้าแก่มีแง่ง แตกออกด้านข้างจำนวนมาก แง่งมีลักษณะแตกเป็นแขนงย่อย มีรูปร่างไม่แน่นอน ลักษณะทั่วไปเป็นรูปกระบองหรือรูปหลอด ยาว 1.5-10 เซนติเมตร หนา 1-2 เซนติเมตร เปลือกด้านนอกมีสีออกสีน้ำตาลแกมสีส้มหรือสีแดง เหง้าที่แก่จะเปลี่ยนเป็นสีเทา เนื้อภายในมีสีน้ำตาลอ่อน สีน้ำเงินหรือสีดำ กลางเหง้ามีตาเจริญเป็นลำต้นเหนือดินหรือช่อดอก ราก เป็นรากฝอยแตกออกจากข้อบริเวณโคนเหง้า มีหน้าที่ช่วยหาอาหารและสะสมอาหารที่บริเวณปลายราก เมื่อหัวแก่ รากจะสร้างสำหรับสะสมอาหาร โดยพองออกเป็นรูปวงรีหรือรูปไข่ สีขาวนวล เรียกว่า “รากน้ำนม”

- ใบเป็นใบเดี่ยว (Simple leaf) รูปกรวย แทงออกบริเวณโคนเหง้า เรียงสลับห่อหุ้มแกนลำต้น เมื่อใบแก่ ก้านใบจะกางแยกออกจากกัน ใบมีลักษณะเป็นรูปรี ปลายใบเป็นติ่งแหลม โคนใบรูปหัวใจ ขอบใบเรียบเป็นคลื่นเล็กน้อย ก้านใบเป็นกาบ สีเขียวอ่อน ใบอ่อนมีมีสีเข้มม่วงอมแดง และเมื่อใบโตแผ่ขยายออกจะค่อยๆ จางเป็นสีเขียว ขอบใบมีแถบเล็กๆ สีแดงใส เส้นแขนงใบนูน ที่กลางใบเป็นทางสีม่วงอมแดง เรียกว่า เส้นกลางใบ

- ดอกออกเป็นช่อ ที่เกิดจากลำต้นเหนือดิน หุ้มด้วยกาบใบ 2 ใบ ใบประดับมีกลีบ 2 กลีบ สีเขียวอ่อน ก้านช่อดอกมีสีเขียว ช่อดอกมีดอกประมาณ 10-20 ดอก ดอกที่ปลายยอดจะบานก่อน ดอกที่บานจะประกอบด้วยกลีบดอก 3 กลีบ มีกลีบใหญ่ 1 กลีบ และกลีบเล็ก 2 กลีบ กลีบดอกบริเวณตรงกลางมีสีม่วง ดอกประกอบด้วยเกสรตัวผู้ อับเรณูอยู่ใกล้เกสรตัวเมีย รังไข่มีขนอ่อนปกคลุม และก้านเกสรเป็นรูปเส้นด้าย

2.3.2 สรรพคุณและประโยชน์ของกระชายดำ

- ใช้เป็นยาอายุวัฒนะ ช่วยชะลอความแก่ มีคุณค่าทางคงกระพันชาตรี ด้วยการใช้เหง้านำมาหั่นเป็นแว่น แล้วนำไปตากแดดจนแห้ง นำมาบดให้เป็นผงละเอียดผสมกับน้ำผึ้งปั้นเป็นยาลูกกลอน ใช้กินเช้าเย็น

- ใช้เป็นยาบำรุงกำลัง ด้วยการใช้เหง้าผสมกับสมุนไพรชนิดอื่นเป็นยาดองเหล้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ว่านกระชายดำช่วยบำรุงธาตุในร่างกาย
- ช่วยบำรุงผิวพรรณของสตรีให้สวยสดใส ดูผุดผ่อง
- ช่วยบำรุงฮอร์โมนเพศชายหากสุภาพสตรีรับประทานแล้วจะช่วยปรับสมดุลของฮอร์โมนทางเพศ
- ช่วยเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ บำรุงสมรรถภาพทางเพศชาย แก้กามตายด้าน ด้วยการใช้เหง้าสดนำมาดองกับเหล้าขาวและน้ำผึ้งแท้ (ในอัตราส่วน 1 กิโลกรัม : เหล้าขาว 3 ขวด : น้ำผึ้ง 1 ขวด) ดองทิ้งไว้ประมาณ 9-15 วัน แล้วนำมาใช้ดื่มวันละ 1-2 เป๊ก
- ช่วยกระตุ้นระบบประสาท บำรุงประสาท ทำให้ร่างกายกระชุ่มกระชวย

2.3.3 หลักฐานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับกระชายดำ

1. ข้อมูลทางเภสัชวิทยาของกระชายดำ สารสกัดกระชายดำด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ช่วยเพิ่มการไหลเวียนของเลือดไปยังอวัยวะเพศของหนูเพศผู้และสุนัข และยังมีผลช่วยเพิ่มความหนาแน่นของอสุจิ และเพิ่มระดับ Testosterone แต่ไม่ทำให้พฤติกรรมทางเพศเปลี่ยนไป นอกจากนี้หนูขาวที่ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ความเข้มข้นสูงในขนาด 1,000 มก./กก./วัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสามารถช่วยป้องกันภาวะผสมไข่ไม่ติดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดดังกล่าวยังส่งผลทำให้ตับโตขึ้นด้วย มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (สาร 5,7-DMF ที่แยกได้จากเหง้ากระชายดำ) ต้านการอักเสบแบบเฉียบพลันได้ดีกว่าแบบเรื้อรัง โดยแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูขาว และมีฤทธิ์ลดไข้ มีฤทธิ์ต้านเชื้อ Plasmodium falciparum ที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย (สาร 5,7,4 -trimethoxyflavone และ 5,7,3,4 -tetramethoxyflavone) และมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* และฤทธิ์ต้านเชื้อ Mycobacterium อย่างอ่อน (สาร 3,5,7,4-tetramethoxyflavone และ 5,7,4-trimethoxyflavone) กระชายดำมีฤทธิ์ในการช่วยยับยั้งเชื้อ S. *aureus* และ B. *subtilis* สารสกัดด้วยเอทานอลจากกระชายดำมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดแดงใหญ่ ลดการหดเกร็งของลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูขาว และยังช่วยยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดในคน จากการศึกษาทางพิษวิทยาในหนูทดลองเป็นระยะเวลา 6 เดือน ในขนาดตั้งแต่ 20-2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าหนูที่ได้รับกระชายดำทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ส่วนอาการและสุขภาพไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และหนูที่ได้รับกระชายดำในขนาด 2,000 มก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับสูงกว่ากลุ่มควบคุม มีเม็ดเลือดขาวอีโอซิโนฟิลต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่ยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติ สำหรับหนูเพศเมียจะมีระดับคอเลสเตอรอลสูงกว่ากลุ่มควบคุม และทุกกลุ่มไม่พบว่ามีความเป็นพิษเมื่อตรวจอวัยวะภายในด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา

2. การออกฤทธิ์เฉพาะ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ พบคุณสมบัติของสาร 5,7,4-trimethoxyflavone และสาร 5,7,3,4- tetramethoxyflavone ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ Plasmodium Falciparum (โรคมาเลเรีย), เชื้อ *Candida albicans* และเชื้อ *Mycobacterium* และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยจากกระชายดำ พบว่า สามารถต้านการเติบโตของเชื้อโรค S. *aureus* ได้ดี พิษต่อเซลล์มะเร็ง การใช้สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จากกระชายดำที่มีต่อเซลล์มะเร็งไม่พบสารใดที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งได ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดแดง การให้สารสกัดจากกระชายดำแก่หนูทดลอง พบว่า หลอดเลือดแดงใหญ่ (Aorta) ของหนูทดลองมีการขยายตัว รวมถึงช่วยลดการหดเกร็งของลำไส้ส่วนปลาย (ileaum) และช่วยยังยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ ฤทธิ์ต้านอักเสบ สาร 5,7 –ไดเมธอกซีฟลาโวน (5,7-DMF) ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบใกล้เคียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับยามาตรฐานหลายชนิด เช่น ไฮโดรคอร์ติโซน, อินโดเมธาซิน, แอสไพริน และเพรดนิโซโลน และออกฤทธิ์ต้านการอักเสบชนิดเฉียบพลันได้อย่างมีประสิทธิภาพดีกว่าแบบเรื้อรัง นอกจากนั้น ยังพบว่าสามารถยับยั้งอาการอุ้งเท้าบวมของหนูทดลองที่ได้รับสารสารคาราจีแนน และเคโอลินได้ดี ฤทธิ์สารสกัดกระชายดำช่วยลดการอักเสบของโรคข้อเข่าเสื่อม จากการทดลอง พบว่า สารสกัดจากเอทานอลและเฮกเซนสามารถยับยั้งการเกิดไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจได้ ซึ่งสามารถชี้บ่งถึงประสิทธิภาพสารสกัดกระชายดำในการยับยั้งสารที่ทำให้เกิดการทำลายของเซลล์ และเนื้อเยื่อได้ พิษกระชายดำ มีการศึกษาพิษเรื้อรังของกระชายดำในหนูทดลองในขนาด 20-2,000 มก./กก./วัน เทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับกระชายดำ พบว่า หนูทดลองที่ได้รับกระชายดำมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น และมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับกระชายดำ อาการ และสุขภาพไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับกระชายดำ ผลการตรวจอวัยวะภายในไม่พบการเปลี่ยนแปลง และความแตกต่างจากลุ่มที่ไม่ได้รับกระชายดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แสงจันทร์ (2525) ได้ศึกษาผลของสมุนไพรบางชนิดในพืชวงศ์ซิงกิเบอเรซี (Zinngiberceae) ต่อการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด โดยใช้สมุนไพร 5 ชนิดในพืชวงศ์ขิง คือ กระชาย ขมิ้น ข่า ขิง และไพล นำมาทำให้แห้งและบทละเอียดแล้วแช่ใน diethyl ether , petroleum ether และน้ำกลั่น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองเอากากออก จากนั้นนำสารที่ได้ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

รัชนี (2549) ได้ทำการศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำโดยใช้สารสกัดจากสมุนไพร โดยใช้สมุนไพร 12 ชนิด ได้แก่ กระชาย กระเทียม กล้วยน้ำว้า กระเพรา ข่า ขิง ชุมเห็ดเทศ เบญกานี บัวบก ฝรั่ง มังคุด และสีเสียดเทศ สกัดด้วยเอทานอลและน้ำ โดยนำตัวอย่างสมุนไพรที่บดละเอียดแล้ว 100 กรัม มาทำการสกัดโดยใช้เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 1000 มล. เขย่าเบาๆและแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วนำมากรองแยกตะกอนออก แล้วนำไปทำให้แห้ง โดยระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และนำพืชสมุนไพร 100 กรัมไปต้ม แล้วนำไปกรองแยกตะกอนออก นำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งโดยการ Freeze drying นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *Listeria monocytogens* , *Salmonella typhi* , *S. aureus* และ *Vabrio parahemolitieus* โดยวิธี disc diffusion ผลการทดลองพบว่าสารสกัดพืชสมุนไพรที่สกัดด้วยเอทานอลของผลฝรั่งและเบญกานี สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ได้ในการทดสอบของสารสกัดของเปลือกมังคุดและสีเสียดเทศพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogens* , *S. aureus* และ *Vabrio parahemolitieus* สารสกัดจากกระเทียม ชุมเห็ดเทศ และใบมังคุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogens* และ *S. aureus* และสารสกัดจากขิงด้วยเอทานอลสามารถยับยั้ง *Listeria monocytogens* , *S. aureus* และ *Salmonella typhi* ได้ ส่วนสารสกัดจากปลีกล้วยน้ำว้ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *Salmonella typhi* ได้ สำหรับสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่สกัดด้วยกล้วยน้ำว้า จากนั้น นำสารสกัดด้วยเอทานอลของเบญกานี ไปศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำแช่เย็น โดยเติมเชื้อ *S. aureus* และ *Vabrio parahemolitieus* ในตัวอย่างกุ้งกุลาดำ พบว่ากุ้งกุลาดำที่มีการใช้สารสกัดของเบญกานีมีปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณแบคทีเรียน้อยกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่มีการใช้สารสกัดจากเบญกานี

Wilson (2005) ได้ศึกษาการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากสารสกัดขมิ้นและอ้อย 2 ชนิด คือ *Curcuna malabarica* และ *Curcuma zedoaria* โดยยับยั้งแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* NCIM 2603 , *S. aureus* NCIM 2127 , *Micrococcus luteus* NCIM 2103 , *E. coli* NCIM 2574 , *Proteus mirabilis* NCIM 2300 และ *Klebsiella pneumoniae* NCIM 2957 และยับยั้งเชื้อรา 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida albicans* NCIM 3102 และ *Aspergillus niger* NCIM 596 สกัดสารโดยใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ petroleum ether , hexane , chloroform , acetone และ ethanol ผลดารศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากขมิ้น อ้อย ด้วย acetone และ hexane สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าตัวทำละลายอื่นที่ใช้ในการทดลอง โดยสารสกัดจาก *Curcuna malabarica* และ *Curcuma zedoaria* มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.01-0.15 มก./มล. และ 0.01-0.94 มก./มล. ตามลำดับ แต่สารสกัดจาก *Curcuna malabarica* ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* NCIM 2127 ได้ ในขณะที่สารสกัดจาก *Curcuma zedoaria* สามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้ อีกทั้งงานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่รายงานความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก *Curcuma*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

zedoaria ซึ่งเป็นแนวทางในการนำพืชชนิดนี้มาใช้เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและราในทางการแพทย์ต่อไป

Habrah (2000) ได้ศึกษาสารสกัดหยาบจากพืชตระกูลขิง 3 ชนิด ได้แก่ *Alpinia hookeriana* Val., *Alpinia malaccensis* Rosc., *Alpinia mutica* Roxb., *Alpinia nutans* Rosc., *Alpinia rafflesiana* Wall., *Alpinia vitellina* (Lindl.) Ridl., *Costus discolor* Rosc., *Costus megalobractea* K. Schum., *Costus spiralis* Rosc., *Costus villosissimus* Jacq., *Zingiber cassummunar* Roxb., *Zingiber ottensii* Vai. และ *Zingiber macroglossum* Val. สกัดโดยใช้ dichloromethane และ methanol เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus substillis* , methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) , *E. coli* และ *P. aeruginosa* และทดสอบการยับยั้งเชื้อรา 2 ชนิด ได้แก่ *Candida albicans* และ *Aspergillus ochraceous* รวมทั้งทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจาก *Alpinia mutica* Roxb. ด้วย dichloromethane สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus substillis* ได้ดีที่สุด และมีเพียงสารสกัดจาก *Costus discolor* Rosc. เท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Aspergillus ochraceous* ได้ นอกจากนี้ผลการทดสอลยังชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจาก *Alpinia malaccensis* และ *Alpinia mutica* มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า α-tocopherol

ปิยุกฤษฎ์ (2555) ศึกษาวิธีการสกัดส้มแขกด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 และ เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 เพื่อนำสารสกัดหยาบจากส้มแขกมาทำผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือ ผลการทดลอง พบว่าตัวทำละลายน้ำที่สกัดเนื้อผลส้มแขกแล้วให้ปริมาณสารสกัดสูงสุด ได้ปริมาณสารสกัดร้อยละ 49.29 ส่วนตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 ที่สกัดรกหุ้มเมล็ดที่ให้ปริมาณสารสกัดสูงสุด ได้ปริมาณสารสกัดร้อยละ 36.80 เมื่อทดสอลฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ คือ *E. coli* , *S. aureus* , *B. cereus* และ *S. typhimurium* ด้วยวิธี Broth Microdilution Method พบว่า สารสกัดหยาบจากส้มแขก มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 8 มก./มล. เมื่อนำมาทำเป็นส่วนผสมของเจลล้างมือ เมื่อนำสารสกัดหยาบส้มแขกมาเป็นส่วนผสมของสเปรย์ทำความสะอาดมือ พบว่า สเปรย์ที่มีส่วนผสมของเอทานอลเข้มข้น ร้อยละ 20 และสารสกัดจากส้มแขกความเข้มข้น 64 มก./มล. สามารถลดเชื้อจุลินทรีย์บนมือได้ร้อยละ 99.60 ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นตัวอย่างในการใช้สารสกัดจากพืชมาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อยับยั้งแบคทีเรีย

จากการสืบค้นข้อมูลทั้งหมด ผู้วิจัยจึงได้นำเอาพืชสมุนไพร 2 ชนิด คือ ไพลและกระชายดำ ในส่วนของ ราก, เหง้า, ลำต้น และใบ มาทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท และทำการทดสอบเชื้อเบื้องต้นด้วยวิธี primary screening จากนั้นจะทำการจัดจำแนกทางฟีโนไทป์ โดยการดูด้วยตาเปล่าเพื่อสังเกตโคโลนีและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่งกราดที่กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อทำการจัดกลุ่มเลือกเชื้อที่ดที่สุดของแต่ละกลุ่มมาทำการทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธีการ Agar disc diffusion จากนั้นทำการจัดจำแนกทางจีโนไทป์โดยการสกัดดีเอ็นเอที่ลำดับเบส 16s rRNA และจัดตำแหน่งใน phylogenetic tree โดยผู้วิจัยคาดหวังว่าจะได้เชื้อที่เป็นสายพันธุ์ใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. มีดผ่าตัด (scalpel handle)
2. เพลทพลาสติก (Plastic sterile petridish)
3. ขวดแก้วทิชชู
4. ออโต้ปิเปตต์ (Autopipette)
5. ทิป (Pipette tip)
6. ทิวป์ (Microcentifuge tube)
7. เหล็กคีบ (Forcep)
8. โกร่งบด (Pestle mortar porcelain)
9. กระดาษทิชชู่
10. เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)
11. แม่เหล็กคนสาร (Magnetic stirring bar)
12. บีกเกอร์ (Beaker)
13. ขวดดูแลนด์ (Duran bottle)
14. เครื่องชั่งสาร (Balance)
15. ช้อนตักสาร (Dispensing spoons)
16. กระดาษฟรอยด์ (foil)
17. แท่งแก้วคนสาร (Glass rod)
18. แท่งแก้วรูปตัวแอล (L-shape glass rod)
19. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
20. สไลด์ (Slide)
21. กระจกปิดสไลด์ (Cover glass)
22. เข็มเขี่ยเชื้อ (Bent needle)
23. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
24. กระบอกตวง (Cylinder)
25. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
26. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
27. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 1000 ไมโครลิตร
28. กระดาษกรอง Whatman No.1
29. กรวยบุชเนอร์ (buchner funnel)
30. กรวยกรอง (funnel)
31. Suction flask
32. โถดูดความชื้น (Desiccator)
33. ขวด vial
34. กรวยแยกสาร (Separating funnel)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

35. ไม้พันสำลี
36. อลูมิเนียมฟลอยล์
37. ตู้ปลอดเชื้อ Laminar Flow Clean Bench
38. เครื่องเขย่าสาร (shaker)
39. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)
40. แผ่น Dics ยา

3.2 สารเคมี

ก. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร Starch Casein Agar

1. สารยับยั้งเชื้อรา (Nystasin)
2. Sodium caseinate
3. Soluble starch
4. K_2HPO_4
5. Agar
6. Distilled water

ข. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร Yeast Extract-Malt Extract Agar (ISP2)

1. Yeast extract (BD-Difco)
2. Malt extract (BD-Difco)
3. Glucose
4. Agar
5. Distilled water

ค. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA)

1. Beef extract power
2. Acid Digest of Casein
3. Soluble starch
4. Agar
5. Distilled water

ง. สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ

1. สาร tween 0.1%
2. เอทานอล (Ethanol) 95%
3. Sodium hypocloride 1%
4. น้ำกลั่น (Distilled Water)

จ. สารเคมีสำหรับสกัดสาร

1. เอทิลอะซิเตรท (ethyl acetate)

ฉ. สารเคมีสำหรับเจือจางเชื้อทดสอบ

1.สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (Sodium coline)
2.สารละลายมาตรฐานแมคฟาแลน (McFarland)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช. สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

1. สารละลายทีอี บัฟเฟอร์ (TE buffer)
2. ไลโซไซม์ (lysozyme)
3. โซเดียมไดเดซิลซัลเฟต (SDS)
4. สารละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล-แอลกอฮอลล์ (phenol : chloroform : isoamyalcohol)
5. โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate)
6. สารละลายเอนไซม์อาร์เอ็นเอ (RNase solution)
7. เอนไซม์โปรตีเนส เค (Proteinase K)
8. ซาลีน โซเดียมซิเตต (saline-sodium citrate)
9. Wash buffer
10. สารละลายอีบี บัฟเฟอร์ (EB buffer)

3.3 เชื้อทดสอบ

1. *Escherichia coli* ATCC 25922
2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
3. *Micrococcus luteus* ATCC 9341
4. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
5. Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA)
6. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
7. *Candida albicans* ATCC 10231

3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

ทำการเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร โดยไพลเก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดนครราชสีมาและกระชายดำมาจากจังหวัดกำแพงเพชร ทำการชะล้างดินออกจากต้นด้วยแยกตัวอย่างพืชออกมาเป็น 4 ส่วน ได้แก่ ราก เหง้า ลำต้น และใบ และทำการตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร

2. การฟอกฆ่าเชื้อพืชตัวอย่างและการบ่มเชื้อแอคติโนมัยสีท

นำพืชตัวอย่างส่วนที่ตัดแล้วมาแช่ด้วย tween ที่ความเจือจาง 0.1% เป็นเวลา 20-30 วินาทีแล้วจึงทำการล้างออกด้วยน้ำบริสุทธิ์ 3 ครั้ง จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วย 95% เอทานอล เป็นเวลา 7 นาที (สำหรับส่วนของใบและลำต้น) หรือ 13 นาที (สำหรับส่วนของเหง้าและราก) ตามด้วยแช่ด้วย 1% Sodium hypochloride (Hyter) เป็นเวลา 7 นาที (สำหรับส่วนของใบและลำต้น) และ 13 นาที (สำหรับส่วนของเหง้าและราก) ซึ่งเวลานั้นสามารถเปลี่ยนแปลงไปตามความเหมาะสม โดยขึ้นอยู่กับความเปราะบางของชิ้นส่วนพืชและชนิดของพืชนั้นๆ จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง ซึ่งนำน้ำสุดท้ายมาใช้เป็น positive control โดยการดูดน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ไป spread ลงในอาหาร starch casein agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ nystasin เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และนำชิ้นส่วนพืชตัวอย่างที่ผ่านการ surface sterilization แล้วนำมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บดด้วยโกร่งและผสมกับน้ำกลั่น 0.4 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร มา spread ลงบนอาหาร starch casein agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ nystasin และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14-30 วัน โดยเช็คผลทุกๆ 3 วัน

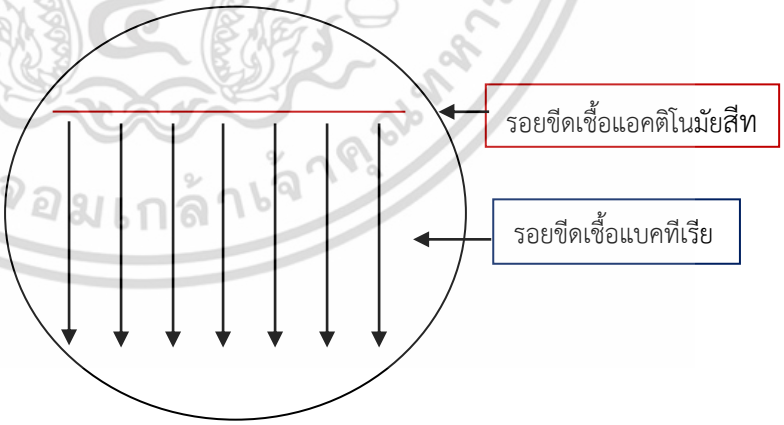
3. การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทให้บริสุทธิ์

หลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 2-5 วันจนมีการเจริญของเชื้อแล้ว จึงจะทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทโดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทลงบนอาหาร ISP2 และทำให้บริสุทธิ์โดยการ subculture ด้วยการ streak plate จนกว่าจะได้เชื้อแอคติโนมัยสีทที่บริสุทธิ์ และนำมาเลี้ยงต่อในอาหาร ISP2

4. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี primary screening และการศึกษาลักษณะทางทางฟีโนไทป์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท

4.1การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี primary screening (Gaeehowham, 2009)

ขีดเชื้อแอคติโนมัยสีทเป็นเส้นตรงลงบนผิวหน้าอาหารอาหารแข็ง ISP2 ฝั่งใดฝั่งหนึ่ง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบทั้งหมด 7 ตัว ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 , *Micrococcus luteus* ATCC 9341 , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 , *Methicillin resistance staphylococcus aureus*(MRSA) , *Bacillus subtilis* ATCC 6633 , *Candida albicans* ATCC 10231 มาขีดในแนวตั้งฉากกับเชื้อแอคติโนที่ขีดไว้ให้มีระยะใกล้ที่สุด โดยเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบนั้นจะต้องมีอายุ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนรอยขีด ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงวิธีการขีดเชื้อทดสอบจากวิธีการ primary screening

4.2 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท

การจัดกลุ่มเลือกแอคติโนมัยสีทที่สนใจโดยจะพิจารณาจากลักษณะการสร้างสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ดูการเจริญและสีของโคโลนีทั้งด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทำการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทเผื่อให้ผลิตสารสกัดและการสกัดสาร (Taeehowisan, 2009)

ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นจึงนำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยแห้งภายใต้การลดความดันโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) นำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยวิธี Agar disc diffusion (Lorian, 1980)

6. การทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทดสอบโดยวิธี Agar disc diffusion (Lorian, 1980)

6.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและการเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่จะใช้ทดสอบ โดยนำเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Methicillin resistance *staphylococcus aureus* (MRSA), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ที่มีอายุ 18 - 24 ชั่วโมงมาผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐานแมคฟาแลน (McFarland) เบอร์ 0.5 (เทียบเท่ากับการปรับระดับความขุ่น (O.D.) ให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.08 - 0.1 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร) ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 1×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร และเตรียมอาหารทริปติกซอยเอกา (Tryptic soy agar) หรืออาหารมิวเลอร์ฮินตันเอกา (mueller's hinton agar) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที เทลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตร แล้วทิ้งให้อาหารแข็งตัว

6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Agar disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Agar disc diffusion จะอาศัยหลักการแพร่ของสารสกัดออกมารอบๆแผ่นทดสอบ (disc) ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ บริเวณที่มีการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย (inhibition zone) จะขึ้นอยู่กับฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัด ในการทดสอบจะใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้แล้วทาลงบนอาหารแข็ง (swab) ด้วยวิธีปราศจากเชื้อ (aseptic technique) ให้เชื้อทดสอบกระจายบนผิวอาหารอย่างสม่ำเสมอ และทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง

เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบที่สกัดได้ในข้างต้น ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นดิสก์ทดสอบ (disc) ช้าๆ รอให้แผ่นทดสอบแห้งสนิท จากนั้นนำแผ่นทดสอบมาวางลงบนอาหารที่ทาเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่แห้งแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เกิด Clear zone หรือ Inhibitor zone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท

7.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Himedia kit (Himedia Technology Co.,Ltd)

ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในขวดรูปชมพู่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ISP2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นทำการปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นมา 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอน เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทส่วนใสออกเพื่อเก็บตัวเซลล์ จากนั้นเติมไลโซไซม์ (lysozyme) 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปใส่เอนไซม์โปรตีเนส เค (Proteinase K) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเพื่อทำลายโปรตีนและนำไปเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการกำจัดอาร์เอ็นเอ(RNA) และโปรตีนที่ปนเปื้อนมาด้วยการเติมสารละลายเอนไซม์อาร์เนส (RNase solution) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม lysis solution (C1) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรและนำไปเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมเอทานอล 95-100% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงทำการย้ายสารทั้งหมดลงในคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำการเทส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นเติม Pwash solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง แล้วเติม Washing buffer solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้แห้งอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดึงคอลัมน์ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิว (Micro-centrifuge tube) หลอดใหม่ แล้วใส่ Elution buffer ลงไปปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ได้ส่วนของดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์

7.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction ; PCR)

ตารางที่ 3.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

สาร	ความเข้มข้น	ปริมาตร
Primer:9F*	10 pmol/µl	4.0µl
Primer:1541R*	10 pmol/µl	4.0µl
dNTP	2.0	10.0µl
10X Taq buffer	10X	10.0µl
MgCl2	25.0Mm	8.0µl
Taq DNA Polymerase	5 Unit/µl	0.5µl
Distilled water	-	59.5µl
DNA Template	100-200 ng/µl	4.0µl
รวม		100.0µl

*primer : 9F (5’ – GAG TTT GAT CCT GGC TCA – 3’)

*primer : 1541R (5’ – AAG GAG GTG ATC CAG CC – 3’)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.3 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกทำการจัดเรียง (aligment) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อที่คัดเลือก (selected sequences) จากฐานข้อมูล genbank/EMBL/DDBJ โดยใช้ alignmentsoftware จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง phylogenetic trees ด้วยโปรแกรมใน MEGA V.7 package

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรตัวอย่าง

การคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากราก ลำต้น ใบ และเหง้าของพืชสมุนไพรที่เก็บจากจังหวัดกำแพงเพชรและนครราชสีมา ได้แก่ กระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wallich.) และไพล (*Zingiber montanum*) โดยเริ่มจากการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตัวอย่างพืชด้วยวิธี Surface sterilized (Mingma *et al*. 2014) และทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์บนอาหาร starch casein agar ด้วยวิธีการ spread plate หลังจากทำการบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน และคัดแยกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะคล้ายแอคติโนมัยซีทลงบนอาหาร ISP2 พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทได้จำนวนทั้งสิ้น 101 ไอโซเลท (แสดงดังตารางที่ 4.1) ซึ่งจำแนกเป็นเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากกระชายดำ (KP) จำนวน 55 ไอโซเลท ซึ่งมาจากส่วนลำต้นกระชายดำและรากกระชายดำจำนวน 21 และ 34 ไอโซเลท ตามลำดับ และเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากไพล (ZM) จำนวน 46 และ 23 ไอโซเลท ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนไอโซเลทของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากกระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wallich.) และไพล (*Zingiber montanum*)

พืช	ส่วนของพืช	จำนวนไอโซเลท
กระชายดำ	ใบ (KPL)*	-
	ลำต้น (KPT)*	21
	ราก (KPR)*	34
	เหง้า (KPRh)*	-
	รวม	55
ไพล	ใบ (ZML)*	-
	ลำต้น (ZMT)*	-
	ราก (ZMR)*	23
	เหง้า (ZMRh)*	23
	รวม	46

หมายเหตุ: * KPL = เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่เยกได้จากใบกระชายดำ
* KPT = เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่เยกได้จากลำต้นกระชายดำ
* KPR = เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่เยกได้จารากกระชายดำ
* KPRh = เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่เยกได้จากเหง้ากระชายดำ
* ZML = เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่เยกได้จากใบไพล
* ZMT = เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่เยกได้จากลำต้นไพล
* ZMR = เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่เยกได้จารากไพล
* ZMRh = เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่เยกได้จากเหง้าไพล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการคัดเลือกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้น

หลังจากทำการการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติคแอคติโนมัยซีทข้างต้น จากนั้นจึงนำเชื้อเอนโดไฟติคแอคติโนมัยซีททั้งหมด 101 ไอโซเลท มาทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Candida albicans* ATCC 10231 จากผลการทดลองดังกล่าว จึงนำเชื้อเอนโดไฟติคแอคติโนมัยซีทมาจัดกลุ่มโดยดูจากฤทธิ์ทางชีวภาพและลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เช่น สีของโคโลนี เส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ และลักษณะของสปอร์ (ในหัวข้อที่ 4.3) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นทั้งหมด 12 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

4.2.1 กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วย 28 ไอโซเลท ได้แก่ KPR2, KPR3, KPR4, KPR5, KPR6, KPR11, KPR12, KPR13, KPR14, KPR17, KPR18, KPR21, KPR23, KPR25, KPR27, KPR30, KPR35, KPR42, KPR43, KPR44, KPR49, KPR53, KPR55, KPR61 ผลการทดลองพบว่าทั้ง 28 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *M. luteus, S. aureus*, *B. subtilis* และ *C. albicans* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยังยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุดคือ KPR2 , ยังยั้งเชื้อ *M. luteus* ได้ดีที่สุดคือ KPR2, ยังยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดคือ KPR35, ยังยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดคือ KPR25 และยังยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุดคือ KPR2 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 34 มม., 30 มม., 16 มม., 32 มม. และ 23 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของกระชายดำกลุ่มที่ 1

รหัสเชื้อ	**บริเวณที่ยับยั้งเชื้อทดสอบ (มม.)**						
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
KPR2	34	-	30	14STA	-	26	23STA
KPR3	-	-	6	12STA	-	5	12STA
KPT4	30	-	5	13STA	-	16	11STA
KPR5	21	-	15	13STA	-	-	12STA
KPR6	30	-	-	10STA	-	10	4STA
KPR11	-	-	21	-	-	21	7STA
KPR12	-	-	12	5 STA	-	20	2STA
KPR13	25	-	15	12STA	-	17	10STA
KPR14	-	-	23	10STA	-	20	14STA
KPR17	23	-	3	15STA	-	5	12STA
KPR18	28	-	12	5STA	-	-	12STA
KPR21	5	-	-	-	-	15	14STA
KPR23	-	-	30	10STA	-	28	20STA
KPR25	7	-	24	13STA	-	32	12 STA
KPR27	14	-	30	2STA	-	12	3STA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

KPR30	32	-	18	13STA	-	18	5STA
KPR35	-	-	6	16STA	-	-	8STA
KPR42	5	-	30	10STA	-	26	16STA
KPR43	7	-	8	7STA	-	7	12STA
KPR44	3	-	25	12STA	-	22	-
KPR49	-	-	28	13STA	-	12	20STA
KPR53	-	-	12	4STA	-	5	13STA
KPT55	2	-	-	5STA	-	5	15STA
KPR61	3	-	21	5STA	-	15	6STA
KPR62	7	-	12	10STA	-	18	9STA

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.1 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท KPR2 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 กลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วย 6 ไอโซเลท KPR64, KPR66, KPR69, KPR65, KPR70 และ KPR71 ผลการทดลองพบว่าทั้ง 6 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *C. albicans* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยังยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดคือ KPR64 และ KPR66 และยังยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุดคือ KPR66 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 3 มม. และ 14 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และ รูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของกระชายดำกลุ่มที่ 2

รหัสเชื้อ	**บริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มม.)**						
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
KPR64	-	-	-	-	-	3	9STA
KPR65	-	-	-	-	-	1	10STA
KPR66	-	-	-	-	-	3	14STA
KPR69	-	-	-	-	-	2	12STA
KPR70	-	-	-	-	-	2	12STA
KPR71	-	-	-	-	-	2	11STA

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.2 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท KPR66 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 กลุ่มที่ 3 มี 1 ไอโซเลท ได้แก่ KPT75 ผลการทดลองพบว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *M. luteus,* MRSA และ *B. subtilis* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยังยั้งเชื้อ *M. luteus,* MRSA และ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดคือ KPT75 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 34 มม., 15 มม. และ 7 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ รูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของกระชายดำกลุ่มที่ 3

รหัสเชื้อ	**บริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มม.)**						
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
KPRT75	-	-	34	-	15STA	7	-

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.3 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท KPT75 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

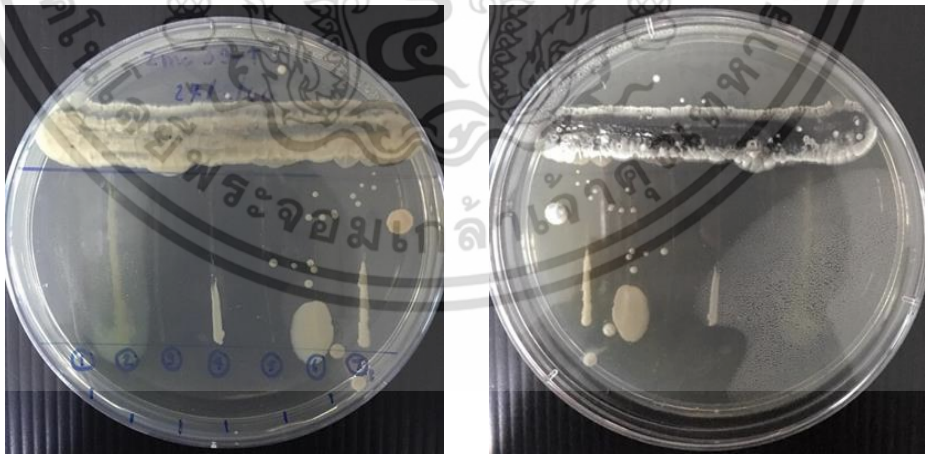
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 กลุ่มที่ 4 ประกอบไปด้วย 9 ไอโซเลท ได้แก่ KPT9, KPT37, KPT39, KPT41, KPT43, KPT44, KPT47, KPT64 และ KPT69 ผลการทดลองพบว่าทั้ง 9 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *M. luteus, S. aureus*, MRSA, *B. subtilis* และ *C. albicans* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยังยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุดคือ KPT39, KPT41 และ KPT47 ,ยับยั้งเชื้อ *M. luteus* ได้ดีที่สุดคือ KPT32, KPT28 และ KPT25, ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดคือ KPT32, ยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ดีที่สุดคือ KPT32, ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดคือ KPT39, KPT41, KPT25 และ KPT5 และยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุดคือ KPT43 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 32 มม., 30 มม., 25 มม., 32 มม., 28 มม. และ 19 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และ รูปที่ 4.4

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของกระชายดำกลุ่มที่ 4

รหัสเชื้อ	**บริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มม.)**						
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
KPT9	27	-	20	19	15	22	13
KPT37	30	-	23	20	23	24	13
KPT39	32	-	32	22	32	28	18
KPT41	32	-	30	25	17	28	17
KPT43	28	-	30	21	20	26	19
KPT44	25	-	30	15	21	28	10
KPT47	32	-	27	20	29	27	18
KPT64	24	-	24	20	17	21	13
KPT69	5	-	25	20	15	28	13

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า



รูปที่ 4.4 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท KPT739 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.5 กลุ่มที่ 5 ประกอบไปด้วย 3 ไอโซเลท ได้แก่ KPT46, KPT48 และ KPT71 ผลการทดลองพบว่าทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *M. luteus* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยังยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุดคือ KPT48 และยับยั้งเชื้อ *M. luteus* ได้ดีที่สุดคือ KPT46, KPT48 และ KPT71 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 28 มม. และ 2 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และ รูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของกระชายดำกลุ่มที่ 5

รหัสเชื้อ	**บริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มม.)**						
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
KPT46	5	-	2STA	-	-	-	-
KPT48	28	-	2STA	-	-	-	-
KPT71	20	-	2STA	-	-	-	-

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.5 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท KPT48 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.6 กลุ่มที่ 6 ประกอบไปด้วย 8 ไอโซเลท ได้แก่ KPT5, KPT6, KPT8, KPT13, KPT15, KPT16, KPT30 และ KPT31 ผลการทดลองพบว่าทั้ง 8 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยังยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุดคือ KPT8 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 31 มม. ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และ รูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของกระชายดำกลุ่มที่ 6

รหัสเชื้อ	**บริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มม.)**						
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
KPT5	5	-	-	-	-	-	-
KPT6	7	-	-	-	-	-	-
KPT8	31	-	-	-	-	-	-
KPT13	28	-	-	-	-	-	-
KPT15	13	-	-	-	-	-	-
KPT16	15	-	-	-	-	-	-
KPT30	14	-	-	-	-	-	-
KPT31	12	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.6 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท KPT8 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

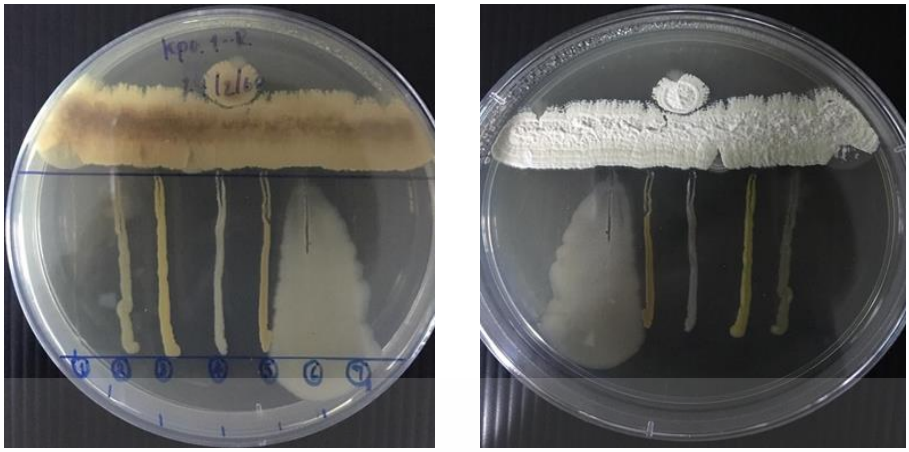
4.2.7 กลุ่มที่ 7 ประกอบไปด้วย 18 ไอโซเลท ได้แก่ ZMR1, ZMR2, ZMR3, ZMR4, ZMR5, ZMR6, ZMR10, ZMR13, ZMR14, ZMR15, ZMR16, ZMR17, ZMR18, ZMR19, ZMR20, ZMR21, ZMR22 และ ZMR23 ผลการทดลองพบว่าทั้ง 18 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *S. aureus*, MRSA และ *C. albicans* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยังยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุดคือ ZMR1 และ ZMR21, ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดคือ ZMR16, ยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ดีที่สุดคือ ZMR32, ZMR3 และ ZMR26 และยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุดคือ ZMR1 และ ZMR25 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 32 มม., 7 มม., 18 มม. และ 10 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และ รูปที่ 4.7

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของไพลกลุ่มที่ 1

รหัสเชื้อ	**บริเวณที่เกิดการยับยั้งหรือฆ่า (มม.)**						
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
ZMR1	32	-	-	5STA	18	-	10
ZMR2	28	-	-	5STA	5	-	-
ZMR3	25	-	-	3STA	18	-	6
ZMR4	-	-	-	3STA	15	-	8
ZMR5	29	-	-	4STA	14	-	6
ZMR6	27	-	-	5STA	16	-	8
ZMR10	26	-	-	4STA	18	-	9
ZMR13	25	-	-	5STA	10	-	10
ZMR14	28	-	-	3STA	5	-	9
ZMR15	15	-	-	-	5	-	5
ZMR16	22	-	-	7STA	3	-	3
ZMR17	18	-	-	4STA	8	-	6
ZMR18	18	-	-	5STA	-	-	5
ZMR19	20	-	-	5STA	8	-	8
ZMR20	-	-	-	3STA	5	-	5
ZMR21	32	-	-	5STA	7	-	-
ZMR22	-	-	-	5STA	8	-	8
ZMR23	30	-	-	5STA	12	-	5

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



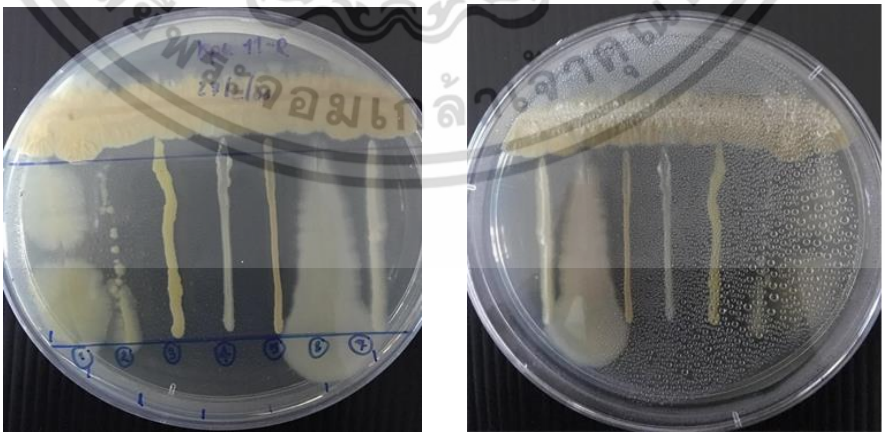
รูปที่ 4.7 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท ZMR1 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

4.2.8 กลุ่มที่ 8 ประกอบไปด้วย 2 ไอโซเลท ได้แก่ ZMR11 และ ZMR12 ผลการทดลองพบว่าทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยังยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดคือ ZMR11 และยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดคือ ZMR11 และ ZMR12 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 5 มม. และ 5 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และ รูปที่ 4.8

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของไพลกลุ่มที่ 2

รหัสเชื้อ	**บริเวณที่เกิดการยับยั้งหรือฆ่า (มม.)**						
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
ZMR11	-	-	-	5STA	-	5STA	-
ZMR12	-	-	-	3STA	-	5STA	-

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า



รูปที่ 4.8 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท ZMR11 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.9 กลุ่มที่ 9 ประกอบไปด้วย 3 ไอโซเลท ได้แก่ ZMR7, ZMR8 และ ZMR9 ผลการทดลองพบว่าทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, MRSA และ *B. subtilis* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยังยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดคือ ZMR9, เชื้อ MRSA คือ ZMR8 และยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดคือ ZMR9 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 10 มม., 13 มม. และ 17 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.10 และ รูปที่ 4.9

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของไพลกลุ่มที่ 3

รหัสเชื้อ	**บริเวณที่เกิดการยับยั้งหรือฆ่า (มม.)**						
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
ZMR7	-	-	-	9STA	3	12	-
ZMR8	-	-	-	6STA	13	13	-
ZMR9	-	-	-	10STA	5	17	-

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.9 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท ZMR9 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.10 กลุ่มที่ 10 ประกอบไปด้วย 6 ไอโซเลท ได้แก่ ZMRh12, ZMRh15, ZMRh17, ZMRh18, ZMRh19 และ ZMRh20 ผลการทดลองพบว่าทั้ง 6 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *M. luteus*, *S. aureus*, MRSA และ *C. albicans* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยังยั้งเชื้อ *M. luteus* ได้ดีที่สุดคือ ZMRh12, ยังยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุดคือ ZMRh12, ยังยั้งเชื้อ MRSA ได้ดีที่สุดคือ ZMRh20 และยังยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุดคือ ZMRh15 และ ZMRh20 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 33 มม., 28 มม., 25 มม. และ 5 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.11 และ รูปที่ 4.10

ตารางที่ 4.11 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของไพลกลุ่มที่ 4

รหัสเชื้อ	บริเวณที่เกิดการยับยั้งหรือฆ่า (มม.)						
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
ZMRh12	-	-	33	28	23	-	3STA
ZMRh15	-	-	31	19	23	-	5STA
ZMRh17	-	-	10	21	20	-	3STA
ZMRh18	-	-	23	22	23	-	2STA
ZMRh19	-	-	23	21	22	-	4STA
ZMRh20	-	-	30	18	25	-	5STA

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.10 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท ZMRh12 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.11 กลุ่มที่ 11 ประกอบไปด้วย 7 ไอโซเลท ได้แก่ ZMRh1, ZMRh2, ZMRh3, ZMRh5, ZMRh6, ZMRh10 และ ZMRh11 ผลการทดลองพบว่าทั้ง 7 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli, M. luteus* และ *B. subtilis* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยังยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุดคือ ZMRh2, ยังยั้งเชื้อ *M. luteus* ได้ดีที่สุดคือ ZMRh10 และ ยังยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดคือ ZMRh10 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 35 มม., 23 มม. และ 16 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.12 และ รูปที่ 4.11

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของไพลกลุ่มที่ 5

รหัสเชื้อ	บริเวณที่เกิดการยับยั้งหรือฆ่า (มม.)						
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
ZMRh1	32	-	15	-	-	10	-
ZMRh2	35	-	18	-	-	12	-
ZMRh3	-	-	12	-	-	12	-
ZMRh5	15	-	10	-	-	12	-
ZMRh6	23	-	17	-	-	13	-
ZMRh10	-	-	23	-	-	16	-
ZMRh11	14	-	18	-	-	4	-

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.11 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท ZMRh2 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

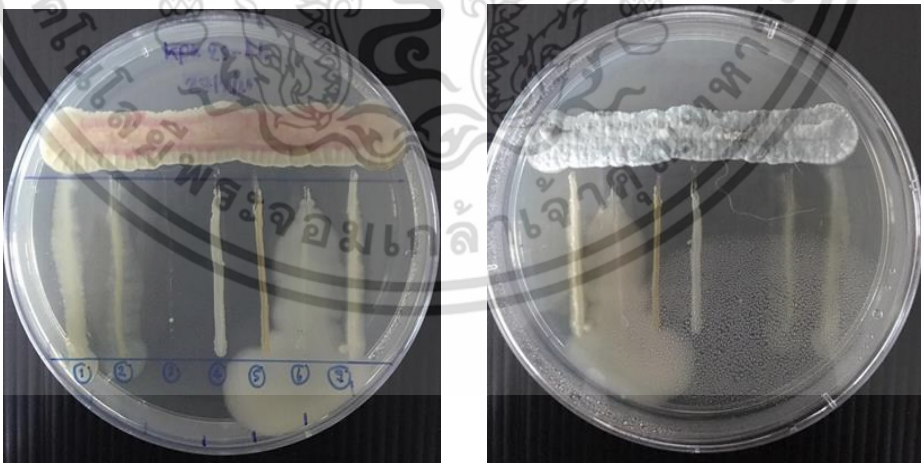
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.12 กลุ่มที่ 12 ประกอบไปด้วย 10 ไอโซเลท ได้แก่ ZMRh4, ZMRh7, ZMRh8, ZMRh23, ZMRh24, ZMRh25, ZMRh26, ZMRh31, ZMRh32 และ ZMRh34 ผลการทดลองพบว่าทั้ง 10 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *M. luteus*, *S. aureus*, MRSA และ *B. subtilis* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยังยั้งเชื้อ *M. luteus* ได้ดีที่สุดคือ ZMRh25, ยังยั้งเชื้อ *S. aureus* คือ ZMRh23, ยังยั้งเชื้อ MRSA ได้ดีที่สุดคือ ZMRh32 และยังยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุดคือ ZMRh4 และ ZMRh34 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 37 มม., 12 มม., 13 มม. และ 10 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.13 และ รูปที่ 4.12

ตารางที่ 4.13 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของไพลกลุ่มที่ 6

รหัสเชื้อ	**บริเวณที่เกิดการยับยั้งหรือฆ่า (มม.)**						
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
ZMRh4	-	-	12	6	8	10	-
ZMRh7	-	-	8	2	10	6	-
ZMRh8	-	-	8	7	5	-	-
ZMRh23	-	-	-	12	8	9	-
ZMRh24	-	-	11	11	10	-	-
ZMRh25	-	-	37	5	5	5	-
ZMRh26	-	-	13	4	9	3	-
ZMRh31	-	-	-	10	12	3	-
ZMRh32	-	-	15	3	13	2	-
ZMRh34	-	-	12	4	8	10	-

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า



รูปที่ 4.12 แสดงฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท ZMRh25 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการแสดงฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีททั้งหมด 101 ไอโซเลท สรุปได้ว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มที่ 1, 4, 5, 6, 7 และ 11 , ยับยั้งเชื้อ *M. luteus* ได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มที่ 1, 3, 4, 5, 10, 11 และ 12 , ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มที่ 1, 4, 7, 8, 9, 10 และ 12 , ยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มที่ 1, 3, 4, 7, 9, 10 และ 12 , ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ทั้งหมด 8 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มที่ 1, 2, 3, 4, 8, 9, 11 และ 12 , ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มที่ 1, 2, 4, 7 และ 10

ตารางที่ 4.14 แสดงฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท

กลุ่มที่	บริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มม.)						
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
1	+	-	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	+	+
3	-	-	+	-	+	+	-
4	+	-	+	+	+	+	+
5	+	-	+	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	+	+	-	+
8	-	-	-	+	-	+	-
9	-	-	-	+	+	+	-
10	-	-	+	+	+	-	+
11	+	-	+	-	-	+	-
12	-	-	+	+	+	+	-

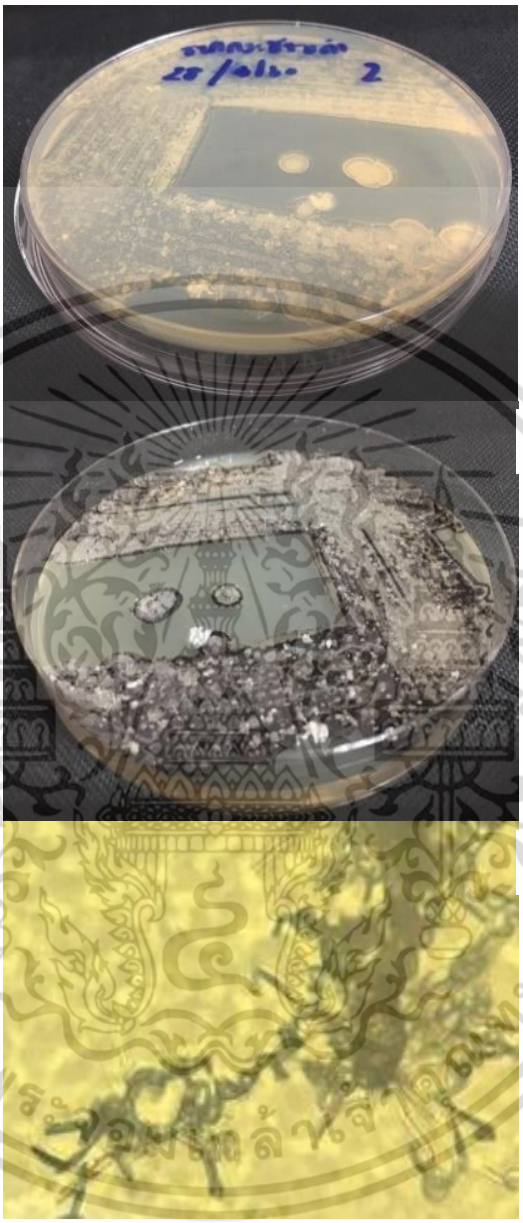
หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Phenotype characterization)

จากการจัดกลุ่มตามฤทธิ์การทดสอบเบื้องต้นได้ทั้งหมด 12 กลุ่ม โดยจะคัดเลือกไอโซเลทที่มีฤทธิ์การยับยั้งเบื้องต้นที่ดีที่สุดมากลุ่มละ 1 ไอโซเลท ได้แก่ KPR2, KPR66, KPT75, KPT39, KPT48, KPT8, ZMR1, ZMR11, ZMR9, ZMRh12, ZMRh2 และ ZMRh25 จะนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เริ่มจากนำมาเลี้ยงบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะของโคโลนี สีของเส้นใยอาหาร สีของเส้นใยอากาศ และลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้เลนส์ส่องระยะไกล (Long working distance) ที่กำลังขยายของเลนส์ 40X โดยจะทำการเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System, Mundie 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 1 KPR2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่ามีลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอาหารสี Light Brownish Gray เส้นใยอากาศสีดำอมเทา Dark Grayish Brown พบการสร้างสปอร์แบบเกลียว แสดงดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KPR2 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

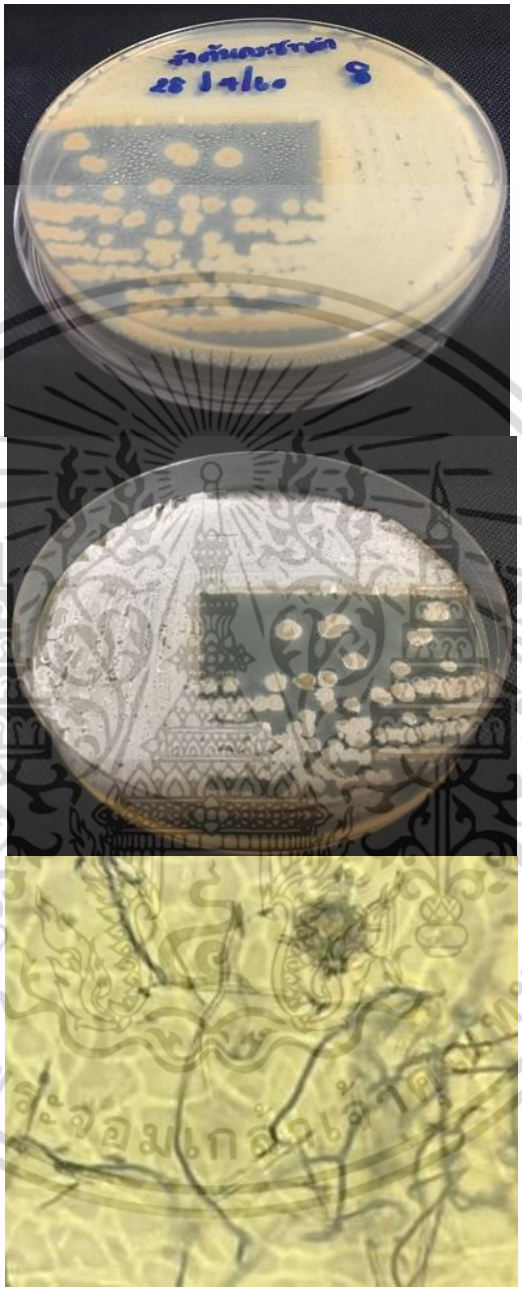
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 2 KPR66 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่ามีลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอาหารสี Moderate Orange Yellow เส้นใยอากาศสี Pale Yellow พบการสร้างสปอร์แบบเส้นตรงแสดงดังรูปที่ 4.14

รูปที่ 4.14 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KPR66 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

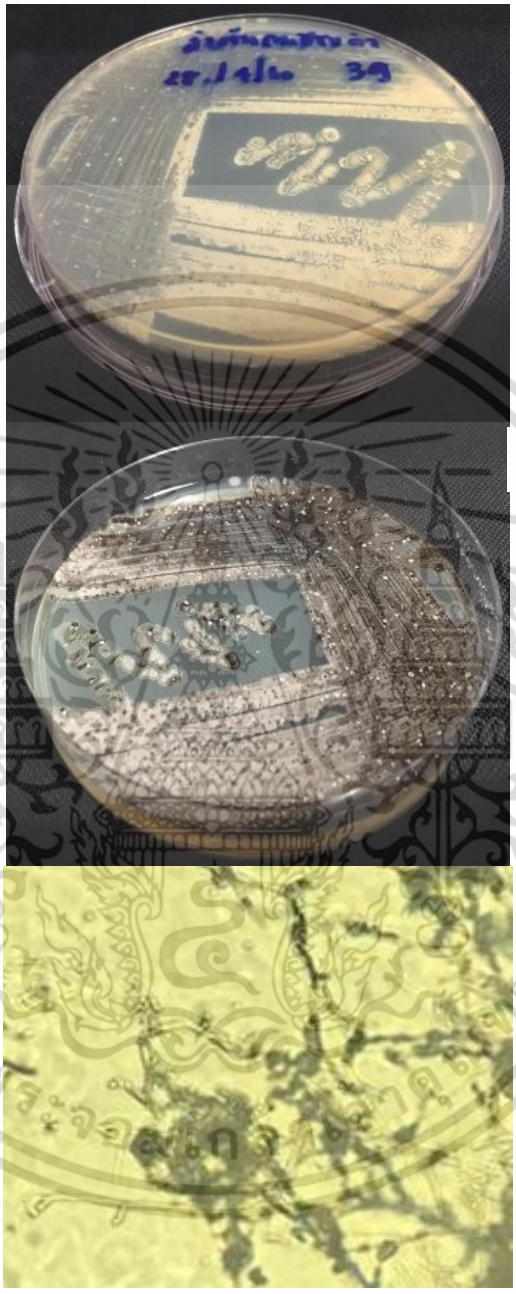
กลุ่มที่ 3 KPT8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่ามีลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอาหารสี Brilliant Orange เส้นใยอากาศสี Yellowish Gray พบการสร้างสปอร์แบบเส้นตรง แสดงดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KPT8 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 4 KPT39 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่ามีลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอาหารสี Light Grayish Yellowish Brown เส้นใยอากาศสี Dark Grayish Yellowish Brown พบการสร้างสปอร์แบบเกลียว แสดงดังรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KPT39 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

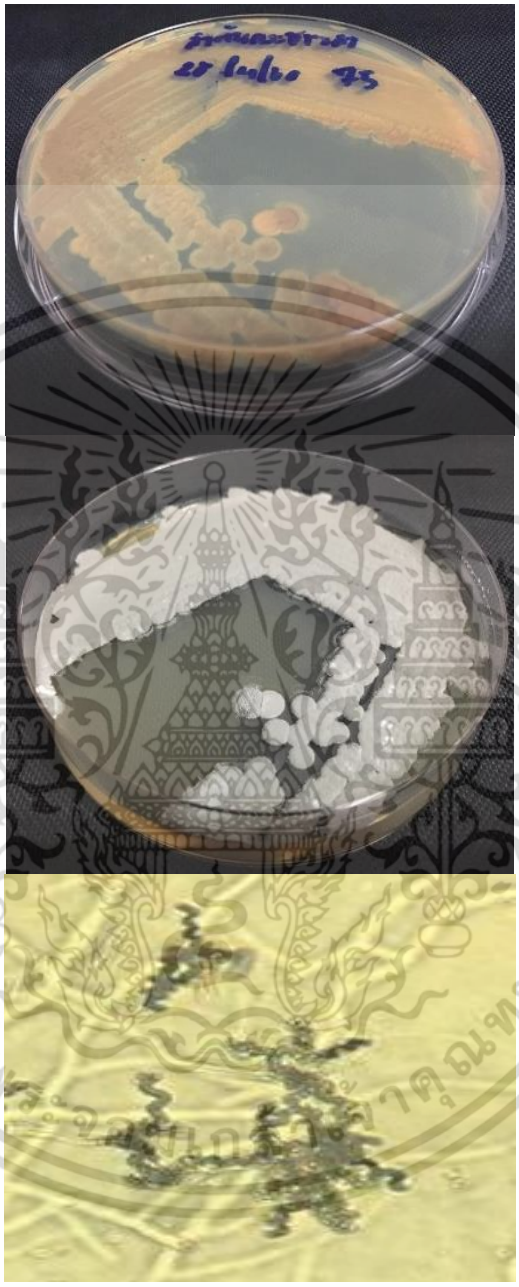
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 5 KPT48 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่ามีลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอาหารสี Light Orange เส้นใยอากาศสี Yellowish White พบการสร้างสปอร์แบบเส้นตรง แสดงดังรูปที่ 4.17

รูปที่ 4.17 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KPT48 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 6 KPT75 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่ามีลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอาหารสี Moderate Orange Yellow เส้นใยอากาศสี Pale Blue พบการสร้างสปอร์แบบเกลียว แสดงดังรูปที่ 4.18



รูปที่ 4.18 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KPT75 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

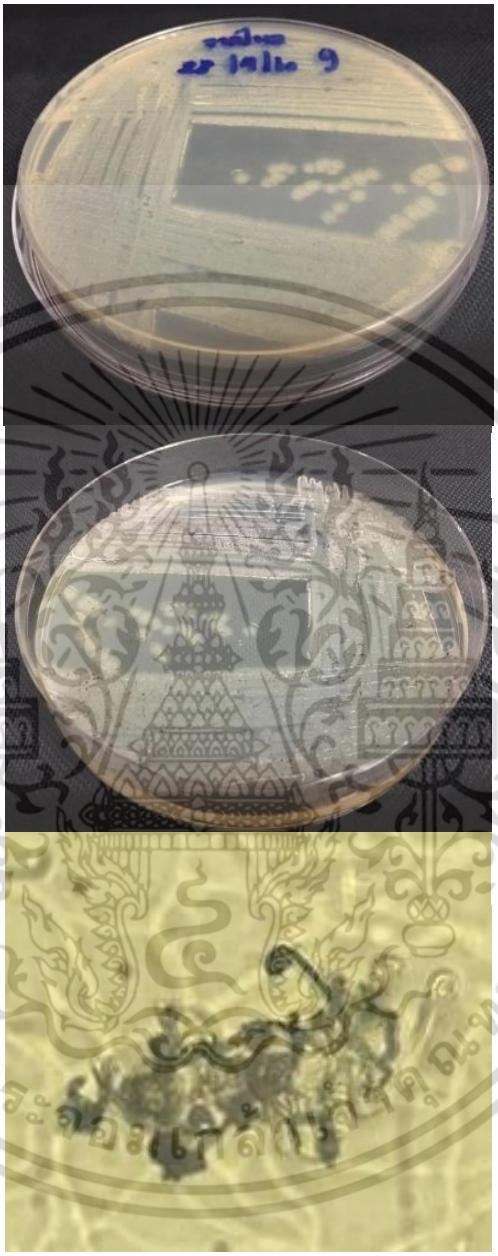
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 7 ZMR1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่ามีลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอาหารสี Light Orange Yellow เส้นใยอากาศสี Yellowish White พบการสร้างสปอร์แบบเส้นตรง แสดงดังรูปที่ 4.19

รูปที่ 4.19 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท ZMR1 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

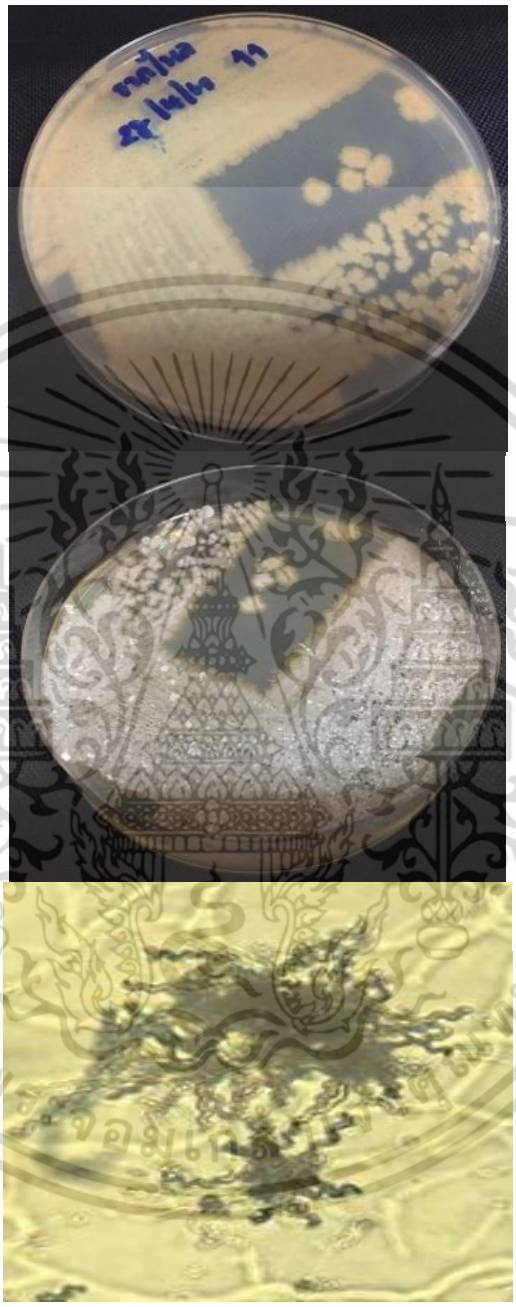
กลุ่มที่ 8 ไอโซเลทที่ ZMR9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่ามีลักษณะโคโลนี รูปร่างกลม สร้างเส้นใยอาหารสี Yellowish Gray เส้นใยอากาศสี Yellowish White พบการสร้างสปอร์แบบเกลียว แสดงดังรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.20 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท ZMR9 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

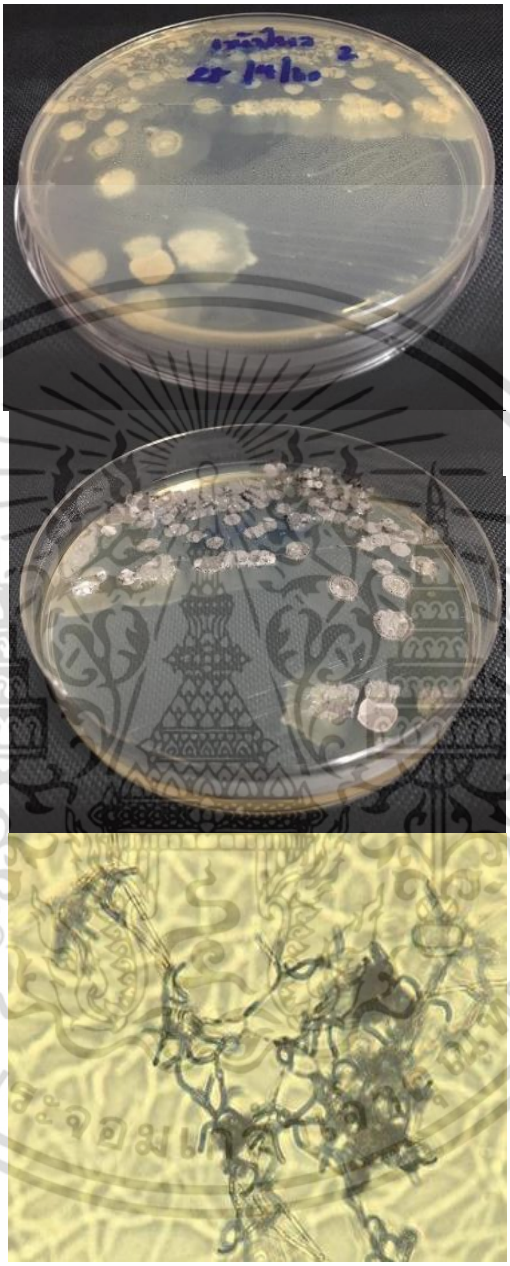
กลุ่มที่ 9 ZMR11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่ามีลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอาหารสี Light Orange Yellow เส้นใยอากาศสี Yellowish Gray พบการสร้างสปอร์แบบเกลียว แสดงดังรูปที่ 4.21



รูปที่ 4.21 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท ZMR11 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 10 ZMRh2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่ามีลักษณะโคโลนี รูปร่างกลม สร้างเส้นใยอาหารสี Light Yellowish Brown เส้นใยอากาศสี Light Brownish Gray พบการสร้างสปอร์แบบเกลียว แสดงดังรูปที่ 4.22



รูปที่ 4.22 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท ZMRh1 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

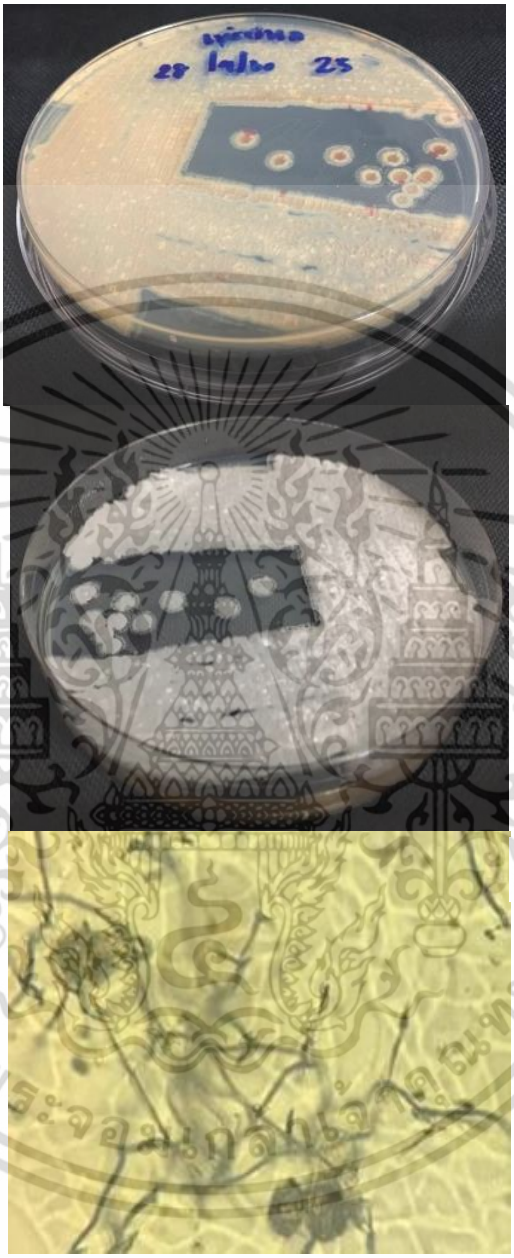
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 11 ZMRh12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่ามีลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอาหารสี Light Orange Yellow เส้นใยอากาศสี Medium Gray พบการสร้างสปอร์แบบเส้นตรง แสดงดังรูปที่ 4.23

รูปที่ 4.23 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท ZMRh12 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 12 ZMRh25 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่ามีลักษณะโคโลนี รูปร่างกลม สร้างเส้นใยอาหารสี Strong Yellowish Pink เส้นใยอากาศสี Light Gray พบการสร้างสปอร์แบบเส้นตรง แสดงดังรูปที่ 4.24



รูปที่ 4.24 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท ZMRh25 (ก. และ ข. สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ค.ลักษณะการสร้างสปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทด้วยวิธี Agar disc diffusion

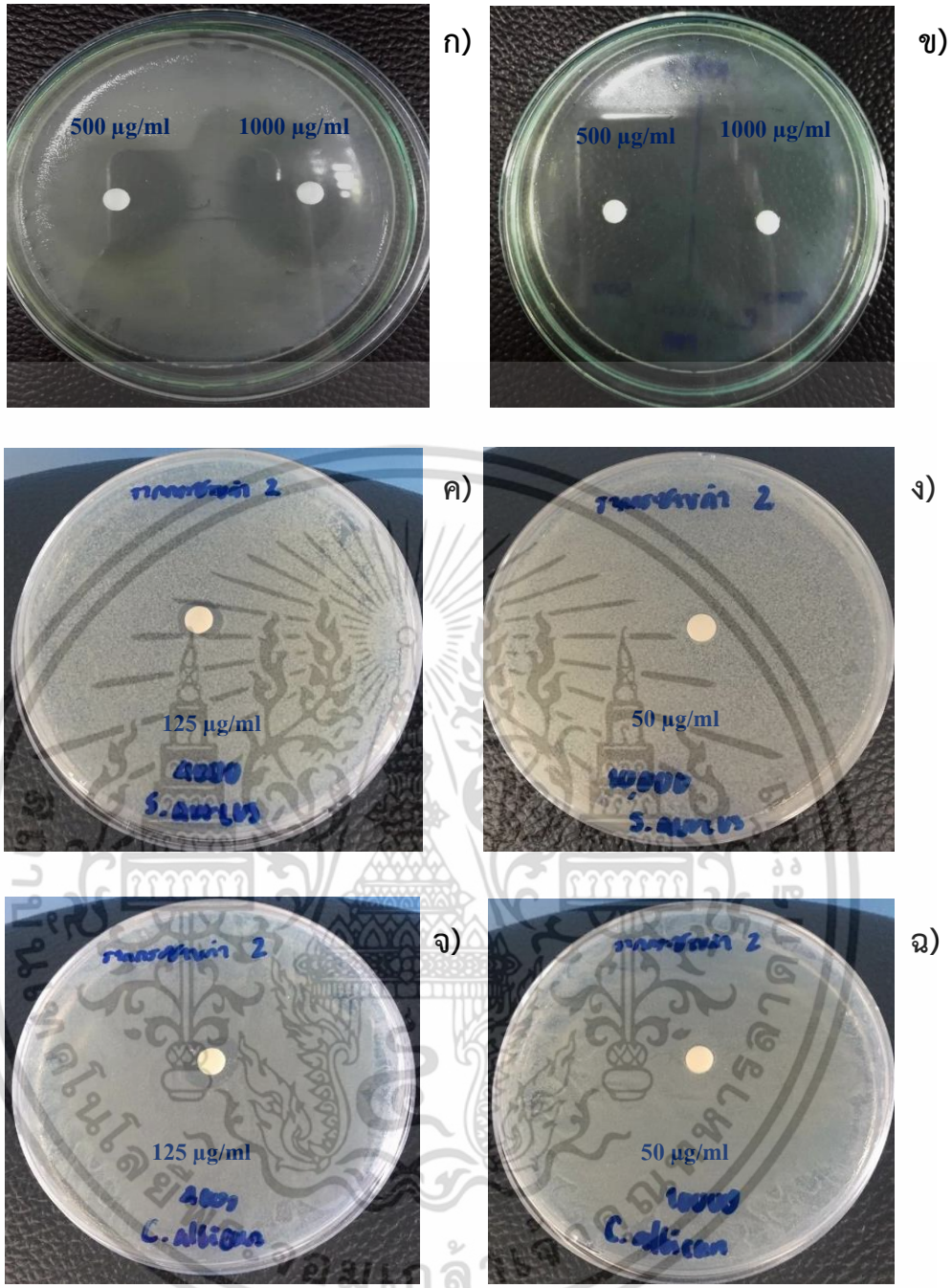
การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อทดสอบจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยหลังจากทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นและจัดกลุ่มของเชื้อเอนโดไฟติกได้เป็น 12 กลุ่ม โดยมีตัวแทนของแต่ละกลุ่ม คือ KPR2, KPR66, KPT75, KPT39, KPT48, KPT8, ZMR1, ZMR11, ZMR9, ZMRh12, ZMRh2 และ ZMRh25 จากนั้นจึงนำเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทข้างต้นมาสกัดสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย Ethyl acetate และทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Agar disc diffusion จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากรากของรากกระชายดำ ไอโซเลทที่ KPR2 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 125 µg/ml แสดงดังตารางที่ 4.15 และ รูปที่ 4.25

ตารางที่ 4.15 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบของกระชายดำไอโซเลท KPR2

ความเข้มข้น (µg/ml)	บริเวณที่เกิดการยับยั้งหรือฆ่า (มม.)						
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
1000	-	-	-	31	-	-	33
500	-	-	-	23	-	-	27
125	-	-	-	6	-	-	11
50	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - ไม่เกิดการยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.25 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบไอโซเลทที่ KPR2 ที่ความเข้มข้น 1000 และ 500 µg/ml ก) เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ข) เชื้อ *Candida albicans* ATCC 10231 ที่ความเข้มข้น 125 และ 50 µg/ml ค) และ ง) เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ที่ความเข้มข้น 125 และ 50 µg/ml จ) และ ฉ) เชื้อ *Candida albicans* ATCC 10231

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

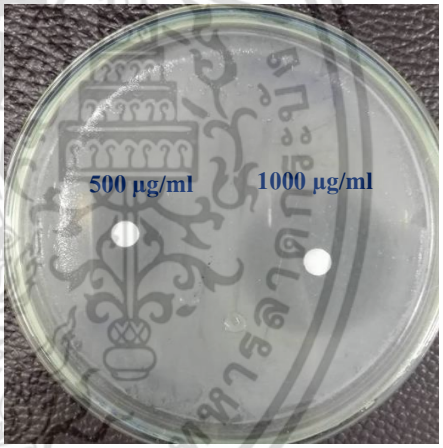
ส่วนสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากรากกระชายดำ ไอโซเลท ที่ KPT39 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 500 µg/ml และเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC25923และ *Candida albicans* ATCC 10231 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 125 µg/ml แสดงดังตารางที่ 4.16 และ รูปที่ 4.26

ตารางที่ 4.16 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบของกระชายดำไอโซเลท KPR39

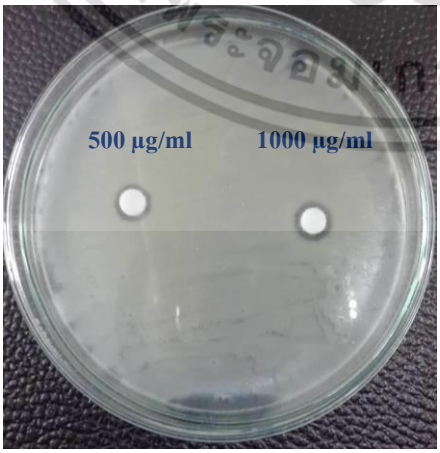
ความเข้มข้น (µg/ml)	บริเวณที่เกิดการยับยั้งหรือฆ่า (มม.)						
	E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
1000	-	-	15	27	-	9	31
500	-	-	9	19	-	6	21
125	-	-	-	9	-	-	13
50	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - ไม่เกิดการยับยั้ง

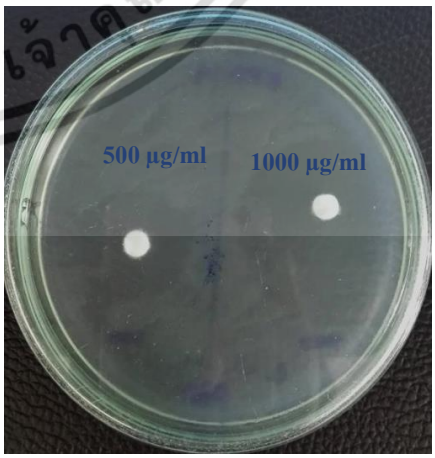
ก)



ข)

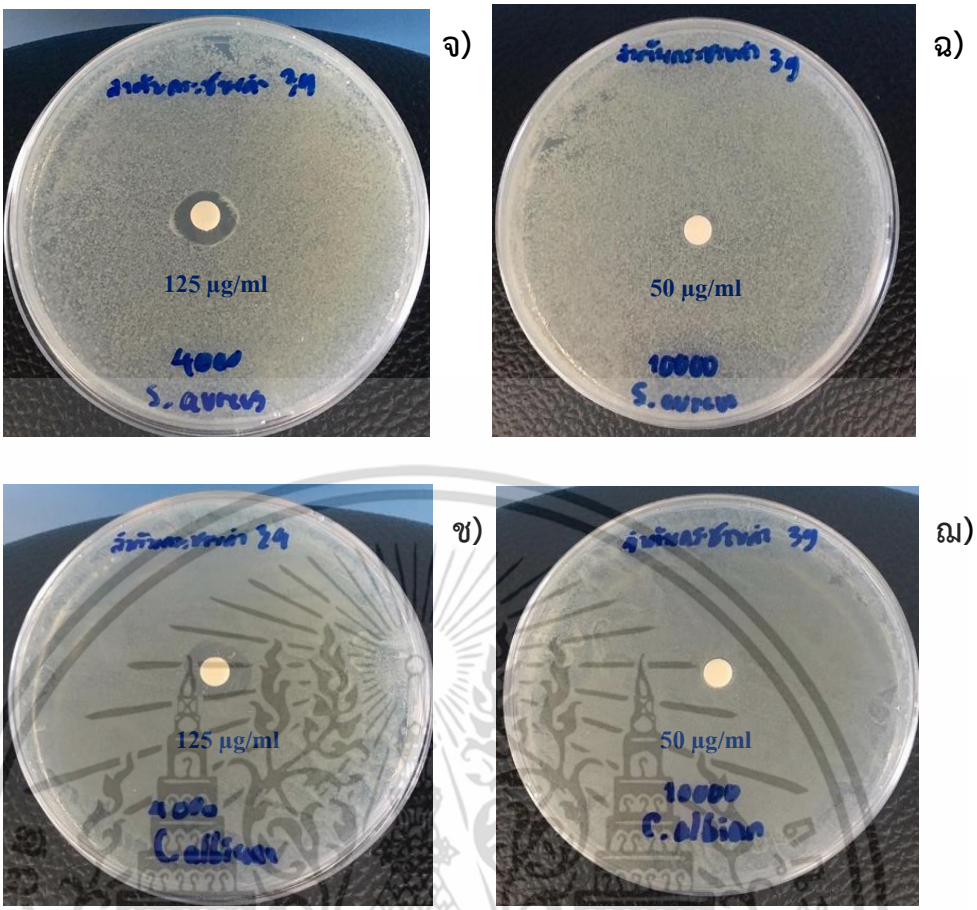


ค)



ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.26 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบไอโซเลทที่ KPT39 ที่ความเข้มข้น 1000 และ 500 µg/ml ก) เชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 25923 ข) เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ค) เชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ง) เชื้อ *Candida albicans* ATCC 10231 ที่ความเข้มข้น 125 และ 50 µg/ml จ) และ ฉ) เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ที่ความเข้มข้น 125 และ 50 µg/ml ช) และ ฌ) เชื้อ *Candida albicans* ATCC 10231

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อทดสอบทั้ง 7 ชนิด สรุปได้ว่า จากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจำนวน 12 ไอโซเลท (จาก 12 กลุ่ม) มีเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเพียง 2 ไอโซเลท เท่านั้น ที่มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ ไอโซเลทที่ KPR2 (ตัวแทนกลุ่มที่ 1) และ ไอโซเลทที่ KPT39 (ตัวแทนกลุ่มที่ 4) ที่ได้กล่าวข้างต้น และดังแสดงในตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบโดยวิธี Agar disc diffusion

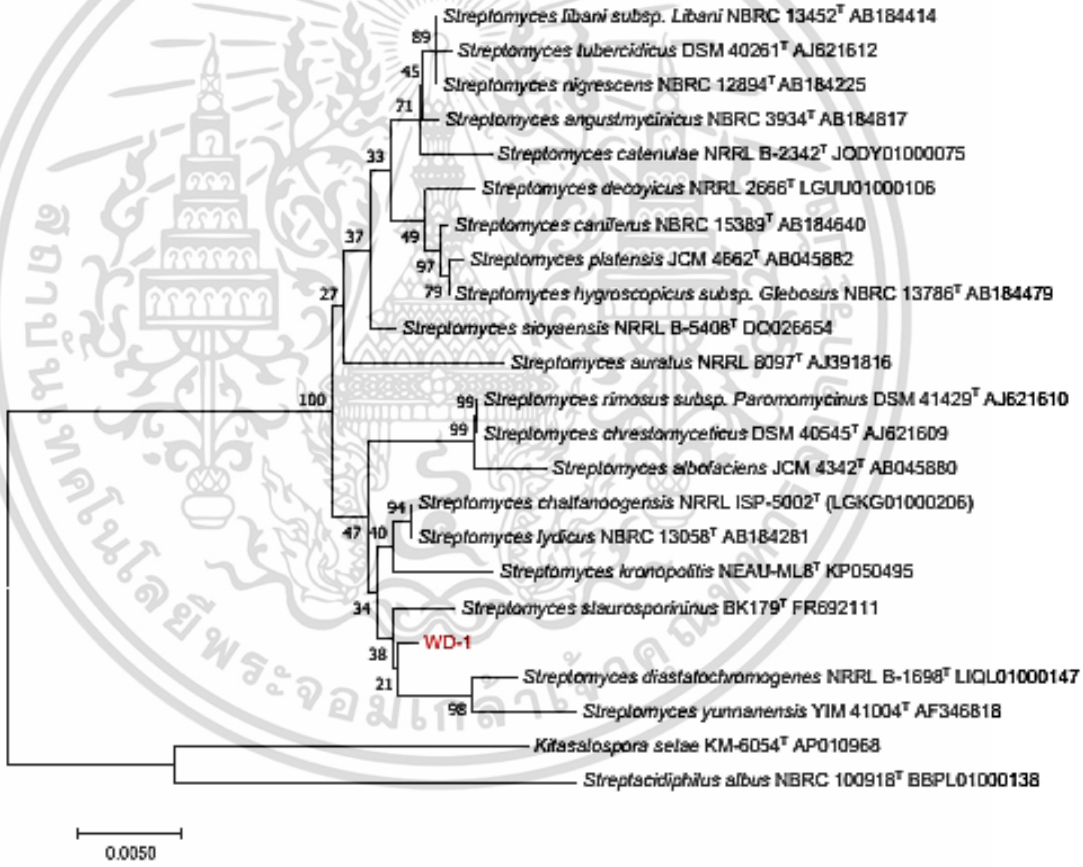
กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	**บริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มม.)**						
		E. coli	*P. aeruginosa*	*M. luteus*	*S. aureus*	MRSA	*B. subtilis*	*C. albicans*
1	KPR2	-	-	-	+	-	-	+
2	KPR66	-	-	-	-	-	-	-
3	KPT75	-	-	-	-	-	-	-
4	KPT39	-	-	+	+	-	+	+
5	KPT48	-	-	-	-	-	-	-
6	KPT8	-	-	-	-	-	-	-
7	ZMR1	-	-	-	-	-	-	-
8	ZMR11	-	-	-	-	-	-	-
9	ZMR9	-	-	-	-	-	-	-
10	ZMRh12	-	-	-	-	-	-	-
11	ZMRh2	-	-	-	-	-	-	-
12	ZMRh25	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: + คือ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ, - คือ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

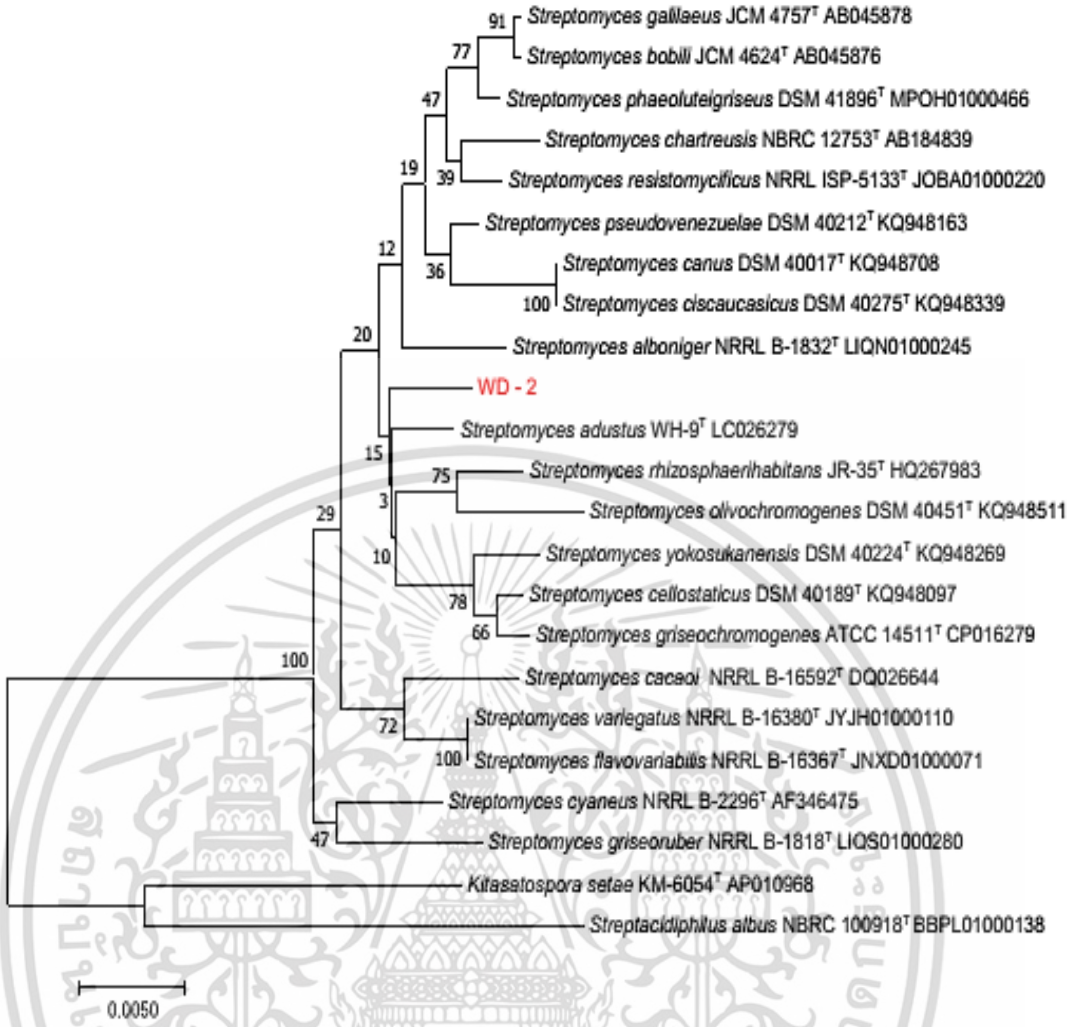
4.5 ผลการศึกษาลักษณะทาง Genotype ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทโดยการศึกษาลำดับเบสของยีน 16s rRNA

ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุถึงสกุลและชนิดของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากพืชสมุนไพรยี่หร่าและฟ้าทะลายโจร ซึ่งเลือกเฉพาะที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเชื้อทดสอบในหัวข้อ 4.4 ในการทดลองนี้ได้ทำการสกัดดีเอนเอของเชื้อแอคติโดนมัยสีทไอโซเลทที่ KPT39 และไอโซเลทที่ KPR2 ด้วย Himedia kit (Himedia Technology Co.,Ltd) จากนั้นจึงทำ PCR และหาลำดับเบสของยีนส์ 16s rRNA ทำการบลาสต์ และจัดกลุ่มวิวัฒนาการ Phylogenetic tree ผลการทดลองพบว่า เชื้อไอโซเลทที่ KPT39 (WD-1) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces diasfatochromogenes* เท่ากับ 99.31% แสดงดังรูปที่ 4.27 และพบว่า เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลทที่ KPR2 (WD-2) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces adustus* เท่ากับ 99.31% แสดงดังรูปที่ 4.28



รูปที่ 4.27 Phylogenetic tree แสดงสายวิวัฒนาการของไอโซเลท KPT39 (WD-1) โดยใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.28 Phylogenetic tree แสดงสายวิวัฒนาการของไอโซเลท KPR2 (WD-2) โดยใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

จากการทดลองนี้ เนื่องจากต้องการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น ราก ลำต้น ใบ และเหง้า ของไพล และกระชายดำ จึงได้ทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นส่วนพืชด้วยวิธี Surface Sterilized โดยใช้ 1% Sodium hypochloride ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Disinfectant (ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์) โดยไม่ทำลายเนื้อเยื่อพืช ถ้าใช้ในระยะเวลาที่เหมาะสมต่อชิ้นส่วนนั้นๆ (อานนท์, 2556 และ Qiu, 2007)

หลังจากนั้นจึงทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น (Primary screening) และทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทต่อการเจริญของเชื้อทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่า ผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น และ ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบนั้นไม่สัมพันธ์กัน เนื่องจากทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทใช้สาร Ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย ซึ่ง Ethyl acetate นั้นเป็นสารซึ่งมีคุณสมบัติเป็นขั้วกลางที่มีประสิทธิภาพในการดึงสารสำคัญส่วนใหญ่ออกจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้ตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติเป็นขั้วต่ำและขั้วสูง (ธีรวุฒิ, 2558) นอกจากนี้ยังพบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทต่อการเจริญของเชื้อทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusionนั้น สารสกัดหยาบของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากกระชายดำไอโซเลทที่ KPT39 สามารถยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ และกระชายดำไอโซเลทที่ KPR2 สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ สุขใจ (2555) ซึ่งพบว่า สารสกัดหยาบของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชวงศ์ขิงนั้นสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* ได้ดีเช่นกัน

จากผลการศึกษาลักษณะทางอนุกรมทางวิธานของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทนั้น ผลการทดลองพบว่า เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัสีทไอโซเลทที่ KPT39 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces diasfatochromogenes* และเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัสีทไอโซเลทที่ KPR2 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces adustus* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สุจรรยา (2556) ที่ได้ทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชวงศ์ขิงและพบว่า เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมันสีทส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* sp. เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากไพลและกระชายดำในครั้งนี้ ได้เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีททั้งสิ้นจำนวน 101 ไอโซเลท ซึ่งพบในไพลและกระชายดำ 46 และ 55 ไอโซเลท ตามลำดับ จากนั้นจึงนำเชื้อเอนโดไฟติกแอคติกแอคติโนมัยสีททั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นด้วยวิธี primary screening กับเชื้อทดสอบ 7 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* , *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่า ทั้ง 101 ไอโซเลท ที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อทดสอบเบื้องต้น จากนั้นจึงทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น และทำการจัดกลุ่มของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งสิ้น 12 กลุ่ม ซึ่งมีตัวแทนกลุ่ม ได้แก่ KPR2, KPR66, KPT75, KPT39, KPT48 และ KPT8 เป็นเชื้อซึ่งคัดแยกได้จากกระชายดำ และ ZMR1, ZMR11, ZMR9, ZMRh12, ZMRh2 และ ZMRh25 เป็นเชื้อซึ่งคัดแยกได้จากไพล จากนั้นจึงนำตัวแทนทั้ง 12 ไอโซเลท มาทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบกับเชื้อทดสอบทั้ง 7 ชนิด ด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบของไอโซเลทที่ KPT39 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 500 µg/ml และยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 125 µg/ml และ สารสกัดหยาบของไอโซเลทที่ KPR2 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 125 µg/ml และหลังจากนำเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทมาทำการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานโดยศึกษาลำเบสของยีน 16S rRNA ทำ phylogenetic tree พบว่า KPT39 (WD-1) มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces diasfatochromogenes* ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.31% และ KPR2 (WD-2) มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces adustus* ที่ระดับความคล้ายคลึง 99.31%

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์จากสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเพียง 12 ไอโซเลท ซึ่งเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มจากเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งหมด 101 ไอโซเลท และพบเพียงแค่ 2 ไอโซเลท ที่มีฤทธิ์ยังยั้งเชื้อทดสอบ ดังนั้น ยังเหลืออีกจำนวนทั้งสิ้น 89 ไอโซเลท ที่ควรจะนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบด้วย Ethyl acetate, สัณฐานวิทยา และอนุกรมวิธาน เพื่อดูถึงฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบต่อเชื้อทดสอบทั้ง 7 ชนิด และสามารถบ่งชี้ถึงความหลากหลายของสกุลและชนิดของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่พบในไพลและกระชายดำได้ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กีรติ พิเชียรสุนทร, กชกร จีรวงส์. คู่มือเภสัชกรรมแผนไทย เล่ม 2 เครื่องยาพฤกษวัตถุ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนัก พิมพ์อมรินทร์. 2547. หน้า 227-31.

คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. บัญชียาจากสมุนไพร พ.ศ. 2549 ตามประการคณะกรรมการแห่งชาติด้านยา (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2549 เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติพ.ศ. 2547 (ฉบับที่ 4). กรุงเทพ ฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตร แห่งประเทศไทย. 2549. หน้า 66-71

ธีรวุฒิ สมดี, ชนิษฐาน ตั้งชีวเจริญ และสุจรรยา ทางกลาง. (2545). การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยสีทจากพืชที่สามารถยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ปิยุกฤษฎ์ เทพปาน. (2541). การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยสีทจากพืชที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

รัชนี มณีสุวรรณ. (2541). การคัดเลือกจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยสีทจากพืชที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุบัณฑิต วิสุทธิพิทักษ์กุล, ยุวดี อึ้งวิเชียร, อิทธิฤทธิ์ อึ้งวิเชียร, อานนท์ คล่องการงาน. รายงานการวิจัย “การวิจัยวิธี การเขตกรรมเพื่อพัฒนาผลผลิตและคุณภาพของไพล” เสนอ ต่อ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 2540; 49 หน้า

สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน กระทรวง สาธารณสุข. ยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน. กรุงเทพ ฯ : โรงพิมพ์องค์การทหารผ่านศึก. หน้า 120-1.

แสงจันทร์ นนทโส. (2537). การแยกเชื้อสเตร็บโตมัยสีทจากพืช. มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Blanco G, Brian P, Pereda A, *et al*. Hybridization and DNA sequence analyses suggest an early evolutionary divergence of related biosynthetic gene sets encoding polyketide antibiotics and spore pigments in *Streptomyces* spp. [J]. *Gene*, 1993, 130(1): 107-116.

Castillo UF, Browne L, Strobel G, *et al*. Biologically active endophytic streptomycetes from *Nothofagus* spp. and other plants in Patagonia [J]. *Microb Ecol*, 2007, 53(1):12-19.

Dahiya SF, Simmons L, Kim JH, *et al*. Metagenomic approaches to natural products from free-living and symbiotic organisms [J]. *Nat Prod Rep*, 2009, 26(11):1488-1503.

David H., Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. *4* [M]. Williams & Wilkins Baltimore, 1989: 2452-2492.

Habrah G, Daisy B, Castillo U, *et al*. Natural products from endophytic microorganisms [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(2): 257-268.

Horst W, Zhang Z. *Populus adenopoda*[M]// Enzyklopädie der Holzgewächse: Handbuch und Atlas der Dendrologie. Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014.

Janso JE, Carter GT. Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(13): 4377-4386.

Li J, Zhao GZ, Chen HH, *et al*. Antitumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from pharmaceutical plants in rainforest [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2008, 47(6): 574-580.

Lorian K, Zhang M, Wu Y, Yang X. Studies on chemical constituents and antibacterial effect of flavonoids in *Chenopodium album* L [J]. *J Northeast Normal Univ*, 2011, 43(1):93-96.

Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, *et al*. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2001, 98(21): 12215-12220.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Panthong A, Kanjanapothi D, Niwatomanum V, Tuntiwachwuttikul T, Ruetrakul V. Anti-inflammatory activities of compounds isolated from *Zingiber cassumunar*. Planta Med. 1990;56:655.

Qiu J, Li C, Miao J, Zhang C, Bao S, Liu S. Research of Chemical Composition of *Dioscorea bulbifera* L [J]. *Acta Chin Medi Pharmacolo*, 2013, 41(5):14-16.

Strobel G. Endophytes as sources of bioactive products [J]. *Microbes Infect*, 2003, 5(6): 535-544.

Verma VC, Gond SK, Kumar A, *et al*. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity [J]. *Microb Ecol*, 2009, **57**(4): 749-756.

Wilson L, Lu CH, Qian XM, *et al*. Diversities within genotypes, bioactivity and biosynthetic genes of endophytic actinomycetes isolated from three pharmaceutical plants [J]. *Curr Microbiol*, 2009, 59(4): 475-482.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหาร Starch Casein Agar

1. Sodium caseinate	1	กรัม
2. Soluble starch	10	กรัม
3. K_2HPO_4	0.5	กรัม
4. Agar	15	กรัม
5. Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนสารเคมีละลายเข้ากัน ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 – 7.5 เทใส่ขวดปิดฝานำไปนึ่งค่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหาร Yeast Extract-Malt Extract Agar (ISP2)

1. Yeast extract (BD-Difco)	4	กรัม
2. Malt extract (BD-Difco)	10	กรัม
3. Glucose	4	กรัม
4. Agar	20	กรัม
5. Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนสารเคมีละลายเข้ากัน ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 – 7.5 เทใส่ขวดปิดฝานำไปนึ่งค่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 อาหาร Mueller Hinton Agar (MHA)

1. Beef extract power	2	กรัม
2. Acid Digest of Casein	17.5	กรัม
3. Soluble starch	1.5	กรัม
4. Agar	15	กรัม
5. Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนสารเคมีละลายเข้ากัน ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 – 7.5 เทใส่ขวดปิดฝานำไปนึ่งค่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 อาหาร Tryptic Soy Agar (TSA)

1. Pancreatic Digest of Casien	15	กรัม
2. Enzymatic Digest of Soybean Meal	5	กรัม
3. Sodiume Cloride	5	กรัม
4. Agar	15	กรัม
5. Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนสารเคมีละลายเข้ากัน ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 – 7.5 เทใส่ขวดปิดฝานำไปนึ่งค่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

1. Potato	200	กรัม
2. Dextose	20	กรัม
3. Agar	17	กรัม
5. Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนสารเคมีละลายเข้ากัน ปรับพีเอชให้เป็น 5.0 – 6.0 เทใส่ขวดปิดฝานำไปนึ่งค่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ลักษณะโคโลนี รูปร่างของสปอร์ และการทดสอบฤทธิ์ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข1 ตารางแสดงไอโซเลทของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทของไพลและกระชายดำ

พืชที่นำมาคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท		**ไอโซเลตของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท**	
พืช	ส่วนของพืช	รหัสไอโซเลท	รวม
กระชายดำ	ราก	KPR2, KPR3, KPR4, KPR5, KPR6, KPR11, KPR12, KPR13, KPR14, KPR17, KPR18, KPR21, KPR23, KPR25, KPR27, KPR31, KPR33, KPR34, KPR35, KPR42, KPR43, KPR44, KPR49, KPR53, KPR55, KPR61, KPR62, KPR64, KPR65, KPR66, KPR69, KPR70, KPR71	34
	ลำต้น	KPT5, KPT6, KPT8, KPT9, KPT13, KPT15, KPT16, KPT30, KPT31, KPT37, KPT39, KPT41, KPT43, KPT44, KPT46, KPT47, KPT48, KPT64, KPT64, KPT69, KPT71, KPT75	21
		รวม	55
ไพล	ราก	ZMR1, ZMR2, ZMR3, ZMR4, ZMR5, ZMR6, ZMR7, ZMR8, ZMR9, ZMR10, ZMR11, ZMR12, ZMR13, ZMR14, ZMR15, ZMR16, ZMR17, ZMR18, ZMR19, ZMR20, ZMR21, ZMR22, ZMR23	23
	เหง้า	ZMRh1, ZMRh2, ZMRh3, ZMRh4, ZMRh5, ZMRh6, ZMRh7, ZMRh8, ZMRh10, ZMRh11, ZMRh12, ZMRh15, ZMRh17, ZMRh18, ZMRh19, ZMRh20, ZMRh23, ZMRh24, ZMRh25, ZMRh26, ZMRh31, ZMRh32, ZMRh34	23
		รวม	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข2 ตารางแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทของกระชายดำ

รหัสเชื้อ	สีเส้นใยอาหาร	สีเส้นใยอากาศ	ลักษณะสปอร์
KPR2	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR3	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR4	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR5	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR6	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR11	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR12	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR13	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR14	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR17	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR18	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR21	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR23	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR25	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR27	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR30	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR31	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR33	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR34	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR35	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR42	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR43	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR44	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR49	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR53	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR55	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR61	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR62	Light_Brownish_Gray	Dark_Grayish_Brown	แบบเกลียว
KPR64	Moderate_Orange_Yellow	Pale_Yellow	แบบเส้นตรง
KPR65	Moderate_Orange_Yellow	Pale_Yellow	แบบเส้นตรง
KPR66	Moderate_Orange_Yellow	Pale_Yellow	แบบเส้นตรง
KPR69	Moderate_Orange_Yellow	Pale_Yellow	แบบเส้นตรง
KPR70	Moderate_Orange_Yellow	Pale_Yellow	แบบเส้นตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข2 (ต่อ)

KPR71	Moderate_Orange_Yellow	Pale_Yellow	แบบเส้นตรง
KPT5	Brilliant_Orange	Yellowish_Gray	แบบเส้นตรง
KPT6	Brilliant_Orange	Yellowish_Gray	แบบเส้นตรง
KPT8	Brilliant_Orange	Yellowish_Gray	แบบเส้นตรง
KPT9	Light_Grayish_Yellowish_Brown	Dark_Grayish_Yellowish_Brown	แบบเกลียว
KPT13	Brilliant_Orange	Yellowish_Gray	แบบเส้นตรง
KPT15	Brilliant_Orange	Yellowish_Gray	แบบเส้นตรง
KPT16	Brilliant_Orange	Yellowish_Gray	แบบเส้นตรง
KPT30	Brilliant_Orange	Yellowish_Gray	แบบเส้นตรง
KPT31	Brilliant_Orange	Yellowish_Gray	แบบเส้นตรง
KPT37	Light_Grayish_Yellowish_Brown	Dark_Grayish_Yellowish_Brown	แบบเกลียว
KPT39	Light_Grayish_Yellowish_Brown	Dark_Grayish_Yellowish_Brown	แบบเกลียว
KPT41	Light_Grayish_Yellowish_Brown	Dark_Grayish_Yellowish_Brown	แบบเกลียว
KPT43	Light_Grayish_Yellowish_Brown	Dark_Grayish_Yellowish_Brown	แบบเกลียว
KPT44	Light_Grayish_Yellowish_Brown	Dark_Grayish_Yellowish_Brown	แบบเกลียว
KPT46	Light_Orange	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
KPT47	Light_Grayish_Yellowish_Brown	Dark_Grayish_Yellowish_Brown	แบบเกลียว
KPT48	Light_Orange	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
KPT64	Light_Grayish_Yellowish_Brown	Dark_Grayish_Yellowish_Brown	แบบเกลียว
KPT69	Light_Grayish_Yellowish_Brown	Dark_Grayish_Yellowish_Brown	แบบเกลียว
KPT71	Light_Orange	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
KPT75	Moderate_Orange_Yellow	Pale_Blue	แบบเกลียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข3 ตารางแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทของไพล

รหัสเชื้อ	สีเส้นใยอาหาร	สีเส้นใยอากาศ	ลักษณะสปอร์
ZMR1	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR2	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR3	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR4	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR5	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR6	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR7	Yellowish_Gray	Yellowish_White	แบบเกลียว
ZMR8	Yellowish_Gray	Yellowish_White	แบบเกลียว
ZMR9	Yellowish_Gray	Yellowish_White	แบบเกลียว
ZMR10	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR11	Light_Orange_Yellow	Yellowish_Gray	แบบเกลียว
ZMR12	Light_Orange_Yellow	Yellowish_Gray	แบบเกลียว
ZMR13	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR14	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR15	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR16	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR17	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR18	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR19	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR20	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR21	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR22	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMR23	Light_Orange_Yellow	Yellowish_White	แบบเส้นตรง
ZMRh1	Light_Yellowish_Brown	Light_Brownish_Gray	แบบเกลียว
ZMRh2	Light_Yellowish_Brown	Light_Brownish_Gray	แบบเกลียว
ZMRh3	Light_Yellowish_Brown	Light_Brownish_Gray	แบบเกลียว
ZMRh4	Strong_Yellowish_Pink	Light_Gray	แบบเส้นตรง
ZMRh5	Light_Yellowish_Brown	Light_Brownish_Gray	แบบเกลียว
ZMRh6	Light_Yellowish_Brown	Light_Brownish_Gray	แบบเกลียว
ZMRh7	Strong_Yellowish_Pink	Light_Gray	แบบเส้นตรง
ZMRh8	Strong_Yellowish_Pink	Light_Gray	แบบเส้นตรง
ZMRh10	Light_Yellowish_Brown	Light_Brownish_Gray	แบบเกลียว
ZMRh11	Light_Yellowish_Brown	Light_Brownish_Gray	แบบเกลียว

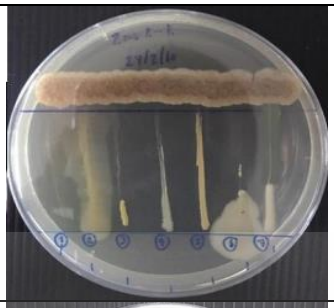
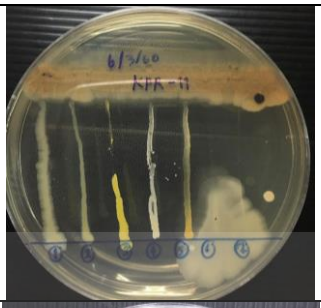
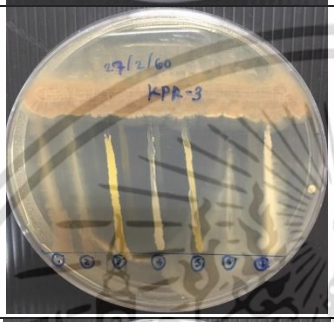
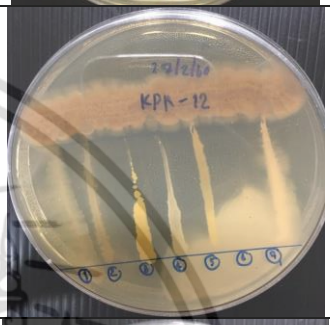
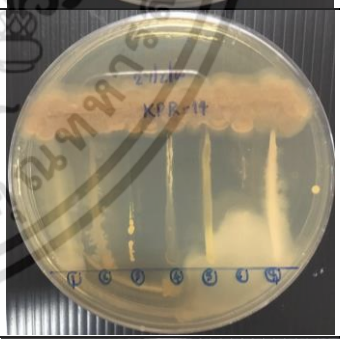
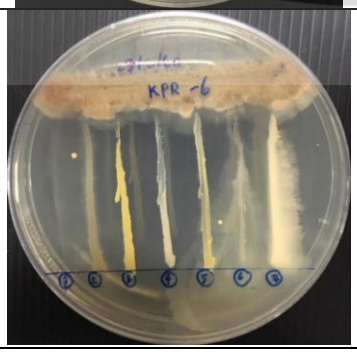
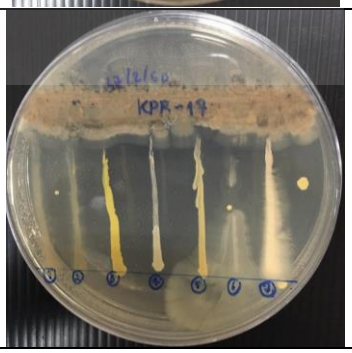
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข3 (ต่อ)

ZMRh12	Light_Orange_Yellow	Medium_Gray	เส้นตรง
ZMRh15	Light_Orange_Yellow	Medium_Gray	เส้นตรง
ZMRh17	Light_Orange_Yellow	Medium_Gray	เส้นตรง
ZMRh18	Light_Orange_Yellow	Medium_Gray	เส้นตรง
ZMRh19	Light_Orange_Yellow	Medium_Gray	เส้นตรง
ZMRh20	Light_Orange_Yellow	Medium_Gray	เส้นตรง
ZMRh23	Strong_Yellowish_Pink	Light_Gray	แบบเส้นตรง
ZMRh24	Strong_Yellowish_Pink	Light_Gray	แบบเส้นตรง
ZMRh25	Strong_Yellowish_Pink	Light_Gray	แบบเส้นตรง
ZMRh26	Strong_Yellowish_Pink	Light_Gray	แบบเส้นตรง
ZMRh31	Strong_Yellowish_Pink	Light_Gray	แบบเส้นตรง
ZMRh32	Strong_Yellowish_Pink	Light_Gray	แบบเส้นตรง
ZMRh34	Strong_Yellowish_Pink	Light_Gray	แบบเส้นตรง

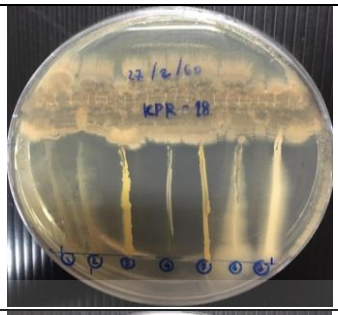
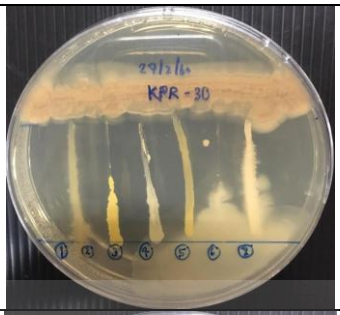
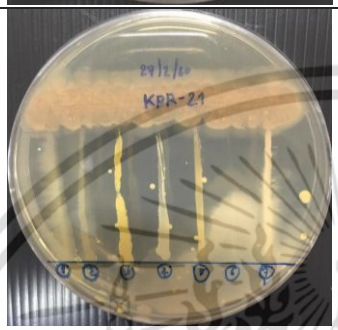
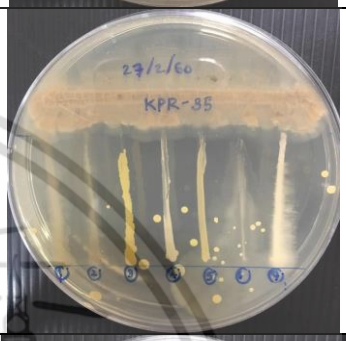
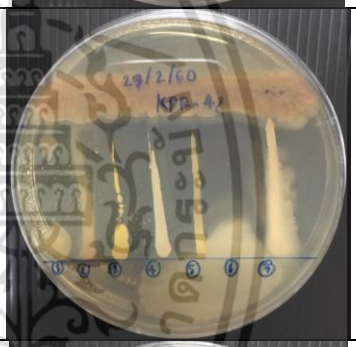
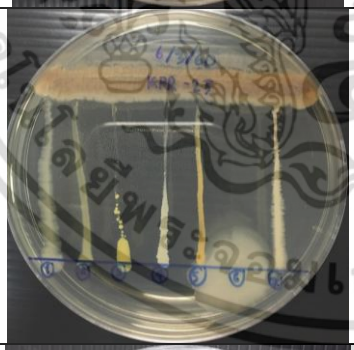
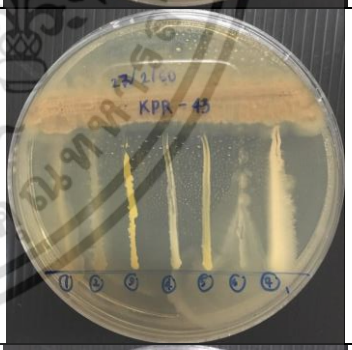
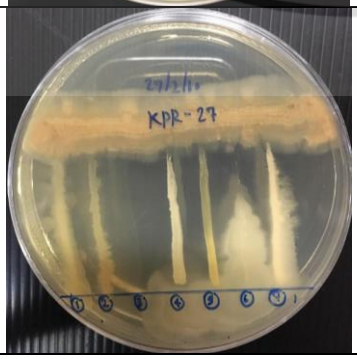
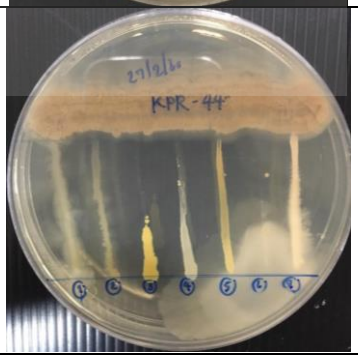
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข4 แสดงผลของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ชนิด ของกระชายดำ

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
KPR2		KPR11	
KPR3		KPR12	
KPR4		KPR13	
KPR5		KPR14	
KPR6		KPR17	

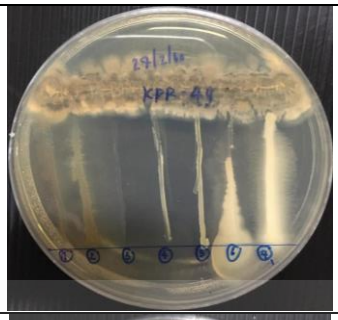
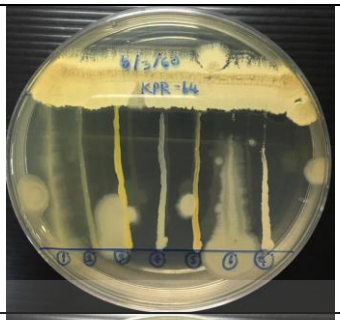
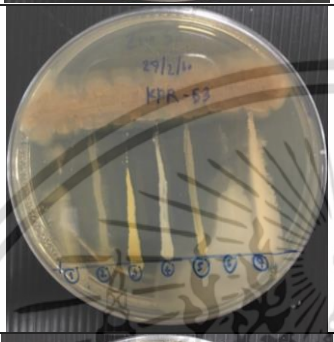
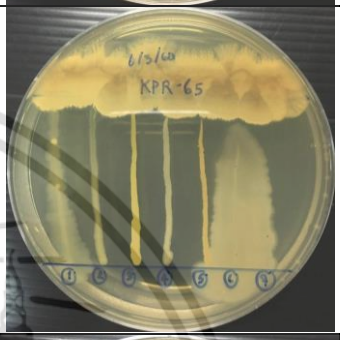
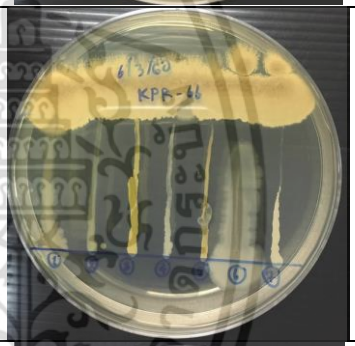
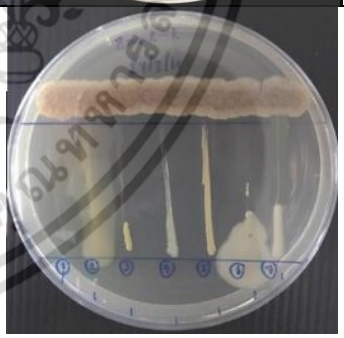
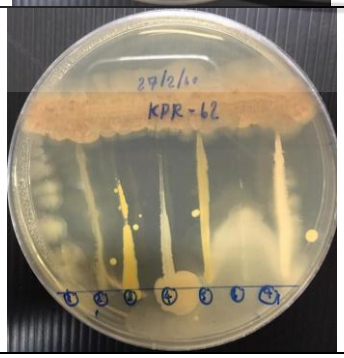
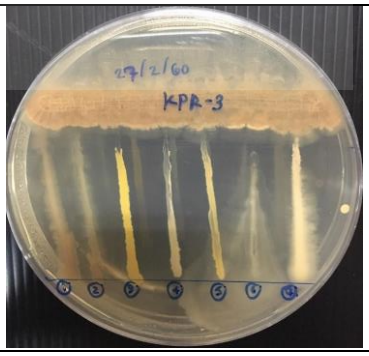
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
KPR18		KPR30	
KPR21		KPR35	
KPR23		KPR42	
KPR25		KPR43	
KPR27		KPR44	

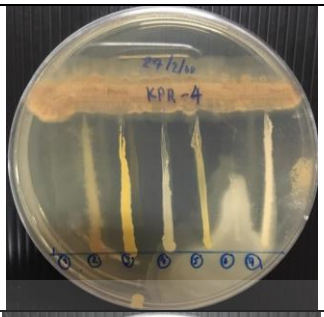
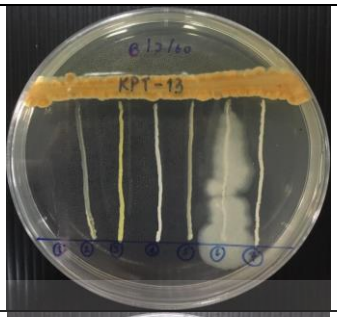
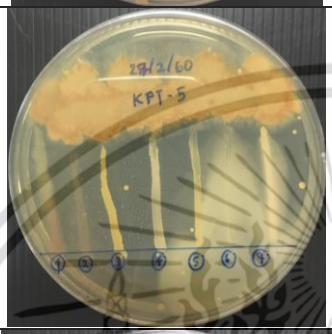
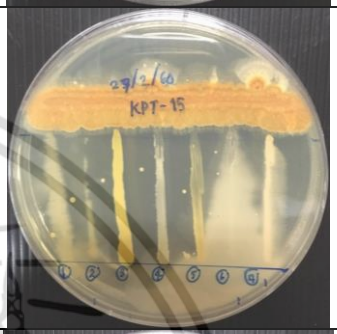
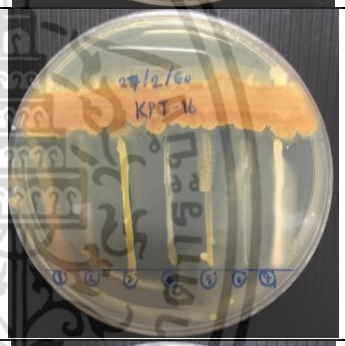
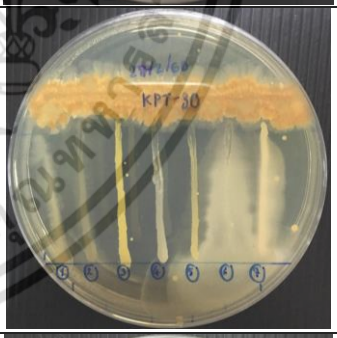
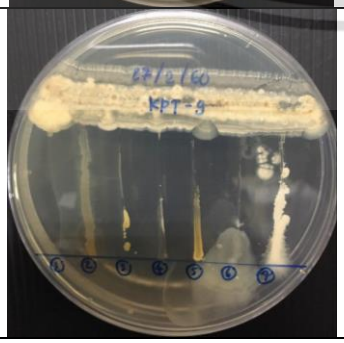
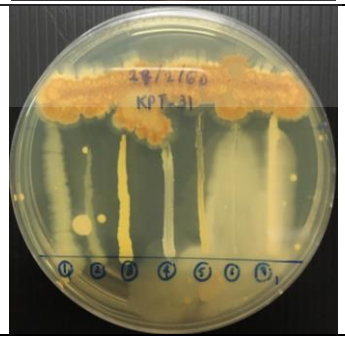
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
KPR48		KPR64	
KPR53		KPR65	
KPR55		KPR66	
KPR61		KPR69	
KPR62		KPR70	

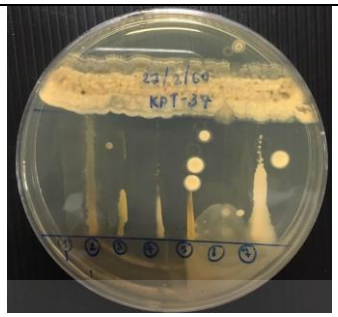
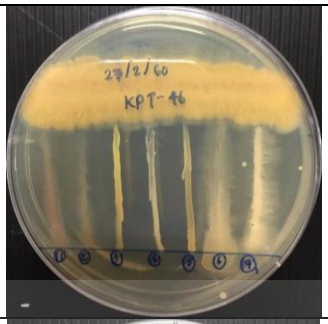
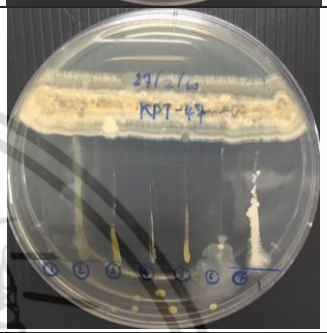
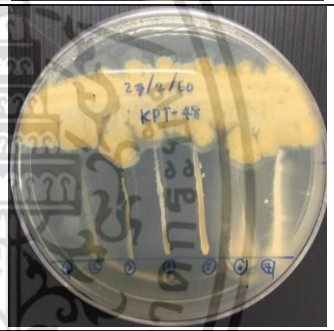
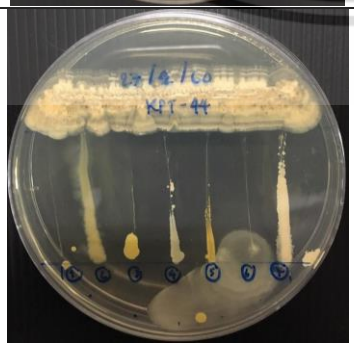
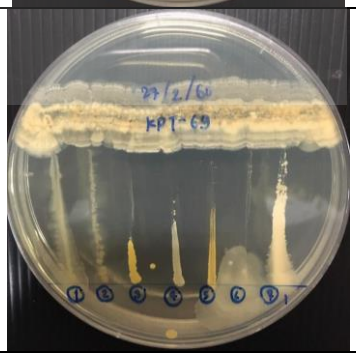
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
KPR71		KPT13	
KPT5		KPT15	
KPT6		KPT16	
KPT8		KPT30	
KPT9		KPT31	

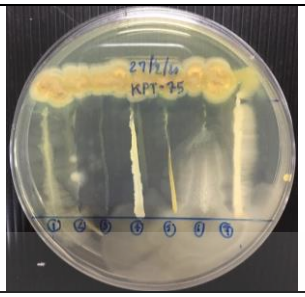
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
KPT37		KPT46	
KPT39		KPT47	
KPT41		KPT48	
KPT43		KPT67	
KPT44		KPT69	

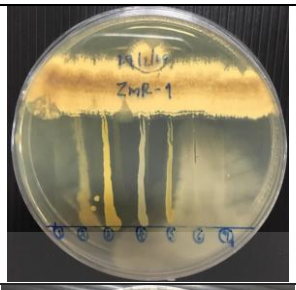
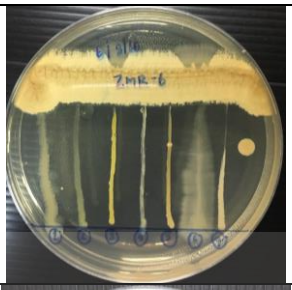
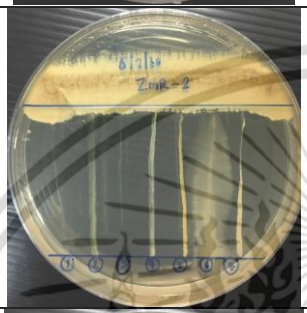
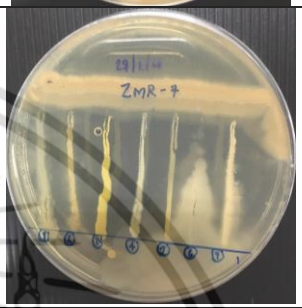
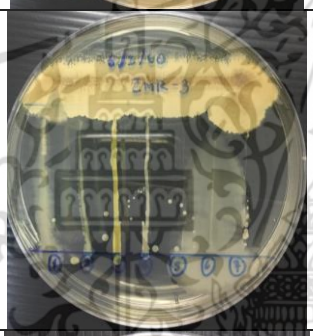
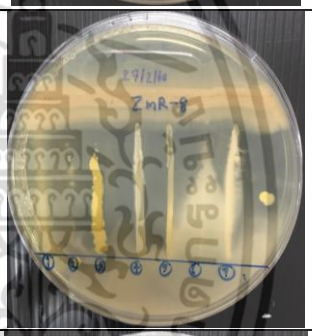
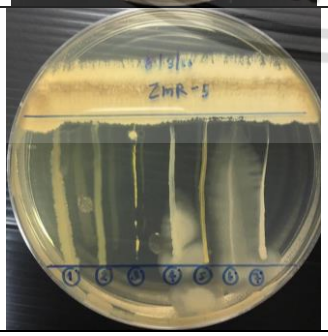
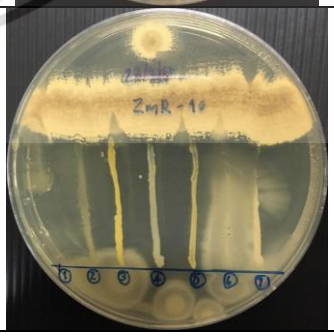
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
KPT75	

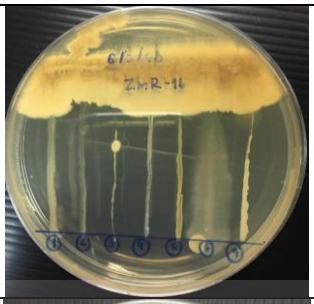
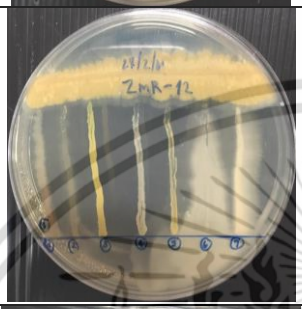
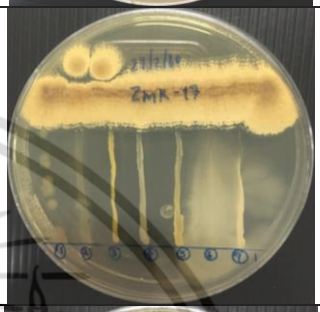
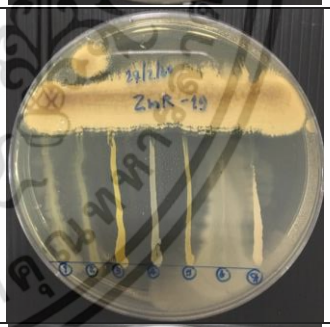
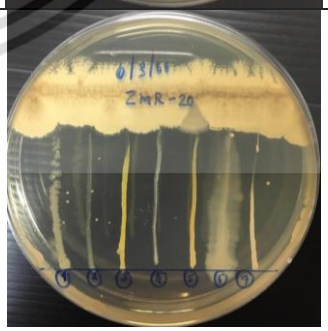
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข5 แสดงผลของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ชนิด ของไพล

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
ZMR1		ZMR6	
ZMR2		ZMR7	
ZMR3		ZMR8	
ZMR4		ZMR9	
ZMR5		ZMR10	

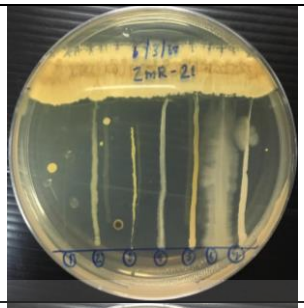
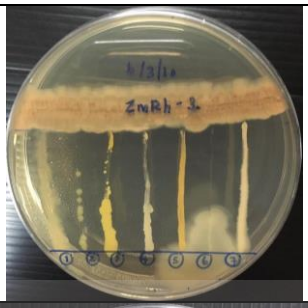
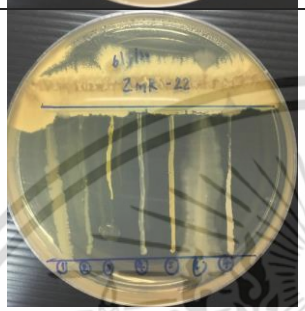
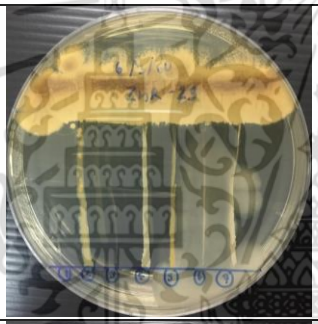
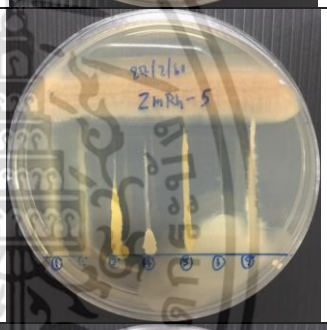
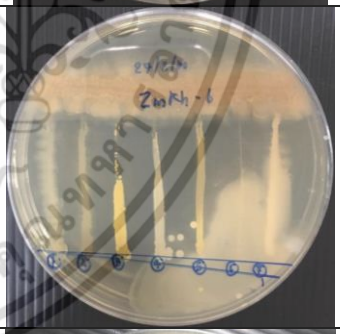
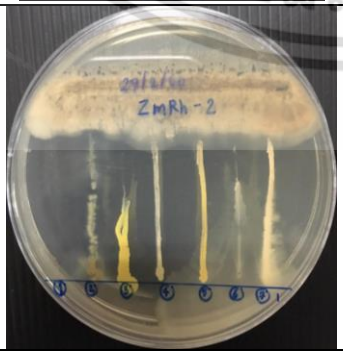
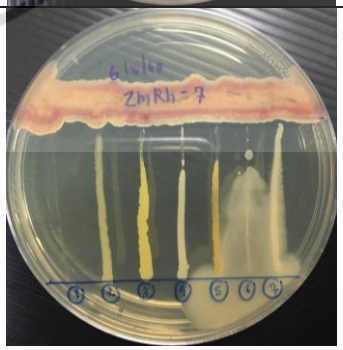
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข5 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
ZMR11		ZMR16	
ZMR12		ZMR17	
ZMR13		ZMR18	
ZMR14		ZMR19	
ZMR15		ZMR20	

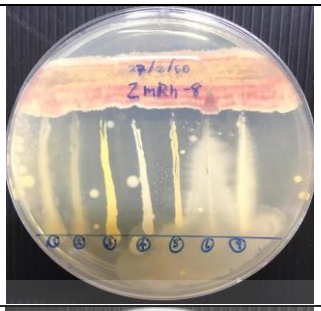
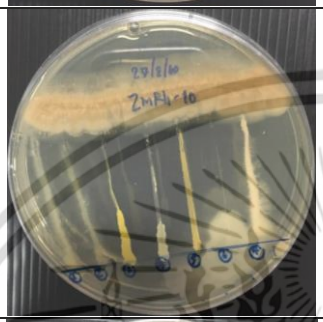
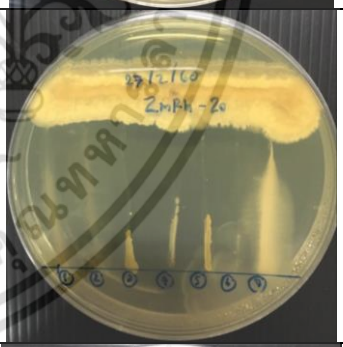
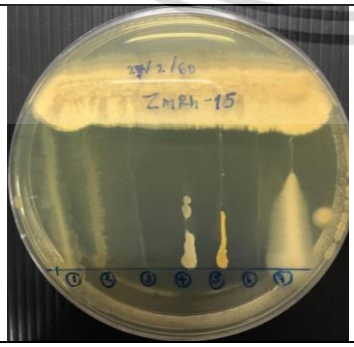
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข5 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
ZMR21		ZMRh3	
ZMR22		ZMRh4	
ZMR23		ZMRh5	
ZMRh1		ZMRh6	
ZMRh2		ZMRh7	

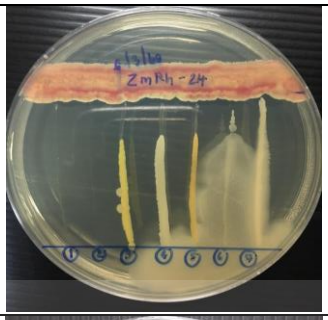
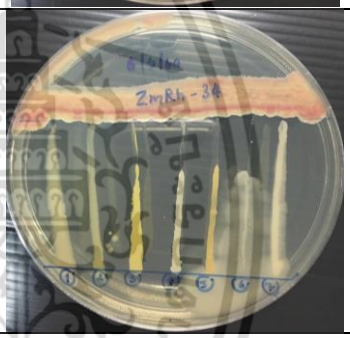
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข5 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
ZMRh8		ZMRh17	
ZMRh10		ZMRh18	
ZMRh11		ZMRh19	
ZMRh12		ZMRh20	
ZMRh15		ZMRh23	

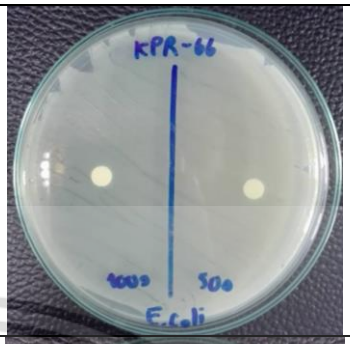
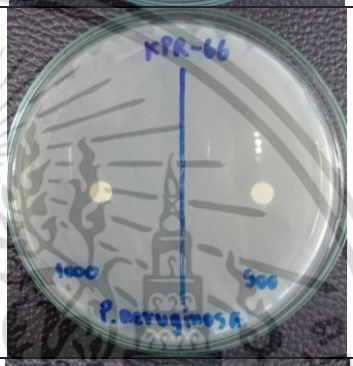
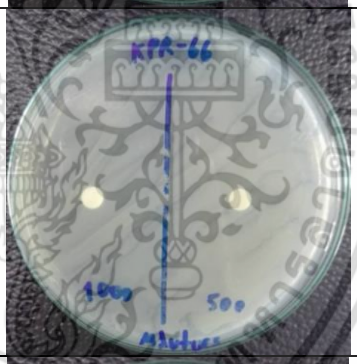
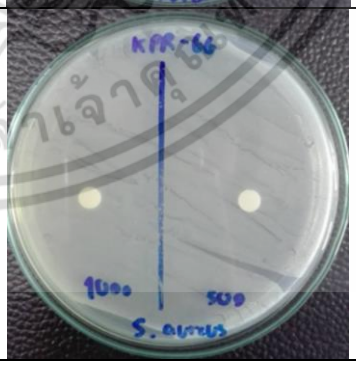
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข5 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
ZMRh24		ZMRh31	
ZMRh25		ZMRh32	
ZMRh26		ZMRh34	

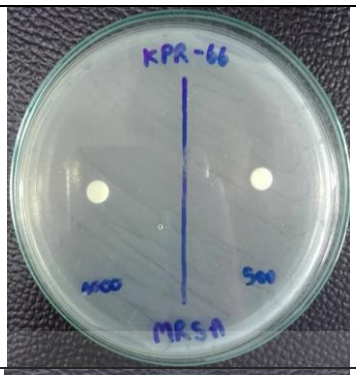
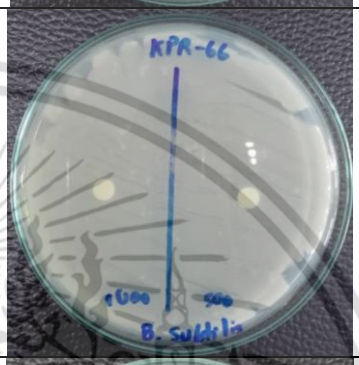
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข6 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ KPR66

รหัสเชื้อ	**เชื้อทดสอบ**	**ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml**
KPR66	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	
	S. aureus	

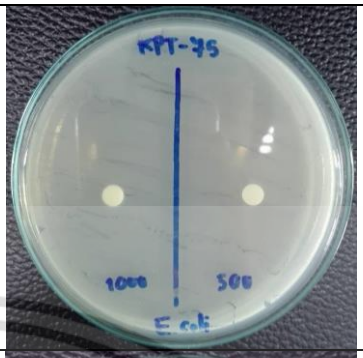
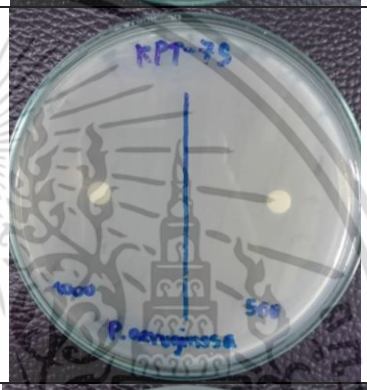
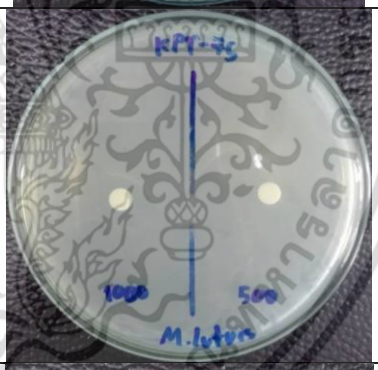
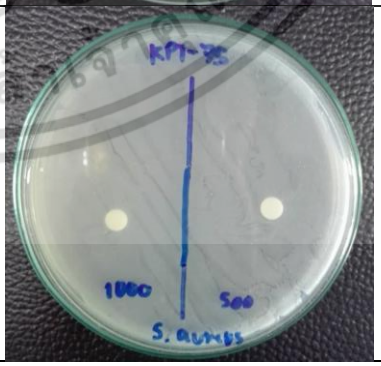
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข6 (ต่อ)

	MRSA			
	B. subtilis			
	C. albicans			

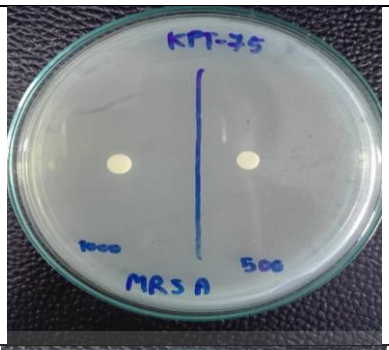
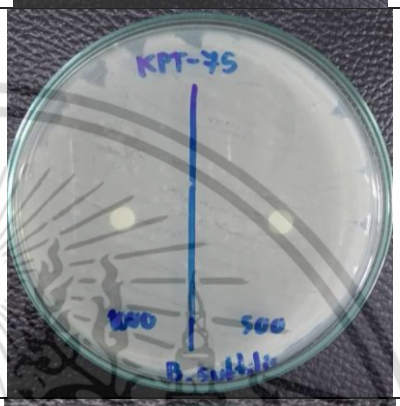
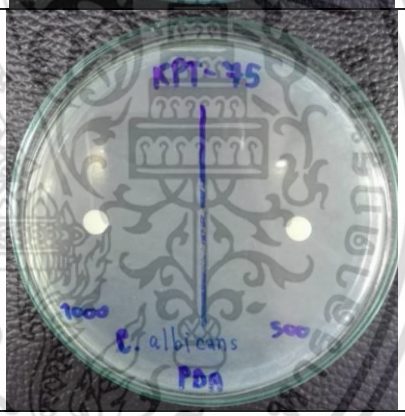
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ KPT75

รหัสเชื้อ	**เชื้อทดสอบ**	**ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml**
KPT75	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	
	S. aureus	

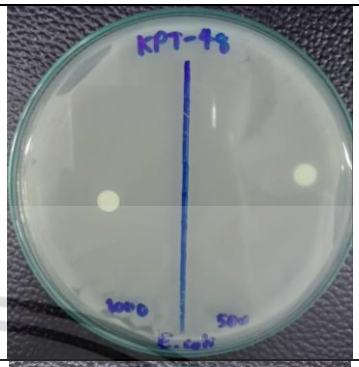
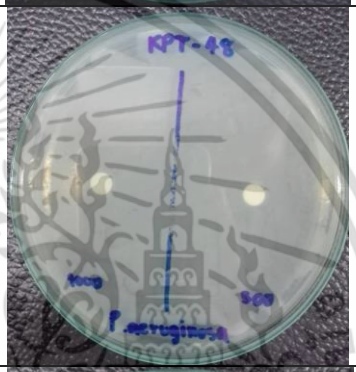
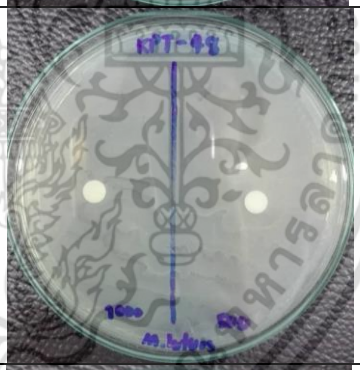
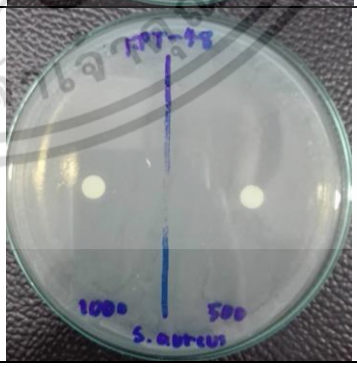
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข7 (ต่อ)

	MRSA			
	B. subtilis			
	C. albicans			

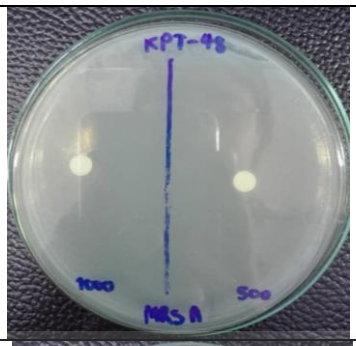
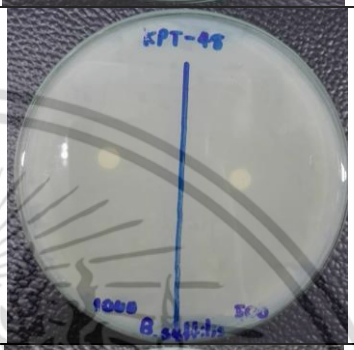
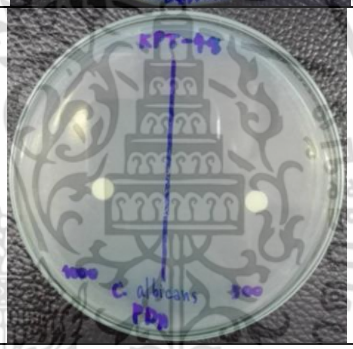
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข8 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ KPT48

รหัสเชื้อ	**เชื้อทดสอบ**	**ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml**
KPT48	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	
	S. aureus	

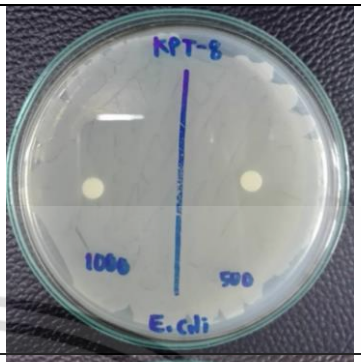
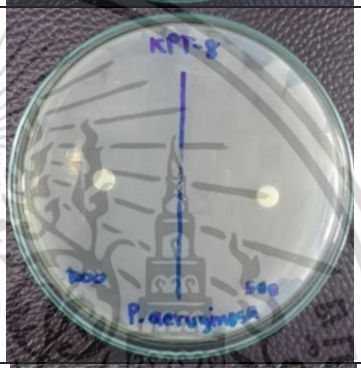
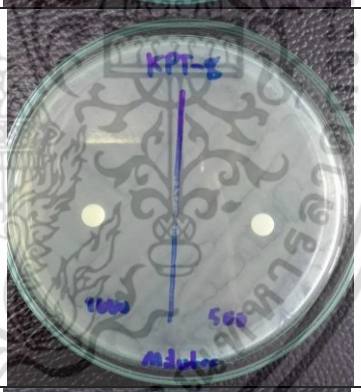
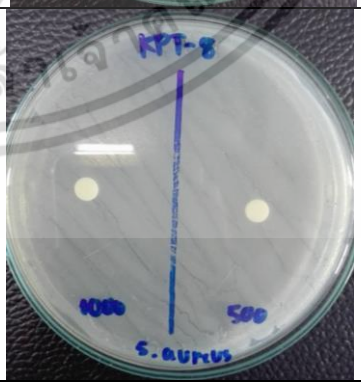
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข8 (ต่อ)

	MRSA			
	B. subtilis			
	C. albicans			

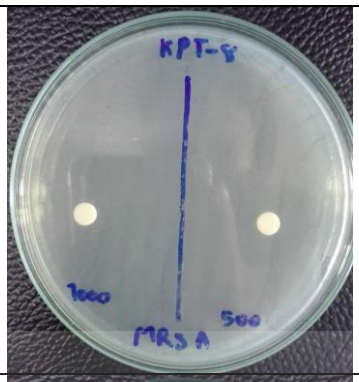
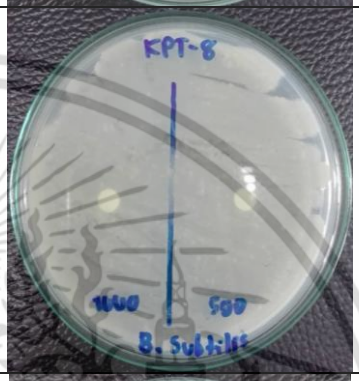
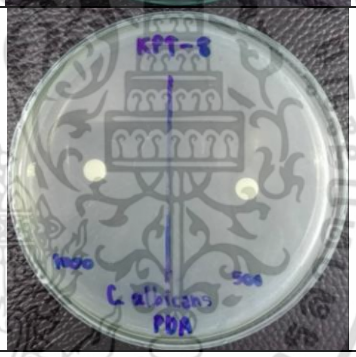
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข9 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ KPT8

รหัสเชื้อ	**เชื้อทดสอบ**	**ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml**
KPT8	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	
	S. aureus	

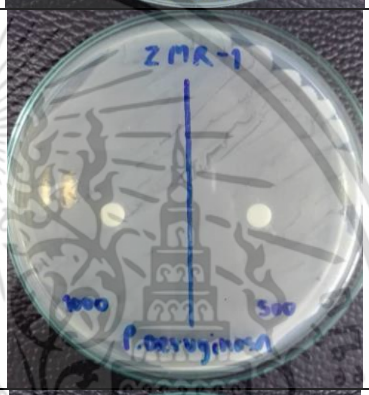
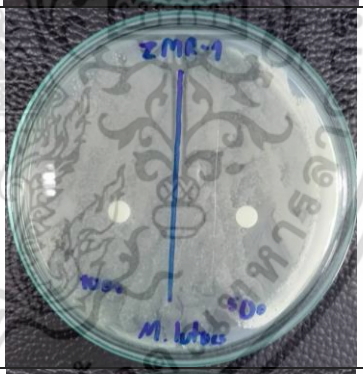
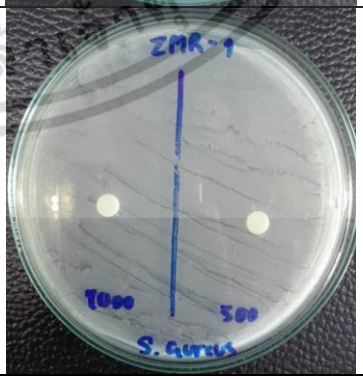
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข9 (ต่อ)

	MRSA			
	B. subtilis			
	C. albicans			

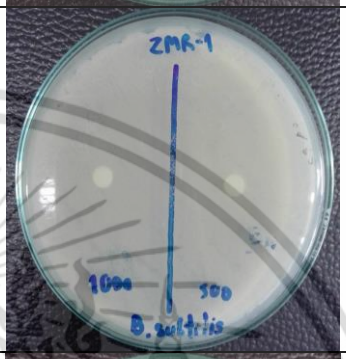
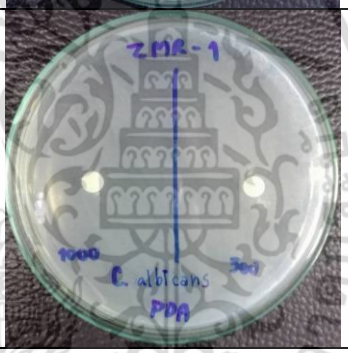
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข10 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ ZMR1

รหัสเชื้อ	**เชื้อทดสอบ**	**ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml**
ZMR1	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	
	S. aureus	

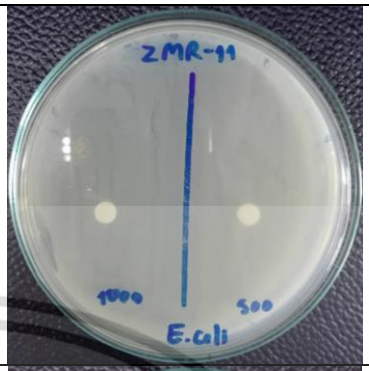
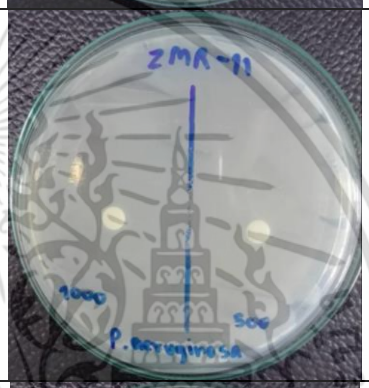
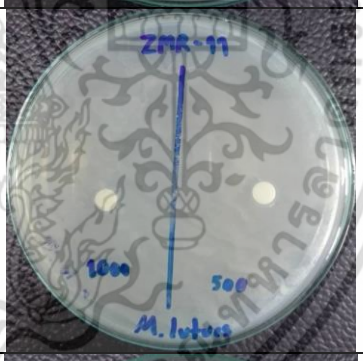
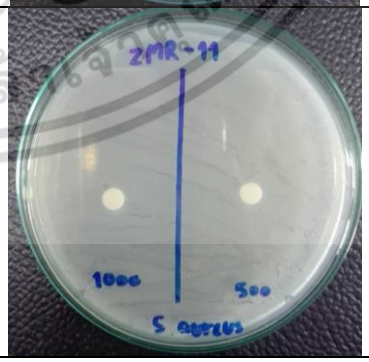
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข10 (ต่อ)

	MRSA			
	B. subtilis			
	C. albicans			

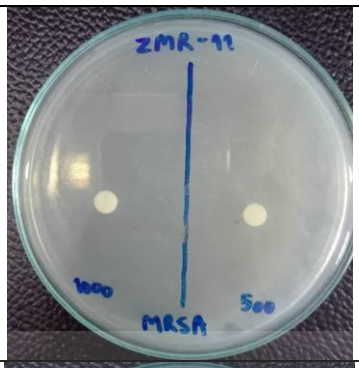
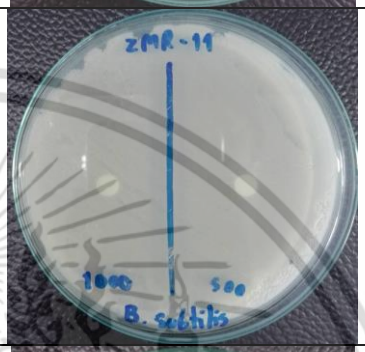
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข11 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ ZMR11

รหัสเชื้อ	**เชื้อทดสอบ**	**ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml**
ZMR11	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	
	S. aureus	

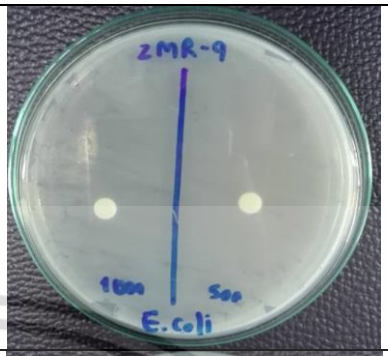
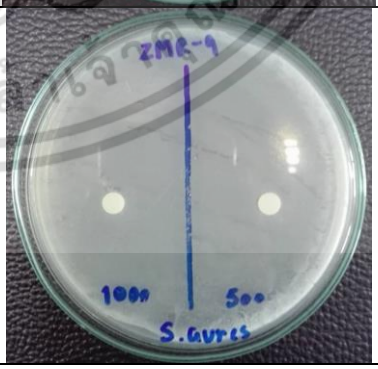
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข11 (ต่อ)

	MRSA			
	B. subtilis			
	C. albicans			

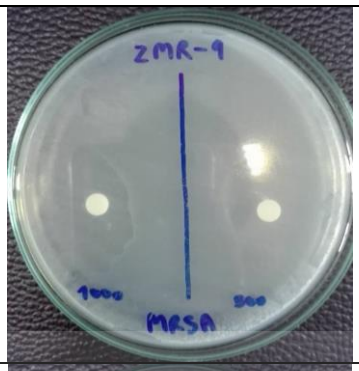
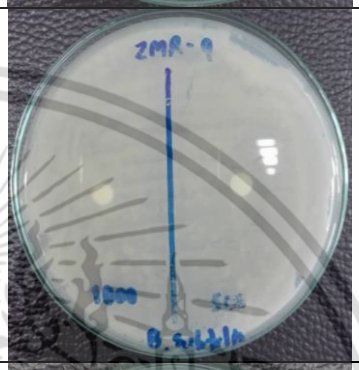
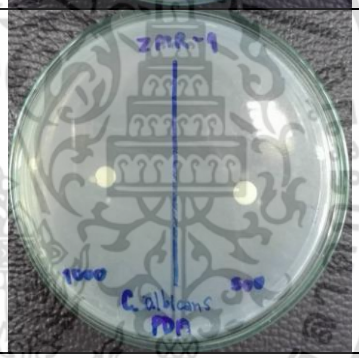
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข12 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ ZMR9

รหัสเชื้อ	**เชื้อทดสอบ**	**ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml**
ZMR9	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	
	S. aureus	

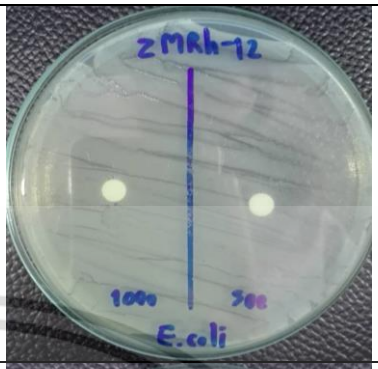
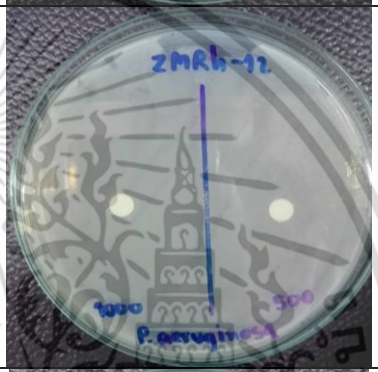
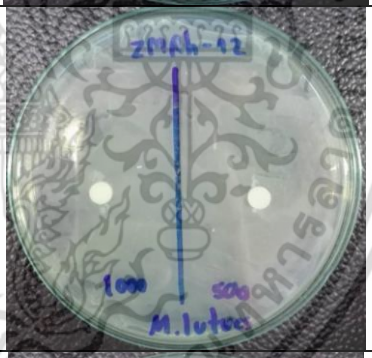
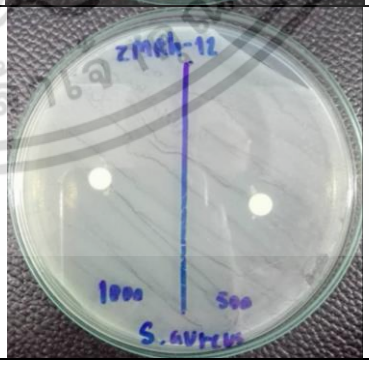
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข12 (ต่อ)

	MRSA			
	B. subtilis			
	C. albicans			

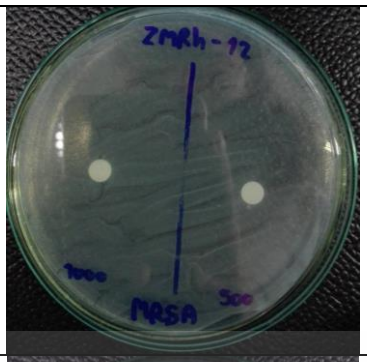
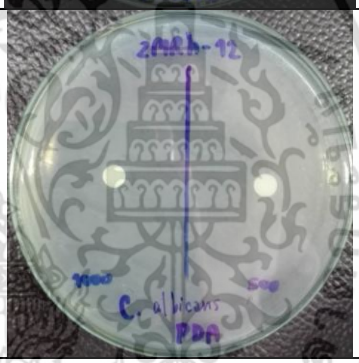
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข13 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ ZMRh12

รหัสเชื้อ	**เชื้อทดสอบ**	**ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml**
ZMRh12	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	
	S. aureus	

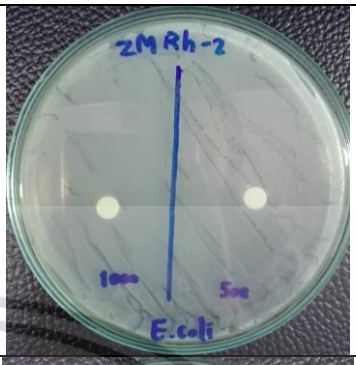
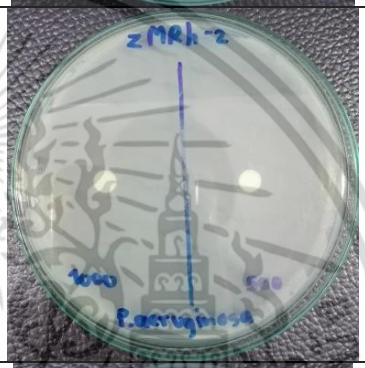
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข13 (ต่อ)

	MRSA			
	B. subtilis			
	C. albicans			

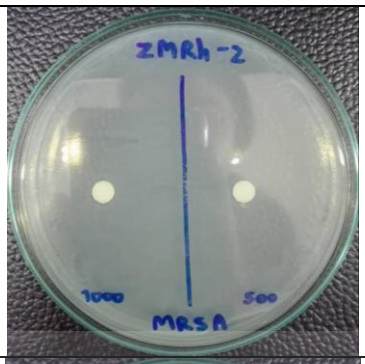
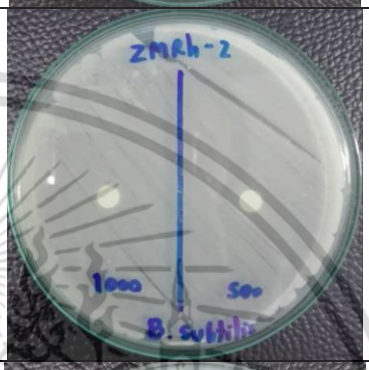
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข14 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ ZMRh2

รหัสเชื้อ	**เชื้อทดสอบ**	**ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml**
ZMRh2	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	
	S. aureus	

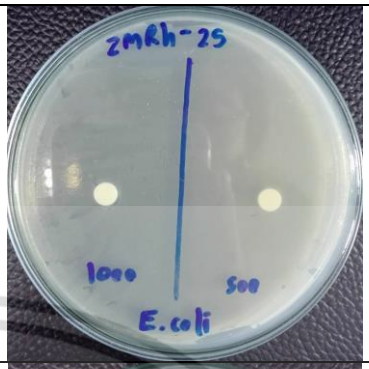
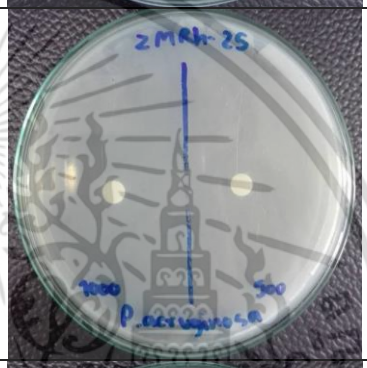
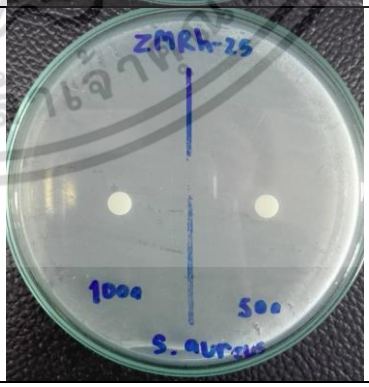
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข14 (ต่อ)

	MRSA			
	B. subtilis			
	C. albicans			

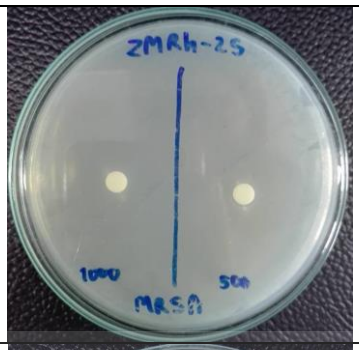
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข15 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบกระชายดำ ZMRh25

รหัสเชื้อ	**เชื้อทดสอบ**	**ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml**
ZMRh25	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	
	S. aureus	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข15 (ต่อ)

	MRSA			
	B. subtilis			
	C. albicans			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

กระดาษสีมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System)

Hex	Color	Name
#ffb5ba		Vivid_Pink
#ea9399		Strong_Pink
#e4717a		Deep_Pink
#f9ccca		Light_Pink
#dea5a4		Moderate_Pink
#c08081		Dark_Pink
#ead8d7		Pale_Pink

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#c4aead		Grayish_Pink
#eae3e1		Pinkish_White
#c1b6b3		Pinkish_Gray
#be0032		Vivid_Red
#bc3f4a		Strong_Red
#841b2d		Deep_Red
#5c0923		Very_Deep_Red
#ab4e52		Moderate_Red
#722f37		Dark_Red
#3f1728		Very_Dark_Red
#ad8884		Light_Grayish_Red
#905d5d		Grayish_Red

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#543d3f		Dark_Grayish_Red
#2e1d21		Blackish_Red
#8f817f		Reddish_Gray
#5c504f		Dark_Reddish_Gray
#282022		Reddish_Black
#ffb7a5		Vivid_Yellowish_Pink
#f99379		Strong_Yellowish_Pink
#e66721		Deep_Yellowish_Pink
#f4c2c2		Light_Yellowish_Pink
#d9a6a9		Moderate_Yellowish_Pink
#c48379		Dark_Yellowish_Pink

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#ecd5c5		Pale_Yellowish_Pink
#c7ada3		Grayish_Yellowish_Pink
#c2ac99		Brownish_Pink
#e25822		Vivid_Reddish_Orange
#d9603b		Strong_Reddish_Orange
#aa381e		Deep_Reddish_Orange
#cb6d51		Moderate_Reddish_Orange
#9e4732		Dark_Reddish_Orange
#b4745e		Grayish_Reddish_Orange
#882d17		Strong_Reddish_Brown
#56070c		Deep_Reddish_Brown
#a87c6d		Light_Reddish_Brown

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#79443b		Moderate_Reddish_Brown
#3e1d1e		Dark_Reddish_Brown
#977f73		Light_Grayish_Reddish_Brown
#674c47		Grayish_Reddish_Brown
#43302e		Dark_Grayish_Reddish_Brown
#f38400		Vivid_Orange
#fd943f		Brilliant_Orange
#ed872d		Strong_Orange
#be6516		Deep_Orange
#fab57f		Light_Orange
#d99058		Moderate_Orange
#ae6938		Brownish_Orange

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#80461b		Strong_Brown
#593319		Deep_Brown
#a67b5b		Light_Brown
#6f4e37		Moderate_Brown
#422518		Dark_Brown
#958070		Light_Grayish_Brown
#635147		Grayish_Brown
#3e322c		Dark_Grayish_Brown
#8e8279		Light_Brownish_Gray
#5b504f		Brownish_Gray
#28201c		Brownish_Black
#f6a600		Vivid_Orange_Yellow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#ffc14f		Brilliant_Orange_Yellow
#eaa221		Strong_Orange_Yellow
#c98500		Deep_Orange_Yellow
#fbc97f		Light_Orange_Yellow
#e3a857		Moderate_Orange_Yellow
#be8a3d		Dark_Orange_Yellow
#fad6a5		Pale_Orange_Yellow
#996515		Strong_Yellowish_Brown
#654522		Deep_Yellowish_Brown
#c19a6b		Light_Yellowish_Brown
#826644		Moderate_Yellowish_Brown
#4b3621		Dark_Yellowish_Brown

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#ae9b82		Light_Grayish_Yellowish_Brown
#7e6d5a		Grayish_Yellowish_Brown
#483c32		Dark_Grayish_Yellowish_Brown
#f3c300		Vivid_Yellow
#fada5e		Brilliant_Yellow
#d4af37		Strong_Yellow
#af8d13		Deep_Yellow
#f8de7e		Light_Yellow
#c9ae5d		Moderate_Yellow
#ab9144		Dark_Yellow
#f3e5ab		Pale_Yellow
#c2b280		Grayish_Yellow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#a18f60		Dark_Grayish_Yellow
#f0ead6		Yellowish_White
#bfb8a5		Yellowish_Gray
#967117		Light_Olive_Brown
#6c541e		Moderate_Olive_Brown
#3b3121		Dark_Olive_Brown
#dcd300		Vivid_Greenish_Yellow
#e9e450		Brilliant_Greenish_Yellow
#beb72e		Strong_Greenish_Yellow
#9b9400		Deep_Greenish_Yellow
#eae679		Light_Greenish_Yellow
#b9b459		Moderate_Greenish_Yellow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#98943e		Dark_Greenish_Yellow
#ebe8a4		Pale_Greenish_Yellow
#b9b57d		Grayish_Greenish_Yellow
#867e36		Light_Olive
#665d1e		Moderate_Olive
#403d21		Dark_Olive
#8c8767		Light_Grayish_Olive
#5b5842		Grayish_Olive
#363527		Dark_Grayish_Olive
#8a8776		Light_Olive_Gray
#57554c		Olive_Gray
#25241d		Olive_Black

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#8db600		Vivid_Yellow_Green
#bdda57		Brilliant_Yellow_Green
#7e9f2e		Strong_Yellow_Green
#467129		Deep_Yellow_Green
#c9dc89		Light_Yellow_Green
#8a9a5b		Moderate_Yellow_Green
#dadfb7		Pale_Yellow_Green
#8f9779		Grayish_Yellow_Green
#404f00		Strong_Olive_Green
#232f00		Deep_Olive_Green
#4a5d23		Moderate_Olive_Green
#2b3d26		Dark_Olive_Green

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#515744		Grayish_Olive_Green
#31362b		Dark_Grayish_Olive_Green
#27a64c		Vivid_Yellowish_Green
#83d37d		Brilliant_Yellowish_Green
#44944a		Strong_Yellowish_Green
#00622d		Deep_Yellowish_Green
#003118		Very_Deep_Yellowish_Green
#b6e5af		Very_Light_Yellowish_Green
#93c592		Light_Yellowish_Green
#679267		Moderate_Yellowish_Green
#355e3b		Dark_Yellowish_Green
#173620		Very_Dark_Yellowish_Green

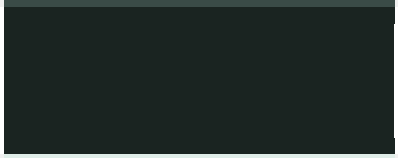
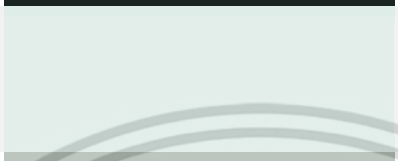
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#008856		Vivid_Green
#3eb489		Brilliant_Green
#007959		Strong_Green
#00543d		Deep_Green
#8ed1b2		Very_Light_Green
#6aab8e		Light_Green
#3b7861		Moderate_Green
#1b4d3e		Dark_Green
#1c352d		Very_Dark_Green
#c7e6d7		Very_Pale_Green
#8da399		Pale_Green
#5e716a		Grayish_Green

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#3a4b47		Dark_Grayish_Green
#1a2421		Blackish_Green
#dfede8		Greenish_White
#b2beb5		Light_Greenish_Gray
#7d8984		Greenish_Gray
#4e5755		Dark_Greenish_Gray
#1e2321		Greenish_Black
#008882		Vivid_Bluish_Green
#00a693		Brilliant_Bluish_Green
#007a74		Strong_Bluish_Green
#00443f		Deep_Bluish_Green
#96ded1		Very_Light_Bluish_Green

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#66ada4		Light_Bluish_Green
#317873		Moderate_Bluish_Green
#004b49		Dark_Bluish_Green
#002a29		Very_Dark_Bluish_Green
#0085a1		Vivid_Greenish_Blue
#239eba		Brilliant_Greenish_Blue
#007791		Strong_Greenish_Blue
#2e8495		Deep_Greenish_Blue
#9cd1dc		Very_Light_Greenish_Blue
#66aabc		Light_Greenish_Blue
#367588		Moderate_Greenish_Blue
#004958		Dark_Greenish_Blue

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#002e3b		Very_Dark_Greenish_Blue
#00a1c2		Vivid_Blue
#4997d0		Brilliant_Blue
#0067a5		Strong_Blue
#00416a		Deep_Blue
#a1caf1		Very_Light_Blue
#70a3cc		Light_Blue
#436b95		Moderate_Blue
#00304e		Dark_Blue
#bcd4e6		Very_Pale_Blue
#91a3b0		Pale_Blue
#536878		Grayish_Blue

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#36454f		Dark_Grayish_Blue
#202830		Blackish_Blue
#e9e9ed		Bluish_White
#b4bcc0		Light_Bluish_Gray
#81878b		Bluish_Gray
#51585e		Dark_Bluish_Gray
#202428		Bluish_Black
#30267a		Vivid_Purplish_Blue
#6c79b8		Brilliant_Purplish_Blue
#545aa7		Strong_Purplish_Blue
#272458		Deep_Purplish_Blue
#b3bce2		Very_Light_Purplish_Blue

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#8791bf		Light_Purplish_Blue
#4e5180		Moderate_Purplish_Blue
#252440		Dark_Purplish_Blue
#c0c8e1		Very_Pale_Purplish_Blue
#8c92ac		Pale_Purplish_Blue
#4c516d		Grayish_Purplish_Blue
#9065ca		Vivid_Violet
#7e73b8		Brilliant_Violet
#604e97		Strong_Violet
#32174d		Deep_Violet
#dcd0ff		Very_Light_Violet
#8c82b6		Light_Violet

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#604e81		Moderate_Violet
#2f2140		Dark_Violet
#c4c3dd		Very_Pale_Violet
#9690ab		Pale_Violet
#554c69		Grayish_Violet
#9a4eae		Vivid_Purple
#d399e6		Brilliant_Purple
#875692		Strong_Purple
#602f6b		Deep_Purple
#401a4c		Very_Deep_Purple
#d5badb		Very_Light_Purple
#b695c0		Light_Purple

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#86608e		Moderate_Purple
#563c5c		Dark_Purple
#301934		Very_Dark_Purple
#d6cadd		Very_Pale_Purple
#aa98a9		Pale_Purple
#796878		Grayish_Purple
#50404d		Dark_Grayish_Purple
#291e29		Blackish_Purple
#e8e3e5		Purplish_White
#bfb9bd		Light_Purplish_Gray
#8b8589		Purplish_Gray
#5d555b		Dark_Purplish_Gray

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#242124		Purplish_Black
#870074		Vivid_Reddish_Purple
#9e4f88		Strong_Reddish_Purple
#702963		Deep_Reddish_Purple
#54194e		Very_Deep_Reddish_Purple
#b784a7		Light_Reddish_Purple
#915c83		Moderate_Reddish_Purple
#5d3954		Dark_Reddish_Purple
#341731		Very_Dark_Reddish_Purple
#aa8a9e		Pale_Reddish_Purple
#836479		Grayish_Reddish_Purple
#ffc8d6		Brilliant_Purplish_Pink

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#e68fac		Strong_Purplish_Pink
#de6fa1		Deep_Purplish_Pink
#efbbcc		Light_Purplish_Pink
#d597ae		Moderate_Purplish_Pink
#c17e91		Dark_Purplish_Pink
#e8ccd7		Pale_Purplish_Pink
#c3a6b1		Grayish_Purplish_Pink
#ce4676		Vivid_Purplish_Red
#b3446c		Strong_Purplish_Red
#78184a		Deep_Purplish_Red
#54133b		Very_Deep_Purplish_Red
#a8516e		Moderate_Purplish_Red

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#673147		Dark_Purplish_Red
#38152c		Very_Dark_Purplish_Red
#af868e		Light_Grayish_Purplish_Red
#915f6d		Grayish_Purplish_Red
#f2f3f4		White
#b9b8b5		Light_Gray
#848482		Medium_Gray
#555555		Dark_Gray
#222222		Black

ที่มา: NBS / ISCC สีระบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปแบบ (สันปก)

ชื่อหัวข้อ**โครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา** (ภาษาไทย) (TH SarabunPSK 16)	ปีการศึกษา (ปีการศึกษาที่จบ) (TH SarabunPSK 16)

ตัวอย่าง (สันปก)

เชื้อเพลิงอัดแท่งจากวัสดุเหลือทิ้งของกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม	ปีการศึกษา 2557

*หากชื่อหัวข้อ**โครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา** ไม่สามารถเขียนได้ในบรรทัดเดียว ให้ขึ้นบรรทัดใหม่โดยวางแนวให้ขอบซ้ายตรงกับบรรทัดก่อนหน้า