การทำให้สารสกัดของรากหม่อนเพาะเลี้ยงบริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี และการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

PARTIAL PURIFICATION OF CRUDE EXTRACT FROM CULTURED MULBERRY ROOTS BY COLUMN CHROMATOGRAPHY AND ITS ANTIBACTERIAL ACTIVITIES

กชกร อายุยงค์
ฐิติมา เกตประยูร
ธีรารัตน์ มาแสง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การทำให้สารสกัดของรากหม่อนเพาะเลี้ยงบริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี และการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

PARTIAL PURIFICATION OF CRUDE EXTRACT FROM CULTURED MULBERRY ROOTS BY COLUMN CHROMATOGRAPHY AND ITS ANTIBACTERIAL ACTIVITIES

T149299

กชกร อายุยงค์
ฐิติมา เกตประยูร
ธีรารัตน์ มาแสง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....149299
วัน, เดือน, ปี.....12 ก.พ. 2561
b.1287873
l.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PARTIAL PURIFICATION OF CRUDE EXTRACT FROM CULTURED MULBERRY ROOTS BY COLUMN CHROMATOGRAPHY AND ITS ANTIBACTERIAL ACTIVITIES

KODCHAKORN AYUYONG
TITIMA KETPRAYOON
THIRARATH MARSAENG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การทำให้สารสกัดของรากหม่อนเพาะเลี้ยงบริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี และการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Partial purification of crude extract from cultured mulberry roots by column chromatography and its antibacterial activites
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกชกร อายุยงค์ รหัสนักศึกษา 55051050 นางสาวฐิติมา เกตประยูร รหัสนักศึกษา 55051081 นางสาวธีรารัตน์ มาแสง รหัสนักศึกษา 55051107
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการ	
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ	

ลิขสิทธิ์ของ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การทำให้สารสกัดของรากหม่อนเพาะเลี้ยงบริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี และการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Partial purification of crude extract from cultured mulberry roots by column chromatography and its antibacterial activities
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกชกร อายุยงค์ นางสาวฐิติมา เกตประยูร นางสาวธีรารัตน์ มาแสง
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี

บทคัดย่อ

รากหม่อนถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรMS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต การเจริญเติบโตของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงและไม่ให้แสงถูกนำมาเปรียบเทียบกันผลปรากฏว่า รากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในทั้งสองสภาวะมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน สารสกัดหยาบของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงและไม่ให้แสงซึ่งสกัดด้วยเมทานอล ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้เอทิลอะซิเตตต่อเมทานอล อัตราส่วน 4 ต่อ 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ หลังจากทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วสามารถแยกสารออกได้เป็น 2 ส่วน คือ สารสีเหลืองจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในทั้งสองสภาวะ และสารสีส้มจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในทั้งสองสภาวะ สารสีเหลืองและสารสีส้มจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกันถูกนำมาทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่า สารสีเหลืองจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ได้ดีกว่าสารสีเหลืองจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่ให้แสงและสารสีส้มจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงทั้งสองสภาวะ เนื่องจากสารสีเหลืองจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียกว้างที่สุด

คำสำคัญ: รากหม่อนเพาะเลี้ยง การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย สารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิมพ์บทคัดย่อแล้ว
รอสอง tag 520

purification of crude extract from culture mulberry root
olumn chromatography and its antibacterial activities

ss Kodchakorn Ayuyong
Miss Titima Ketprayoon
Miss Thirarath Marsaeng
Bachelor of Science
Biotechnology
ear 2015
Asst. Prof. Dr. Pana Lohasupthawee

Abstract

Mulberry roots were cultured at 25°C in liquid MS media without plant growth regulators. The growth of mulberry roots cultured under continuous light condition were compared to those cultured under continuous dark condition. The result showed there was no different in growth of mulberry roots between these two conditions. Both the crude methanolic extract of the mulberry roots grown under light condition and dark condition were partial purified by column chromatography using ethyl acetate: methanol:: 4:1 as mobile phase. After partial purification of the root extracted from both cultured conditions, they were separated into two fractions (the yellow fraction of both cultured conditions and the orange fraction of both cultured conditions). The antibacterial property of both yellow and orange fractions from different cultured conditions were examined. The yellow fraction extracted from mulberry roots culture under light condition was more effective on antibacterial against *Micrococcus luteus* ATCC 9341 than the yellow fraction extracted from roots cultured under dark condition and the orange fraction from both cultured conditions, as the yellow fraction under light condition showed maximum zone of inhibition.

Keywords: Culture mulberry root, Antibacterial activities, Extract

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเรื่องการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดจากรากหม่อนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดระยะเวลาในการจัดทำโครงงานพิเศษได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำ จากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือ สารเคมีและอุปกรณ์เครื่องแก้วที่เกี่ยวข้องในการทดลอง เพื่อให้การศึกษาทดลองสำเร็จลุล่วง คณะผู้จัดทำตระหนักและทราบซึ้งในความกรุณาจากทุกๆท่านเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ที่อนุเคราะห์ดูแลการทำวิจัย ให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆของโครงงานพิเศษนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงยิ่ง ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทำการทดสอบในโครงงานพิเศษนี้ ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงยิ่ง ณ ที่นี้

ขอของพระคุณ คุณปรียานุช ศรีไพบูรณ์ และคุณณัฐฑิตา ปราณนัทธี เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่ได้กรุณาให้แนะนำ และช่วยเหลือด้านการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาวิจัยนี้ คณะผู้จัดทำตระหนักและรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณา

ขอขอบพระคุณรัญญิการ์ โปราหานักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพคณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำชี้แนวทางในการแก้ไขปัญหาและข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นคณะผู้จัดทำตระหนักและรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณา

นางสาวกชกร อายุยงค์
นางสาวฐิติมา เกตประยูร
นางสาวธีรารัตน์มาแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ต้นหม่อน	3
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	3
2.1.2 สรรพคุณของหม่อนทางเภสัชวิทยา	6
2.1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากหม่อน	6
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	9
2.2.1 ปัจจัยที่มีผลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	10
2.2.2 ประโยชน์การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	10
2.3 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร	12
2.3.1การทำสมุนไพรให้แห้ง	12
2.3.2 การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญ	12
2.3.3 การเลือกวิธีการสกัด	14
2.3.4 วิธีการสกัด	14
2.3.5 การทำสารสกัดให้เข้มข้น	17
2.4 การทำให้สารบริสุทธิ์	18
2.4.1 คอลัมน์โครมาโตกราฟี	18
2.4.2 ทินแลร์โครมาโตกราฟี	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5 การทดสอบความไวของเชื้อต่อผลิตภัณฑ์ต้านจุลชีพ	21
2.5.1 Dilution test	21
2.5.2 Diffusion test	23
2.6 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ	23
2.5.1 *Escherichia coli*	23
2.5.2 *Bacillus subtilis*	23
2.5.3 *Staphylococcus aureus*	24
2.5.4 *Pseudomonas aeruginosa*	24
2.5.5 *Micrococcus* sp.	25
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	25
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 พืชที่ใช้	27
3.2 วัสดุและอุปกรณ์	27
3.3 สารเคมี	27
3.4 วิธีการทดลอง	28
3.4.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	28
3.4.2 การเพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหารเหลวสูตรMS	28
3.4.3 การเก็บรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว	28
3.4.4 การวัดการเจริญเติบโตของรากหม่อน	29
3.4.5 การสกัดสารจากรากหม่อนด้วยเครื่องสกัดซอกห์เลต	29
3.4.6การทำให้สารสกัดหยาบบริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี	29
3.4.7 การศึกษาลักษณะโครมาโทแกรมของสารที่ออกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟี	30
3.4.8 การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากรากหม่อนโดยวิธี Disc diffusion	30
3.4.9การวิเคราะห์ทางสถิติ	31
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 สารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่ใช้ในการทดลอง	32
4.2 การเจริญเติบโตของรากหม่อนในสภาวะต่างๆ	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 ผลการศึกษาลักษณะโครมาโทแกรมของสาร ที่ออกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วย Thin-layer chromatography	34
4.4 ผลการศึกษาลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดที่ได้จากรากหม่อน ที่เพาะเลี้ยงให้แสงและไม่ให้แสงที่ออกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วย Thin-layer chromatography	36
4.5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของ สารสกัดจากรากหม่อนโดยวิธีDisc diffusion	39
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	47
เอกสารอ้างอิง	49
ภาคผนวก	51
ภาคผนวก ก	52
ภาคผนวก ข	55
ภาคผนวก ค	69
ภาคผนวก ง	74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 โครมาโตกราฟีแบบต่างๆ	18
4.1 ปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะที่ให้แสง และไม่ให้แสงเป็นเวลา 20วัน	33
4.2 แสดงดัชนีการเจริญเติบโตของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง และไม่ให้แสงเป็นเวลา 20 วัน	33
4.3 แฟรกชันของสารสีเหลืองและสารสีส้มของสารสกัดจากรากหม่อนที่นำมารวมกัน หลังทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี	35
4.4 ค่า R_fและลักษณะการเรืองแสงของสารสกัดหยาบ สารสีเหลืองและสารสีส้มบนแผ่น TLC	38
4.5 ค่าเฉลี่ยบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสารสกัดจากรากหม่อน ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง	41
4.6 ค่าเฉลี่ยบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสารสกัดจากรากหม่อน ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ให้แสง	42
4.7 แสดงขนาดบริเวณที่มีการยับยั้งแบคทีเรียของสารสีเหลือง และสีส้ม จากสารสกัดรากหม่อนเพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง และไม่ให้แสง	43
ข-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานซูโครส ที่ความเข้มข้นต่างๆ	56
ข-2 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงรากหม่อนแบบให้แสง ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร	57
ข-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานซูโครส ที่ความเข้มข้นต่างๆ	58
ข-4 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงรากหม่อนแบบไม่ให้แสงนาน 20 วัน ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร	59
ข-5 ค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงรากหม่อนแบบไม่ให้แสงนาน 28 วัน ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร	59
ข-6 น้ำหนักผงรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงแบบให้แสงเป็นเวลา20 วัน	60
ข-7 น้ำหนักผงรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงแบบให้แสงเป็นเวลา17วัน	60
ข-8 น้ำหนักผงรากหม่อนที่เลี้ยงแบบไม่ให้แสงเป็นเวลา13 วัน	61
ข-9 น้ำหนักผงรากหม่อนที่เลี้ยงแบบไม่ให้แสงเป็นเวลา14วัน	61
ข-10 น้ำหนักผงรากหม่อนที่เลี้ยงแบบไม่ให้แสงเป็นเวลา20วัน	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข-11 น้ำหนักผงรากหม่อนที่เลี้ยงแบบไม่ให้แสงเป็นเวลา28วัน	62
ข-12 ดัชนีการเจริญเติบโตของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงแบบให้แสงกับแบบไม่ให้แสง เป็นเวลา 20 วัน	63
ข-13 ขนาดความกว้างของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยสารสีเหลืองที่สกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงแบบให้แสง	64
ข-14 ขนาดความกว้างของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยสารสีส้มที่สกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงแบบให้แสง	65
ข-15 ขนาดความกว้างของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยสารสีเหลืองที่สกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงแบบไม่ให้แสง	67
ข-16 ขนาดความกว้างของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยสารสีส้มที่สกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงแบบไม่ให้แสง	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ต้นหม่อน	3
2.2 ใบหม่อน	4
2.3 ดอกของหม่อน	4
2.4 ผลหม่อน	5
2.5 ลักษณะรากของหม่อน	5
2.6 เชื้อเพลิงจากหม่อนและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	9
2.7 ภาพโดยรวมของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	9
2.8 การสกัดสมุนไพรโดยวิธีMaceration ในระดับห้องปฏิบัติการและอุตสาหกรรม	15
2.9 การสกัดสมุนไพรโดยวิธีSoxhlet extraction	16
2.10 การสกัดสมุนไพรโดยวิธีLiquid – Liquid Extraction	16
2.11 การสกัดสมุนไพรโดยวิธีExtraction of volatile oil	17
2.12 การกลั่นในภาวะสุญญากาศด้วยเครื่องมือ Rotary evaporator	17
2.13 คอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบต่างๆ	20
2.14 ตำแหน่งการแต้มสารระดับตัวทำละลาย solvent front ในการทำTLC และการคำนวณ R_f (retention factor)	21
2.15 การทดสอบความไวของเชื้อต่อผลิตภัณฑ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี Broth dilution method	22
3.1 ตำแหน่งการวางแผ่นดิสก์บนอาหารMHAที่ใช้ในการทดสอบ	31
4.1 แผนภูมิแท่งค่าเฉลี่ยดัชนีการเจริญเติบโตของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง และในสภาวะที่ไม่ให้แสง เป็นเวลา 20 วัน	33
4.2 สารแต่ละแฟรกชันที่ได้จากการแยกสารสกัดหยาบจากรากหม่อนด้วย เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี	34
4.3 สารสีเหลืองและสารสีส้มจากรากหม่อนที่นำมารวมกัน หลังทำการชะออกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟี	36
4.4 ลักษณะโครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง และไม่ให้แสง	37
4.5 ลักษณะโครมาโตแกรมของสารสีส้มจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง และไม่ให้แสง	37
4.6ลักษณะโครมาโตแกรมของสารสีเหลืองจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง และไม่ให้แสง	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 ผลการยับยั้งแบคทีเรียของสารสีเหลือง และสารสีส้มจากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงด้วยวิธี disc diffusion	43
4.8 ผลการยับยั้งแบคทีเรียของสารสีเหลือง และสารสีส้มจากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ให้แสงด้วยวิธี disc diffusion	45
ข-1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสสำหรับรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงแบบให้แสง	56
ข-2 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสสำหรับรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงแบบไม่ให้แสง	58
ค-1 ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นหม่อนในอาหารแข็งสูตรMS เป็นเวลา 30 วัน	70
ค-2 ลักษณะการเจริญเติบโตของรากหม่อนในอาหารเหลวสูตรMSที่ไม่ใส่ฮอร์โมนในสภาวะที่มีแสงเป็นเวลา 20 วัน	71
ค-3 ลักษณะการเจริญเติบโตของรากหม่อนในอาหารเหลวสูตรMSที่ไม่ใส่ฮอร์โมนในสภาวะที่ไม่มีแสงเป็นเวลา 20 วัน	71
ค-4 ลักษณะรากหม่อนสด และรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง	72
ค-5 ลักษณะรากหม่อนสด และรากหม่อนแห้งที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีแสง	72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบัน สารที่สกัดจากพืชเป็นหนึ่งในตัวเลือกที่นิยมนำมาใช้ในการต้านแบคทีเรีย โดยปกติยาปฏิชีวนะหรือ Antibiotics ที่สามารถต้านแบคทีเรียได้ ส่วนใหญ่จะผลิตมาจากเชื้อราและสารเคมี ซึ่งบุคคลบางกลุ่มที่มีระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายไวต่อยามากกว่าปกติจึงทำให้เกิดอาการแพ้ (ธีรัตถ์ , 2555) ส่วนสารสกัดที่ได้จากพืชเป็นสารที่มาจากธรรมชาติ ส่วนมากไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค จึงสามารถใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะที่ผลิตมาจากเชื้อราและสารเคมีที่อาจจะมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตได้

หม่อนชื่อสามัญ Mulberry ชื่อวิทยาศาสตร์ *Morus alba* L. ภาคอีสานเรียก มอน มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ประเทศจีน มีอายุนานมากกว่า 100 ปี ภาษาจีนแต้จิ๋วเรียก“ซิวเอียะ” เป็นพืชยืนต้นชนิดหนึ่งที่มีรูปร่างเป็นไม้ทรงพุ่มขนาดกลาง เปลือกต้นสีน้ำตาลแดง ลำต้นตั้งตรง แตกกิ่งก้านไม่มากนัก ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ ใบกว้าง 8-15 เซนติเมตร ยาว 10-15 เซนติเมตร ด้านขอบใบมีรอยหยัก ผิวใบสาก ปลายเรียวแหลมยาว ฐานใบกลมหรือรูปหัวใจ ก้านใบเล็กเรียวยาว 1.0-1.5 เซนติเมตร ช่อดอกมีรูปทรงกระบอกคล้ายหางกระรอกยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ออกที่ซอกใบและปลายยอด มีสีขาวหม่นหรือแกมเขียว ช่อดอกเพศผู้และช่อดอกเพศเมียอยู่ต่างต้นกัน ไม่เพศผู้ก็เพศเมีย มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่พบดอกทั้ง 2 เพศ ดอกเพศผู้แต่ละดอกจะมีกลีบดอก (sepal) 4 กลีบ มีเกสรตัวผู้ 4 เกสร (stamen) ซึ่งแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ก้านเกสร (filament) และอับละอองเกสร (anther) เมื่อดอกบานก้านเกสรจะยืดตัวออก และปลดปล่อยละอองเกสรที่มีลักษณะสีเหลืองออก ดอกเพศเมียมีกลีบดอก 4 กลีบ รังไข่ (ovary) ก้านเกสรตัวเมีย (style) และยอดเกสรตัวเมีย (stigma) โดยกลีบดอกจะห่อหุ้มรังไข่ไว้ซึ่งทำให้มองดูมีลักษณะคล้ายลูกบอลสีเขียว ผลมีลักษณะเป็นผลรวม รูปทรงกระบอกมีสีเขียว เมื่อสุกจะมีแดง สีม่วงแดง สุกมากจะมีสีดำ ตามลำดับ มีรสชาติหวานอมเปรี้ยวรับประทานได้ (กรมหม่อนไหม, 2556) ยอดอ่อนรับประทานได้ มักใช้ใส่แกงแทนผงชูรส ใบใช้เลี้ยงตัวไหม สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น วัวควายที่กินใบหม่อนทำให้มีน้ำนมเพิ่มขึ้น สารสำคัญที่พบในเปลือกราก พบว่ามีสาร Betulinicacidm, Mulberrinm, Mulberrochromene, B-amyrin, Cyclomulberrin, Cyclomulberrochromene, UndecaprenolและDodecaprenol (นิดดา, 2550) แต่อย่างไรก็ตามการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดจากรากหม่อนเป็นเรื่องที่ได้รับความสนใจไม่มากนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษนี้จึงมุ่งเน้นที่การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสง โดยนำสารสกัดหยาบที่ได้แต่ละสภาวะมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ก่อนจะนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion

1.2 วัตถุประสงค์

1) เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของรากหม่อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระหว่างในสภาวะที่ให้แสง และในสภาวะที่ไม่ให้แสง
2) เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากรากหม่อนโดยวิธี Thin-layer Chromatography
3) เพื่อทำให้สารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธี Column Chromatography
4) เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากรากหม่อนในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม่อนในอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นนำรากหม่อนเลี้ยงใส่อาหารเหลวสูตร MS ในที่สว่างและที่มืดเป็นเวลา 20 วัน จนได้รากในปริมาณเท่าๆกัน แล้วเก็บรากมาบด เพื่อนำไปสกัดด้วยซอกห์เลต (Soxhlet Extraction) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารที่อยู่ในรากที่เลี้ยงในที่ให้แสงและไม่ให้แสง ซึ่งเป็นการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ ในการทดลองนี้ใช้เมทานอล จากนั้นนำไประเหยแห้งแบบสุญญากาศ และในลำดับต่อไปคือนำไปแยกสารให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (Column Chromatography) เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของสารโดยวิธี Thin-layer Chromatography ต่อไป จะได้สารที่มีค่า R_f ต่างกันสองชนิดมาใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของสารได้ จากนั้นทำการระเหยแบบสุญญากาศ และนำไปทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc Diffusion

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของรากหม่อน โดยการเพราะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2) ทราบองค์ประกอบของสารสกัดจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสง
3) สารสกัดมีความบริสุทธิ์บางส่วนหลังจากผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี
4) สารสกัดจากรากหม่อนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ต้นหม่อน

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Morus alba* Linn

วงศ์ : Moraceae

ต้นกำเนิด : หม่อนมีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน มีอายุนานได้มากกว่า 100 ปี สำหรับประเทศไทยพบมีการปลูกมากในพื้นที่ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีการปลูกหม่อนเลี้ยงไหม เพื่อการผลิตเส้นใยไหม และผ้าไหม มีชื่อเรียกแตกต่างกันตามแต่ละท้องถิ่น เช่น ภาคอีสานเรียก มอน ภาษาจีนเรียก ซังเยี่ย เป็นต้น (วิโรจน์, 2557)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

หม่อน (*Morus alba* Linn.) เป็นไม้ยืนต้นจำพวกไม้พุ่ม อยู่ในวงศ์ Moraceae เช่นเดียวกับปอสา ขนุน และโพธิ์ เป็นต้น ลักษณะที่สำคัญของพืชในวงศ์นี้ คือ มียางมีขนที่ใบ มีเส้นใย ใบมีรูปร่างแตกต่างกัน ทั้งที่เป็นแฉกและไม่เป็นแฉกดังแสดงในรูปที่ 2.1 หม่อนแต่ละพันธุ์จะมีเพียงเพศเดียว ไม่เพศผู้ก็เพศเมีย มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่พบดอกทั้ง 2 เพศ อยู่ในต้นเดียวกัน หม่อนที่มีดอกเพศเมียจะมีเมล็ดสำหรับขยายพันธุ์แต่ไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากจะได้ต้นที่ไม่เหมือนพันธุ์เดิม เพราะมีการผสมข้ามพันธุ์ จึงนิยมขยายพันธุ์ด้วยการปักชำท่อนพันธุ์ หม่อนสามารถเจริญได้ดีตั้งแต่เขตอบอุ่นจนถึงเขตร้อน หม่อนเป็นพืชที่มีอายุนาน 80-100 ปี ถ้าไม่ได้รับความกระทบกระเทือนจากการเก็บเกี่ยวหรือโรค แมลงศัตรู สามารถเจริญได้ดีตั้งแต่เขตอบอุ่นถึงเขตร้อน หม่อนที่เกิดในเขตอากาศหนาวจะหยุดพักไม่เจริญเติบโต นับตั้งแต่ปลายฤดูใบไม้ร่วงจนถึงฤดูใบไม้ผลิ (วิโรจน์, 2557)

รูปที่ 2.1 ต้นหม่อน

ที่มา: http://www.bookmuey.com/images/Mulberry0001.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.1 ใบ

ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปไข่ กว้าง 5–6.5 เซนติเมตร ยาว 7-10 เซนติเมตร ปลายเรียวแหลมยาว โคนกลมค่อนข้างรูปหัวใจ หรือค่อนข้างตัด ใบอ่อนขอบเป็นพูสองข้างไม่เท่ากัน ขอบพูเป็นซี่ฟัน เส้นใบมี 3 เส้น ออกจากโคนยาวไปถึงกลางใบ และเส้นใบออกจากเส้นกลางใบ 4 คู่ เส้นร่างแหเห็นชัดด้านล่างก้านใบเรียวเล็ก ยาว 1.0-1.5 เซนติเมตร (วิโรจน์, 2557) ดังแสดงในรูปที่ 2.2

รูปที่ 2.2 ใบหม่อน

ที่มา: http://upic.me/i/vc/bm-01.jpg

2.1.1.2 ดอก

ดอกสีขาวออกเป็นช่อช่อดอกเป็นหางกระรอก ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ช่อดอกเพศผู้และช่อดอกเพศเมียอยู่ต่างต้นกัน ไม่เพศผู้ก็เพศเมีย มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่พบดอกทั้ง 2 เพศ ดอกเพศผู้แต่ละดอกจะมีกลีบดอก (sepal) 4 กลีบมีเกสรตัวผู้ 4 เกสร (stamen) ซึ่งแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ก้านเกสร (filament) และอับละอองเกสร (anther) เมื่อดอกบานก้านเกสรจะยืดตัวออกและปลดปล่อยละอองเกสรที่มีลักษณะสีเหลืองออก ดอกเพศเมีย มีกลีบดอก 4 กลีบ รังไข่ (ovary) ก้านเกสรตัวเมีย (style) และยอดเกสรตัวเมีย (stigma) โดยกลีบดอกจะห่อหุ้มรังไข่ไว้ซึ่งทำให้มองดูมีลักษณะคล้ายลูกบอลสีเขียว (กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556)

รูปที่ 2.3 ลักษณะดอกของหม่อน

ที่มา: http://frynn.com/wp-content/uploads/2014/07.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.3 ผล

เป็นผลที่เกิดจากช่อดอก ผลเป็นผลรวมอยู่ในกระจุกเดียวกัน โดยจะออกตามซอกใบ ลักษณะของผลเป็นรูปทรงกระบอก ยาวประมาณ 1-2.5 เซนติเมตร ผลเป็นสีเขียว เมื่อผลสุกแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดงเข้มหรือสีม่วงดำ เกือบดำ เนื้อนิ่ม ฉ่ำน้ำ และมีรสหวานอมเปรี้ยว (วิโรจน์, 2557) ดังแสดงในรูปที่ 2.4

รูปที่ 2.4 ลักษณะดอกของหม่อน

ที่มา: http://frynn.com/wp-content/uploads/2014/07.jpg

2.1.1.4 ราก

สำหรับการเก็บเกี่ยวรากหม่อนมาใช้ประโยชน์นั้น ในประเทศจีนจะเก็บในช่วงปลายฤดูใบไม้ร่วง ระหว่างที่ใบหม่อนกำลังร่วงและในช่วงต้นฤดูใบไม้ผลิก่อนที่ใบจะงอก โดยเอาส่วนของไม้ก๊อก (cork) ที่เป็นสีน้ำตาลเหลืองออกดังแสดงในรูปที่ 2.5 ตัดตามยาวของลำต้นแล้วลอกเปลือกออกตากแดด ซึ่งรากที่ได้จะมีคุณสมบัติทางยาสูงสุด (วิโรจน์, 2557)

รูปที่ 2.5 ลักษณะรากของหม่อน

ที่มา: http://p4.s1sf.com/gu/0/ui/0/734/2012b7p116c.JPG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 สรรพคุณของหม่อน

2.1.2.1 ผลหม่อน

ช่วยดับร้อน คลายความร้อนรุ่ม ช่วยขับลมร้อน ช่วยบรรเทาอากากระหายน้ำ ทำให้ชุ่มคอ ทำให้ร่างกายชุ่มชื่น ช่วยบำรุงหัวใจ แก้อาการท้องผูก บำรุงตับและไต ช่วยรักษาตับและไตพร่อง บำรุงเส้นผมให้ดกดำ ป้องกันผมหงอกก่อนวัย (วิโรจน์, 2557)

2.1.2.2 ใบหม่อน

มีสารสารฟายโตสเตอรอล (Phytosterol) ที่มีประสิทธิภาพในการลดความระดับคอเลสเตอรอล มีกาบา (GABA) ที่มีคุณสมบัติในการลดความดันโลหิตมีสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ที่มีคุณสมบัติป้องกันการดูดซึมของน้ำตาลในลำไส้เล็ก ทำให้กระแสเลือดหมุนเวียนดีและหลอดเลือดแข็งแรง ยับยั้งการเกิดสารก่อมะเร็งเม็ดเลือด มะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ลดอาการแพ้ต่างๆ และยืดอายุเม็ดเลือดขาว มีแร่ธาตุ และวิตามินอื่นๆที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น แคลเซียม โปแตสเซียม โซเดียม แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี วิตามินเอ วิตามินบี อีกทั้งยังมีกรดอะมิโนหลายชนิด (วิโรจน์, 2557)

2.1.2.3 ผลหม่อน

มีสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ชื่อ Anthyocyanin ซึ่งเป็นสารสีม่วงแดง ช่วยป้องกันโรคหัวใจ และป้องกันโรคมะเร็ งมีวิตามินบี 6 ช่วยบำรุงเลือด ตับ ไต ลดการเกิดสิว ลดอาการปวดประจำเดือน ป้องกันและยับยั้งการเกิดลิ่มเลือด ป้องกันเส้นเลือดแตก สาเหตุของโรคอัมพฤก อัมพาต มีวิตามินซีสูงช่วยป้องกันหวัด โรคภูมิแพ้ โรคปอด วัณโรค ป้องกันเชื้อไวรัส มีวิตามินเอช่วยบำรุงสายตา ป้องกันการเกิดต้อกระจก บำรุงเหงือกและฟัน สร้างภูมิให้ระบบหายใจ บำรุงผิว ลดการอักเสบของสิว มีกรดโฟลิคป้องกันโรคโลหิตจาง ป้องกันทารกพิการ ช่วยการเจริญเติบโตของทารกในครรภ์ หญิงแรกตั้งครรภ์เดือนแรกต้องการกรดโฟลิค ช่วยแก้อาการเมาค้าง ผ่อนคลายความเครียด ช่วยบำรุงเส้นผมให้ดกดำ ป้องกันผมหงอกก่อนวัย (วิโรจน์, 2557)

2.1.2.4 รากหม่อน

เปลือกรากหม่อนมีรสชุ่ม เป็นยาเย็นออกฤทธิ์ต่อปอดและม้าม ใช้เป็นยาแก้ไอเป็นเลือด แก้ไอร้อนไอหอบ เป็นยาสมาน อีกทั้งสารสกัดจากเปลือกราก มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ซึ่งเกี่ยวข้องในขบวนการสร้างเม็ดสีที่ผิวหนัง จึงมีการนำสารสกัดรากหม่อนมาใช้เป็น whitening agent ในเครื่องสำอาง รวมถึงสารสกัดเอทานอลจากใบและบิวทานอลจากเปลือกรากมีสารฟลาโว-นอยด์ที่มีฤทธิ์ลดความดันโลหิตในหนู (วิโรจน์, 2557)

2.1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากหม่อน

2.1.3.1 อาหารหนอนไหม

ใบหม่อนมีปริมาณโปรตีน 22.60% คาร์โบไฮเดรท 42.25% ไขมัน 4.57% ความชื้น 6.55% เส้นใยและเถ้า 24.03% เป็นพืชอาหารที่วิเศษสุดสำหรับหนอนไหม (Bombyx mori) ซึ่งเป็นไหมบ้านนิยมเลี้ยงโดยทั่วไป ส่วนไหมชนิดอื่นๆซึ่งเป็นไหมป่า บางชนิดใช้ใบละหุ่ง ใบกระท้อน ใบโอ๊ค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือใบมันสำปะหลัง เป็นอาหารได้ นิยมเลี้ยงกันบ้างในประเทศอินเดีย จีน และญี่ปุ่น ปัจจุบันญี่ปุ่นได้พัฒนาพันธุ์ที่สามารถใช้ใบหม่อนและก้านอ่อนของหม่อนเป็นอาหารได้ ตลอดจนพันธุ์ไหมที่สามารถกินพืชตระกูลกระหล่ำได้ เช่น พันธุ์ Asagiri (J 601 x C 601) และพันธุ์ที่กินผลแอปเปิ้ลโดยไม่แสดงอาการเป็นพิษ ตลอดจนปัจจุบันสามารถผลิตอาหารเทียมที่ไม่ใช้ใบหม่อนเป็นส่วนประกอบได้แล้ว แต่การเจริญเติบโตและผลผลิตรังไหมก็ไม่สมบูรณ์เท่าเทียมกับการใช้หม่อนเป็นอาหาร เนื่องจากหนอนไหมมีความสามารถในการเปลี่ยนโปรตีนจากใบหม่อนเป็นเส้นใยไหมได้ดีกว่าพืชชนิดอื่น ใบหม่อน 108-120 กิโลกรัม สามารถเปลี่ยนเป็นรังไหมได้ประมาณ 6-7 กิโลกรัม เมื่อสาวเป็นเส้นไหมจะได้ประมาณ 1 กิโลกรัม อุตสาหกรรมการผลิตไหมทั้งขนาดเล็ก ขนาดใหญ่ และในครัวเรือนยังคงต้องปลูกหม่อนไว้สำหรับเลี้ยงไหม (กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556)

2.1.3.2 พืชสมุนไพร

ตำราสมุนไพรจีนกล่าวถึงสรรพคุณของหม่อนไว้อย่างมากมาย เช่น ยอดหม่อนนำมาต้มใช้ดื่มและล้างตา เพื่อบำรุงสายตา ส่วนใบหม่อนนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นพบว่า สามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอลในกระต่าย ลดปริมาณน้ำตาลในเลือด ลดความดันโลหิตและลดอัตราการตายของหนูที่มีสาเหตุจากมะเร็งในตับได้ กิ่งหม่อนช่วยทำให้เลือดไหลเวียนสะดวก รักษาอาการปัสสาวะสีเหลือง กลิ่นฉุนเกิดจากความร้อนภายใน ทำให้ลำไส้ทำงานได้ดี ขจัดความร้อนในปอดและกระเพาะอาหาร ขจัดการหมักหมมในกระเพาะอาหารและเสลดในปอด นอกจากนั้นยังใช้รักษาอาการปวดมือเท้าเป็นตะคริว เหน็บชา โดยใช้กิ่งหม่อนและโคนต้นหม่อนเก่าๆมาตัดเป็นท่อน ผึ่งไว้ให้แห้ง นำมาต้มดื่มก็สามารถขจัดโรคดังกล่าวได้ ผลหม่อนรักษาโรคไขข้อ บำรุงหัวใจบำรุงผมให้ดกดำ ทำให้ตับไม่มีไฟ หัวใจคลายความร้อนรุ่ม เส้นประสาทตาดี รากหม่อนสามารถลดปริมาณน้ำตาลในเส้นเลือด ลดความรุนแรงและรักษาโรคเบาหวานได้ สารอัลคาลอย Deoxnojirimycin (DNJ) จากส่วนเปลือกรากหม่อน Morus nigra ได้นำมาทำเป็นยาชื่อ Homonojirimycin เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน (กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556)

2.1.3.3 สารป้องกันกำจัดโรคพืช

นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น พบว่าเนื้อเยื่อของกิ่งหม่อนบริเวณ Cortex และ Xylem จะสร้างสาร Phytoalexins (PA) ที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อรา จึงทำให้หม่อนมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราบางชนิด เช่น *Stigming mori* และ *Fusarium solanif.*sp. ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้กิ่งหม่อนแห้งตาย และพบว่าสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้จาก epidermal cells ของลำต้นและราก คือ Prenylflavone compounds เช่น luwanon C, morucin , albanin A-H และ albafuran A&B สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rosellinia necatrix* ที่เป็นสาเหตุของโรครากขาวของหม่อนได้ การพัฒนาสารกำจัดโรคพืชชนิดใหม่ด้วยการใช้สารที่สกัดจากส่วนต่างๆ ของหม่อนเป็นความหวังของนักวิชาการโรคพืชในอนาคต นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ได้ค้นพบสารสกัดจากเปลือกรากหม่อน ที่ความเข้มข้น 5,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ชนิด *Pythium* sp. *Phytophthora parasitica* และ *Phytophthora palmivira* ได้ 100% ยับยั้งการเจริญเติบโตของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา *Fusarium oxysporum f.vasinfectum* และ *Botryodiplodia theobrmae* ได้ 78-79% และเชื้อรา *Colletotrichum gloeospoioides* ได้ 61% ในห้องปฏิบัติการ (กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556)

2.1.3.4 ไม้ประดับ

ประเทศในเขตอบอุ่นทั้งในทวีปเอเชีย อเมริกา ยุโรป และออสเตรเลีย เช่น ประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และออสเตรเลีย จะมีการปลูกหม่อนไว้ประดับตามสนามหญ้าหน้าบ้านหรือหลังบ้าน โดยเฉพาะหม่อนย้อยหรือหม่อนระย้า ที่มีลักษณะแตกต่างจากหม่อนทั่วๆไป คือ เมื่อแตกกิ่งใหม่กิ่งจะย้อยห้อยลงมาตามแรงดึงดูดของโลก ไม่ได้ตั้งตรงขึ้นไปเช่นพันธุ์อื่น ทำให้ดูเป็นพุ่มสวยงาม เคยมีผู้นำหม่อนระย้ามาปลูกที่ศูนย์วิจัยหม่อนไหมนครราชสีมาแต่สูญพันธุ์ไปแล้ว ถนนบางสายในประเทศญี่ปุ่น เช่น ที่เมืองมัตสุโมโต้ มีการปลูกหม่อนเป็นไม้ประดับตลอดสาย มีการตัดแต่งให้เป็นพุ่มดูสวยงามไม่แพ้ไม้ชนิดอื่น ชาวไทยยังไม่นิยมใช้หม่อนเป็นไม้ประดับอาจจะเป็นเพราะว่าพันธุ์พื้นเมืองไม่มีดอกที่สวยงาม ไม่มีผลให้ (กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556)

2.1.3.5 อาหารสัตว์

ใบหม่อนนอกจากใช้เป็นอาหารของหนอนไหมแล้ว ยังมีสัตว์อีกหลายชนิดที่ชื่นชอบรสชาติของใบหม่อน เช่น วัวและควาย การนำใบหม่อนไปเลี้ยงปลา ได้มีการทดลองเลี้ยงไหมด้วยเศษใบหม่อนที่เหลือจากการเลี้ยงไหมไปเลี้ยงปลานิล พบว่าปลานิลมีการอยู่รอดถึง 98% หลังการเลี้ยง 6 เดือน ในขณะที่การเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชลอยน้ำอยู่รอด 94% แม้ว่าน้ำหนักปลาที่ได้จะน้อยกว่ากันก็ตาม (93.7 กรัม และ 133.0 กรัมต่อตัว ตามลำดับ) (กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556)

2.1.3.6 ของที่ระลึกและอุปกรณ์กีฬา

ไม้หม่อนที่เหลือจากการตัดแต่งใช้ใบไปเลี้ยงไหมแล้ว กิ่งที่ลอกเปลือกออกและไม่ได้ลอกเปลือกสามารถนำมาประดิษฐ์เป็นของที่ระลึกได้หลากหลายชนิด หรือของใช้ไม้สอยได้หลายอย่าง อาทิ กระเช้า หรือ ตะกร้าใส่แยมฯลฯ กิ่งหม่อนขนาดใหญ่หรือโคนหม่อนนำมาแกะสลักเป็นรูปสัตว์ต่างๆ ทำเป็นพวงกุญแจหรือตั้งประดับในตู้กระจก หรือทำแบบจำลองวัสดุอุปกรณ์ต่างๆเป็นของที่ระลึกหรือทำเป็นอุตสาหกรรมในครอบครัวจำหน่ายได้ ในประเทศอินเดีย มีการใช้ไม้หม่อนทำอุปกรณ์กีฬา เช่น ไม้เบสบอล คริกเก็ต และอื่นๆ อุปกรณ์กีฬาที่ทำจากไม้หม่อนถือว่ามีคุณภาพสูง (กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556)

2.1.3.7 ปุ๋ยและเชื้อเพลิง

ในประเทศอินเดีย บังคลาเทศ และศรีลังกามีการใช้กิ่งหม่อนที่ได้จากการเลี้ยงไหมตลอดจนตอหม่อนที่หมดอายุมาเป็นเชื้อเพลิงดังแสดงในรูปที่ 2.6 สำหรับประเทศไทยพบว่ามีการนำหม่อนมาใช้เป็นเชื้อเพลิงน้อยมาก เนื่องจากนำไปทำเป็นปุ๋ยหมัก หรือปุ๋ยพืชสดใส่ในแปลงหม่อนแทน (กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556)

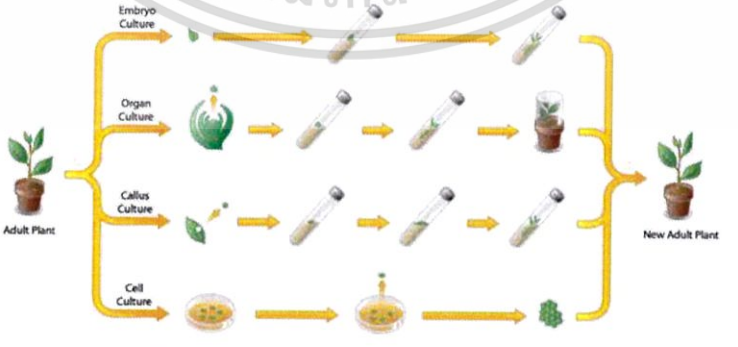
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.6 เชื้อเพลิงจากหม่อนและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

ที่มา: http://www.monmai.com/media/2013/12/chearpleangkeaw.jpg

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) หมายถึงการนำชิ้นส่วนพืช (เช่น ลำต้น ใบดอก ตา เป็นต้น) มาทำให้สะอาดปราศจากโรค แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ในสภาพปลอดเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคหนึ่งในกลุ่มของเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ โดยการนำเอาชิ้นส่วนของพืชที่มีขนาดเล็ก เช่น อวัยวะต่างๆ เซลล์ หรือโปรโตพลาสต์ (protoplast) มาเลี้ยงในสภาพหลอดทดลอง (invitro) เช่น ในขวดแก้วที่บรรจุอาหารสังเคราะห์ซึ่งมีองค์ประกอบคือ ธาตุอาหารต่างๆ แหล่งคาร์บอน วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และนำไปเลี้ยงในสภาวะที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และควบคุมสภาวะแวดล้อม ได้แก่ แสง และอุณหภูมิ ชิ้นส่วนของพืชเหล่านี้จะมีการเจริญเป็นต้นพืชโดยตรง หรือเจริญเป็นแคลลัส (callus) หรือเอมบริออยด์ (embryoid) แล้วพัฒนาเป็นต้นต่อไปดังแสดงในรูปที่2.7 เนื่องจากพืชมีคุณสมบัติที่เรียกว่า "Totipotency" คุณสมบัตินี้ก็คือ เซลล์พืชมีความสามารถที่จะเจริญเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งนักวิทยาศาสตร์สามารถบังคับได้ จึงได้นำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆหลายด้าน เช่น การขยายพันธุ์พืช การปรับปรุงพันธุ์พืช การทำให้พืชปลอดโรคหรือใช้ในทางเภสัชกรรมเพื่อผลิตยา เป็นต้น (จารุวรรณ และคณะ, 2553)



รูปที่2.7 ภาพโดยรวมของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ที่มา: http://agritech.tnau.ac.in/bio-tech/biotech_tc_notes_clip_image002.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 ปัจจัยที่มีผลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ อาหารเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยอาหารเพาะเลี้ยงนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง อาหารเพาะเลี้ยงมีมากมายหลายสูตรให้เลือกใช้งาน เช่น สูตร Murashige & Skoog (MS) เป็นสูตรพื้นฐานที่นิยมใช้กับพืชทั่วไป สูตรVacin and Went เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้สกุลต่างๆ สูตร Woody Plant Medium (WPM) เหมาะสำหรับไม้เนื้อแข็ง โดยทั่วไปสูตรอาหารเหล่านี้จะประกอบด้วยธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแตสเซียม (K) ธาตุอาหารรองที่พืชต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อย เช่น โบรอน (B) โมลิมดินัม (Mo) แมงกานิส (Mn) โคบอลต์ (Co) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) ไอโอดีน (I) และธาตุอาหารอื่นๆ เช่น วิตามิน กรดอะมิโน และน้ำตาล นอกจากนี้อาจจะมีส่วนประกอบอื่นๆ เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หรือสารจากธรรมชาติอื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าว มันฝรั่ง กล้วยหอม สารสกัดจากยีสต์ ซึ่งมีสารช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืชรวมอยู่ด้วย (จารุวรรณ และคณะ, 2553)

2.2.2 ประโยชน์การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.2.2.1 เพื่อการขยายพันธุ์

โดยอาศัยอาหารสูตรที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นเป็นทวีคูณ ต้นที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นพืชเพียงต้นเดียว และทำการย้ายเนื้อเยื่อเดือนละครั้ง และแต่ละเดือนต้นพืชสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้ 10 ต้น เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 6 เดือน เราสามารถผลิตต้นพืชในการทดลองถึงล้านต้น ซึ่งไม่มีวิธีอื่นใดที่จะผลิตต้นกล้าพืชให้ได้ปริมาณมากและรวดเร็วเช่นนี้ (จารุวรรณ และคณะ, 2553)

2.2.2.2 เพื่อการปรับปรุงพันธุ์

ในการเลือกเนื้อเยื่อพืชสามารถคัดเลือกสายพันธุ์พืชเพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน (resistant plant) สามารถที่จะชักนำให้เกิดความต้านทานขึ้นในต้นพืช โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเงื่อนไขต่างๆ เช่น การสร้างพันธุ์ต้านทานต่อสารพิษของโรค ต้านทานต่อแมลง หรือต่อยากำจัดวัชพืช เป็นต้น หรือเพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน (tolerance plant) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถที่จะคัดสายพันธุ์ทนทานได้จากการจัดเงื่อนไขของอาหารและสภาวะแวดล้อม เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดเลือกสายพันธุ์ทนต่อดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนร้อน โดยการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง เป็นต้น โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แล้วคัดเลือกเอาสายพันธุ์ดีไว้ ซึ่งอาจทำได้โดยการใช้สารเคมี การฉายรังสี การตัดต่อยีน (DNA recombination) และการย้ายยีน (gene transformation) ยังเปิดโอกาสให้สามารถใช้ประโยชน์ในการสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ (transgenic plant) (จารุวรรณ และคณะ, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.3 เพื่อการผลิตพืชที่ปราศจากเชื้อไวรัส

(Virus-free plant propagation)

ปัญหาสำคัญประการหนึ่งของการผลิตพืช คือ โรค ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรียหรือไวรัส ต้นพืชที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะปราศจากเชื้อราและแบคทีเรียเป็นอันดับแรก เพราะถ้าหากว่ามีอนุภาคของเชื้อเหล่านั้นตกลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก็จะแสดงอาการปนเปื้อนของเชื้อ (contamination) เพราะทั้งอนุภาคของแบคทีเรียและสปอร์ของราสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วบนอาหาร และจะปรากฏกลุ่มโคโลนีของจุลินทรีย์เหล่านั้นที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า เราจึงสามารถเก็บออกมาขจัดทิ้งได้ ส่วนในกรณีของการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสซึ่งเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กมาก และจะสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ก็ต่อเมื่ออาศัยอยู่ในเซลล์ชนิดอื่นฉะนั้นต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสจึงไม่แสดงอาการปนเปื้อนให้เห็น สามารถทราบได้ก็ต่อเมื่อเกิดอาการบนต้นพืช ดังนั้น ก่อนทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องคัดเลือกชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของพืชที่นับว่ามีความปลอดจากเชื้อไวรัสมากที่สุด คือ apical meristem ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่อยู่บริเวณปลายยอดของลำต้น และเนื้อเยื่อของคัพภะ (embryo) ที่อยู่ในเมล็ด เนื่องจากอนุภาคของไวรัสสามารถเคลื่อนย้ายได้ทางท่ออาหาร (phloem) และท่อน้ำ (xylem) เนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีท่อน้ำและท่ออาหารที่จะติดต่อกับส่วนอื่นๆของต้นพืช (จารุวรรณ และคณะ, 2553)

2.2.2.4 เพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite)

พืชบางชนิดสามารถให้สารที่มีคุณสมบัติทางยาหรือมีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมแต่ในบางครั้งปริมาณเนื้อสารที่ต้องการมีอยู่ในปริมาณน้อยมาก จะต้องใช้ชิ้นส่วนพืชจำนวนมากนำมาสกัดแยกการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อของพืชเหล่านั้นในสภาพแวดล้อมและอาหารที่เหมาะสมก็อาจชักนำให้เกิดการสังเคราะห์สารที่เราต้องการได้มากขึ้น (จารุวรรณ และคณะ, 2553)

2.2.2.5 เพื่อการศึกษาทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช (Biochemical and Physiology study)

ต้นพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลองนั้นสามารถที่จะติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายและอย่างใกล้ชิดเช่น การศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อพืชต่อยาฆ่าแมลง ยาปราบศัตรูพืช หรือต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชและการควบคุมตัวแปรต่างๆ ในหลอดทดลองทำได้ง่ายกว่าแปลงทดลอง (จารุวรรณ และคณะ, 2553)

2.2.2.6 เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช (Germplasm conservation, gene bank)

ปัจจุบันพืชพรรณหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไปหรือกำลังจะสูญพันธุ์ไปอย่างน่าเป็นห่วง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมหรือเกิดจากการทำลายของมนุษย์เองด้วย เหตุนี้นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงได้พยายามคิดหาวิธีที่จะเก็บรักษาพืชพรรณต่างๆไว้ในหลอดทดลองโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของสารชะลอการเจริญเติบโตบางชนิดหรือมีสารที่ทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้เกิดความเครียดของน้ำขึ้นในหลอดทดลอง ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามากๆ เพื่อเป็นการประหยัดแรงงาน เวลา และอาหารในการที่จะต้องทำการย้ายเนื้อเยื่อบ่อยๆ จนกว่าเมื่อใดที่ต้องการจะเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อนั้นสามารถย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชชนิดนั้นๆ อีกวิธีหนึ่งก็คือ การเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ในไนโตรเจนเหลวที่ อุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส ในสภาพเช่นนี้เซลล์และเนื้อเยื่อจะคงสภาพและมีชีวิตอยู่ได้ยาวนาน (จารุวรรณ และคณะ, 2553)

2.3 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีการใดหรือใช้ตัวทำละลายใดสารสกัดที่ได้จะเป็นของผสมหรือสารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดออกมาจากพืชสมุนไพร โดยใช้น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลาย (solvent) สารสกัดอย่างหยาบนี้เป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร โดยจะมีทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทั้งทางเภสัชวิทยา (pharmacologically active constituents) ซึ่งมักเรียกว่า สารสำคัญ (active constituents) องค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทั้งทางเภสัชวิทยา (pharmacologically inactive constituents) ซึ่งเรียกว่าสารเฉื่อย (inert substances) ชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบในสารสกัดจะเปลี่ยนไปตามสภาพของสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด (ปรีดา, 2557)

2.3.1 การทำสมุนไพรให้แห้ง

โดยทั่วไปการสกัดจะให้ผลดีเมื่อเราสามารถสกัดสารจากพืชสด โดยการนำเอาพืชสดที่เก็บได้มาต้มกับแอลกอฮอล์ เพื่อทำให้เอนไซม์เสียสภาพก่อนเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง จากนั้นจึงนำไปทำการสกัด หรือนำพืชสดมาแช่แอลกอฮอล์ แต่วิธีการเหล่านี้ไม่สะดวก และไม่เหมาะสมกับอุตสาหกรรม จึงจำเป็นต้องนำเอาตัวอย่างพืชสดมาทำให้แห้งก่อนการทำสมุนไพรให้แห้งจะคงสภาพสมุนไพร ควรจะทำให้แห้งโดยวิธีที่เร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ เพราะอุณหภูมิที่สูงจะทำให้สารสำคัญสลาย หรือเปลี่ยนแปลงไปได้ (รัตนา, 2547)

การทำสมุนไพรให้แห้งอาจทำได้โดย (ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2534)

2.3.1.1. Air drying เป็นการทำให้แห้งด้วยอากาศ อาจจะเป็นการทำให้แห้งในที่ร่ม (shade drying) หรือตากแดด (sun drying)

2.3.1.2. Artificial heat เป็นการทำให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากพลังงานอื่น เช่น ไฟฟ้า ได้แก่ การทำให้แห้งโดยใช้ตู้อบ ซึ่งจะมีการควบคุมอากาศที่ผ่านเข้าออก และอุณหภูมิ วิธีนี้จะดีกว่าวิธีแรกที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้แน่นอน

2.3.2 การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญ

ในการสกัดจะได้ผลดีหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งตัวทำละลายที่ดีควรมีลักษณะเป็นตัวทำละลายที่ต้องการละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดีไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไปถ้าต้องการแยกสี ตัวทำละลายจะต้องไม่มีสี และถ้าต้องการแยกกลิ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวทำละลายต้องไม่มีกลิ่น ไม่มีพิษ มีจุดเดือดต่ำ และแยกตัวออกจากสารที่ต้องการสกัดได้ง่าย ไม่ละลายปนเป็นเนื้อเดียวกับสารที่นำมาสกัดมีราคาพอสมควร

ในการเลือกตัวทำละลายต้องอาศัยหลักเกณฑ์ต่อไปนี้ (ปรีดา, 2557)

1. สารละลาย และตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน

2. ละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุด และในขณะเดียวกันต้องละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด (Selectivity)

3. แรง (Fore) แรงซึ่งเกี่ยวข้องในการละลายที่สำคัญ คือ

3.1 Dispersion force เป็นแรงที่เกิดจาก Transient charger induced ในโมเลกุลจำพวกตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจะประกอบด้วยโมเลกุลซึ่งเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ทำให้พวกสารที่ไม่มีขั้วเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างโมเลกุลได้ง่าย

3.2 Dipole-dipole force เป็นแรงที่พบในตัวทำละลายที่มีขั้วเกิดการเหนี่ยวนำโมเลกุลเกิดเป็นขั้วบวก และขั้วลบ พวกนี้จะทำให้โมเลกุลของตัวทำละลายที่มีขั้วจับกันแน่น พวกสารซึ่งไม่มีขั้วจะแทรกตัวเข้าไปได้ยาก

3.3 H-bonding สารที่สามารถสร้าง H-bonding กับตัวทำละลายได้ดีก็จะละลายได้ดีตัวทำละลายที่นิยมใช้กัน ได้แก่ น้ำ (water), แอลกอฮอล์ (alcohol) หรือสารละลายผสมของสารละลายทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้อาจใช้กรด หรือด่างเติมลงในน้ำยาสกัด เพื่อปรับความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาให้เหมาะสมยิ่งขึ้น ส่วนสารละลายชนิดอื่นๆ เช่น อีเทอร์ (ether) คลอโรฟอร์ม (chloroform) มีใช้บ้างเฉพาะกรณี

ตัวทำละลายที่นิยมใช้ ดังต่อไปนี้ (ปรีดา, 2557)

2.3.2.1 น้ำ

จัดเป็นตัวทำละลายที่ดี หาง่าย ราคาถูก แต่การใช้น้ำอย่างเดียวเป็นตัวทำละลายในการสกัดพืชสมุนไพรมีข้อเสียหลายประการ คือสามารถละลายองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออกมาได้มาก เช่นเดียวกับสารสำคัญที่ต้องการ สารเฉื่อยที่ละลายออกมากับน้ำ เช่น น้ำตาล และแป้งล้วนเป็นอาหารที่ดีของเชื้อจุลินทรีย์ จึงทำให้เกิดการบูดเสียของสารสกัดเนื่องจากจุลินทรีย์ได้ถ้าไม่ใส่สารกันบูด (Preservative) นอกจากนี้น้ำระเหยได้ที่อุณหภูมิสูงในการไล่น้ำออกไปซึ่งอาจเกิดความเสียหายกับสารสำคัญได้ ดังนั้นจึงไม่นิยมใช้น้ำเป็นตัวทำละลายอย่างเดียวเป็นน้ำยาสกัดแต่ใช้ร่วมกับตัวทำละลายอื่นๆเช่น แอลกอฮอล์ หรือกรดหากเติมกรดเล็กน้อยลงไปในน้ำ (acidifiedwater) ใช้สกัดองค์ประกอบสำคัญในพืชสมุนไพรที่มีองค์ประกอบสำคัญเป็นสารประกอบอัลคาลอยด์ ส่วนน้ำที่เติมด่างลงไปเล็กน้อย (alkanised water) จะใช้สกัดพืชสมุนไพรบางชนิด เช่น เปลือกคาสคารา (Cascara bark) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.2 แอลกอฮอล์

จัดเป็นตัวทำละลายที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ แอลกอฮอล์มีข้อดีกว่า เนื่องจากแอลกอฮอล์มีความจำเพาะในการละลายมากกว่าน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หากต้องการทำสารสกัดให้เข้มข้นจะระเหยได้ง่ายแต่ราคาของแอลกอฮอล์จะแพงกว่าน้ำ

2.3.2.3 น้ำยาผสมแอลกอฮอล์ (hydroalcoholic mixture)

เป็นน้ำยาที่สกัดได้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถละลายสารสำคัญในพืชสมุนไพรได้ใกล้เคียงแอลกอฮอล์แต่ราคาถูกกว่า และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้อีกด้วย นอกจากนี้การใช้น้ำยาผสมแอลกอฮอล์ ยังช่วยป้องกันการแยกตัวของสารต่างๆ ในสารสกัดเมื่อตั้งทิ้งไว้ ซึ่งเกิดขึ้นในกรณีที่ใช้น้ำอย่างเดียวในการสกัด

2.3.3 การเลือกวิธีการสกัด

การสกัดสารสำคัญในพืชสมุนไพรมีหลายวิธี ซึ่งวิธีการสกัดที่ดีที่สุดสำหรับพืชสมุนไพร แต่ละชนิดมักได้จากการทดลองขั้นต้น โดยทั่วไปวิธีการสกัดที่เหมาะสมขึ้นกับปัจจัยหลายๆอย่าง ได้แก่ (ปรีดา, 2557)

2.3.3.1 ธรรมชาติของพืชสมุนไพร

โดยพิจารณาจากลักษณะโครงสร้าง และเนื้อเยื่อ สมุนไพรที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เช่น ดอก ใบ อาจสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชัน หากเป็นสมุนไพรที่มีเนื้อเยื่อแข็งแรง และเหนียว เช่น เปลือก ราก เนื้อไม้ ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชัน หรือสกัดแบบต่อเนื่องความสามารถในการละลายของสารสำคัญในน้ำยาสกัด ถ้าละลายได้ง่ายนิยมใช้วิธีดูดซับ แต่ถ้าละลายได้น้อยก็จำเป็นต้องใช้วิธีเพอร์โคเลชัน หรือการสกัดแบบต่อเนื่องความคงตัวของสารสำคัญในสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อนควรใช้วิธีมาเซอเรชัน หรือเพอร์โคเลชัน

2.3.3.2 คุณค่าของสารสกัด และค่าใช้จ่ายในการสกัด

หากต้องการสารสกัดที่ไม่ใช่สารสำคัญและมีคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่น รส ของยาต่างๆ ก็อาจใช้วิธีง่ายๆที่ไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่เตรียมไว้ว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

2.3.3.3 ความต้องการที่จะให้ได้การสกัดที่สมบรูณ์ (exhausted extraction) หรือเกือบสมบูรณ์หากต้องการสารสกัดเจือจาง การใช้วิธีมาเซอเรชันก็เพียงพอแล้ว แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นก็ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชัน หรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

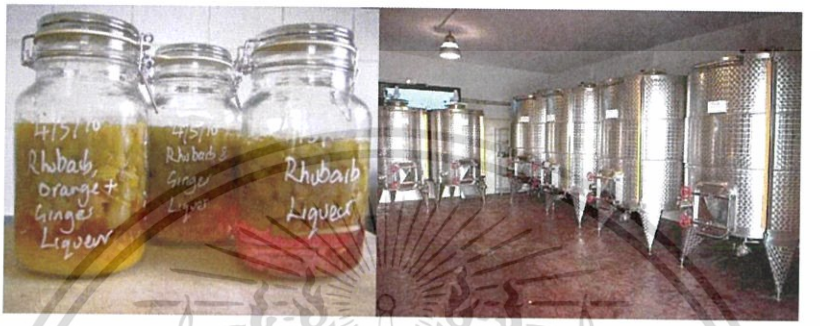
2.3.4 วิธีการสกัด

ในการเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรนั้นมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในพืชกับความคงทนต่อความร้อน และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ ทั้งนี้แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน วิธีเหล่านี้ ได้แก่ (ปรีดา, 2557)

2.3.4.1 Maceration วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด โดยทำการคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารในพืชสมุนไพรแล้วนำพืชสมุนไพรไปใส่ไว้ในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวดรูปชมพู่หรือโถ ทำการเขย่าเป็นเวลา และแช่ไว้อย่างน้อย 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 2.8 จากนั้นนำมากรองแล้วบีบเอาสารสกัดออกมาจากกากสมุนไพรให้ได้มากที่สุด นำสารละลายสมุนไพรที่ได้ไปทำการกรองเอาเศษสมุนไพรที่ติดออกให้หมด แล้วจึงนำสารที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อ วิธีนี้มีข้อดีคือ สารสกัดจะไม่ถูกความร้อน ทำให้โอกาสในการสลายตัวของสารสกัดลดลง ข้อเสียของวิธีนี้คือจะสิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

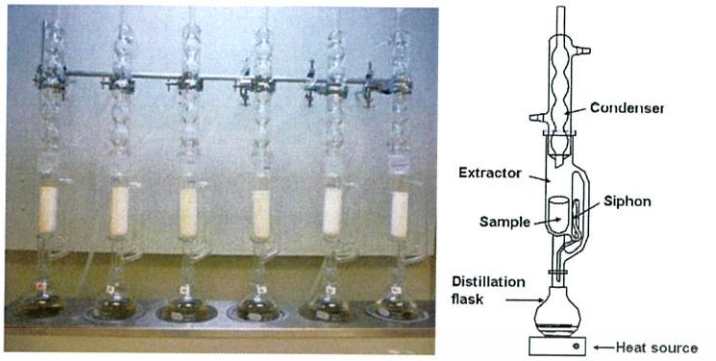


รูปที่ 2.8 การสกัดสมุนไพรโดยวิธีMaceration ในระดับห้องปฏิบัติการและอุตสาหกรรม
ที่มา: http://2.bp.blogspot.com/-8vlzntjFYfE/masceration.jpg

2.3.4.2 Percolation เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่อง โดยนำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้นทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อยบรรจุผงยาที่ละชิ้นลงในอุปกรณ์ที่เรียกว่า Percolator เติมตัวทำละลายไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพรทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วไขสารสกัดออกมา ควรเติมตัวทำละลายไม่ให้แห้ง นำสารที่สกัดได้ไปกรอง วิธีการนี้มีข้อดีเช่นเดียวกับวิธี Maceration คือ สารไม่ถูกความร้อนเป็นวิธีที่ง่าย และสะดวก

2.3.4.3 Soxhlet extraction เป็นวิธีที่ใช้ความร้อนในการสกัดและต้องอาศัยการควบแน่นเข้าช่วย เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องดังแสดงในรูปที่ 2.9 ตัวทำละลายจะต้องมีจุดเดือดต่ำ เมื่อระเหยจะนำสารจากพืชสมุนไพรไปด้วยจากนั้นเมื่อถูกความเย็นก็จะกลั่นตัวลงใน Thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงขึ้นถึงระดับกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับไปในขวดรูปชมพู่ด้วยวิธีกาลักน้ำ ทำตัวละลายก็ระเหยขึ้นแล้วกลั่นตัวกลับมาเป็นตัวทำละลายสกัดสารใหม่วนเวียนไป การใช้ความร้อนอาจทำให้สารที่ระเหยง่ายระเหยออกไป จึงไม่เหมาะกับการสกัดสารจากพืชสมุนไพรที่มีสารที่ระเหยง่ายเป็นองค์ประกอบ วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสำหรับการสกัดสารองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อน และใช้ตัวทำละลายน้อยไม่สิ้นเปลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



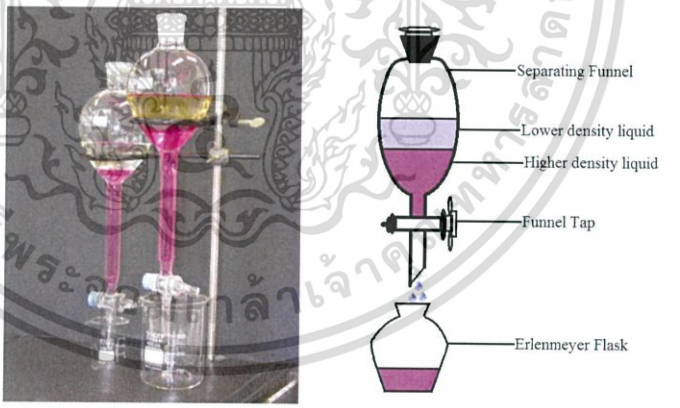
รูปที่ 2.9 แสดงการสกัดสมุนไพรโดยวิธีSoxhlet extraction

ที่มา: http://www.sciencemadness.org/talk/files.php?pid=220782&aid=15826

2.3.4.4 Liquid – LiquidExtraction เป็นการสกัดจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่รวมตัวเป็นสารเนื้อเดียวกันดังแสดงในรูปที่ 2.10 แบ่งได้ 2 ชนิดคือ

1.Extraction lighter คือ ตัวทำละลายที่ใช้สกัดเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

2.Raffinate lighterคือ ตัวทำละลายที่ใช้สกัดหนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร



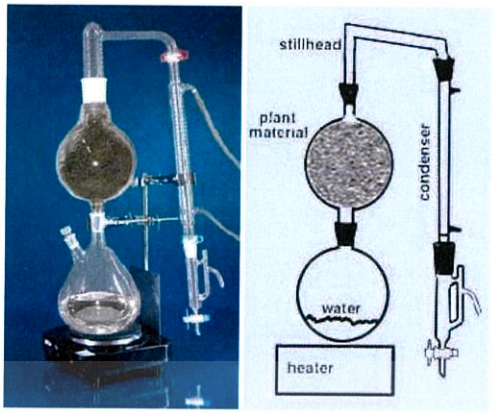
รูปที่ 2.10 แสดงการสกัดสมุนไพรโดยวิธีLiquid – Liquid Extraction

ที่มา: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d1/Liquid_liquid_extraction.png

2.3.4.5. Extraction of volatile oil ใช้สำหรับการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีการต่างๆ หลายวิธี เลือกใช้ตามความเหมาะสมของพืชแต่ละชนิด เช่นการดูดซับ การใช้ตัวทำละลาย วิธีการบีบ การกลั่นโดยน้ำหรือไอน้ำดังแสดงในรูปที่ 2.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 2.11 แสดงการสกัดสมุนไพรโดยวิธีExtraction of volatile oil
ที่มา: https://s-media-cache-ak0.pinimg.com/236x/d4/ca/b6.jpg

2.3.5 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักมีปริมาตรมาก หรือเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนลำบากจึงจำเป็นต้องทำให้เข้มข้นเสียก่อน ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี (ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2534)

2.3.5.1 การระเหย (Free Evaporation) เป็นการนำตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือแผ่นความร้อน (hot plate) วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสารสกัดสลายตัวได้ เนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไป และหากใช้สารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในการสกัดการระเหยโดยให้ความร้อนโดยตรง (direct heat) บนแผ่นความร้อนอาจเกิดอันตรายได้ง่าย นอกจากนี้ควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดการสลายตัวของสาระสำคัญเมื่อใช้ความร้อน

2.3.5.2 การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (distillation in vacuum) จัดเป็นวิธีที่นิยมที่สุด เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศ (vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า Rotary evaporatorดังแสดงในรูปที่ 2.12

รูปที่ 2.12 แสดงการกลั่นในภาวะสุญญากาศด้วยเครื่องมือ Rotary evaporator
ที่มา : http://i00.i.aliimg.com/img/pb/764/750/402/402750764_564.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
149299

2.3.5.3 การทำให้แห้ง (drying) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดจนแห้ง ได้สารสกัดออกมาในสภาพของแข็ง หรือกึ่งของแข็ง มีหลายวิธี เช่น การใช้ความเย็น (lyophilizer หรือ freeze dryer) หรือการใช้ความร้อน (spray dryer) ฯลฯ

2.3.5.4 อัลตราฟิลเทรชัน (ultrafiltration) เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นเมมเบรน (membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) สูงกว่า 5,000

2.4 การทำสารให้บริสุทธิ์

การทำสารให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย การตกผลึก การกลั่น และการสกัด วิธีการแยกสารอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้แพร่หลายมาก คือ วิธีโครมาโตกราฟี วิธีนี้สามารถแยกสารที่ผสมกันอยู่โดยอาศัยหลักการที่ว่าสารต่างชนิดกันจะกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคนิ่ง (Stationary phase) หรือตัวดูดซับ และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) หรือตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน สารต่างชนิดกันจึงเดินทางผ่านวัฏภาคนิ่งออกมากับวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ไม่พร้อมกันจึงเกิดการแยกขึ้น ในปัจจุบันมีเทคนิคทางโครมาโตกราฟีหลายประเภทจำแนกไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 โครมาโตกราฟีแบบต่าง ๆ

โครมาโตกราฟี	วัฏภาคนิ่ง	วัฏภาคเคลื่อนที่	หลักการทำงาน
Column Chromatography	Solid	Liquid	Adsorption
Thin-Layer Chromatography (TLC)	Solid	Liquid	Adsorption
Gas-Solid Chromatography	Solid	Gas	Adsorption
Paper Chromatography	Liquid	Liquid	Partition
Gas-Liquid Chromatography	Liquid	Gas	Partition

เทคนิคทางโครมาโตกราฟี ที่สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง และยังมีการใช้งานกันทั่วไป ได้แก่ คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography) และทินแลร์โครมาโตกราฟี (thin-layer chromatography) (คลังความรู้สู่ความเป็นเลิศทางวิทยาศาสตร์ คณิตศาสตร์และเทคโนโลยีสถาบันส่งเสริมการสอน, 2554)

2.4.1 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography)

คอลัมน์โครมาโตกราฟีดังแสดงในรูปที่ 2.13 เป็นเทคนิคที่นิยมใช้แยกสารต่างๆมากมายหลายชนิด อาทิ การแยกองค์ประกอบต่างๆ ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ การแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากปฏิกิริยา เทคนิคนี้สามารถปรับขนาดคอลัมน์ให้เหมาะกับปริมาณสารที่ต้องการแยกได้ โดยมีวัฏภาคนิ่งที่เป็นของแข็ง เช่น ซิลิกาเจล($SiO_2.xH_2O$) บรรจุอยู่ในคอลัมน์ยาว จากนั้นจึงเติมสารผสมที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการแยกลงไปด้านบนของคอลัมน์ก่อนที่จะผ่านตัวทำละลายที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ลงไปเพื่อทำให้เกิดการแยกวัฏภาคนิ่งจะมีแรงดึงดูดกับสารชนิดต่างๆด้วยความแรงต่างกัน ซิลิกาเจลมีความมีขั้วสูง จึงมีแรงดึงดูดกับสารที่มีขั้วมากๆได้แข็งแรงกว่าสารไม่มีขั้ว ดังนั้นตัวทำละลายหรือวัฏภาคเคลื่อนที่จึงชะสารต่างชนิดออกมาไม่พร้อมกัน สารที่ถูกดูดซับไว้ได้ดี (สารมีขั้วสูง) จะออกมาจากคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับได้ไม่ดี (สารมีขั้วต่ำ)

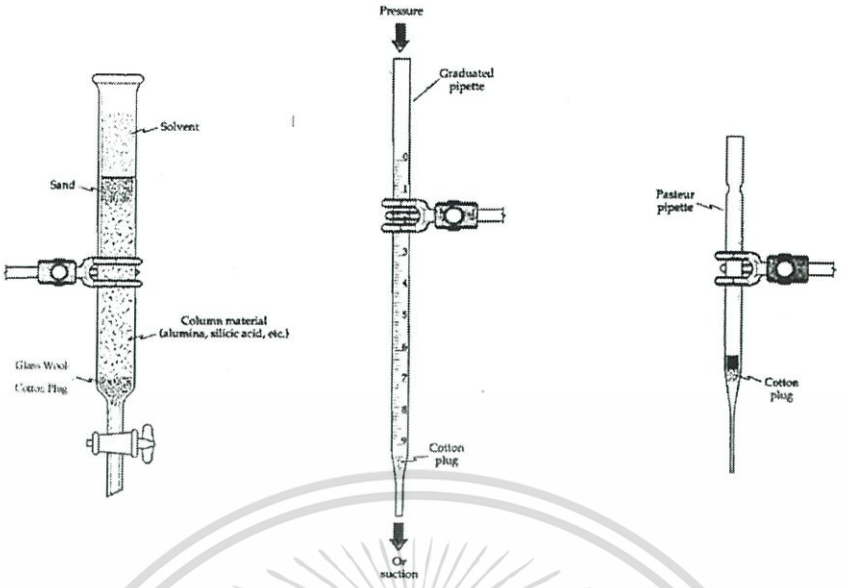
สารที่นิยมใช้เป็นวัฏภาคนิ่ง ได้แก่ ซิลิกาเจล อะลูมินา เซลลูโลส ชูโครส แป้ง แคลเซียม-คาร์บอเนต โดยซิลิกาเจลและอลูมินาเป็นวัฏภาคนิ่งที่ได้รับความนิยมมากที่สุด โดยทั่วไปอลูมินาจะมีขั้วสูงกว่าซิลิกาเจล ซิลิกาเจลนั้นใช้ในการแยกสารได้เกือบทุกชนิด ยกเว้นสารที่มีขั้วมากๆ หรือสารที่มีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นเบสมากๆ ส่วนอลูมินานั้นมีความว่องไวในการดึงดูดสารตัวอย่างหรือกัมมันตภาพ (activity) หลายระดับขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำ (ค่า X) ที่อยู่ในโครงสร้างของ $Al_2O_3.xH_2O$ พวกที่ปราศจากน้ำจะมีแอคติวิตี้สูงสุด เมื่อเติมน้ำลงไปก็จะมีแอคติวิตี้ลดลงตามลำดับ

ปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดว่าสารตัวอย่างจะออกมาเร็วหรือช้าอย่างไร และการแยกจะเป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพดีหรือไม่ ได้แก่ แรงดึงดูดระหว่างสารตัวอย่างกับวัฏภาคนิ่ง และการละลายของสารตัวอย่างในวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนั้น ความมีขั้วของสารที่จะแยกและความมีขั้วของตัวทำละลายที่เลือกใช้ (วัฏภาคเคลื่อนที่) จึงมีผลต่อการแยกมาก โดยทั่วไปแล้วพอจะเรียงลำดับความมีขั้วของสารได้ ดังนี้ alkanes < alkenes < dienes < aromatic hydrocarbons < ethers < esters < ketones < aldeheydes < amines < phenols < alcohols และ organic acids ตามปกติสารไม่มีขั้วจะเคลื่อนที่ลงมาอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามมวลโมเลกุลก็มีผลด้วยเช่นกัน กล่าวคือถ้าสารไม่มีขั้วซึ่งมีมวลโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าสารที่ไม่มีขั้วที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า

ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี มักเริ่มต้นด้วยการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีขั้วน้อยๆ เพื่อชะสารที่ถูกดูดซับไว้ไม่ดีออกมาก่อน จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วมากขึ้นตามลำดับ เพื่อชะสารที่ถูกดูดซับได้ดีขึ้นตามลำดับ ในบางกรณีถ้าหาตัวทำละลายเดี่ยวที่มีขั้วตามต้องการไม่ได้ก็อาจจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายผสม

ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตรกราฟีเรียงตามลำดับจากมีขั้วน้อยไปมาก ได้แก่ petroleum ether หรือ hexane < cyclohexane < chloroform < carbon disulfide < diethyl ether < dichloromethane < ethyl acetate < acetone <2-propanol < ethanol < methanol < acetic acid ความสามารถในการชะ (eluent strength) จะมีความสัมพันธ์กับสภาพขั้ว โดยลำดับนี้ เปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับชนิดของตัวดูดซับ (วัฏภาคนิ่ง) ตัวทำละลายที่มีขั้วมากจะมีความสามารถในการชะสูงกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยเมื่อตัวดูดซับเป็นสารมีขั้ว เช่นซิลิกาเจล แต่จะมีความสามารถในการชะต่ำกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยเมื่อตัวดูดซับเป็นสารไม่มีขั้ว เช่น ถ่านกัมมันต์ หรือซิลิกาเจลที่ถูกเคลือบผิวด้วยหมู่ไฮโดรคาร์บอนหรือหมู่ไซเลน (คลังความรู้สู่ความเป็นเลิศทางวิทยาศาสตร์ คณิตศาสตร์และเทคโนโลยีสถาบันส่งเสริมการสอน, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.13 คอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบต่างๆ

ที่มา: http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302275/chapter9

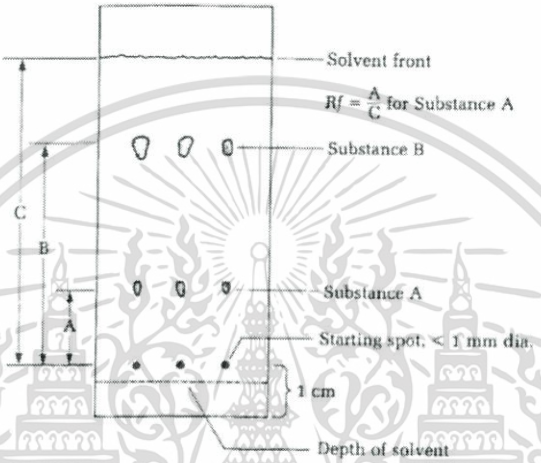
2.4.2 ทินแลร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)

ทินแลร์โครมาโตกราฟี (TLC) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่รวดเร็ว สะดวก และราคาไม่แพง นิยมใช้ในการตรวจการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมี ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาร ระหว่างกระบวนการแยกสารในขั้นตอนต่างๆ ใช้ในการยืนยันชนิดของสาร และสามารถตรวจหาจำนวนองค์ประกอบในของผสมดังแสดงในรูปที่ 2.14

หลักการของ TLC นั้น คล้ายคลึงกับคอลัมน์โครมาโตกราฟีจะต่างกันก็เพียงแต่ในกรณีของ TLC วัฏภาคนิ่งจะถูกเคลือบติดไว้ที่แผ่นกระจกแผ่นอลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติกบางๆ สารจะถูกแต้มไว้ที่ใกล้ๆ ปลายด้านหนึ่งของแผ่นโดยใช้หลอดแคปิลลารีจากนั้นจึงนำแผ่นดังกล่าวไปวางลงในภาชนะที่ใส่วัฏภาคเคลื่อนที่ไว้ตื้นๆ เมื่อตัวทำละลายถูกดูดซึมขึ้นไปตามตัวดูดซับด้วย capillary action ก็จะพาสารตัวอย่างขึ้นไปด้วย จึงเกิดการแยกของสารเกิดขึ้นด้วยหลักการเดียวกับคอลัมน์โครมาโตกราฟี ตัวอย่างเช่น หากใช้ซิลิกาเป็นวัฏภาคนิ่งและใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สารที่มีขั้วน้อยจะละลายได้ดีในวัฏภาคเคลื่อนที่แต่ถูกดูดซับด้วยวัฏภาคนิ่งได้น้อยจึงเคลื่อนที่ไปได้ดีด้วยระยะที่มากกว่าสารที่มีขั้วสูงซึ่งละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้น้อยแต่ดูดซับบนวัฏภาคนิ่งได้ดี เนื่องจากใช้สารปริมาณน้อยมากในการแยกเทคนิค TLC จึงเหมาะสมเป็นเครื่องมือวิเคราะห์มากกว่าที่จะเป็นเครื่องมือในการแยกสารเพื่อเก็บแต่ละองค์ประกอบดังในกรณีของคอลัมน์โครมาโตกราฟี ประโยชน์ของ TLC นอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังรวมถึงการใช้ในการทดลองหา ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมก่อนการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (โดยการใช้วัฏภาคนิ่งชนิดเดียวกับที่จะบรรจุลงคอลัมน์ในการทำTLC) รวมถึงการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารที่ออกมาจากคอลัมน์โครมาโต-กราฟีด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวดูดซับที่นิยมใช้ในเทคนิค TLC ได้แก่ อลูมินา และซิลิกาเจล เช่นเดียวกับที่ใช้ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี ดังนั้นระบบตัวทำละลายรวมถึงความเร็วช้าของการเคลื่อนที่ของสารมีขั้วและไม่มีขั้วจึงมีแนวโน้มทำนองเดียวกันกับที่กล่าวไว้ในคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยทั่ว ๆ ไปแล้วนิยมใช้ตัวดูดซับเป็นอลูมินากับสารกลุ่มที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อยๆ เช่น ไฮโดรคาร์บอน อัลคิลเฮไลด์ อีเทอร์ และนิยมใช้ซิลิกาเจลกับสารที่ค่อนข้างมีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ เอมีน เป็นต้น (คลังความรู้สู่ความเป็นเลิศทางวิทยาศาสตร์ คณิตศาสตร์และเทคโนโลยีสถาบันส่งเสริมการสอน, 2554)



รูปที่ 2.14 ตำแหน่งการแต้มสารระดับตัวทำละลาย solvent front ในการทำTLC และการคำนวณ R_f (retention factor)

ที่มา: http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302275/chapter9

2.5 การทดสอบความไวของเชื้อต่อผลิตภัณฑ์ต้านจุลชีพ

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

วิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อผลิตภัณฑ์ต้านจุลชีพมีดังนี้ (ภัทรดล และคณะ, 2551)

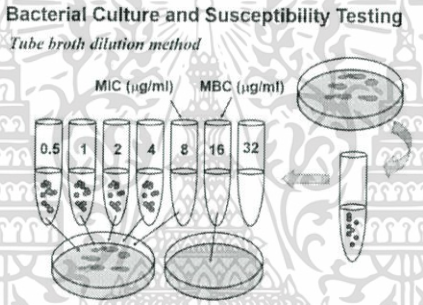
2.5.1 Dilution test

เป็นการทดสอบหาปริมาณ เพราะสามารถทราบค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ทำลายเชื้อได้ นิยมใช้กับเชื้อที่เจริญได้ช้า ใช้ทดสอบยืนยันผลวิธี Diffusion test ที่ให้ความไวปานกลางหรือดื้อยา เพื่อว่าจะสามารถใช้ยานั้นในจำนวนสูงๆได้ และใช้ทดสอบความไวของเชื้อ anaerobe การทดสอบวิธีนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.1 Broth dilution method ทำได้โดยการเจือจางผลิตภัณฑ์ในอาหารเหลวให้ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ลดลงทีละครึ่งตามลำดับ จนมีความเข้มข้นสุดท้ายตามที่ต้องการ แล้วเติมเชื้อที่ต้องการทดสอบลงไปเท่าๆกันทุกหลอด (ปริมาณเชื้อประมาณ 10^5-10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 35-37 องศาเซลเซียส) นาน 18 ชั่วโมง แล้วนำมาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration = MIC) โดยดูจากหลอดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่เจริญเมื่อดูด้วยตาเปล่า และนำไปหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration = MBC) โดยนำหลอดที่เชื้อเจริญทุกหลอดไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ปริมาณผลิตภัณฑ์ในหลอดทดลองที่มาความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อขึ้นคือ MBC ดังแสดงในรูปที่ 2.15

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



รูปที่ 2.15 การทดสอบความไวของเชื้อต่อผลิตภัณฑ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี Broth dilution method
ที่มา : https://s3.amazonaws.com/classconnection/727/flashcards/2998727/jpg/2-150CF4FB8447CED5805.jpg

2.5.1.2 Agar dilution method ทำได้โดยการเจือจางผลิตภัณฑ์ให้มีความเข้มข้นต่างกัน แล้วผสมกับอาหารวุ้นขณะที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส แล้วเทลงจานแก้ว ให้ผลิตภัณฑ์และวุ้นผสมเข้าด้วยกัน จะสามารถผสมผลิตภัณฑ์กับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการ เมื่อวุ้นแข็งแล้ว นำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาแตะเป็นจุดๆให้ห่างกันพอสมควร โดยใช้ loop หรือ multiple inoculators ให้เริ่มเพาะเชื้อจานที่มีความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ต่ำก่อน

ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนจานอาหารเดียวกันได้ และถ้ามีเชื้ออื่นๆปนเปื้อนก็สามารถมองเห็นได้ แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถหาค่า MBC ได้ (ภัทรดล และคณะ, 2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 Diffusion test

วิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุดคือ Disc diffusion method เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพเท่านั้น สามารถบอกผลได้เพียงว่าเชื้อมีความไวต่อผลิตภัณฑ์ มีความไวปานกลางหรือไม่มีการตอบสนองต่อผลิตภัณฑ์ ไม่อาจทราบค่าMIC หรือ MBC ได้ ไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญช้าและแอนแอโรบ แต่อย่างไรก็ตามเป็นวิธีการทดสอบที่ดีที่สุด

หลักการทั่วไปคือ การทำให้ผลิตภัณฑ์ต้านจุลชีพจากที่หนึ่งซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อแบคทีเรียจำนวนพอเหมาะไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลการทดลองโดยการวัดขนาดของบริเวณยับยั้ง (Zone of inhibition) ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสรอบ disc วิธีนี้อาจไม่อ่านผลเป็นความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อโดยตรง เนื่องจากขนาดบริเวณยับยั้งนอกจากจะขึ้นอยู่กับความไวของเชื้อต่อผลิตภัณฑ์ต้านจุลชีพแล้ว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของผลิตภัณฑ์ต้านจุลชีพ ปริมาณและอัตราการเจริญของเชื้อ สภาวะความเป็นกรดด่างและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ เป็นต้น (ภัทรดล และคณะ, 2551)

2.6 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

2.6.1 *Escherichia coli*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) รูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) ไม่สร้างสปอร์เป็น facultative anaerobe เคลื่อนที่โดยใช้ peritrichous flagella เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae และเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) ประเภท fecal coliform ซึ่งเป็นโคลิฟอร์มที่พบในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น จึงใช้เป็นดัชนีบ่งชี้สุขลักษณะของอาหารและน้ำโรคที่เกิดจาก *E. Coli* มีหลายโรค ได้แก่โรคอุจจาระร่วงจะพบในกลุ่มคน 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นเด็กเล็ก เรียกโรคที่เกิดขึ้นว่า infantile diarrhea ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ Enteropathogenic เด็กได้รับเชื้อปนมากับน้ำ น้ำนม อาหาร อีกกลุ่มหนึ่งเป็นโรคอุจจาระร่วงจาก *E. Coli* คือ ผู้ใหญ่ที่เดินทางไปต่างถิ่น เรียกโรคนี้ว่า traveler's diarrhea เกิดจากเชื้อ Enteropathogenic *E. coli* มีระยะฟักตัว 5-15 วัน มีอาการถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ มีไข้ต่ำๆ คลื่นไส้ อาเจียนโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะมักมีสาเหตุมาจากเชื้อที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของผู้ป่วยเอง การติดเชื้อแบบนี้พบบ่อยในผู้หญิง เนื่องจากท่อปัสสาวะค่อนข้างจะสั้นและตรงเข้าสู่กระเพาะปัสสาวะ จึงทำให้เกิดโรคการติดเชื้อที่กระเพาะปัสสาวะ เกิดกระเพาะปัสสาวะอักเสบ ซึ่งอาจจะลุกลามไปยังไตได้ด้วย (นิธิยา และพิมพ์เพ็ญ, 2546ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 Bacillus subtilis

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) อยู่ในวงศ์Bacillaceae ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับ*Clostridium* และ*Desulfotomaculum* เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่า (flaggella) ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) แต่บางชนิดเป็น facultative anaerobe สร้างเอนโดสปอร์ (spore forming bacteria) สปอร์แบคทีเรีย (bacterial spore) ของ *Bacillus* จะทนต่อความร้อน (thermoduric bacteria) ทนต่อความแห้งแล้ง สารเคมี และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆได้ดีสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนในอาหารให้เป็นกรดแอมิโนเป็นจุลินทรีย์สาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย (microbial spoilage) และทำให้อาหารที่เน่าเสียเกิดกลิ่นเหม็น (นิธิยา และพิมพ์เพ็ญ, 2546ข)

2.6.3 Staphylococcus aureus

เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งในสกุล(genus) *Staphylococcus*อยู่ในวงศ์(family) Micrococcaceae เป็นแบคทีเรียก่อโรค (pathogen) ที่สำคัญในอาหารแบคทีเรียชนิดนี้ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive bacteria) มีรูปร่างเป็นทรงกลม (coccus) อยู่รวมกันเป็นพวงคล้ายพวงองุ่น ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming bacteria) ไม่เคลื่อนไหว ส่วนใหญ่ไม่มีแคปซูล ให้ผลบวกในการทดสอบ catalase และในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะสลายน้ำตาลกลูโคสให้กรดอินทรีย์ จัดอยู่ในกลุ่มfacultative anaerobeคือเจริญได้ในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ แต่เจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีอากาศ *Staphylococcus aureus* สร้างสารพิษ (toxin) ชนิดเอนทีโรทอกซิน (enterotoxin) สารพิษที่สร้างมีสมบัติพิเศษ คือ ทนความร้อนจะสามารถทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยได้ มีอาการคลื่นไส้อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้องและอ่อนเพลีย ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการปวดศีรษะ เป็นตะคริวที่กล้ามเนื้อ และมีการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตเป็นระยะๆ รวมทั้งอาจมีการเต้นของชีพจรผิดปกติ ซึ่งโดยทั่วไปอาการจะดีขึ้นภายใน 2-3 วัน ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานสารพิษของร่างกาย ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและปริมาณสารพิษที่สร้างขึ้นในอาหาร รวมทั้งสภาพร่างกายโดยทั่วไปของผู้ที่ได้รับเชื้อด้วย (นิธิยา และพิมพ์เพ็ญ, 2546ค)

2.6.4 Pseudomonas aeruginosa

เป็นแบคทีเรียที่ย้อยติดสีแกรมลบ (Gram-negative bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming bacteria) เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น (aerobic bacteria) การเสื่อมเสียที่มี Pseudomonas เป็นสาเหตุมักเกิดที่ผิวซึ่งสัมผัสกับอากาศ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacteria) ทำให้อาหารที่เก็บรักษาด้วยการแช่เย็น (cold storage) เสื่อมเสียได้ เป็นแบคทีเรียที่ย่อยโปรตีนได้ (proteolytic bacteria) จึงเป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหารที่มีโปรตีน (protein) เป็นส่วนประกอบ เช่น เนื้อสัตว์ (meat) น้ำนม (milk) ไข่ (egg) อาหารทะเล (seafood) สร้างรงควัตถุ (pigment) ที่มีสีต่างๆ ทำให้อาหารเปลี่ยนสี หรือเรืองแสง เช่นไพโอไซยานิน (pyocyanin) มีสีฟ้า ไพโอเวอร์ดิน (pyoverdins) มีสีเหลือง เรืองแสงได้ภายใต้ด้วยแสง UV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไพโอรูบิน (pyorubin) มีสีแดง ไพโอเมลานิน (pyomelanin) มีสีน้ำตาล*Pseudomonas* sp.มีบทบาทสำคัญกับการเสื่อมเสียของอาหาร (food spoilage) การเสื่อมเสียของผักและผลไม้ ทำให้เกิดโรคจุดสีน้ำตาล (brown spot) ในผักผลไม้ *Pseudomonas* สร้างเอนไซม์เพกทิเนส (pectinase) ที่ย่อยเพกทิน (pectin) ได้ ทำให้เกิดโรคของผักและผลไม้ที่เรียกว่า โรคเน่าเละ (soft rot) (นิธิยา และพิมพ์เพ็ญ, 2546ง)

2.6.5 *Micrococcus* sp.

เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram-positive bacteria) อยู่วงศ์ (family) Micrococcaceae ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับ *Staphylococcus* รูปร่างกลม (coccus) การแบ่งเซลล์แบบ binary fissionของแบคทีเรียวงศ์นี้ จะเกิดการแบ่งมากกว่าหนึ่งแนวทำให้เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่มไม่สร้างสปอร์สร้างเม็ดสี (pigment) ได้ ทำให้มีสีต่างๆ เช่น สีชมพู สีแดง สีส้ม มี metabolism แบบ respiratory คืออาศัยปฏิกิริยาออกซิเดทีฟในการเปลี่ยนสารประกอบคาร์บอนเป็นน้ำและพลังงานสามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแต่ไม่ผลิตก๊าซต้องการอากาศในการเจริญ (aerobic bacteria) มีปฏิกิริยา catalase-positive เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophillic bacteria) แต่บางสายพันธุ์เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacteria) เป็นแบคทีเรียนี้ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (microbial spoilage) ได้หลายประเภท เช่นการเสื่อมเสียของน้ำนมการเสื่อมเสียของไข่ การเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์ สัตว์ปีกอาหารกึ่งแห้ง อาหารทะเล ปลาหอย รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอก แฮม (นิธิยา และพิมพ์เพ็ญ, 2546จ)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.7.1 ภัทรดล สงเคราะห์ และคณะ (2551) ได้ศึกษาการเลี้ยงรากหม่อนในอาหารเหลวMS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญ NAA ในปริมาณที่ต่างกัน ในสภาวะที่ให้แสงเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่ให้แสง จากนั้นทดสอบคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ที่มีอยู่ในสารสกัดรากหม่อนที่สกัดด้วยวิธี soxhlet extraction โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีกิจกรรมต้านทานอนุมูลอิสระสูงที่สุด (IC_{50}เท่ากับ 0.419 มิลลิกรัมของสารสกัด) และมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด (2.5860±0.0121 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด) นอกจากนี้ได้ทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากรากหม่อนโดยวิธี disc diffusion พบว่า สารสกัดจากรากหม่อนไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 10231 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 แต่แสดงการยับยั้ง *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2 จันทิมา เกยานนท์ และคณะ (2545) ได้ศึกษาฤทธิ์ของใบชาหม่อนและรากหม่อนในการต้านเชื้อแบคทีเรียทำการสกัดใบชาหม่อนที่ทำจากหม่อน 10 สายพันธุ์ด้วยน้ำร้อน และสกัดรากแห้งจากหม่อน 7 สายพันธุ์ด้วยเมทานอล ผลการทดสอบโดยวิธี Agar diffusion พบว่าสารสกัดจากใบชาหม่อนยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคนได้เพียง 6 ชนิด จากทั้งหมด 42 ชนิดที่นำมาทดสอบขณะที่สารสกัดจากรากหม่อนยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 12 ชนิด ได้แก่ *Corynebacterium diphtheriae, Vibrio cholerae, Staphylococcus aureus, Aeromonas hydrophila, Acinetobacter anitratus, A. lwoffi, Moraxella osloensis, Alcaligenes faecalis, Salmonella choleraesuis, S. paratyphi A,* S. typhimurium และ *Serratia marcescens*

2.7.3 Lakshmi Pethakamsetty และคณะ (2013) ได้ทำการทดสอบหาสารพฤกษเคมีและสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากรากหม่อน *Morus indica* ด้วยการสกัดรากหม่อนแห้งโดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย และทำให้สารสกัดบริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีแยกสารบนแผ่น TLC และระบุชนิดสารด้วยวิธีสเปกโตรสโคปิก พบว่า มีสารสำคัญ 6 ชนิด ได้แก่ β-sitosterol, α-amyrin acetate, salvigenin, morusin, cyclomorusin และcirisimaritin จากนั้นนำสารสกัดรากหม่อนมาทดสอบการยับยั้งจุลิทรีย์ด้วยวิธี cup-plate agar diffusion พบว่าสารสกัดรากหม่อนมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus pumilis, Escherichia coliand, Klebsiella pneumonia*และ *Saccharomyces ceriviseae* ได้ดี

2.7.4 Job U. Ramosและคณะ (2016) ได้ศึกษาสารพฤกษเคมี และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียจากหม่อนสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ Guisang you 12, Alfonso และ S54 ด้วยวิธี paper disc diffusion ทำการสกัดใบหม่อนโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือเอทานอล และน้ำร้อน พบว่า หม่อนสายพันธุ์ S54 ที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*ได้สูงที่สุด มีความกว้างบริเวณยับยั้ง 7.80 มิลลิเมตร รองลงมาคือ สายพันธุ์ Alfonso และGuisang you 12 ตามลำดับ และหม่อนสายพันธุ์ Alfonso ที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้สูงที่สุด มีความกว้างบริเวณยับยั้ง 11.15 มิลลิเมตร รองลงมาคือสายพันธุ์ S54 และGuisang you 12 ตามลำดับ

2.7.5 Mohamed Z.M. และคณะ (2013) ได้ศึกษากิจกรรมการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดจากหม่อน จามจุรี และอินทผาลัม โดยใช้เมทานอล 80% เป็นตัวทำละลายในการสกัดส่วนกระพี้ไม้ แก่นไม้ และเปลือกไม้ของพืชแต่ละชนิด และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion และ 96-well micro-plate พบว่า สารสกัดที่ได้จากแก่นไม้และเปลือกใหม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุด โดยสารสกัดจากหม่อนสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดจากจามจุรีและอินทผาลัมมีฤทธิ์อ่อนกว่า

2.7.6 Nauman Khalid และคณะ (2011) ได้ศึกษากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบของน้ำลูกหม่อนสด ด้วยวิธี Agar-well diffusion น้ำลูกหม่อนสดสามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 8 ชนิดที่นำมาทดสอบได้ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Enterococcus faecalis ATCC 49452, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus spizizenii* ATCC 6633, *Bacillus subtilis* ATCC 19659 และ*Corynebacterium diphtheria* ATCC 39255 แต่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ *Bacillus spizizenii* และ *Bacillus subtilis* ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พืชที่ใช้

3.1.1 ต้นหม่อน สายพันธุ์ *Morus alba* Linn

3.2 วัสดุและอุปกรณ์

3.2.1 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2.2 จานเพาะเลี้ยง (Petri dish)

3.2.3 เครื่องเขย่า (Shaker)

3.2.4 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

3.2.5 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)

3.2.6 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.2.7 เครื่องสกัดแบบซอกห์เลต (Soxhlet extractor)

3.2.8 เครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)

3.2.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.10 ปากคีบ (Forceps)

3.2.11 มีด

3.2.12 Column chromatography

3.2.13 กระดาษกรอง Whatmanเบอร์ 1

3.2.14 แผ่น Thin layer chromatography (TLC)

3.2.15 UV box

3.2.16 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.2.17 โกร่ง

3.2.18 เครื่องวัด McFarland standard

3.2.19 Paper disc

3.2.20 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

3.3 สารเคมี

3.3.1 Methanol

3.3.2 Ethyl acetate

3.3.3 อาหารสำเร็จรูป MS (Murashige and Skoog, 1962)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 อาหารสำเร็จรูป MHA (Mueller Hinton agar)

3.3.5 ผงวุ้น (Agar)

3.3.6 น้ำตาลทราย

3.3.7 Tetracycline

3.3.8 Gentamicin

3.3.9 น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.4.1.1 การเตรียมอาหารแข็งสูตร MS (ภาคผนวก ก)

ชั่งอาหารMSสำเร็จรูป 4.43 กรัม น้ำตาลทราย 30 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร และค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ระหว่าง 5.6–5.8 เติมผงวุ้น 8 กรัม ทำให้ผงวุ้นละลายโดยนำไปต้มหรือใช้ไมโครเวฟจนวุ้นละลายทั้งหมด แบ่งอาหารที่เตรียมได้ใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปิดฝาให้สนิท แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4.1.2 การเตรียมอาหารเหลวสูตร MS (ภาคผนวก ก)

ชั่งอาหารMSสำเร็จรูป 4.43 กรัม น้ำตาลทราย 30 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร และค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ระหว่าง 5.6–5.8 ตวงอาหารเหลวที่เตรียมได้ใส่ในโหลแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงราก โหลละ 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4.2 การเพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหารเหลว

คัดเลือกรากหม่อนที่สมบูรณ์จากต้นหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรMSที่มีอายุ 30 วันตัดรากหม่อนบนจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ชั่งน้ำหนักเริ่มต้นของรากหม่อนแล้วใส่ลงในโหลแก้วที่บรรจุอาหารเหลวสูตรMS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าด้วยความเร็ว 110 rpm โดยมีการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของรากหม่อนใน 2 สภาวะ คือ สภาวะที่ให้แสง และสภาวะที่ไม่ให้แสงเป็นระยะเวลา 20 วัน ขั้นตอนทั้งหมดทำในตู้ปลอดเชื้อ

3.4.3 การเก็บรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

เมื่อเพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหารเหลวสูตรMSเป็นเวลา 20 วัน แล้วจึงนำอาหารเหลวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงรากมาวัดปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ (ภาคผนวก ข) และเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลในอาหารเริ่มต้นคือ 30 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงเก็บรากหม่อนจากอาหารเหลวมาชั่งน้ำหนักสดแล้วนำไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักทุก 30 นาที จนมีน้ำหนักคงที่ นำรากหม่อนที่อบแห้งมาบดเป็นผงด้วยเครื่องโกร่งบดละเอียด เก็บใส่ในขวดปิดฝาให้สนิทแล้วเก็บรักษาไว้ในที่มืด เพื่อนำไปใช้สกัดสารต่อไป

3.4.4 การวัดการเจริญเติบโตของรากหม่อน

นำรากหม่อนที่เก็บจากโหลเพาะเลี้ยงแต่ละโหลใส่ในจานเพาะเลี้ยงที่ทราบน้ำหนัก ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักทุก 30 นาที จนมีน้ำหนักคงที่ และคำนวณหาดัชนีการเจริญเติบโตของราก จากสูตร

$$\text{ดัชนีการเจริญเติบโตของราก} = \frac{\text{น้ำหนักสดสุดท้าย} - \text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}$$

3.4.5 การสกัดสารจากรากหม่อนด้วยเครื่องสกัดซอกห์เลต

นำผงรากหม่อนที่ได้จากการอบแห้งมาสกัดด้วยเครื่องสกัดแบบซอกห์เลต (Soxhlet extraction) โดยชั่งน้ำหนักผงรากหม่อน 8 กรัม ใส่ในกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1ที่พับเป็นถุง และใช้เมทานอลปริมาตร 150 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลายในการสกัด ทำการสกัดเป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ได้เป็นสารสกัดหยาบของรากหม่อนเก็บไว้ในขวดแก้วที่ห่อฟรอยด์

3.4.6 การทำให้สารสกัดหยาบบริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

1.นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.4.5 มาทำการแยกองค์ประกอบของสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสเคลื่อนที่ ละลายซิลิกาเจลด้วยเมทานอลจากนั้นบรรจุซิลิกาเจลลงในคอลัมน์แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ซิลิกาเจลเซ็ตตัวเพื่อให้สามารถแยกสารได้ดี

2. ปล่อยเมทานอลทิ้งแล้วเติมเฟสเคลื่อนที่คือ Ethyl acetate: Methanol อัตราส่วน 4: 1 ลงในคอลัมน์เพื่อชะเมทานอลออก จนเหลือเฟสเคลื่อนที่อยู่ในระดับเดียวกับซิลิกาเจล

3. เติมสารสกัดที่ละลายด้วยเมทานอลลงไป 8 มิลลิลิตรจากนั้นเติม Ethyl acetate: Methanol อัตราส่วน 4: 1 ลงไปเพื่อทำการชะสารที่ต้องการแยกออกมา

4. เก็บสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ใส่ลงในขวดแก้ว ประมาณขวดละ 20 มิลลิลิตร จนสารที่ออกจากคอลัมน์มีสีใส

5. เปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอล เพื่อชะตัวอย่างที่ตกค้างออกจากคอลัมน์ให้หมด

6. เติมสารสกัดลงไปอีก 8 มิลลิลิตร และเติม Ethyl acetate: Methanol อัตราส่วน 4: 1 ลงไปเพื่อชะสารที่ต้องการแยกออกมาจากคอลัมน์ แล้วทำตามข้อ 4 และ5 จนกว่าสารสกัดจะหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.7 การศึกษาลักษณะโครมาโทแกรมของสารที่ออกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยเทคนิค Thin-layer chromatography

นำสารสกัดที่ผ่านการแยกจากคอลัมน์โครมาโตกราฟีของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงตลอดเวลา กับไม่ให้แสงมาทำการเปรียบเทียบลักษณะโครมาโตแกรม โดยทำโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง หรือThin-layer chromatography (TLC) ใช้ Ethyl acetate: Methanol อัตราส่วน 4: 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ เพื่อดูความแตกต่างจำนวนแถบของสารที่เรืองแสงภายใต้UV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร แล้วจึงนำสารที่มีลักษณะการเรืองแสงคล้ายกันมารวมกัน

3.4.8 การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากรากหม่อนโดยวิธี Disc diffusion

3.4.8.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่

1. *Escherichia coli* ATCC 25922
2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
5. *Micrococcus luteus* ATCC 9341

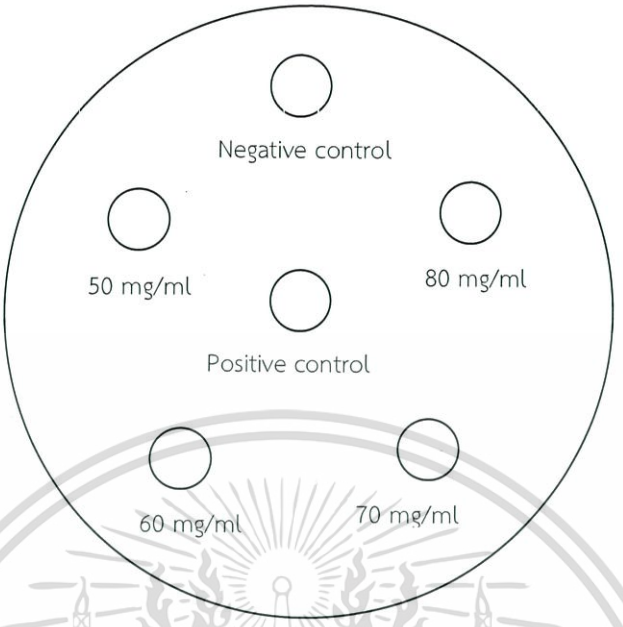
3.4.8.2 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร MHA นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเขี่ยเชื้อมาใส่น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบความขุ่นให้ได้เท่ากับความขุ่นของ McFarland standard No. 0.5 จะได้เชื้อที่มีความหนาแน่นประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.4.8.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ แล้วป้าย (swab) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารMHA วางดิสก์ที่หยดสารสกัดจากรากหม่อนลงบนแผ่นดิสก์ 20 ไมโครลิตรต่อแผ่น โดยมีความเข้มข้นของสารสกัด 50 60 70 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแผ่นดิสก์ชุดควบคุม ใช้เมทานอลเป็นชุดควบคุมทางลบ (negative control) และใช้ยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (Tetracycline) เป็นชุดควบคุมทางบวก (positive control) ยกเว้น*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ใช้เจนตาไมซิน (Gentamicin) โดยมีตำแหน่งในการวางแผ่นดิสก์ดังรูปที่ 3.1 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งเป็นหน่วยมิลลิเมตร โดยการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 ตำแหน่งการวางแผ่นดิสก์บนอาหารMHAที่ใช้ในการทดสอบ

3.4.9. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการทดลองนี้เก็บผลการทดลองในรูปแบบค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 22 โดยใช้วิธีการทดลองแบบสองปัจจัย (Two Factorial Experiment) ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completily Randomize Design)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเจริญเติบโตของรากหม่อนในสภาวะต่างๆ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหารเหลวสูตรMSโดยไม่ใส่ฮอร์โมนในสภาวะที่ต่างกัน คือ เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการให้แสง และเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ให้แสง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน แล้วทำการวัดปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงรากเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 20 วัน แสดงปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวในตารางที่ 4.1 แล้วจึงวัดดัชนีการเจริญเติบโตของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง และสภาวะที่ไม่ให้แสง แสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1 แสดงแผนภูมิแท่งของค่าเฉลี่ยดัชนีการเจริญเติบโตของรากหม่อนในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสง

จากการทดลองพบว่า รากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง และไม่ให้แสงมีการใช้น้ำตาลในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน คือ จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 20 วัน รากหม่อนที่เลี้ยงในสภาวะให้แสง และไม่ให้แสงมีปริมาณน้ำตาลอยู่ 0.161±0.01 และ 0.172±0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับและการเพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะที่ให้แสง และสภาวะที่ไม่ให้แสงมีดัชนีการเจริญเติบโตของรากหม่อนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าเฉลี่ยดัชนีการเจริญเติบโตของรากหม่อนในสภาวะที่ให้แสงและสภาวะที่ไม่ให้แสงเท่ากับ 2.7145±1.04 และ2.5305±0.91 ตามลำดับ

4.2 สารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่ใช้ในการทดลอง

สารสกัดรากหม่อนที่ใช้ในการทดลองได้จากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและในสภาวะที่ไม่ให้แสง ผ่านการอบแห้งและบดให้เป็นผงละเอียดแล้วนำมาสกัดแบบต่อเนื่องด้วยเครื่องสกัดแบบซอกห์เลตทำให้สารสกัดเข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุน ผลที่ได้เป็นสารสกัดหยาบของรากหม่อนจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงมีน้ำหนักแห้ง 2.83 กรัม โดยหลังจากทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีแล้วได้สารสีเหลือง 0.4972 กรัม และสารสีส้ม 1.379 กรัม และสารสกัดหยาบของรากหม่อนจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ให้แสงมีน้ำหนักแห้ง 2.45 กรัม โดยหลังจากทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีแล้วได้สารสีเหลือง 0.4124 กรัม และสารสีส้ม 1.0073 กรัม จากผงรากหม่อน 8 กรัมน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงเป็นเวลา 20 วัน

สภาวะในการเพาะเลี้ยง	ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณน้ำตาลเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)[n]
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	
ให้แสง	0.154	0.168	0.161±0.01
ไม่ให้แสง	0.196	0.147	0.172±0.03

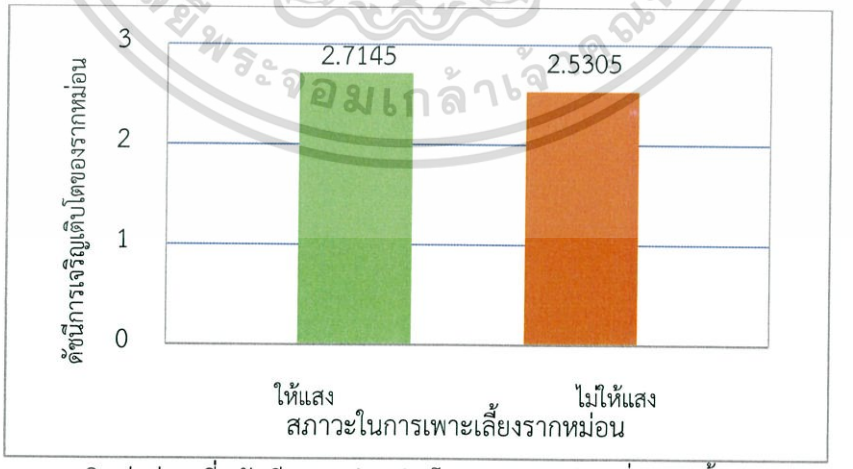
[n]: ปริมาณน้ำตาลเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error, SE)

ตารางที่ 4.2 แสดงดัชนีการเจริญเติบโตของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงเป็นเวลา20วัน

โหลที่	ในที่สว่าง			ในที่มืด		
	น้ำหนักสดเริ่มต้น (g)	น้ำหนักสดสุดท้าย (g)	ดัชนีการเจริญเติบโต[n]	น้ำหนักสดเริ่มต้น (g)	น้ำหนักสดสุดท้าย (g)	ดัชนีการเจริญเติบโต[n]
1	1.65	4.3737	1.6507	1.24	3.425	1.7621
2	1.01	3.8095	2.7718	1.20	3.955	2.2958
3	1.06	5.0043	3.7210	0.74	2.781	3.5335
เฉลี่ย			2.7145±1.04[a]			2.5305±0.91[a]

[n]: ดัชนีการเจริญเติบโตของรากเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error, SE)

[a]: ข้อมูลที่มีอักษรเหมือนกันแสดงถึงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ0.05



รูปที่ 4.1 แผนภูมิแท่งค่าเฉลี่ยดัชนีการเจริญเติบโตของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงและสภาวะที่ไม่ให้แสง เป็นเวลา 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการทำสารสกัดหยาบรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง และสภาวะไม่ให้แสงให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

สารสกัดหยาบของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงและไม่ให้แสงถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี สารสกัดหยาบของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง 2.83 กรัมน้ำหนักแห้ง ละลายด้วยเมทานอล 7 มิลลิลิตร และสารสกัดหยาบของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่ให้แสง 2.45 กรัมน้ำหนักแห้ง ละลายด้วยเมทานอล 6 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายของสารสกัดหยาบ 1 มิลลิลิตรเจือจางด้วยเมทานอล 7 มิลลิลิตร แล้วบรรจุลงในคอลัมน์โครมาโตกราฟีมีซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเอทิลอะซิเตตต่อเมทานอล อัตราส่วน 4:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ทำการเก็บสารที่ออกจากคอลัมน์ใส่ในขวดแก้วโดยเก็บขวดละประมาณ 20 มิลลิลิตร แล้วทำการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอล เพื่อชะสารที่ติดอยู่ในคอลัมน์ออกให้หมด โดยทำการเก็บสารที่ออกจากคอลัมน์ที่ชะด้วยเมทานอลลงในขวดแก้ว โดยเก็บขวดละ 20 มิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.2

รูปที่ 4.2 สารแต่ละแฟรกชันที่ได้จากการแยกสารสกัดหยาบจากรากหม่อนด้วยเทคนิคคอลัมน์-โครมาโตกราฟี

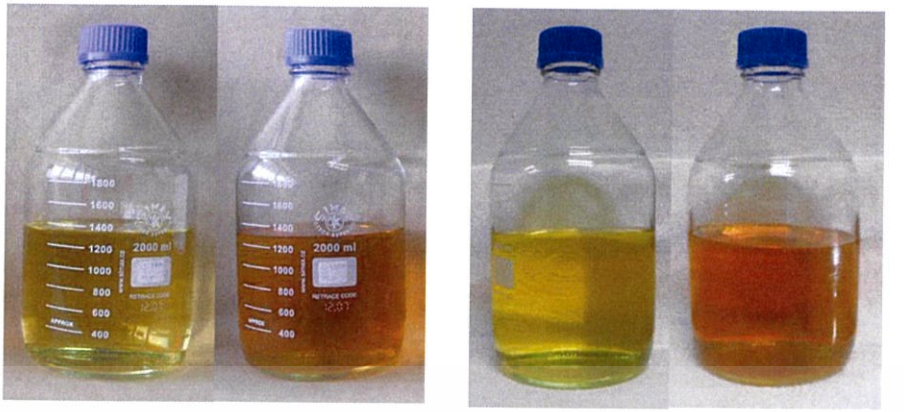
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการแยกสารสกัดหยาบของรากหม่อนด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยแบ่งสารสกัดหยาบของรากหม่อนที่เจือจางด้วยเมทานอลครั้งละ 8 มิลลิลิตร ในสภาวะให้แสงทำการแยกสารสกัดหยาบทั้งหมด 7 ครั้ง และสภาวะไม่ให้แสงทำการแยกสารสกัดหยาบทั้งหมด 6 ครั้งพบว่า สารสกัดที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ทั้งสองชนิดมีสีแตกต่างกัน คือ สารสีเหลืองซึ่งถูกชะด้วยเอทิลอะซิเตตต่อเมทานอลอัตราส่วน 4: 1 และสารสีส้มซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยเมทานอล จากนั้นนำสารแต่ละแฟรกชันที่มีสีเหมือนกันมารวมกัน ดังตารางที่ 4.3 และสารสีเหลืองและสารสีส้มที่นำมารวมกัน แสดงดังรูปที่ 4.3 แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน

ตารางที่ 4.3 แฟรกชันของสารสีเหลือง และสารสีส้มของสารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง และไม่ให้แสงที่นำมารวมกันหลังทำให้สารสกัดหยาบบริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีครั้งละ 8 มิลลิลิตรทำทั้งหมด 7 ครั้ง (สภาวะให้แสง) และ 6 ครั้ง (สภาวะไม่ให้แสง)

ครั้งที่	สภาวะการเพาะเลี้ยง			
	ให้แสง		ไม่ให้แสง	
	แฟรกชัน	สีของสาร	แฟรกชัน	สีของสาร
1.	2 - 13	เหลือง	2 - 12	เหลือง
	29 - 35	ส้ม	21 - 35	ส้ม
2.	3 - 10	เหลือง	3 - 13	เหลือง
	24 - 31	ส้ม	20 - 36	ส้ม
3.	1 - 15	เหลือง	1 - 11	เหลือง
	22 - 31	ส้ม	18 - 33	ส้ม
4.	2 - 14	เหลือง	2 - 11	เหลือง
	24 - 36	ส้ม	26 - 39	ส้ม
5.	2 - 10	เหลือง	1 - 14	เหลือง
	27 - 39	ส้ม	22 - 37	ส้ม
6.	2 - 9	เหลือง	3 - 9	เหลือง
	15 - 26	ส้ม	13- 26	ส้ม
7.	2 - 11	เหลือง	-	-
	27 - 35	ส้ม	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(A) (B)

รูปที่ 4.3 สารสีเหลืองและสารสีส้มจากรากหม่อนที่นำมารวมกัน หลังทำการชะออกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟี (A) สารสีเหลืองและสารสีส้มของสารสกัดจากรากหม่อนที่เจริญในสภาวะที่ให้แสง และ (B) สารสีเหลืองและสารสีส้มของสารสกัดจากรากหม่อนที่เจริญในสภาวะเจริญในที่ไม่ให้แสง

4.4 ผลการศึกษาลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบ สารสีเหลือง และสารสีส้มที่ได้จากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและสภาวะไม่ให้แสงที่ออกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยเทคนิคThin-layer chromatography

เมื่อนำสารที่สกัดได้จากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง และสภาวะที่ไม่ให้แสง ได้แก่ สารสกัดหยาบ สารสีเหลืองและสารสีส้ม มาศึกษาลักษณะโครมาโตแกรมด้วยเทคนิคโคมาโต-กราฟีแบบชั้นบาง (TLC) โดยมีเอทิลอะซิเตตต่อเมทานอลอัตราส่วน 4: 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ สังเกตลักษณะการเรืองแสงของสารภายใต้แสงUV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร และนำลักษณะโครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบ สารสีเหลือง และสารสีส้มจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและสภาวะที่ไม่ให้แสงมาเปรียบเทียบกัน

จากการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและสภาวะไม่ให้แสงมีลักษณะโครมาโตแกรมเหมือนกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.4 และสารสีส้มของสารสกัดจากรากหม่อนในสภาวะที่ให้แสงและสภาวะไม่ให้แสงมีลักษณะโครมาโตแกรมเหมือนกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.4 ลักษณะโครมาโตแกรมของ (A) สารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง (B) สารสกัดหยาบจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่ให้แสง

รูปที่ 4.5 ลักษณะโครมาโตแกรมของ (A) สารสีส้มจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง (B) สารสีส้มจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่ให้แสง

แต่ลักษณะโครมาโตแกรมของสารสีเหลืองมีลักษณะต่างกัน คือ สารสีเหลืองที่ได้จากราก หม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่ให้แสงปรากฏแถบเรืองแสงสีส้ม มีค่า R_f เท่ากับ0.81 ส่วนสารสีเหลือง จากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงไม่ปรากฏแถบเรืองแสงนี้ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และจาก การคำนวณอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่บนเฟสคงที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Retention factor, R_f) ดังแสดงในตารางที่ 4.4พบว่า สารสีเหลืองมีค่า R_f อยู่ระหว่าง 0.87-0.93 และสารสีส้มมีค่า R_f อยู่ระหว่าง 0-0.58

รูปที่ 4.6 ลักษณะโครมาโตแกรมของ (A) สารสีเหลืองจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง (B) สารสีเหลืองจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่ให้แสง

ตารางที่ 4.4 แสดงอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่บนเฟสคงที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (R_f) และลักษณะการเรืองแสงภายใต้แสงUVความยาวคลื่น 365 นาโนเมตรของสารสกัดหยาบ สารสีเหลือง และสารสีส้มจากรากหม่อนบนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC)

สารสกัดจากรากหม่อน	สภาวะการเจริญ	R_f	Visible light	UV light(365 nm)
สารสกัดหยาบ	เจริญในที่มีแสง	0.96	Invisible	Visible
		0.93	เหลือง	Visible
		0.87	Invisible	Visible
		0.81	Invisible	Visible
		0.36	Invisible	Visible
		0.17	Invisible	Visible
	เจริญในที่ไม่มีแสง	0.96	Invisible	Visible
		0.93	เหลือง	Visible
		0.87	Invisible	Visible
		0.81	Invisible	Visible
		0.36	Invisible	Visible
		0.17	Invisible	Visible

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4. 4แสดงอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่บนเฟสคงที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (R_f) และลักษณะการเรืองแสงภายใต้แสงUV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตรของสารสกัดหยาบ สารสีเหลือง และสารสีส้มจากรากหม่อนบนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) (ต่อ)

สารสกัดจากรากหม่อน	สภาวะการเจริญ	R_f	Visible light	UV light(365 nm)
สารสีเหลือง	เจริญในที่มีแสง	0.99	Invisible	Visible
		0.93	เหลือง	Visible
		0.86	Invisible	Visible
		0.81	Invisible	Visible
		0.17	Invisible	Visible
	เจริญในที่ไม่มีแสง	0.99	Invisible	Visible
		0.86	Invisible	Visible
		0.17	Invisible	Visible
สารสีส้ม	เจริญในที่มีแสง	0.97	Invisible	Visible
		0.37	Invisible	Visible
	เจริญในที่ไม่มีแสง	0.97	Invisible	Visible
		0.37	Invisible	Visible

4.5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดจากรากหม่อนโดยวิธี Disc diffusion

นำสารสีเหลือง และสารสีส้มจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง และไม่ให้แสงมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยเตรียมสารที่มีความเข้มข้น 50 60 70 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ด้วยวิธีDisc diffusion แสดงผลการยับยั้งของสารสกัดรากหม่อนแสดงในตารางที่ 4.5-4.6 ภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแสดงในรูปที่ 4.7-4.8 และในตารางที่ 4.7 แสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสีเหลือง และสารสีส้มจากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงและไม่ให้แสงด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดรากหม่อนโดยวิธี Disc diffusion พบว่า สารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสง ที่ความเข้มข้น 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

60 70 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ได้โดยสารสีเหลืองและสารสีส้มที่ได้จากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งอยู่ในช่วง 13.7 – 15.3 มิลลิเมตร และ 8.7 – 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสีเหลืองและสารสีส้มที่ได้จากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ให้แสงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งอยู่ในช่วง 11.3– 12.7 มิลลิเมตร และ 7.7 – 10.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของสารสีเหลืองจากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสง พบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสีเหลืองจากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงแตกต่างจากสารสีเหลืองจากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่ให้แสงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และสารสีเหลืองจากสารสกัดรากหม่อนในสภาวะให้แสงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *M. luteus*ATCC 9341 ได้ดีที่สุด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง 15.3±0.57มิลลิเมตร

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งของสารสกัดจากรากหม่อนที่ได้นี้ มีความขัดแย้งกับงานวิจัยของ Lakshmi Pethakamsetty และคณะ (2013) ซึ่งพบว่า สารสกัดจากรากหม่อน (*Morusindica*) ที่สกัดโดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli*ได้ดี อาจมีสาเหตุจากการใช้ตัวทำละลายที่ต่างกันทำให้ได้สารสกัดที่มีสารที่เป็นองค์ประกอบต่างกัน และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกันด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสารสกัดสีเหลือง และสีส้มจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง

เชื้อที่ใช้ทดสอบ	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มิลลิเมตร)[n] ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	50	60	70	80	P	N
สารสีเหลือง						
Escherichia coli	-	-	-	-	30	-
Bacillus subtilis	-	-	-	-	30	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	30	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	15	-
Micrococcus luteus	13.7±1.2[a]	13.7±0.57[a]	13.7±0.57[a]	15.3±0.57[b]	37	-
สารสีส้ม						
Escherichia coli	-	-	-	-	30	-
Bacillus subtilis	-	-	-	-	30	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	30	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	15	-
Micrococcus luteus	8.7±1.5[a]	10[a]	9.7± 0.58[a]	10[a]	36	-

[n]: ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error, SE)

[a,b]:ข้อมูลที่มีอักษรไม่เหมือนกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ0.05

-: ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

P: ชุดควบคุมทางบวก, N: ชุดควบคุมทางลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสารสกัดสีเหลือง และสีส้มจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ให้แสง

เชื้อที่ใช้ทดสอบ	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มิลลิเมตร)[n]					
	ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	50	60	70	80	P	N
สารสีเหลือง						
Escherichia coli	-	-	-	-	30	-
Bacillus subtilis	-	-	-	-	30	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	30	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	15	-
Micrococcus luteus	11.3±0.58[a]	12.2±0.29[a]	12.3±0.58[b]	12.7±0.58[b]	36	-
สารสีส้ม						
Escherichia coli	-	-	-	-	30	-
Bacillus subtilis	-	-	-	-	30	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	30	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	15	-
Micrococcus luteus	7.7±0.58[a]	7.7±0.58[a]	8.3±0.58[a]	10.3±0.58[b]	37	-

[n]: ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error, SE)

[a,b]:ข้อมูลที่มีอักษรไม่เหมือนกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ0.05

-: ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

P: ชุดควบคุมทางบวก, N: ชุดควบคุมทางลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง*Micrococcus luteus* ได้ดีที่สุดของสารสีเหลือง และสีส้มจากสารสกัดรากหม่อนเพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง และไม่ให้แสง

สภาวะการเพาะเลี้ยง	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง(มิลลิเมตร)[n]	
	สารสีเหลือง	สารสีส้ม
ให้แสง	15.3±0.57[c]	10[a]
ไม่ให้แสง	12.7±0.58[b]	10.3±0.58[a]

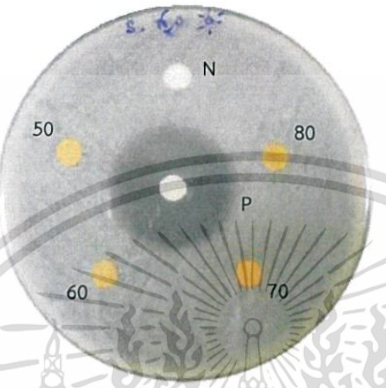
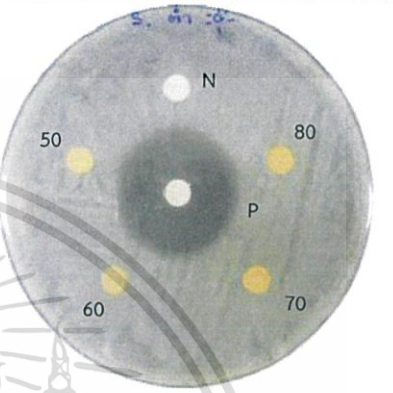
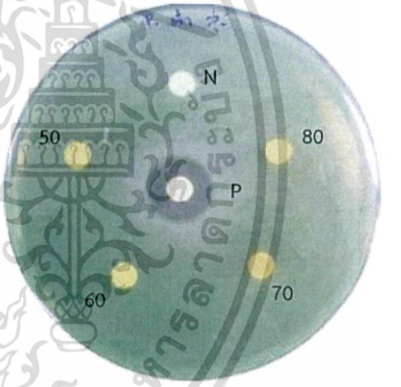
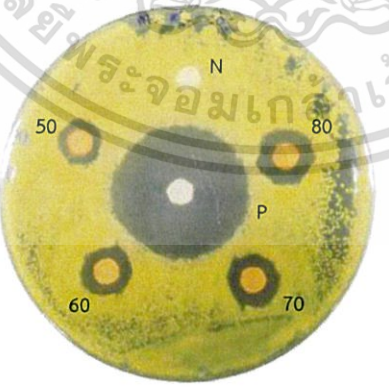
[n]: ขนาดของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error, SE)

[a, b, c]:ข้อมูลที่มีอักษรไม่เหมือนกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

รูปที่ 4.7 แสดงการยับยั้งแบคทีเรียของสารสีเหลือง และสารสีส้มจากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงด้วยวิธี disc diffusion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.7 แสดงการยับยั้งแบคทีเรียของสารสีเหลือง และสารสีส้มจากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงด้วยวิธี disc diffusion (ต่อ)

เชื้อที่ทดสอบ	สารสกัดจากรากหม่อน เจริญในที่มีแสง	
	สารสกัดสีเหลือง	สารสกัดสีส้ม
Staphylococcus aureus ATCC 25923		
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853		
Micrococcus luteus ATCC 6633		

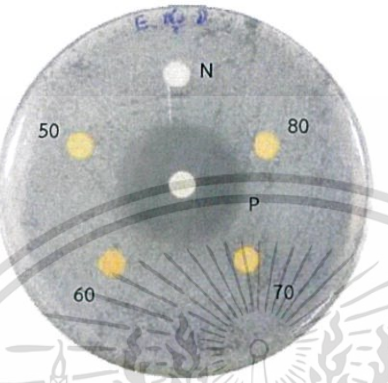
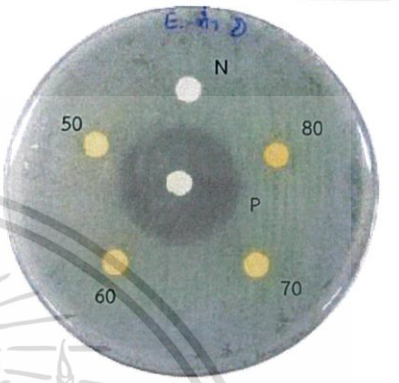
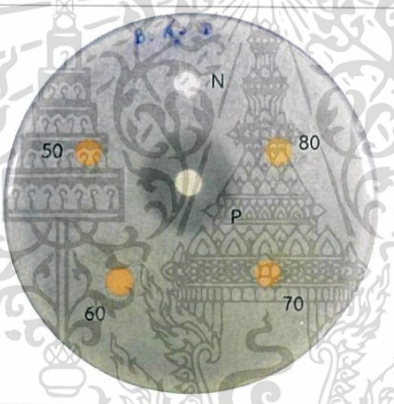
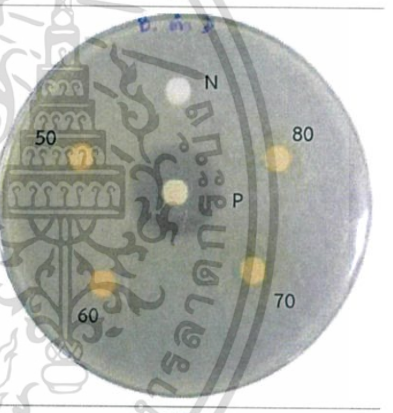
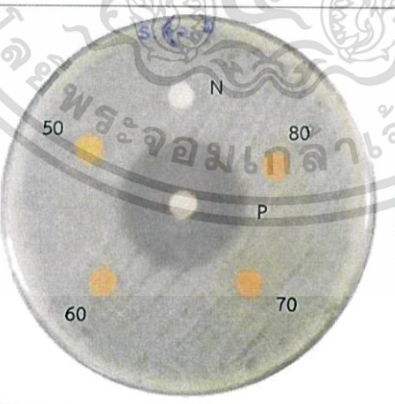
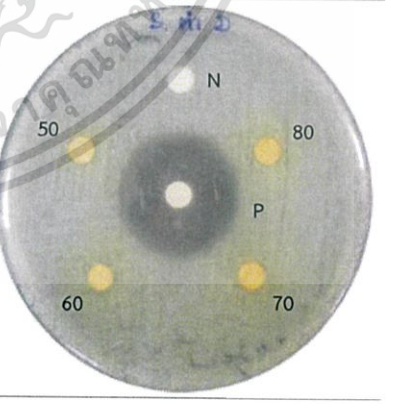
หมายเหตุ P: ชุดควบคุมทางบวก คือ ยาปฏิชีวนะ

N: ชุดควบคุมทางลบ คือ เมทานอล

50, 60, 70, 80: ความเข้มข้นของสารสกัด มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

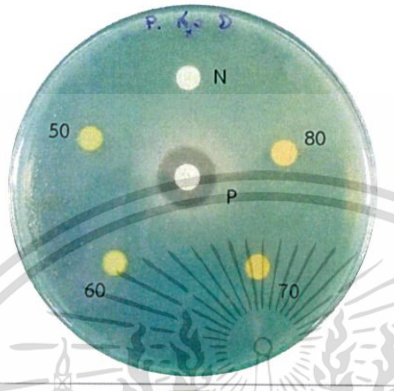
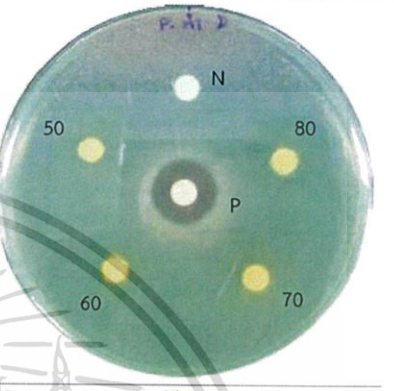
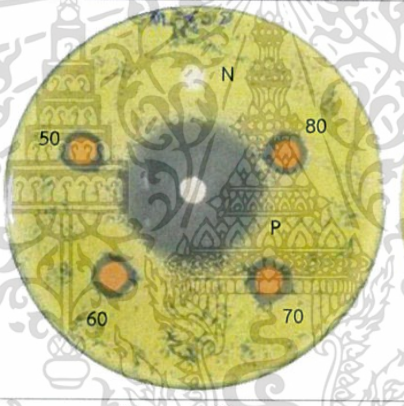
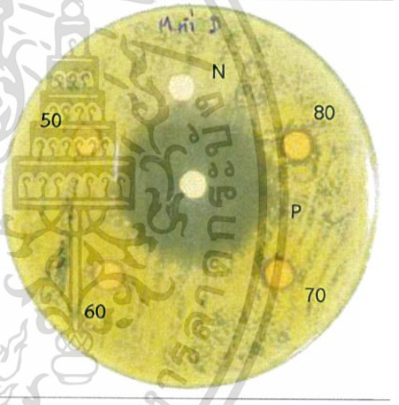
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.8 แสดงผลการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ให้แสงด้วยวิธี disc diffusion

เชื้อที่ทดสอบ	สารสกัดจากรากหม่อน เจริญในที่ไม่มีแสง	
	สารสกัดสีเหลือง	สารสกัดสีส้ม
Escherichia coli ATCC 25922		
Bacillus subtilis ATCC 6633		
Staphylococcus aureus ATCC 25923		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.8 แสดงผลการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ให้แสงด้วยวิธี disc diffusion (ต่อ)

เชื้อที่ทดสอบ	สารสกัดจากรากหม่อน เจริญในที่ไม่มีแสง	
	สารสกัดสีเหลือง	สารสกัดสีส้ม
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853		
Micrococcus luteus ATCC 6633		

หมายเหตุ P: ชุดควบคุมทางบวก คือ ยาปฏิชีวนะ

N: ชุดควบคุมทางลบ คือ เมทานอล

50, 60, 70, 80: ความเข้มข้นของสารสกัด มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหารเหลว MS โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกัน คือ เพาะเลี้ยงรากหม่อนในสภาวะที่ให้แสง และในสภาวะที่ไม่ให้แสง ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าด้วยความเร็ว 110 rpm เป็นเวลา 20 วัน พบว่ารากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่ให้แสงมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน โดยมีดัชนีการเจริญเติบโตเฉลี่ยของรากหม่อนในสภาวะให้แสง และไม่ให้แสงเท่ากับ 2.7145±1.04 และ 2.5305±0.91 ตามลำดับ

จากการศึกษาลักษณะโครมาโตแกรมของสารที่ออกจากคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วยเทคนิค Thin-layer chromatography โดยมีเอทิลอะซิเตต: เมทานอล อัตราส่วน 4: 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ เมื่อสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงUV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร สามารถแบ่งสารได้ 2 ชนิด คือ สารสีเหลือง และสารสีส้ม มีค่า R_f อยู่ระหว่าง 0.87-0.93 และ 0-0.58 ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดหยาบ สารสกัดสีเหลือง และสารสกัดสีส้มของสารสกัดจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่างกันมาศึกษาลักษณะโครมาโตแกรมด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง และสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงUV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบว่า สารสกัดหยาบของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและสภาวะไม่ให้แสงมีลักษณะโครมาโตแกรมเหมือนกัน และสารสีส้มของสารสกัดจากรากหม่อนในสภาวะที่ให้แสงและสภาวะไม่ให้แสงมีลักษณะโครมาโตแกรมเหมือนกัน แต่สารสีเหลืองมีลักษณะต่างกัน คือ สารสีเหลืองที่ได้จากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่ให้แสงปรากฏแถบเรืองแสงสีส้ม มีอัตราการเคลื่อนที่ของสาร (R_f) เท่ากับ 0.81 ส่วนสารสีเหลืองจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงไม่ปรากฏแถบเรืองแสงนี้ และจากการคำนวณอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่บนเฟสคงที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Retention factor, R_f) พบว่า สารสีเหลืองมีค่า R_f อยู่ระหว่าง 0.87-0.93 และสารสีส้มมีค่า R_f อยู่ระหว่าง 0-0.58

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสีเหลือง และสีส้มของสารสกัดจากรากหม่อนทั้งสองสภาวะด้วยวิธี Disc diffusion ที่ความเข้มข้น 50 60 70 และ80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli Bacillus subtilis Staphylococcus aureus Pseudomonas aeruginosa* และ *Micrococcus luteus* พบว่า สารสกัดจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 โดยสารสีเหลืองและสารสีส้มที่ได้จากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งอยู่ในช่วง 13.7 – 15.3 มิลลิเมตร และ 8.7 – 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสีเหลืองและสารสีส้มที่ได้จากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ให้แสงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การยับยั้งอยู่ในช่วง 11 - 12 มิลลิเมตร และ 8 – 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของสารสีเหลืองจากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงและไม่ให้แสง สารสีเหลืองที่ได้จากสารสกัดรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. luteus* ATCC 9341 ได้ดีที่สุด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง 15.3±0.57 มิลลิเมตร

ข้อเสนอแนะ

ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีควรเลือกสารที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่มีคุณสมบัติเหมาะสม และทำให้แยกสารสกัดได้ดี จะทำให้ได้สารสกัดที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ และอาจมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในการเพาะเลี้ยงรากหม่อนในอาหารเหลวควรใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อเร่งให้รากเจริญได้เร็วขึ้น จะทำให้ลดระยะเวลาในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ประโยชน์ของหม่อน, 2556. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.qsds.go.th/qsis_nort/inside_page.php?pageid=87

คลังความรู้สู่ความเป็นเลิศทางวิทยาศาสตร์ คณิตศาสตร์และเทคโนโลยีสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโดย สสวท. คอลัมน์โครมาโตกราฟี, 2554. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.scimath.org/socialnetwork/groups/viewbulletin

จารุวรรณ ชนะมาร, บุษบา ฉายสอน และปิยนุช ศุภเกษตร. 2553. "การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสกัดจากพญาวานร". โครงงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จันทิมา เกยานนท์, พรพิมล นุ่มสงวน, อมรรัตน์ พรหมบุญ และสุนันทา รัตนาโภ. 2545. "ฤทธิ์ของใบชาหม่อนและรากหม่อนในการต้านเชื้อแบคทีเรียและการต้านการกลายพันธุ์". ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จุฑามาศ กิติธรรม. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, 2542. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://sites.google.com/site/cuthamaskitithrrm/kar-pheaa-leiyng-neuxyeux-phuch

ชญานินทร์ อินทรศร, อรรัตน์ แสงแก้ว และอัญญพร แสงแก้ว. 2552. "การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากสารสกัดเปลือกมังคุด". โครงงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชลลดา สร้อยแสง, ปรางทิพย์ มณีสะอาด และลัยลักษณ์ ดีชื่น. 2552. "ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบจากใบมะรุม". โครงงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธีรัตถ์ เหลืองมั่นคง.ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. แพ้ยาคุณแน่ใจได้อย่างไร, 2555. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/91

นิดดา หงส์วิวัฒน์ และทวีทอง หงส์วิวัฒน์. 2550. หม่อนในผลไม้ 111 ชนิด: คุณค่าอาหารและการกิน. กรุงเทพ. หน้า 254

นิธิยา รัตนาปนนท์และพิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. โรคและอาการของโรคที่เกิดจาก *Escherichia coli*, 2546ก. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3938/escherichia-coli

นิธิยา รัตนาปนนท์และพิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. *Bacillus subtilis*, 2546ข. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/6203/bacillus-subtilis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิธิยา รัตนาปนนท์และพิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. *Staphylococcus aureus*, 2546ค. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1197/staphylococcus-aureus-สแตฟิโลค็อกคัส-ออเรียส

นิธิยา รัตนาปนนท์และพิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์.*Pseudomonas aeruginosa*, 2546ง. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1541/pseudomonas

นิธิยา รัตนาปนนท์และพิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. *Micrococcus* sp., 2546จ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1982/micrococcus-ไมโครคอกคัส

ปรีดา บัวยก. การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร, 2557. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://blog.eduzones.com/preeda/print.php?content_id=138718

ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. วิธีการทำสมุนไพรให้แห้ง, 2534 [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www2.eduzones.com/preeda/print.php?content_id=138718

ภัทรดล สงเคราะห์, ญาดา ชพานนท์ และบัณฑิต จันทร์ศรี. 2551. "การเพาะเลี้ยงรากหม่อนเพื่อการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระและสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์". โครงงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. การทำสมุนไพรให้แห้ง, 2547. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www2.eduzones.com/preeda/print.php?content_id=138718

วิโรจน์ แก้วเรือง, หม่อน สรรพคุณและประโยชน์ของต้นหม่อน, 2557. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://frynn.com/%E0%B8%AB%E0%B8%A1%E0%B9%88%E0%B8%AD%E0%B8%99/

Job U. Ramos, Eden S. David and Kristine Grace D. Waing. 2016. Phytochemical screening and antibacterial testing of different varieties of *Morus spp.* (Mulberry)*Journal of Biological Engineering Research and Review*, 3(1):44-48.

Lakshmi Pethakamsetty, Ganapaty,S. and Mary Bharathi, K., 2013.Phytochemical and Antimicrobial Examination of the Root Extracts of MorusIndica.*International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 21(2):75-80.

Mohamed Z.M. Salem, Hussein Aly, YousryGohar and Abdel-Wahab El-Sayed. 2013. Biological Activity of Extracts from *Morusalba* L., *Albizzialebbeck* (L.) Benth. and *Casuarinaglauca* Sieber Against the Growth of some Pathogenic Bacteria. *International Journal of Agricultural and Food Research*, 2(1): 9-22.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nauman Khalid, SardarAtiqFawad and Iftikhar Ahmed. 2011. Antimicrobial activity, phytochemical profile and trace mineral of black mulberry (*Morus nigra* L.) fresh juice. Pakistan Journal of Botany, 43: 91-96.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

1. อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	1,650 mg/l
Calcium chloride ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	440 mg/l
Magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	370 mg/l
Potassium phosphate (KH_2PO_4)	170 mg/l
Potassium nitrate (KNO_3)	1,900 mg/l
Boric acid (H_3BO_3)	6.2 mg/l
Cobalt chloride ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.025 mg/l
Cupric sulfate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.025 mg/l
Ferrous sulfate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	27.8 mg/l
Manganese sulfate ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	22.3 mg/l
Potassium iodide (KI)	0.83 mg/l
Sodium molybdate ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.25 mg/l
Zinc sulfate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	8.6 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37.2 mg/l
i-Inositol	100 mg/l
Niacin	0.5 mg/l
Pyridoxine ·HCl	0.5 mg/l
Thiamine · HCl	0.1 mg/l
Glycine (recrystallized)	2.0 mg/l

ปรับ pH เป็น 5.7±0.1 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Mueller Hinton Agar (MHA)

เป็นอาหารสำเร็จรูป ปริมาณที่ใช้ 38 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

Beef infusion	300 กรัม
CasaminoAcids	17.5 กรัม
Starch	1.5 กรัม
Agar	17 กรัม

ปรับ pH เป็น 5.7±0.1 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

3. Nutrient agar (NA)

เป็นอาหารสำเร็จรูป ปริมาณที่ใช้ 30 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Agar	15 กรัม

ปรับ pH เป็น 7 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

4. วิธีหาปริมาณน้ำตาลซูโครส

การสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส

1. ปิเปต 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครลิตร จากสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ
2. เติม 30% KOH ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน
3. ปิดฝาด้วยลูกแก้ว แล้วนำไปแช่ในในน้ำเดือดนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
4. เติมสารละลายแอนโทรน 3 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ในน้ำอุ่น 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาทีโดยปิดฝาด้วยลูกแก้ว
5. นำมาหาค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร
6. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นสารละลายน้ำตาลซูโครส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การหาปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหารเหลว

1. นำอาหารเหลวกรองเซลล์ออกแล้วมา 100 ไมโครลิตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำ
2. ทำตามขั้นตอนในข้อ 2 ถึงข้อ 5 ของการสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส
3. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลซูโครสจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งค่าที่ได้คือปริมาณน้ำตาลซูโครสจาก 100 ไมโครลิตรอาหาร (ถ้าไม่มีการเจือจาง)

6. การเตรียมสารละลานแอนโทรน

ละลายแอนโทรน 150 มิลลิกรัม ใน 100 มิลลิลิตร ของ 70% H_2SO_4 สีของสารละลายควรเป็นสีเหลือง ซึ่งมีความคงตัวเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมน้ำตาล

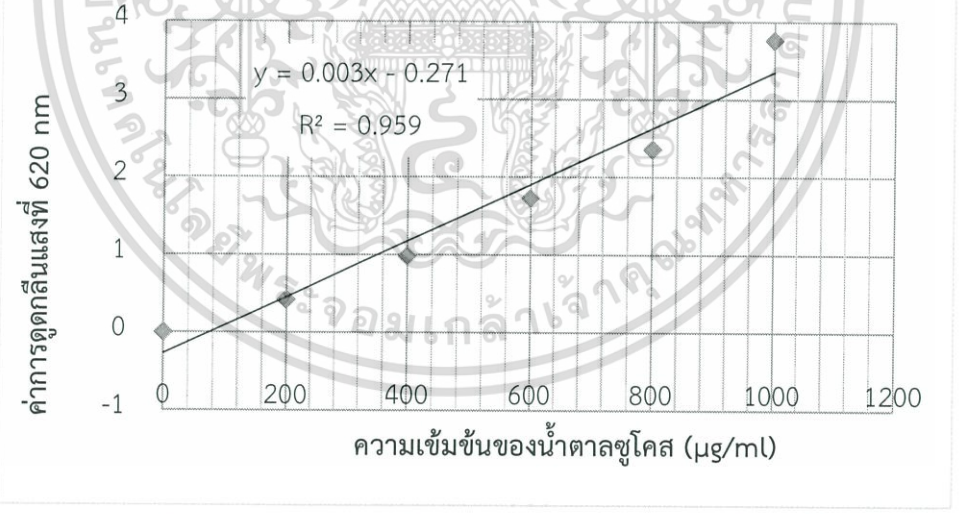
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ผลการทดลองไม่เป็นทางการ

1. ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงแบบที่ให้แสง

ตารางภาคผนวก ข ที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (µg/100 µl)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm
0	0
20	0.416
40	0.760
60	1.118
80	2.358



รูปภาคผนวก ข ที่ 1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสสำหรับรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงแบบให้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเหลวเมื่อเพาะเลี้ยงรากหม่อนแบบมีแสงนาน 20วัน

ตารางภาคผนวก ข ที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงรากหม่อนแบบให้แสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm		เฉลี่ย	ความเข้มข้นของน้ำตาล (g/L)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		
1	0.280	0.287	0.284	0.154
2	0.333	-	0.333	0.168

จากกราฟมาตรฐานได้สมการ y = 0.0036x – 0.2718

เมื่อ X คือ ความเข้มข้นของน้ำตาล (µg/ml)

Y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 620 nm

ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส $X = \frac{y + 0.2718}{0.0036}$

ตัวอย่างที่ 1: ความเข้มข้นของน้ำตาล $= \frac{0.284 + 0.2718}{0.0036}$

$= 154.389$ µg/ml

$= 0.154$ g/L

ตัวอย่างที่ 2: ความเข้มข้นของน้ำตาล $= \frac{0.333 + 0.2718}{0.0036}$

$= 168$ µg/ml

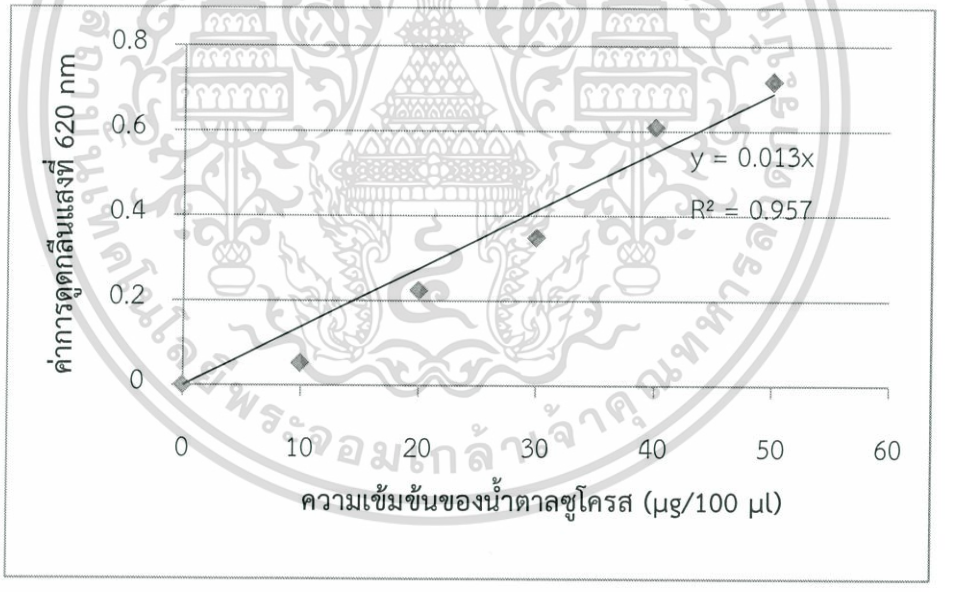
$= 0.168$ g/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงแบบที่ไม่ให้แสง

ตารางภาคผนวก ข ที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (µg/100 µl)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm		เฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	
0	0	0	0
10	0.050	0.056	0.053
20	0.209	0.239	0.224
30	0.351	0.346	0.3485
40	0.648	0.572	0.61
50	0.741	0.692	0.7165



รูปภาคผนวก ข ที่ 2 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสสำหรับรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงแบบไม่ให้แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเหลวเมื่อเพาะเลี้ยงรากหม่อนแบบไม่มีแสงนาน 20 วัน

ตารางภาคผนวก ข ที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงรากหม่อนแบบไม่ให้แสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm		เฉลี่ย	ความเข้มข้นของน้ำตาล (g/L)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		
15	0.251	0.328	0.290	0.223
16	0.394	0.484	0.439	0.338

จากกราฟมาตรฐานได้สมการ y = 0.013x

เมื่อ X คือ ความเข้มข้นของน้ำตาล (µg/100 µl)

Y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 620 nm

ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส $X = \frac{y}{0.0013}$

ตัวอย่าง 15: ความเข้มข้นของน้ำตาล $= \frac{0.290}{0.013}$

$= 22.3077$ µg/100 µl

$= 223.077$ µg/ml $= 0.223$ g/L

ตัวอย่าง 16: ความเข้มข้นของน้ำตาล $= \frac{0.439}{0.013}$

$= 33.7692$ µg/100 µl

$= 337.692$ µg/ml $= 0.338$ g/L

คำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเหลวเมื่อเพาะเลี้ยงรากหม่อนแบบไม่มีแสงนาน 28 วัน

ตารางภาคผนวก ข ที่ 5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงรากหม่อนแบบไม่ให้แสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm		เฉลี่ย	ความเข้มข้นของน้ำตาล (g/L)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		
4	0.259	0.248	0.254	0.1955
19	0.192	0.189	0.191	0.1469

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่าง 4: ความเข้มข้นของน้ำตาล $= \frac{0.254}{0.013}$

= 19.5385 µg/100 µl

= 195.54 µg/ml = 0.1955 g/l

ตัวอย่าง 19: ความเข้มข้นของน้ำตาล $= \frac{0.191}{0.013}$

= 14.6923 µg/100 µl

= 146.923 µg/ml = 0.1469 g/L

3. น้ำหนักรากเริ่มต้น น้ำหนักรากสุดท้าย และน้ำหนักแห้งของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ให้แสง

ตารางภาคผนวก ข ที่ 6 แสดงน้ำหนักผงรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงแบบให้แสงเป็นเวลา20 วัน

โหลที่	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ดัชนีการเจริญเติบโต
1	1.65	4.3737	0.4852	1.6507
2	0.52	4.5832	0.4261	7.8138
3	0.96	5.9685	0.6924	5.2172
4	1.01	3.8095	0.3918	2.7718
5	0.42	3.4017	0.3251	7.0993
6	0.71	6.2623	0.637	7.8201
7	1.06	5.0043	0.7727	3.7210
น้ำหนักผงรากรวม (กรัม)			3.7303	

ตารางภาคผนวก ข ที่ 7 แสดงน้ำหนักผงรากหม่อนที่เลี้ยงแบบให้แสงเป็นเวลา17 วัน

โหลที่	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ดัชนีการเจริญเติบโต
1	2.36	9.4588	1.0449	3.008
2	3.17	8.5692	0.9102	1.7032
3	2.83	9.5065	0.9124	2.3592
4	2.52	7.1978	0.7172	1.8563
5	3.08	10.1713	1.1867	2.3024
น้ำหนักผงรากรวม (กรัม)			4.7714	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. น้ำหนักรากเริ่มต้น น้ำหนักรากสุดท้าย และน้ำหนักแห้งของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ให้แสง

ตารางภาคผนวก ข ที่ 8 แสดงน้ำหนักผงรากหม่อนที่เลี้ยงแบบไม่ให้แสงเป็นเวลา13 วัน

โหลที่	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ดัชนีการเจริญเติบโต
1	1.15	2.4647	0.2091	0.6586
2	0.92	2.1207	0.2385	1.6790
3	0.93	2.4647	0.2074	1.2803
น้ำหนักผงรากรวม (กรัม)			0.655	

ตารางภาคผนวก ข ที่ 9 แสดงน้ำหนักผงรากหม่อนที่เลี้ยงแบบไม่ให้แสงเป็นเวลา14 วัน

โหลที่	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ดัชนีการเจริญเติบโต
1	0.72	3.3631	0.3119	3.671
2	1.35	4.4474	0.4403	2.2944
3	1.15	3.0757	0.3174	1.6745
4	1.29	3.1464	0.3198	1.4391
5	0.9	2.4135	0.2758	1.6817
6	0.71	2.7911	0.2429	2.93113
7	0.86	2.8545	0.2749	2.31919
8	0.94	3.2644	0.3101	2.47277
9	0.64	2.6696	0.2347	3.17125
น้ำหนักผงรากรวม (กรัม)			2.7278	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข ที่ 10 แสดงน้ำหนักผงรากหม่อนที่เลี้ยงแบบไม่ให้แสงเป็นเวลา20 วัน

โหลที่	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ดัชนีการเจริญเติบโต
1	0.93	1.3261	0.1746	0.42591
2	0.73	1.0133	0.1188	0.38808
3	0.63	1.9224	0.2425	2.05143
4	0.68	2.6308	0.3167	2.86882
5	0.84	2.6636	0.2937	2.17095
6	0.74	3.3548	0.3321	3.53351
7	0.74	2.5071	0.2839	2.38797
8	1.14	3.045	0.395	1.67105
9	1.2	3.955	0.477	2.29583
10	1.44	3.349	0.449	1.32569
11	1.21	2.495	0.343	1.06198
12	1.23	2.728	0.385	1.21789
13	0.74	2.781	0.359	2.75811
14	1.24	3.425	0.444	1.7621
15	1.35	3.759	0.5	1.78444
16	0.83	2.683	0.355	2.23253
17	1.15	2.57	0.333	1.23478
น้ำหนักผงรากรวม (กรัม)			5.8023	

ตารางภาคผนวก ข ที่ 11 แสดงน้ำหนักผงรากหม่อนที่เลี้ยงแบบไม่ให้แสงเป็นเวลา28 วัน

โหลที่	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ดัชนีการเจริญเติบโต
1	2.02	2.9111	0.3988	0.44114
2	1.5	4.367	0.5363	1.91133
3	1.15	4.037	0.5088	2.51043
4	1.57	4.9985	0.6407	2.18376
5	0.75	2.9049	0.4036	2.8732

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข ที่ 11 แสดงน้ำหนักผงรากหม่อนที่เลี้ยงแบบไม่ให้แสงเป็นเวลา28 วัน (ต่อ)

โหลที่	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ดัชนีการเจริญเติบโต
6	0.68	1.5901	0.2157	1.33838
7	0.86	3.4468	0.4356	3.00791
8	1.27	5.3241	0.6919	3.1922
9	2.02	2.9111	0.3988	0.44114
น้ำหนักผงรากรวม (กรัม)			3.8314	

ตารางภาคผนวก ข ที่ 12 แสดงดัชนีการเจริญเติบโตของรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงแบบให้แสงกับแบบไม่ให้แสงเป็นเวลา 20 วัน

โหลที่	ในที่สว่าง			ในที่มืด		
	น้ำหนักสดเริ่มต้น (g)	น้ำหนักสดสุดท้าย (g)	ดัชนีการเจริญเติบโต	น้ำหนักสดเริ่มต้น (g)	น้ำหนักสดสุดท้าย (g)	ดัชนีการเจริญเติบโต
1	1.65	4.3737	1.6507	1.24	3.425	1.7621
2	1.01	3.8095	2.7718	1.20	3.955	2.2958
3	1.06	5.0043	3.7210	0.74	2.781	3.5335
เฉลี่ย			**2.7145±1.04**			**2.5305±0.91**

สูตร ดัชนีการเจริญเติบโต = $\frac{\text{น้ำหนักสดสุดท้าย} - \text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดจากรากหม่อน

ตารางภาคผนวก ข ที่ 13 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสารสีเหลืองที่สกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงแบบให้แสง

เชื้อที่ทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			เฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
Escherichia coli ATCC 25922	Positive	30	30	30	30
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
Bacillus subtilis ATCC 6633	Positive	30	30	30	30
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Positive	30	30	30	30
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
	Positive	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข ที่ 13 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสารสีเหลืองที่สกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงแบบให้แสง (ต่อ)

เชื้อที่ทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			เฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
Pseudomonas aeruginosa ACTT 27853	Positive	15	15	15	15
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
Micrococcus luteus ATCC 9341	Positive	36	37	38	37±1.0
	Negative	-	-	-	-
	50	13	15	13	13.7±1.2
	60	13	14	14	13.7±0.57
	70	14	13	14	13.7±0.57
	80	15	15	16	15.3±0.57

ตารางภาคผนวก ข ที่ 14 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสารสีส้มที่สกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงแบบให้แสง

เชื้อที่ทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			เฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
Escherichia coli ATCC 25922	Positive	30	30	30	30
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข ที่ 14 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสารสีส้มที่สกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงแบบให้แสง (ต่อ)

เชื้อที่ทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			เฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
Bacillus subtilis ATCC 6633	Positive	30	30	30	30
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Positive	30	30	30	30
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
	Positive	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa ACTT 27853	Positive	15	15	15	15
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
Micrococcus luteus ATCC 9341	Positive	37	36	36	36.3±0.58
	Negative	-	-	-	-
	50	10	9	7	8.7±1.53
	60	10	10	10	10
	70	9	10	10	9.7±0.58
	80	10	10	10	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข ที่ 15 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสารสีเหลืองที่สกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงแบบไม่ให้แสง

เชื้อที่ทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			เฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
Escherichia coli ATCC 25922	Positive	30	30	30	30
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
Bacillus subtilis ATCC 6633	Positive	30	30	30	30
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Positive	30	30	30	30
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
	Positive	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข ที่ 15 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสารสีเหลืองที่สกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงแบบไม่ให้แสง (ต่อ)

เชื้อที่ทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			เฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
Pseudomonas aeruginosa ACTT 27853	Positive	15	15	15	15
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
Micrococcus luteus ATCC 9341	Positive	36	36	36	36
	Negative	-	-	-	-
	50	11	12	11	11.3±0.58
	60	12.5	12	12	12.2±0.29
	70	12	13	12	12.3±0.58
	80	13	12	13	12.7±0.58

ตารางภาคผนวก ข ที่ 16 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสารสีส้มที่สกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงแบบไม่ให้แสง

เชื้อที่ทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			เฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
Escherichia coli ATCC 25922	Positive	30	30	30	30
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข ที่ 16 แสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสารสีส้มที่สกัดจากรากหม่อนเพาะเลี้ยงแบบไม่ให้แสง (ต่อ)

เชื้อที่ทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			เฉลี่ย (มิลลิเมตร)
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	
Bacillus subtilis ATCC 6633	Positive	30	30	30	30
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Positive	30	30	30	30
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
	Positive	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa ACTT 27853	Positive	15	15	15	15
	Negative	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	60	-	-	-	-
	70	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
Micrococcus luteus ATCC 9341	Positive	37	37	37	37
	Negative	-	-	-	-
	50	7	8	8	7.7±0.58
	60	8	7	8	7.7±0.58
	70	9	8	8	8.3±0.58
	80	10	11	10	10.3±0.58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

รูปภาพ

1. ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นหม่อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 30 วัน

รูปภาคผนวกค ที่ 1 ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นหม่อนในอาหารแข็งสูตร MS (A) กิ่งของต้นหม่อนที่มีตาข้าง (B) ต้นหม่อนที่เจริญจากตาข้างเป็นเวลา 30 วัน (C) รากหม่อนที่เจริญในอาหารแข็งเป็นเวลา 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ลักษณะการเจริญเติบโตของรากหม่อนเป็นเวลา 20 วันที่มีสภาวะการเจริญในที่มีแสง

รูปภาคผนวก ค ที่ 2 ลักษณะการเจริญเติบโตของรากหม่อนในอาหารเหลวสูตรMSที่ไม่ใส่ฮอร์โมน ปริมาตร 200 มิลลิลิตรที่มีสภาวะการเจริญในที่มีแสงเป็นเวลา 20 วัน

3. แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของรากหม่อนเป็นเวลา 20 วันที่มีสภาวะการเจริญในที่ไม่มีแสง

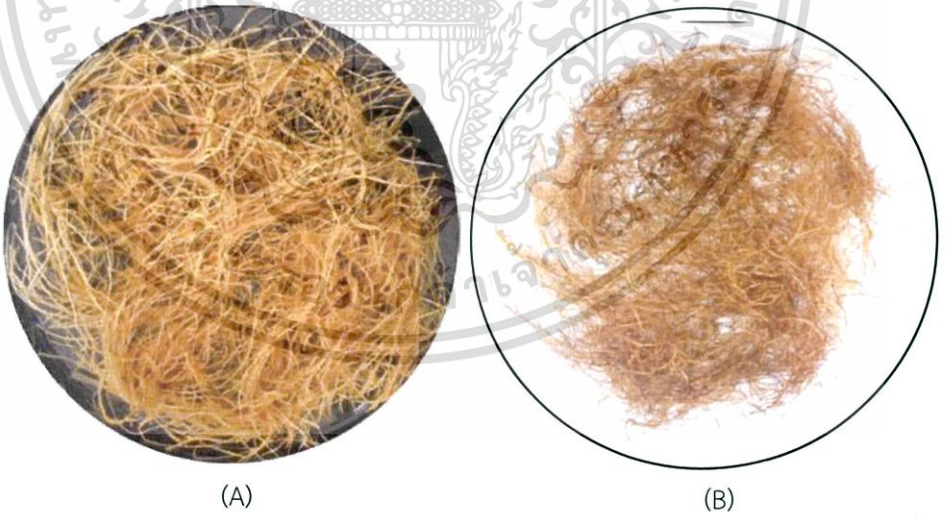
รูปภาคผนวก ค ที่ 3 ลักษณะการเจริญเติบโตของรากหม่อนในอาหารเหลวสูตรMSไม่ใส่ฮอร์โมน ปริมาตร 200 มิลลิลิตรที่มีสภาวะการเจริญในที่ไม่มีแสงเป็นเวลา 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. **แสดงลักษณะทางกายภาพของรากหม่อนที่เจริญในอาหารเหลวสูตร MS ที่เจริญในสภาวะที่มีแสงเป็นเวลา 20วัน**

รูปภาคผนวก ค ที่ 4 ลักษณะทางกายภาพของรากหม่อนที่เจริญในอาหารเหลวสูตร MS ในสภาวะที่มีแสงเป็นเวลา 20 วัน (A) รากหม่อนสด (B) รากหม่อนอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C

5. **แสดงลักษณะทางกายภาพของรากหม่อนที่เจริญในอาหารเหลวสูตร MS ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีแสงเป็นเวลา 20วัน**



รูปภาคผนวก ค ที่ 5 ลักษณะทางกายภาพของรากหม่อนที่เจริญในอาหารเหลวสูตร MS มีสภาวะการเจริญในที่มีแสงเป็นเวลา 20 วัน (A) รากหม่อนสด (B) รากหม่อนอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสีเหลือง และสีส้มสกัดจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง

Oneway

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
yellow	Between Groups	6.250	3	2.083	3.571	.067
	Within Groups	4.667	8	.583		
	Total	10.917	11			
orange	Between Groups	3.583	3	1.194	1.792	.227
	Within Groups	5.333	8	.667		
	Total	8.917	11			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

yellow

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05	
conc	N	1	2
50.0000	3	13.666667	
60.0000	3	13.666667	
70.0000	3	13.666667	
80.0000	3		15.333333
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

orange

Duncan[a]

conc	N	Subset for alpha = 0.05
		1
50.0000	3	8.666667
70.0000	3	9.666667
60.0000	3	10.000000
80.0000	3	10.000000
Sig.		.097

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2. ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารสีเหลือง และสารสีส้มสกัดจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะไม่ให้แสง

Oneway

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Noyellow	Between Groups	3.260	3	1.087	4.977	.031
	Within Groups	1.747	8	.218		
	Total	5.007	11			
Noorange	Between Groups	14.333	3	4.778	14.333	.001
	Within Groups	2.667	8	.333		
	Total	17.000	11			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

yellow

Duncan[a]

conc	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
50.0000	3	11.333333	
60.0000	3	12.166667	12.166667
70.0000	3		12.433333
80.0000	3		12.733333
Sig.		.060	.192

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

orange

Duncan[a]

conc	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
50.0000	3	7.6667	
60.0000	3	7.6667	
70.0000	3	8.3333	
80.0000	3		10.3333
Sig.		.212	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสีเหลือง และสารสีส้มสกัดจากรากหม่อนที่เพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสง กับสภาวะไม่ให้แสง

Oneway

ANOVA

conc80

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	54.000	3	18.000	72.000	.000
Within Groups	2.000	8	.250		
Total	56.000	11			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Clear zone

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05		
condition	N	1	2	3
No light - yellow	3	10.0000		
No light - orange	3	10.3333		
Light - orange	3		12.3333	
Light - yellow	3			15.3333
Sig.		.438	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้