



โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)

รายงานผลการดำเนินงาน

โครงการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นแปะ มะกอกโคกเพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรม
และต่อยอดเทคโนโลยีชีวภาพพืชท้องถิ่น จังหวัดบุรีรัมย์

สนองพระราชดำริ

โดย

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

ปีงบประมาณ พ.ศ.2565

บทคัดย่อ

ต้นแปะและมะกอกโคกถือเป็นต้นไม้ที่ทรงคุณค่าของจังหวัดบุรีรัมย์ทั้งในแง่ของประวัติศาสตร์และสรรพคุณในการรักษาโรคที่ได้รับการบอกเล่ากันมา โดยในปัจจุบันพบว่าพืชทั้งสองชนิดนั้นมีจำนวนน้อยและพบได้เฉพาะบางพื้นที่เท่านั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อขยายพันธุ์ต้นแปะและมะกอกโคกโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเพื่อสกัดและแสดงการออกฤทธิ์ของสารสกัดจาก ต้นแปะ และมะกอกโคก ในการยับยั้งจุลชีพก่อโรค ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำขึ้นส่วนตาข้างและกิ่งอ่อนของมะกอกโคกให้เกิดเป็นแคลลัสที่ดีที่สุดคืออาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 20 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ลักษณะของแคลลัสมีสีเขียวอ่อน สีน้ำตาลอ่อน และเกาะกันแน่น มีขนาดเฉลี่ยความกว้าง 1.5 ซม. และความยาวเฉลี่ย 1.8 ซม. และการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำขึ้นส่วนตาข้างของแปะให้เกิดเป็นแคลลัสที่ดีที่สุดคืออาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/l เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ลักษณะของแคลลัสมีสีเขียว สีน้ำตาลอ่อน ขนาดเฉลี่ยความกว้าง 1.8 ซม. และความยาวเฉลี่ย 2.1 ซม. การสารสกัดกิ่งและใบของต้นแปะและมะกอกโคกด้วยเอทานอลได้ผลได้สารสกัดร้อยละ 6.35 9.65 5.00 และ 11.85 ร้อยละสารสกัด/ปริมาณตัวอย่างสารสกัด ตามลำดับ โดยสารสกัดที่ได้จากใบของแปะและมะกอกโคก มีสีเขียวเข้มมากกว่ากิ่งของแปะและมะกอกโคก สารสกัดจากกิ่งและใบของแปะ และมะกอกโคกถูกนำมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* โดยสารสกัดจากกิ่งของแปะและมะกอกโคกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียได้โซนยับยั้งน้อยกว่าสารสกัดของใบของแปะและมะกอกโคก สารสกัดจากใบมะกอกโคกมีแนวโน้มการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดด้วยการแสดงโซนยับยั้งที่กว้างกว่าสารสกัดจากกิ่งและใบของแปะและกิ่งมะกอกโคก สารสกัดจากมะกอกโคกแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งและทำลายการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิดได้ ด้วยความเข้มข้นต่ำกว่าการใช้สารสกัดจากกิ่งและใบแปะและกิ่งมะกอกโคก จากผลการทดสอบแสดงว่ากิ่งและใบของแปะและมะกอกโคกสามารถออกฤทธิ์ในการต่อต้านการทำลายแบคทีเรียก่อโรคได้ ซึ่งผลการดำเนินการนี้สำคัญอย่างยิ่งในการเข้าใจประโยชน์บางประการของพืชท้องถิ่นทั้งแปะและมะกอกโคก และสำคัญอย่างยิ่งต่อการอนุรักษ์ และใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนพืชท้องถิ่นต่อไปด้วย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

เดิมนั้นจังหวัดบุรีรัมย์มีชื่อเรียกว่า เมืองแปะ ซึ่งเป็นชื่อต้นไม้ชนิดหนึ่ง โดยตามประวัติศาสตร์เมืองบุรีรัมย์ระบุว่า ในสมัยกรุงธนบุรี พระยาจักรีเดินทางมาพบเมืองร้างอยู่บริเวณลำห้วยจะเข้มากร จึงให้ตั้งเมืองแล้วเรียกชื่อเมืองตามต้นไม้ที่อยู่วัดบริเวณนั้น “ต้นไม้แปะ” จึงเป็นต้นไม้ประจำจังหวัดบุรีรัมย์ ต่อมากรมส่งเสริมวัฒนธรรมกระทรวงวัฒนธรรม ได้ประกาศผลการคัดเลือกต้นไม้ “รุกข มรดกของแผ่นดิน ใต้ร่มพระบารมี” และต้นไม้ที่พบในอุทยานประวัติศาสตร์พนมรุ้ง ตำบลตาเป็ก อำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดบุรีรัมย์ เป็น 1 ใน 63 ต้นไม้ ที่ได้รับการคัดเลือก ประกาศ ณ วันที่ 13 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561 ต้นแปะจึงเป็นต้นไม้ประวัติศาสตร์ และทรงคุณค่าของจังหวัดบุรีรัมย์ (สำนักงานประชาสัมพันธ์จังหวัดบุรีรัมย์, 2564) นอกจากต้นแปะแล้วจังหวัดบุรีรัมย์ยังมีต้นไม้ที่หาชมได้ยากโดยเกี่ยวข้องกับความเชื่อและตำนานโบราณ เรื่องท้าวปาจิตกับนางอรพิม นั่นคือต้นมะกอกโคกหรือต้นหิฟ หรือโยนีปีศาจ หรือภาษาพื้นถิ่นชาวเขมรเรียกว่าต้น กะนุขะมอย ซึ่งพบอยู่บริเวณยอดภูเขาไฟกระโดง จะเห็นได้ว่าต้นไม้ทั้งสองชนิดนี้เกี่ยวข้องกับประวัติศาสตร์และความเชื่อที่มีมาอย่างยาวนานของชาวบุรีรัมย์ ในแง่ของการใช้ประโยชน์นั้นพบว่ามะกอกโคกมีสรรพคุณด้านสมุนไพร โดยใบใช้คั้นน้ำหยอดหู แก้ปวดหู หูอักเสบ ราก รสเย็น ถอนพิษสำแดง หรือต้มน้ำดื่มแก้ร้อนในกระหายน้ำ ผลมีรสเปรี้ยว ดับพิษไข้ แก้ไข้กาฬ ไข้หวัด แก้ร้อนใน กระหายน้ำ สำหรับต้นแปะนั้นนิยมนำมาทำไม้ล้อหรือไม้ประดับ สรรพคุณทางสมุนไพรยังไม่แน่ชัด ซึ่งปัจจุบันพบว่าต้นแปะนั้นมีราคาค่อนข้างสูงและในพื้นที่จังหวัดบุรีรัมย์กลับพบได้น้อยและถูกนำไปปลูกเฉพาะสถานที่ที่สำคัญหรือส่วนราชการ ส่วนมะกอกโคกนั้นมีการขยายพันธุ์โดยหน่วยงานราชการที่เกี่ยวข้องมาอย่างต่อเนื่อง แต่ใช้วิธีการเพาะจากเมล็ดทำให้ได้จำนวนต้นน้อย และปัญหาของเมล็ดไม่สมบูรณ์เนื่องจากเมล็ดเสียหายจากการกัดแทะของกระรอกป่า และอัตราการงอกต่ำ

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการอนุรักษ์พืช ได้ถูกนำมาใช้เพื่อการขยายพันธุ์ขุนไพศาล ทักษิณ ตามที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว รัชกาลที่ 9 ทรงมีพระราชกระแสให้อนุรักษ์ต้นขุนหลังพระตำหนักไพศาลทักษิณ ในพระบรมมหาราชวัง นำไปสู่การขยายพันธุ์ต้นไม้ที่มีลักษณะพิเศษ ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของพระราชวังต่าง ๆ และยังอนุรักษ์พันธุ์ไม้ที่เป็นเอกลักษณ์อีกหลายชนิดเพื่อให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงถือเป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชที่มีประสิทธิภาพสูง นอกจากจะขยายพันธุ์ได้ในปริมาณมากภายในระยะเวลาที่สั้นลงแล้ว ยังได้พันธุ์กรรมที่มีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการ ต้นแปะซึ่งได้ถูกยกให้เป็นต้นไม้ประจำจังหวัดบุรีรัมย์ และมะกอกโคกยังเป็นไม้ในตำนานมีเรื่องราวเล่าขาน เป็นจุดเด่นบนภูเขาไฟกระโดงซึ่งเป็นแหล่ง

ห้องที่ียวสำคัญของจังหวัดบุรีรัมย์ และยังมีสรรพคุณด้านสมุนไพรที่มีคุณค่า มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ร่วมสนองพระราชดำริตามโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ได้เล็งเห็นความสำคัญของต้นไม้ทั้งสองชนิดนี้ว่าควรแก่การอนุรักษ์ ขยายพันธุ์และนำไปต่อยอดเทคโนโลยีชีวภาพพืชท้องถิ่นเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.2.1 เพื่อขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรมพืชท้องถิ่นจังหวัดบุรีรัมย์ ได้แก่ ต้นแปะ และมะกอกโคกด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.2 เพื่อสกัดและแสดงการออกฤทธิ์ของสารสกัดจาก ต้นแปะ และมะกอกโคก ในการยับยั้งจุลชีพก่อโรค

1.3 เป้าหมายของโครงการ

เพื่ออนุรักษ์พันธุกรรมต้นแปะ และมะกอกโคกซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นจังหวัดบุรีรัมย์ และต่อยอดเทคโนโลยีชีวภาพพืชท้องถิ่นเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

1.4 กิจกรรมและเป้าหมายของโครงการ

1.4.1 กิจกรรมของโครงการ

1. การสำรวจต้นแปะและมะกอกโคกในพื้นที่จังหวัดบุรีรัมย์ โดยการบ่งชี้ด้วยลักษณะทางพฤกษศาสตร์โดยผู้เชี่ยวชาญและเปรียบเทียบข้อมูลจากฐานข้อมูลพรรณไม้
2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาอ่อน หรือเมล็ด เพื่อขยายพันธุ์ในห้องปลอดเชื้อ โดยศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกและเพื่อเพิ่มจำนวนต้น
3. สกัดสาร (Crude extract) จากต้นแปะ และมะกอกโคก โดยการสกัดสารจากส่วนต่าง ๆ ของพืช
4. การทดสอบสารสกัดจากเปลือกลำต้น และใบมะกอกโคกต่อการยับยั้งการเจริญของจุลชีพ

1.4.2 เป้าหมายของโครงการ

เพื่ออนุรักษ์พันธุกรรมต้นแปะ และมะกอกโคกซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นจังหวัดบุรีรัมย์ และต่อยอดเทคโนโลยีชีวภาพพืชท้องถิ่นเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

1.5 ตัวชี้วัดของโครงการ

1.5.1 เชิงปริมาณ

- 1) ได้ต้นอ่อนเนื้อเยื่อต้นแปะ และมะกอกโคก ไม่น้อยกว่าชนิดละ 20 ต้น
- 2) ได้สารสกัดจากต้นแปะ และมะกอกโคกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคไม่น้อยกว่า 5 สายพันธุ์

1.5.2 เชิงคุณภาพ

- 1) ต้นแปะและมะกอกโคกซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นของจังหวัดบุรีรัมย์ได้รับการอนุรักษ์พันธุ์กรรมให้คงอยู่ เพื่อประโยชน์ด้านการศึกษาและการท่องเที่ยว
- 2) ต้นแปะและมะกอกโคกได้รับการขยายพันธุ์โดยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- 3) ได้ผลการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคจากสารสกัดของต้นแปะและมะกอกโคก

1.6 สถานที่ดำเนินการ

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ และศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะกอกโคก

2.1.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของต้นมะกอกโคก

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Lamiales

Family: Anacardiaceae

Genus: Schrebera

Species: *Schrebera swieteniodes* Roxb.

2.1.2 ลักษณะทั่วไปทางพฤกษศาสตร์

ไม้ต้น ผลัดใบ สูง 7-15 ม. ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก มีใบย่อย 7-9 ใบ รูปไข่ กว้าง 2-4 ซม. ยาว 4-7 ซม. โคนใบมนหรือสอบเรียว ปลายใบแหลม แผ่นใบค่อนข้างหนา ดอกสีเหลืองอมน้ำตาล กลิ่นหอมอ่อนๆ ออกเป็นช่อตามซอกใบใกล้ยอด กลีบรองดอก 5 กลีบ กลีบดอกเป็นหลอด ปลายแยกเป็น 5-7 แฉก ผลเป็นผลแห้ง ทรงกลม เปลือกแข็ง สีสน้ำตาลอ่อนก้านป่องเล็กน้อย กว้าง 4 ซม. ยาว 5-6.5 ซม. เมื่อแก่จะแตกจากด้านล่างเป็น 2 ซีก (ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2565)

2.2 เปะ

2.2.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของต้นเปะ

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Lamiales

Family: Lamiaceae

Genus: *Vitex*

Species: *Vitex scabra* Wall.ex Schauer.

2.2.2 ลักษณะทั่วไปทางพฤกษศาสตร์

ต้นแปะจัดอยู่ในสกุล *Vitex* และมีการค้นพบครั้งแรกโดยคาโรลัส ลินเนียส (Carolus Linnaeus) ซึ่งมีการค้นพบทั้งหมด 4 สปีชีส์ ได้แก่ *V. agnus-castus*, *V. negundo*, *V. pinnata* และ *V. trifolia* เป็นไม้ยืนต้นหรือไม้พุ่ม อยู่ในวงศ์ Lamiaceae (Chantaranothai, 2011) โดยต้นแปะ เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง และเป็นพืชประจำถิ่น (Endemic species) ที่พบในป่าเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีอัตราการเจริญเติบโตช้า เปลือกลำต้นมีกลิ่นหอม (วราพร วีระพลากร, 2551)

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการนำเอาชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชตั้งแต่ระดับเซลล์เนื้อเยื่อ โพรโทพลาสต์ และอวัยวะบางอย่างของพืช เช่น ยอด ลำต้น ราก ใบ และส่วนต่าง ๆ ของดอกหรือผล มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุอาหารพืชอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ และแสงที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งการเจริญของเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถเจริญไปเป็นแคลลัส หรืออวัยวะต่าง ๆ เช่น ตา หรือ ราก หรือเอ็มบริโอได้ การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ (Embryogenesis) คือการทำให้เซลล์ ที่ได้จากชิ้นส่วนพืชหรือแคลลัสพัฒนาเป็นต้นอ่อนโดยแคลลัสนั้นได้มาจากเซลล์ที่เป็นอวัยวะของพืชไม่ได้มาจากเซลล์สืบพันธุ์ เรียกกระบวนการนี้ว่าโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส (Somatic embryogenesis) และเรียกเอ็มบริโอที่ได้ว่า เอ็มบริอยด์ (Embryoid) ถ้าเอ็มบริโอนั้น ได้มาจากไข่ปฏิสนธิกับสเปิร์มก็จะเรียกกระบวนการนี้ว่า ไซโกติกเอ็มบริโอเจเนซิส (Zygotic embryogenesis) ซึ่งพบได้ตามธรรมชาติ การชักนำให้เกิดอวัยวะ (Organogenesis) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารสังเคราะห์ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของกลุ่มออกซิน (Auxin) และไซโตไคนิน (Cytokinin) สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อนั้นมาเพาะเลี้ยงเจริญและพัฒนากลายไปเป็นตา ต้น หรือรากได้ โดยเจริญเพียงอย่างเดียวหนึ่ง เช่น ถ้าเกิดต้นจะไม่เกิดราก เมื่อต้องการให้เนื้อเยื่อเกิดรากต้องนำต้นที่ได้ มาเลี้ยงในอาหารใหม่เพื่อชักนำให้เกิดรากต่อไป การชักนำให้เกิดแคลลัส แคลลัส คือ กลุ่มเซลล์พาเรงไคมาที่ยังไม่เปลี่ยนแปลงไปเป็นรากหรือลำต้น โดยจะเกาะกันอยู่อย่างหลวม ๆ เรียกว่า ไพรเอเบิลแคลลัส (Friable callus) หรืออยู่กันอย่างหนาแน่น (Hard callus) แคลลัสมีสีหลายสี เช่น ขาว เหลือง ม่วง แดง และเขียว เป็นต้น ภายในแคลลัสอาจมีเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ท่อน้ำหรือท่ออาหารก็ได้ ก่อนแคลลัสสามารถเจริญไปเป็นต้นได้ โดยใช้ สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น ออกซินและไซโตไคนิน การกระตุ้นให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้น พืชอาจเกิดจากเซลล์เพียงหนึ่งเซลล์โดยมีการเจริญไปเป็นราก

หรือต้น หรืออาจเกิดจากกลุ่มเซลล์ข้างเคียงกันโดยกลุ่มเซลล์เหล่านั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่าง ๆ แล้วเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ (มานี เตื้อสกุล, 2550)

2.4 การศึกษาสารสกัดจากพืช

มนุษย์รู้จักนำเอาพืชสมุนไพรมาใช้ในชีวิตประจำวันมาเป็นเวลาช้านาน ซึ่งความต้องการพืชสมุนไพรได้พัฒนาควบคู่ไปกับการเจริญรุ่งเรืองทางด้านวัฒนธรรม ความเป็นอยู่ในสังคม เศรษฐกิจ และการเมือง ซึ่งวิธีการเลือกใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคของบรรพบุรุษนั้นจัดเป็นมรดกทางวัฒนธรรมที่มีคุณค่า โดยมีการนำพืชสมุนไพรมาใช้รักษาโรคในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ยาหม้อ ยา ลูกกลอน นอกจากนี้ยังนำมาใช้เป็นเครื่องเทศ เครื่องปรุงในการประกอบอาหาร ปัจจุบันโรงพยาบาลหลายแห่งใน

ประเทศไทยได้นำสมุนไพรไทยมาพัฒนาเป็นตำรับยาสำหรับแพทย์แผนไทยเพื่อรักษาโรคต่าง ๆ (Chotchoung-chatchaia et al, 2012) เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากกว่ายาแผนปัจจุบันที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี และมีแนวโน้มการนำไปใช้ประโยชน์เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งในประเทศไทย มีสมุนไพรเป็นจำนวนมาก หาได้ง่าย ราคาถูก สามารถปลูกใช้ได้เองภายในครัวเรือน การใช้สมุนไพรจึงมีความปลอดภัยและช่วยประหยัดรายจ่ายของครอบครัว ตลอดจนช่วยลดการขาดดุลการค้าของประเทศในการสั่งซื้อยาได้เป็นจำนวนมากอีกด้วย นอกจากนี้ที่กล่าวมาแล้วสมุนไพรยังมีฤทธิ์อีกด้านหนึ่งที่สำคัญคือ สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobials) ที่สามารถพบอยู่ในพืชสมุนไพรหลายชนิดในประเทศไทย และยังสามารถนำมาพัฒนาเป็นส่วนประกอบสำคัญในยาหยอดตาสูตรสมุนไพรอีกด้วย พืชสมุนไพรไทยที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในยาหยอดตาสมุนไพรคือพืชวงศ์ Lamiaceae ซึ่งได้แก่กะเพรา (Mitra et al., 2000)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วรพร วีระพลกร (2551) ทำการศึกษาชิ้นส่วนยอดของมะคัง (*Vitex scabra* Wall. Ex Schauer) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติมฮอร์โมน 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ Benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0, 2, 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด โดยมีการเกิดยอด 60 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 2.4 ยอด มีความยาวเฉลี่ย 1.29 เซนติเมตรในทุกสูตรอาหารไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น เมื่อนำส่วนยอดของมะคังมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 6 สัปดาห์พบว่าอาหารทุกสูตรที่มี 2,4-D

สามารถชักน้ำให้เกิดแคลลัสได้ โดยสูตรที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรแคลลัสมีลักษณะแข็ง เกาะตัวกันแน่น สีขาวปนเขียว และมีแคลลัส เกาะตัวกันหลวม ๆ สีเหลืองขนาดเล็ก ๆ อยู่ด้านบน

รองเดช ตั้งตระการพงษ์ และ จุลจิตร ตั้งตระการพงษ์ (2559) ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบสะระแหน่ (*Mentha cordifolia* Opiz.) โดยวิธีการสกัดด้วยเอทานอลที่มีต่อเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Salmonella Typhi*, *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* โดยวิธี Agar disc diffusion ผลการศึกษาพบว่าใบสะระแหน่ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Salmonella Typhi* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* และ *Streptococcus pyogenes* โดยมีขนาดค่าเฉลี่ยของ Clear zone คือ 13.17 ± 0.05 , 12.50 ± 0.05 , 12.00 ± 0.07 , 11.67 ± 0.06 , 11.00 ± 0.03 และ 10.50 ± 0.02 มิลลิเมตร ตามลำดับและ ผลที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) ซึ่งการที่ใบสะระแหน่ มีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีเป็นผลมาจากส่วนประกอบที่สำคัญของน้ำมันหอมระเหยจากพืชชนิดนี้คือ Eugenol Phenol และ Thymol ซึ่งออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด ผลที่ได้แสดงให้เห็นศักยภาพที่สำคัญในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีอยู่โดยทั่วไปและสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันโรคติดเชื้อในระบบต่าง ๆ ของร่างกายได้ ทั้งเป็นการส่งเสริมให้มีการนำพืชสมุนไพรไทยมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้น

Wajid และ Mohammed (2017) ทำการศึกษาด้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จากรากของต้นมะกอกโคก ด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-Azino-bis (3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) และ Lipid peroxidation assay พบว่าค่า IC_{50} มีค่าเท่ากับ 1.7 ไมโครกรัมจากการทดสอบด้วยวิธี DPPH การทดสอบด้วยวิธี ABTS มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.35 ไมโครกรัม และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 23.53 ไมโครกรัม จากการทดสอบด้วยวิธี Lipid peroxidation assay

Velavarthipati และ Mallikarjuna (2015) ทำการศึกษารสจากใบของต้นมะกอกโคก โดยใช้สาร เอทิล อะซีเตท เมทานอล และน้ำเป็นตัวทำละลาย พบสาระสำคัญคือ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก โดยในสารสกัดจากน้ำจะพบสารอัลคาลอยด์มากที่สุดคือ 31 มิลลิกรัม/กรัม

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พิษทดลอง

มะกอกโคก เก็บตัวอย่างจากสวนอุทยานเขากระโดง อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ และจากบริเวณยอดภูเขาไปเขาอังคาร ต.เจริญสุข อ.เฉลิมพระเกียรติ จ.บุรีรัมย์ และแปะ เก็บตัวอย่างจากสวนอุทยานเขากระโดง อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ และภายในสวนพฤกษศาสตร์โรงเรียน มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ เก็บตัวอย่างในช่วงเดือนมีนาคม ถึงเดือนกรกฎาคม

3.2 วิธีการทดลองการชักนำให้เกิดแคลลัสในมะกอกโคก

3.2.1 การศึกษาสูตรฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อมะกอกโคก

กระบวนการฟอกฆ่าเชื้อเริ่มจากการนำชิ้นไลต์มาถูบริเวณพื้นผิวของมะกอกโคกที่ผ่านการตัดแต่งแล้วให้สะอาด แล้วนำชิ้นส่วนตาข้างไปผ่านน้ำนาน 30 นาที จากนั้นเริ่มทำการฟอกฆ่าเชื้อตามขั้นตอนแต่ละสูตรดังนี้

สูตรที่ 1 นำเนื้อเยื่อมาแช่ลงในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% นาน 20 วินาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 15% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 15 นาที และสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 10% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เขย่าสม่ำเสมอ

สูตรที่ 2 นำเนื้อเยื่อมาแช่ลงในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% นาน 20 วินาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 20% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 20 นาที และสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 10% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เขย่าสม่ำเสมอ

สูตรที่ 3 นำเนื้อเยื่อมาแช่ลงในแคปแทนนาน 15 นาที แช่ในเบตาดีนนาน 15 นาที แช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% นาน 20 วินาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 15% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 15 นาที และสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 10% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เขย่าสม่ำเสมอ

สูตรที่ 4 นำเนื้อเยื่อมาแช่ลงในแคปแทนนาน 15 นาที แช่ในเบตาดีนนาน 15 นาที แช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% นาน 20 วินาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 20%

ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 20 นาที และสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 10% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยดนาน 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เขย่าสม่ำเสมอ

3.2.2 การศึกษาสูตรอาหารร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของมะกอกโคก

นำชิ้นส่วนของตาข้าง หรือยอดอ่อนที่ผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาชักนำให้เกิดแคลลัสโดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกันทั้งหมด 7 สูตร ได้แก่สูตรที่ 1 Murashige and Shook (MS) ที่ปราศจากฮอร์โมน สูตรที่ 2 อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรที่ 3 อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรที่ 4 อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรที่ 5 อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรที่ 6 อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรที่ 7 อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสูตรอาหารทั้งหมดจะปรับให้มีค่า pH เท่ากับ 5.7 ± 0.1 (ปรับด้วย 1N HCl และ 1N NaOH) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารและระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน

สูตรที่	อาหารและระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน
1	MS
2	MS ร่วมกับ BA 2 mg/l
3	MS ร่วมกับ BA 3 mg/l
4	MS ร่วมกับ BA 4 mg/l
5	MS ร่วมกับ BA 10 mg/l
6	MS ร่วมกับ BA 15 mg/l
7	MS ร่วมกับ BA 20 mg/l

3.2.3 ขั้นตอนการเตรียมอาหารและน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อมะกอกโคก

3.2.3.1 วิธีการเตรียมสูตรอาหาร MS ปริมาตร 1 ลิตร

1. นำบีกเกอร์ขนาด 2 ลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 200 มิลลิลิตร

2. ให้ดูดสารละลายจาก stock 1 มา 50 มิลลิลิตร แล้วเติมลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น
3. ให้ดูดสารละลายจาก stock 2, 3 และ 4 มาอย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์เดียวกับ stock 1
4. นำแท่งแก้วคนสารละลายให้เข้ากัน
5. ชั่งน้ำตาล 30 กรัม แล้วเติมลงในบีกเกอร์ที่มี stock 1,2,3 และ 4 อยู่
6. นำสารละลายไปปรับค่ากรด-ด่าง (pH) โดยปรับค่าให้อยู่ในช่วง 5.6-5.8 โดยใช้กรดเกลือ (1N HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1N NaOH) เป็นบัฟเฟอร์เป็นตัวปรับค่า
7. ปรับปริมาตรสารให้ได้ 1000 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวปรับปริมาตร
8. นำสารละลายมาตั้งบนเตาให้ความร้อน แล้วเติมวุ้นที่ชั่งไว้ 8 กรัม และผงถ่าน 0.25 กรัม เคี่ยวจนวุ้นกับผงถ่านละลาย
9. นำอาหารที่เคี่ยวแล้วมาเทลงในขวดขนาด 4 ออนซ์ เทอาหารใส่ขวดให้ได้ปริมาตร 15-20 ml คลายฝาออกเล็กน้อย
10. นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
11. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (ทิ้งไว้ประมาณ 7 วันเพื่อสังเกตประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ)

3.2.3.2 วิธีการเตรียมสารฟอกฆ่าเชื้อ

1. สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ 25 กรัมต่อลิตร (เตรียมปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ชั่งสารแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ 2.5 กรัม แล้วเติมลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
2. แอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ตวงแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 66.7 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (โดยใช้กระบอกตวงตวง)
3. น้ำยาฟอกฆ่าเชื้อไฮเตอร์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ตวงสารละลายไฮเตอร์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วตวงน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 80 มิลลิลิตร (โดยใช้กระบอกตวง) เติมหิเตอร์และน้ำกลั่นเข้าด้วยกัน
4. น้ำยาฟอกฆ่าเชื้อไฮเตอร์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ตวงสารละลายไฮเตอร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วตวงน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร (โดยใช้กระบอกตวง) เติมหิเตอร์และน้ำกลั่นเข้าด้วยกัน

3.2.4 ขั้นตอนการเตรียมกิ่ง และการฟอกฆ่าเชื้อ

3.2.4.1 นำกิ่งมะกอกโคกมาตัดให้เหลือเป็นข้อ ๆ โดยใช้กรรไกรตัดกิ่งดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ตัดแต่งกิ่งมะกอกโคกให้เป็นข้อ ๆ โดยใช้กรรไกรตัดกิ่ง

3.2.4.2 ตัดแต่งบริเวณตาดกิ่งให้ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ดังภาพที่ 3.2



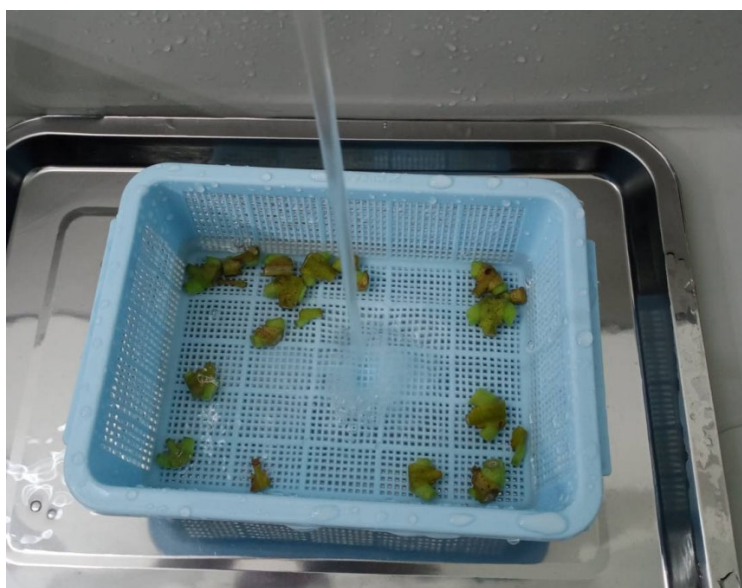
ภาพที่ 3.2 ตัดแต่งกิ่งมะกอกโคกให้มีขนาดพอเหมาะโดยใช้มีดผ่าตัด

3.2.4.3 นำมาล้างด้วยชั้นไลต์ให้สะอาดดังภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.3 ใช้ชั้นไลต์ลูบทำความสะอาดบริเวณพื้นผิว

3.2.4.4 เปิดน้ำประปาให้ไหลผ่านนาน 30 นาทีดังภาพที่ 3.4



ภาพที่ 3.4 ผ่านน้ำโดยใช้น้ำประปาไหลผ่าน

3.2.4.5 แช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อราแคปแทน 15 นาที เขย่าสม่ำเสมอ ดังภาพที่ 3.5



ภาพที่ 3.5 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อฆ่าเชื้อรา

3.2.4.6 แอลกอฮอล์ 15 นาที เขย่าสม่ำเสมอ ดังภาพที่ 3.6



ภาพที่ 3.6 แอลกอฮอล์

3.2.4.7 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 วินาที เขย่าสม่ำเสมอ ดังภาพที่ 3.7



ภาพที่ 3.7 เนื้อเยื่อในแอลกอฮอล์ 70%

3.2.4.8 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 โดยใช้ไฮเตอร์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 15 นาที เขย่าสม่ำเสมอ ภาพที่ 3.8



ภาพที่ 3.8 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่หนึ่งโดยใช้ไฮเตอร์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

3.2.4.9 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 โดยใช้ไฮเตอร์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 10 นาที เขย่าสม่ำเสมอ ดังภาพที่ 3.9



ภาพที่ 3.9 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่สองโดยใช้ไฮเตอร์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

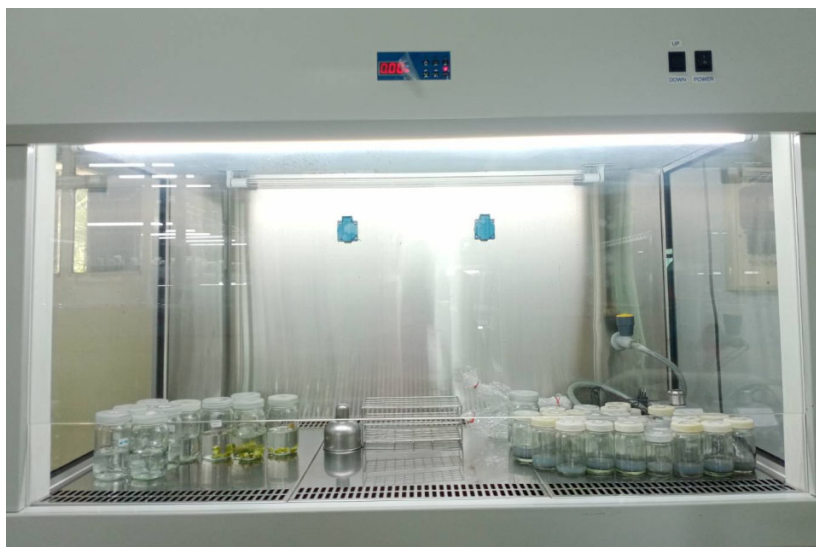
3.2.5 ขั้นตอนตัดแต่งเนื้อเยื่อลงในอาหาร

3.2.5.1 ทำความสะอาดตู้ลาร์มินาโดยใช้แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วเปิดแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 30 นาทีดังภาพที่ 3.10



ภาพที่ 3.10 เปิดแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว

3.2.5.2 นำผ้าสะอาดชุบแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ พอหมาดๆ เช็ดอุปกรณ์ต่าง ๆ เข้าตู้ลาร์มินาดังภาพที่ 3.11



ภาพที่ 3.11 การวางอุปกรณ์ในตู้ลาร์มินา

3.2.5.3 นำกิ่งมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เขย่าสม่ำเสมอ ดัง

ภาพที่ 3.12



ภาพที่ 3.12 นำกิ่งมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

3.2.5.4 ย้ายเนื้อเยื่อพักลงในเพลทที่ปลอดเชื้อ ดังภาพที่ 3.13



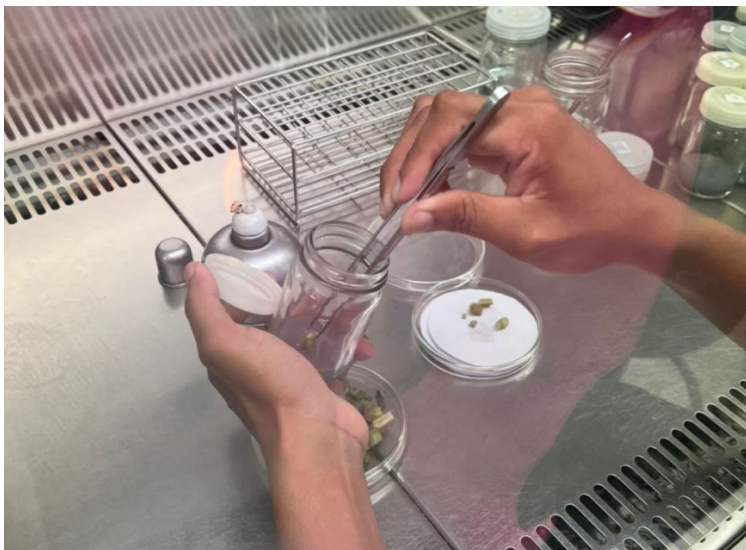
ภาพที่ 3.13 พักกิ่งลงในเพลทที่ปลอดเชื้อ

3.2.5.5 ใช้ด้ามมีดจุ่มแอลกอฮอล์ 95% แล้วลนไฟ นำมาตัดแต่งกิ่ง โดยจะเลือกตัดเอาบริเวณต่ากิ่งและกิ่งอ่อนดังภาพที่ 3.14



ภาพที่ 3.14 ตัดแต่งต่ากิ่งโดยใช้มีดปลอดเชื้อ

3.2.5.6 นำขวดอาหารมาลนไฟบริเวณปากขวด แล้วใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ 95% ลนไฟ แล้วใช้ปากคีบถ่ายเนื้อเยื่อลงในอาหาร ดังภาพที่ 3.15



ภาพที่ 3.15 ถ่ายเนื้อเยื่อลงในอาหาร

3.2.5.7 นำปากขวดลนไฟแล้วปิดฝาขวดให้สนิท ดังภาพที่ 3.16



ภาพที่ 3.16 ปิดฝาขวดแล้วลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อ

3.2.5.8 นำเนื้อเยื่อไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2500 ลักซ์ ให้แสงนาน 8 ชั่วโมงต่อวัน ดังภาพที่ 3.17



ภาพที่ 3.17 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.3 วิธีการทดลองการชักนำให้เกิดแคลลัสในต้นแปะ

3.3.1 การศึกษาสูตรฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อต้นแปะ

กระบวนการฟอกฆ่าเชื้อเริ่มจากการนำชิ้นไลต์มาถูบริเวณพื้นผิวของต้นแปะที่ผ่านการตัดแต่งแล้วให้สะอาด แล้วนำชิ้นส่วนตาข้างไปผ่านน้ำนาน 30 นาที จากนั้นเริ่มทำการฟอกฆ่าเชื้อตามขั้นตอนแต่ละสูตรดังนี้

สูตรที่ 1 แช่เนื้อเยื่อ 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 20 วินาที แล้วฟอกในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 15% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที และสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 10 นาที เขย่าตลอดการฟอกฆ่าเชื้อ

สูตรที่ 2 แช่เนื้อเยื่อ 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วฟอกในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 15% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที และสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 10 นาที เขย่าตลอดการฟอกฆ่าเชื้อ

สูตรที่ 3 แช่เนื้อเยื่อ 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วฟอกในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 15% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที และสารละลาย

โซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 10 นาที เขย่าตลอดการฟอกฆ่าเชื้อ

สูตรที่ 4 แช่เนื้อเยื่อ 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 2 นาที แล้วฟอกในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 15% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที และสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 10 นาที เขย่าตลอดการฟอกฆ่าเชื้อ

3.3.2 การศึกษาสูตรอาหารร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของต้นแปะ

นำชิ้นส่วนของตาข้าง หรือยอดอ่อนที่ผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาชักนำให้เกิดแคลลัสโดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 สูตร ได้แก่สูตรที่ 1 อาหารสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน สูตรที่ 2 อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรที่ 3 อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรที่ 4 อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสูตรอาหารทั้งหมดจะปรับให้มีค่า pH เท่ากับ 5.7 + 0.1 (ปรับด้วย 1N HCl และ 1N NaOH) แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สูตรอาหารและระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน

สูตรที่	อาหารและระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน
1	MS
2	MS ร่วมกับ BA 2 mg/l
3	MS ร่วมกับ BA 3 mg/l
4	MS ร่วมกับ BA 4 mg/l

3.3.3 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง การฟอกฆ่าเชื้อ และการย้ายลงอาหารของต้นแปะ

3.3.3.1 นำกิ่งต้นแปะที่ได้มาจากสวนพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ มาตัดแต่งและนำมาคัดเลือก (ภาพที่ 3.18) ตัดให้ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นไหลผ่านน้ำ 30 นาที



ภาพที่ 3.18 ตาข้างต้นแปะ

3.3.3.2 นำชิ้นส่วนต้นแปะที่ไหลผ่านน้ำ มาแช่ 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 20 วินาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ที่มีระดับความเข้มข้นร้อยละ 15% เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นฟอกต่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ที่มีระดับความเข้มข้นร้อยละ 10% เป็นเวลา 10 นาที

3.3.3.3 ทำความสะอาดตู้ลาร์มินาโดยใช้ 70% แอลกอฮอล์ แล้วเปิด UV นาน 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว เมื่อครบเวลาแล้วเช็ดอุปกรณ์เข้าตู้ด้วย 70% แอลกอฮอล์

3.3.3.4 หลังจากการฟอกฆ่าเชื้อเสร็จแล้ว นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที ล้างครบ 3 ครั้ง นำกิ่งต้นแปะมาปักลงในเพลทเปล่าที่ปลอดเชื้อ

3.3.3.5 ตัดแต่งกิ่งโดยเลือกตัดบริเวณชิ้นส่วนตาข้าง (ภาพ 10) แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร สูตร MS ที่เติมน้ำตาล 15 กรัม/ลิตร, ผงวุ้น 8 กรัม/ลิตร และฮอร์โมน BA ที่ระดับความเข้มข้น 2, 3 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ให้แสงนาน 8 ชั่วโมง/วัน และบันทึกผลการทดลอง

3.4 การทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

ในที่นี้การศึกษากายยับยั้งแบคทีเรียในที่นี้เป็นการศึกษาในต้นแปะ และมะกอกโคก เพื่อให้ทราบถึงสรรพคุณ และให้ตระหนักและเห็นคุณค่าของพืชแต่ละชนิดได้ นำไปสู่การอนุรักษ์ ยั่งยืนยิ่งขึ้น ในการศึกษาได้นำส่วนกิ่งและใบของต้นพืชทั้งแปะและมะกอกโคกมาสกัดสาร โดยการ

เก็บตัวอย่างแปะได้เริ่มในเดือนปลายมกราคม-กุมภาพันธ์ 2565 แล้วนำมาแยกส่วนใบ และกิ่งออก แล้วกำจัดฝุ่นที่ติดด้วยแปรงปัด สำหรับใบของแปะและมะกอกโคกใช้วิธีการปั่นด้วยเครื่องปั่น และสำหรับส่วนกิ่งของมะกอกโคกและแปะ ทำให้เป็นผงด้วยการใช้ตะไบฝน ตัวอย่างที่ผ่านการลดขนาด จะได้ขนาดประมาณ 20 mesh ตัวอย่างที่ได้จะใช้ในการสกัดแบบสดต่อไป

3.4.2 การสกัดสารออกฤทธิ์

จากที่กล่าวมาการสกัดสารออกฤทธิ์ใช้ตัวอย่างสด เนื่องจากการใช้ตัวอย่างที่แห้ง แล้วพบว่ามีความแข็ง ทำให้ตัวทำละลายไม่สามารถสกัดสารจากตัวอย่างแห้งได้ดีเท่ากับการใช้ตัวอย่างสด จึงเลือกใช้ตัวอย่างสดในการสกัด โดยนำตัวอย่างที่ลดขนาดแล้วในข้อ 3.1.1 มาบ่มร่วมกับตัวทำละลายเอทานอล ในสัดส่วน 1:6 (โดยน้ำหนัก) แล้วกวนด้วยเครื่องกวน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที แล้วถ่ายเก็บส่วนใสไว้ นำตะกอนตัวอย่างไปสกัดใหม่ (Re-extraction) ด้วยวิธีการเช่นเดิม ดำเนินการเช่นนี้ประมาณ 3-4 รอบ จากนั้นสารที่สกัดได้ต้องนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นต่อไป

3.4.3 การทำสารสกัดเข้มข้น

สารที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายยังมีความเจือจาง เนื่องจากยังละลายอยู่ในตัวทำละลายปริมาณมาก จึงต้องทำให้เข้มข้นขึ้นก่อนการนำมาทดสอบ วิธีการทำสารสกัดเข้มข้นใช้วิธีการระเหยในสภาวะสูญญากาศแบบหมุน ด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่ความดันความคมไม่เกิน 20 มิลลิบาร์ อุณหภูมิอ่างน้ำร้อน ประมาณ 35 ± 1 องศาเซลเซียส และเครื่องหล่อน้ำเย็นในคอลัมน์คอนเดนเซอร์ 10 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตัวทำละลายระเหยหมด จากนั้นเติมตัวทำละลายเล็กน้อยเพื่อละลายสารสกัดออกมา แล้วตั้งในตู้ดูดไอระเหย (Fume hood) เพื่อระเหยตัวทำละลาย (ภาพสารสกัดแสดงในภาคผนวก) การคำนวณผลได้สารสกัดตามสมการด้านล่าง โดยรายงานผลเป็นร้อยละสารสกัด/ปริมาณตัวอย่างสด

$$\text{Extraction yield (\%)} = \frac{\text{weight of crude extracts (g)}}{\text{weight of sample (g)}} \times 100$$

3.4.4 การทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

สารสกัดหยาบ (Crude extract) ในข้อ 3.1.3 ถูกนำมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion ซึ่งในที่นี้มีการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ด้วยการ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดในอาหาร Nutrient broth (NB) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความขุ่น 0.05 (มีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/ml) จากนั้นนำมาป้ายด้วยสำลีพ่นก้านปราศจากเชื้อ (Swab) บนอาหารทดสอบ Mueller hinton agar แล้วเจาะหลุมอาหารขนาด 6 มิลลิเมตร จากนั้นหยดสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 500 300 และ 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยมีเอทานอลเป็นตัวควบคุมลบ (Negative control) และยาปฏิชีวนะเตตระไซคลินปริมาณ 10 มิลลิกรัม เป็นตัวควบคุมบวก (Positive control)

3.4.5 ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรีย

ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration) คือความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิดลงในอาหาร NB เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับค่าความขุ่นให้ได้ 0.03 จากนั้นย้ายสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงมาในหลอดทดสอบ ผสมกับสารสกัด โดยให้ได้สารสกัดความเข้มข้นสุดท้ายในความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 500 300 150 100 80 60 40 15 10 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเปรียบเทียบความขุ่น โดยเทียบกับสารแขวนลอยที่ปราศจากสารสกัด

3.4.6 ความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายแบคทีเรีย

ความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration) คือความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด ที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ โดยการนำสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ผสมกับสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ที่บ่มครบ 18 ชั่วโมงแล้ว มาทดสอบการมีชีวิตบนอาหาร Nutrient agar ด้วยวิธีหยดบนอาหาร (Drop plate) แล้วบ่ม 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสังเกตการทำลายแบคทีเรียได้ของสารสกัด ซึ่งหากไม่พบการเจริญ แสดงว่าสารสกัดที่ความเข้มข้นนั้นสามารถทำลายแบคทีเรียได้ เปรียบเทียบไปจนถึงความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ไม่พบการเจริญ แสดงว่าความเข้มข้นนั้นเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายแบคทีเรีย

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลองการชักนำให้เกิดแคลสในมะกอกโคก

4.1.1 ผลของสารฟอกฆ่าเชื้อ

สูตรที่ 1 นำเนื้อเยื่อมาแช่ลงในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% นาน 20 วินาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 15% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 15 นาที และสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 10% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 10 นาที เขย่าสม่ำเสมอ พบว่า สูตรที่ 1 มีอัตราการรอดชีวิต 15.32 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการปนเปื้อน 84.68 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อรา (ภาพที่ 4.1) มีเส้นใยราเกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อเมื่อผ่านไป 4-5 วัน และมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียเล็กน้อย (ภาพที่ 4.2)

สูตรที่ 2 นำเนื้อเยื่อมาแช่ลงในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% นาน 20 วินาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 20% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 20 นาที และสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 10% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 10 นาที เขย่าสม่ำเสมอ สูตรที่ 2 มีอัตราการรอดชีวิต 0 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการปนเปื้อน 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อรา มีเส้นใยราเกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อเมื่อผ่านไป 4-5 วัน และมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียเล็กน้อย

สูตรที่ 3 นำเนื้อเยื่อมาแช่ลงในแคปแทนนาน 15 นาที แช่ในเบตาดีนนาน 15 นาที แช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% นาน 20 วินาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 15% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 15 นาที และสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 10% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 10 นาที เขย่าสม่ำเสมอ สูตรที่ 3 มีอัตราการรอดชีวิต 41.38 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการปนเปื้อน 58.62 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อรา มีเส้นใยราเกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อเมื่อผ่านไป 4-5 วัน และมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียเล็กน้อย

สูตรที่ 4 นำเนื้อเยื่อมาแช่ลงในแคปแทนนาน 15 นาที แช่ในเบตาดีนนาน 15 นาที แช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% นาน 20 วินาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 20% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 20 นาที และสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 10% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 10 นาที เขย่าสม่ำเสมอ สูตรที่ 4 มีอัตราการรอดชีวิต 87.23

เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการปนเปื้อน 12.77 เปอร์เซ็นต์ มีการปนเปื้อนจากเชื้อรา ไม่พบการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงผลการฟอกฆ่าเชื้อ

สูตรที่	จำนวน(ขวด)	อัตราปนเปื้อน		อัตราการปลอดเชื้อ (ขวด)	
		ขวด	เปอร์เซ็นต์	ขวด	เปอร์เซ็นต์
1	372	315	84.68%	57	15.32%
2	120	120	100.00%	0	0.00%
3	116	51	58.62%	36	41.38%
4	141	18	12.77%	123	87.23%



ภาพที่ 4.1 การปนเปื้อนจากเชื้อราบนอาหาร



ภาพที่ 4.2 การปนเปื้อนจากแบคทีเรียบนอาหาร

4.1.2 ผลการชักนำให้เกิดแคลัส

นำชิ้นส่วนของตาข้าง หรือยอดอ่อนที่ผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาชักนำให้เกิดแคลัสโดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกันทั้งหมด 7 สูตร สูตรละ 10 ซ้ำพบว่าสูตรที่ 1 อาหารสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน พบว่าไม่มีแคลัสเกิดขึ้น (ภาพที่ 4.3 และ ภาพที่ 4.7) สูตรที่ 2 อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีแคลัสเกิดขึ้น แคลัสมีสีเขียวอ่อน เกาะกันแน่น (ภาพที่ 4.4 และภาพที่ 4.8) สูตรที่ 3 อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีแคลัสเกิดขึ้น แคลัสมีสีเขียวอ่อนเกาะกันแน่น (ภาพที่ 4.5 และภาพที่ 4.9) สูตรที่ 4 อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีแคลัสเกิดขึ้น แคลัสมีสีเขียวอ่อนเกาะกันแน่น (ภาพที่ 4.6 และภาพที่ 4.10) สูตรที่ 5 อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีแคลัสเกิดขึ้น แคลัสมีสีเขียวอ่อนเกาะกันแน่น (ภาพที่ 4.11) สูตรที่ 6 อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีแคลัสเกิดขึ้น แคลัสมีสีเขียวอ่อนเกาะกันแน่น (ภาพที่ 4.12) สูตรที่ 7 อาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีแคลัสเกิดขึ้น แคลัสมีสีเขียวอ่อนเกาะกันแน่น (ภาพที่ 4.13) ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ตารางแสดงผลการชักนำให้เกิดแคลลัสในมะกอกโคก

สูตรอาหาร	ค่าเฉลี่ยขนาดแคลลัส กว้าง*ยาว ซม.(จำนวน 10 ช้ำ)			สีแคลลัส	ลักษณะแคลลัส
	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์		
MS BA 0 mg/l	-	-	-	-	ไม่เกิดแคลลัส
MS BA 2 mg/l	0.2*0.4	0.3*0.5	0.3*0.6	เขียวอ่อน	เกาะกันแน่น
MS BA 3 mg/l	0.3*0.6	0.4*0.7	0.5*0.7	น้ำตาล และเขียว อ่อน	เกาะกันแน่น
MS BA 4 mg/l	0.3*0.7	0.4*0.8	0.4*1.0	เขียวอ่อน	เกาะกันแน่น
MS BA 10 mg/l	0.4*0.4	0.5*0.6	0.6*1.0	เขียวอ่อน	เกาะกันแน่น
MS BA 15 mg/l	0.6*0.6	0.8*1.0	1.2*1.5	เขียวอ่อน	เกาะกันแน่น
MS BA 20 mg/l	0.7*0.8	0.9*1.2	1.5*1.7	เขียวอ่อน	เกาะกันแน่น



ภาพที่ 4.3 แคลลัสของมะกอกโคกในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม BA อายุ 6 สัปดาห์



ภาพที่ 4.4 แคลลัสของมะกอกโคกในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 mg/l อายุ 6 สัปดาห์



ภาพที่ 4.5 แคลลัสของมะกอกโคกในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 mg/l อายุ 6 สัปดาห์



ภาพที่ 4.6 แคลลัสของมะกอกโคกในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4 mg/l อายุ 6 สัปดาห์



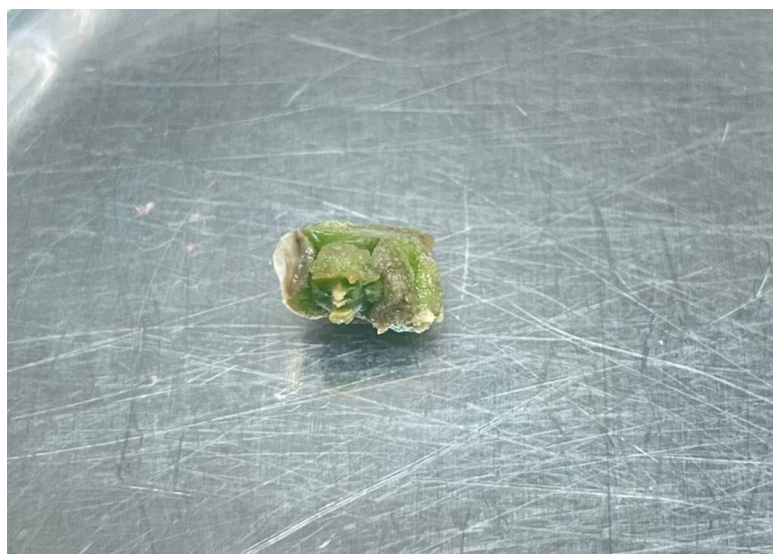
ภาพที่ 4.7 แคลลัสของมะกอกโคกในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม BA อายุ 8 สัปดาห์



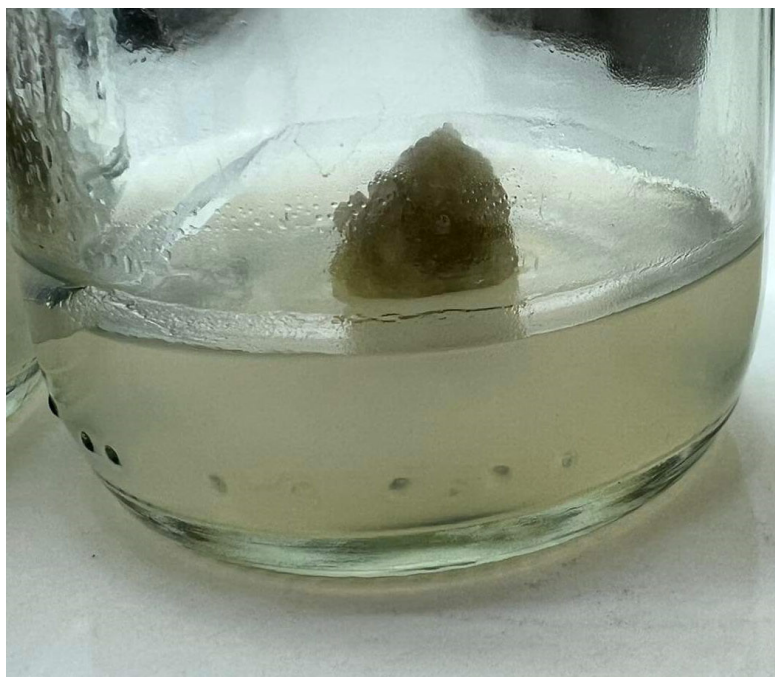
ภาพที่ 4.8 แคลลัสของมะกอกโคกในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 mg/l อายุ 8 สัปดาห์



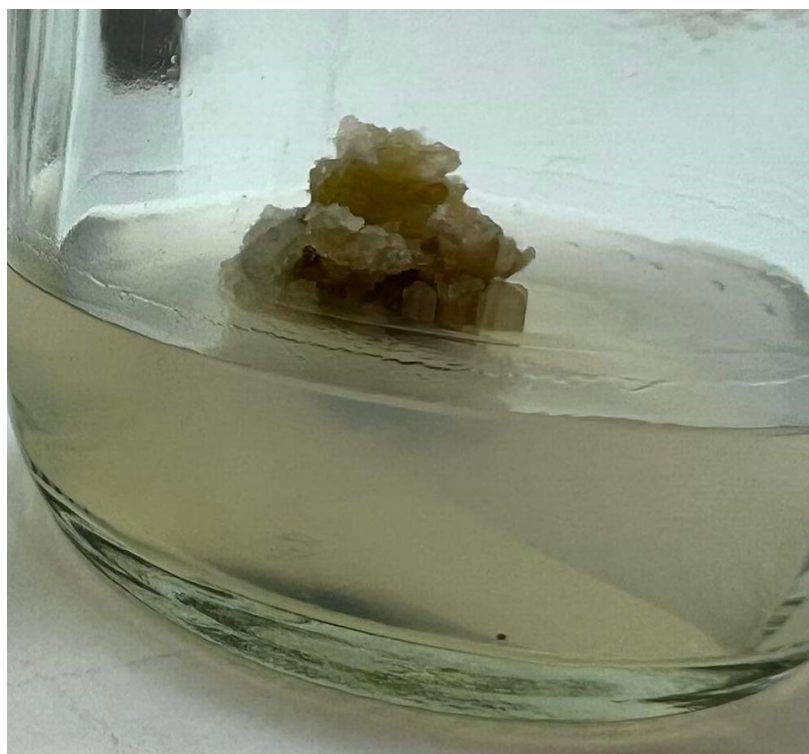
ภาพที่ 4.9 แคลลัสของมะกอกโคกในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 mg/l อายุ 8 สัปดาห์



ภาพที่ 4.10 แคลลัสของมะกอกโคกในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4 mg/l อายุ 8 สัปดาห์



ภาพที่ 4.11 แคลลัสของมะกอกโคกในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 10 mg/l อายุ 8 สัปดาห์



ภาพที่ 4.12 แคลลัสของมะกอกโคกในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 15 mg/l อายุ 8 สัปดาห์



ภาพที่ 4.13 แคลลัสของมะกอกโคกในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 20 mg/l อายุ 8 สัปดาห์

4.2 ผลการทดลองการชักนำให้เกิดแคลลัสในแปะ

4.2.1 ผลของสารฟอกฆ่าเชื้อ

จากการทดลองการฟอกฆ่าเชื้อตาข้างของต้นแปะด้วยการแช่ใน 70% แอลกอฮอล์ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน 4 สูตร ในความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 15% ร่วมกับ Tween- 20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที และความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 10 นาที (ตารางที่ 4.3) พบว่า

สูตรที่ 1 แช่เนื้อเยื่อ 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 20 วินาที แล้วฟอกในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 15% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที และสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 10 นาที เขย่าตลอดการฟอกฆ่าเชื้อ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตดีที่สุดและมีอัตราการปนเปื้อนน้อย

สูตรที่ 2 แช่เนื้อเยื่อ 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วฟอกในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 15% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที และสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 10 นาที เขย่าตลอดการฟอกฆ่าเชื้อ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตรองจากสูตร 2 และมีอัตราการปนเปื้อนจากรา

สูตรที่ 3 แช่เนื้อเยื่อ 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 1 นาที่ แล้วฟอกในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 15% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที และสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 10 นาที ขยำตลอดการฟอกฆ่าเชื้อ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตต่ำและมีการปนเปื้อนจากเชื้อราสูง (ภาพที่ 4.14)

สูตรที่ 4 แช่เนื้อเยื่อ 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 2 นาที่ แล้วฟอกในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 15% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที และสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 10 นาที ขยำตลอดการฟอกฆ่าเชื้อผลการฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อของกิ้งก่าตีนแปะ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตต่ำ พบการปนเปื้อนจากเชื้อราและมีการไหม้ของเนื้อเยื่อ

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการฟอกฆ่าเชื้อ

สูตรที่	จำนวนขวด	รอด (จำนวนขวด)	ตาย (จำนวนขวด)	ปนเปื้อน (จำนวนขวด)	เปอร์เซ็นต์ การรอด(%)
1	50	40	-	10	80.00
2	50	32	-	18	64.00
3	50	9	-	41	18.00
4	50	10	22	18	20.00



ภาพที่ 4.14 การปนเปื้อนของเชื้อราบนผิวหน้าของอาหาร

4.2.2 ผลการชักนำให้เกิดแคลลัส

นำชิ้นส่วนของตาข้าง หรือยอดอ่อนที่ผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาชักนำให้เกิดแคลลัสโดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 สูตร สูตรละ 10 ข้ำ (ตารางที่ 4.4) พบว่าสูตรที่ 1 อาหารสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน พบว่าไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น แต่มียอดอ่อนเกิดขึ้น (ภาพที่ 4.15) สูตรที่ 2 อาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 mg/l พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด แคลลัสมีขนาดใหญ่ สีเขียว (ภาพที่ 4.16) สูตรที่ 3 อาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 3 mg/l พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แคลลัสมีสีเขียว และเกิดต้นอ่อนเล็กๆหลายต้นขึ้นบริเวณผิวด้านนอกแคลลัส ต้นอ่อนมีขนาดเล็กแตกยอดคล้ายกอ ใบเล็ก (ภาพที่ 4.17) และสูตรที่ 4 อาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 4 mg/l พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เพียงเล็กน้อย แคลลัสมีสีเขียว และเกิดต้นอ่อนเล็กๆหลายต้นขึ้นบริเวณผิวด้านนอกแคลลัส ต้นอ่อนมีขนาดเล็กแตกยอดคล้ายกอ ใบมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 4.18) เมื่อเปรียบเทียบอาหารทั้ง 4 สูตรจะพบว่า อาหารสูตรที่ 1 MS ที่ปราศจากฮอร์โมนจะสามารถชักนำให้เป็นต้นได้ดีกว่าอาหารทุกสูตร แต่ต้นอ่อนจะไม่มีราก และไม่เกิดแคลลัสเลย อาหารสูตรที่ 2 MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 mg/l จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยแคลลัสจะมีลักษณะเกาะกันแน่น มีทั้งสีน้ำตาลและสีเขียว อาหารสูตร 3 และ 4 มีการเติมฮอร์โมน BA ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น พบว่าชักนำให้เกิดแคลลัสได้ไม่ดีเท่าสูตรที่ 2 แคลลัสจะเกิดช้ากว่าและมีขนาดเล็กกว่า และมีการเกิดยอดเล็กๆที่ไม่สมบูรณ์เนื่องจากใบก็มีขนาดเล็กด้วย ทั้งนี้เป็นมาจากฮอร์โมน BA ที่มีระดับความเข้มข้นที่สูงเกินไปและไม่เหมาะสม เนื่องจากฮอร์โมนชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มไซโทไคนินซึ่งเกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ของพืช และการชักนำให้เกิดยอด หากมีการเติมฮอร์โมนในกลุ่มนี้ในระดับความเข้มข้นที่สูงเกินไป ก็ จะชักนำให้เกิดเป็นยอดขนาดเล็กจำนวนมาก

ตารางที่ 4.4 ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสในเปาะ

สูตรอาหาร	ค่าเฉลี่ยขนาดแคลลัส กว้าง*ยาว ซม.(จำนวน 10 ข้ำ)			สีแคลลัส	ลักษณะแคลลัส
	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์		

MS BA 0 mg/l	-	-	-	-	ไม่เกิดแคลลัส
MS BA 2 mg/l	0.8*1.0	1.3*1.4	1.8*2.1	เขียว	เกาะกันแน่น
MS BA 3 mg/l	0.4*0.7	0.8*0.9	1.2*1.5	เขียว	เกาะกันแน่น
MS BA 4 mg/l	0.2*0.4	0.4*0.5	0.6*0.8	เขียวอ่อน	เกาะกันแน่น



ภาพที่ 4.15 ยอดจากตาข้างของแปะในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม BA อายุ 8 สัปดาห์



ภาพที่ 4.16 แคลลัสและยอดของแปะในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 mg/l อายุ 8 สัปดาห์



ภาพที่ 4.17 แคลลัสและยอดของแปะในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 mg/l อายุ 8 สัปดาห์



ภาพที่ 4.18 แคลลัสและยอดของแปะในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4 mg/l อายุ 8 สัปดาห์

4.3 ลักษณะสารสกัดจากต้นแปะและมะกอกโคก

ตัวอย่างใบและกิ่งของต้นแปะและมะกอกโคกถูกเก็บรวบรวม และนำมาสกัดสารเพื่อทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น โดยเมื่อสกัดแล้วทำสารเข้มข้นแล้วพบว่า สามารถสกัดได้ผลได้สารสกัด (Extraction yield; %) ร้อยละ 3.17 4.82 2.5 และ 5.925 (สารสกัดต่อปริมาณตัวอย่าง) จากเปลือกและใบของต้นแปะและมะกอกโคก ตามลำดับ โดยมีลักษณะของสารสกัดที่แตกต่างกัน ได้แก่ สารสกัดจากกิ่งและใบต้นแปะ มีสีน้ำตาลปนเขียว และสีเขียวขุ่น เป็นสีเขียวเข้ม ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากกิ่งและใบของมะกอกโคกมีสีน้ำตาลปนเขียว และสีเขียวขุ่น ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ผลได้สารสกัด และลักษณะของสารสกัดจากกิ่งและใบของแปะและมะกอกโคก

ชนิดสารสกัด	ผลได้สารสกัด (ร้อยละสารสกัด/ปริมาตรตัวอย่างสด)	ลักษณะสารสกัด
กิ่งต้นแปะ	6.35	สีน้ำตาลปนสีเขียว
ใบแปะ	9.65	สีเขียวขุ่น สีเขียวเข้ม
กิ่งมะกอกโคก	5.00	สีน้ำตาลปนเขียว
ใบมะกอกโคก	11.85	สีเขียวขุ่นเข้ม

จากผลการสกัดสารที่แสดงในตารางข้างต้น จะเห็นว่าตัวอย่างที่ได้จากใบจะได้ปริมาณผลได้ของสารสกัดต่อตัวอย่าง มีค่ามากกว่าผลได้จากการสกัดสารจากเนื้อกิ่งของพืชทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้ จะเห็นว่าสารสกัดที่ได้จากใบจะมีสีเขียวเข้มกว่าสารที่สกัดจากกิ่งของพืชทั้ง 2 ชนิดด้วย สารสกัดจากใบที่มีสีเขียวเข้มมากกว่าสารสกัดจากกิ่ง เกี่ยวข้องกับโครงสร้างใบพืชมีรงควัตถุคลอโรฟิลล์ที่มากกว่าส่วนกิ่ง เนื้อไม้ หรือลำต้น โดยทั่วไปใบพืชจะมีปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์ที่มากกว่าส่วนอื่น ๆ ของพืช และส่วนใบพืชจึงมีหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง

Naidoo et al. (2022) สกัดสารออกฤทธิ์จากส่วนต่าง ๆ ของ *Tabernaemontana ventricosa* Hochst. ex A. DC. ได้แก่ ใบ ลำต้น และยาง ในตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ เฮกเซน

คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ซึ่งสามารถสกัดสารจากใบได้ผลได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับอีก 2 ส่วนนั้น ในทุกตัวทำละลาย ซึ่งสอดคล้องเช่นเดียวกับการสกัดได้ของสารสกัดในการดำเนินการนี้

4.4 การออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ของสารสกัดจากต้นแปะและมะกอกโคก

สารสกัดที่ได้จากกิ่งและใบ ของต้นแปะและมะกอกโคกถูกนำมาทดสอบการออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* โดยวิธีการ Agar diffusion ด้วยสารสกัดหยาบแต่ละความเข้มข้น ได้แก่ 500 300 และ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการทดสอบ แสดงว่าสารสกัดจากกิ่งและใบ ของแปะและมะกอกโคกสามารถออกฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ (ตารางที่ 4.6)

กิ่งต้นแปะสามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง *B. cereus* ได้เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (Inhibition zone) 1.20 1.15 และ 1.10 เซนติเมตร จากการใช้สารสกัดเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 500 300 และ 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการยับยั้ง *S. aureus* ด้วยสารสกัดจากกิ่งแปะที่ความเข้มข้น 500 300 และ 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถแสดงโซนยับยั้งเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.80 0.85 และ 0.90 เซนติเมตร ตามลำดับ และสารสกัดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้เส้นผ่านศูนย์กลางยับยั้ง คือ 0.85 0.80 และ 0.90 เซนติเมตร ตามลำดับ

สารสกัดจากใบแปะที่ความเข้มข้น 500 300 และ 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเป็น 1.20 1.15 และ 1.20 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง *S. aureus* ได้แก่ 0.91 0.90 และ 0.95 เซนติเมตร ตามลำดับ และเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง *E. coli* คือ 1.40 1.45 และ 1.30 เซนติเมตร ตามลำดับ

กิ่งต้นมะกอกโคกให้สารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *B. cereus* ได้เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งเป็น 1.30 1.35 และ 1.10 เซนติเมตร จากสารสกัดกิ่งมะกอกโคกความเข้มข้น 500 300 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในการทดสอบการยับยั้ง *S. aureus* พบโซนยับยั้งการเจริญเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.90 0.85 และ 0.85 เซนติเมตร ตามลำดับ และสารสกัดของกิ่งมะกอกโคกที่ความเข้มข้น 500 300 และ 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญได้เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง 1.10 1.09 และ 0.90 เซนติเมตร ตามลำดับ

สำหรับสารสกัดที่ได้จากใบมะกอกโคก ที่ความเข้มข้น 500 300 และ 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถแสดงโซนยับยั้งการเจริญ *B. cereus* ได้เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.35 1.30 และ 1.20 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับการเส้นผ่านศูนย์กลางยับยั้ง *S. aureus* 1.55 1.25 และ 1.15

เซนติเมตร ตามลำดับ และสารสกัดชนิดนี้สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง 1.35 1.30 และ 0.9 เซนติเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 การเกิดโซนยับยั้งของสารสกัดจากกิ่งและใบของแปะและมะกอกโคก

ชนิดสารสกัด	ชนิดแบคทีเรีย	โซนยับยั้งที่ความเข้มข้นต่าง (เซนติเมตร)		
		500	300	150
กิ่งต้นแปะ	<i>B. cereus</i>	1.20	1.15	1.10
	<i>S. aureus</i>	0.80	0.85	0.90
	<i>E. coli</i>	0.85	0.80	0.90
ใบแปะ	<i>B. cereus</i>	1.20	1.15	1.20
	<i>S. aureus</i>	0.91	0.90	0.95
	<i>E. coli</i>	1.40	1.45	1.30
กิ่งมะกอกโคก	<i>B. cereus</i>	1.30	1.35	1.11
	<i>S. aureus</i>	0.90	0.85	0.85
	<i>E. coli</i>	1.10	1.09	0.90
ใบมะกอกโคก	<i>B. cereus</i>	1.35	1.30	1.20
	<i>S. aureus</i>	1.55	1.25	1.15
	<i>E. coli</i>	1.35	1.30	0.90

จากผลการทดสอบจะเห็นว่าสารสกัดจากกิ่งแปะสามารถเกิดโซนยับยั้งการเจริญ *B. cereus* ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น สำหรับสารสกัดจากใบแปะสามารถแสดงโซนยับยั้งการเจริญ *E. coli* และ *B. cereus* ได้ชัดเจนดีกว่า *S. aureus* สำหรับสารสกัดกิ่งมะกอกโคกสามารถยับยั้งการเจริญ *B. cereus* ได้โซนยับยั้งที่ขนาดกว้างกว่า *S. aureus* และ *E. coli* และสำหรับสารสกัดจากใบมะกอกโคกสามารถแสดงโซนการยับยั้ง *B. cereus*, *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดี และการเกิดโซนใสจากสารสกัดกิ่งมะกอกโคกมีขนาดชัดเจนที่มากกว่าสารสกัดจากกิ่งและใบของแปะ และชัดเจนมากกว่าสารสกัดจากกิ่งมะกอกโคก

จะเห็นว่าสารสกัดจากกิ่งและใบของทั้งแปะ และมะกอกโคกสามารถแสดงโซนยับยั้ง *B. cereus* ได้ชัดเจนดี แต่การเกิดโซนยับยั้งต่อ *S. aureus* น้อยกว่า ซึ่งผลการทดสอบนี้แตกต่างจากรายงานของ Mostafa, A.A. et al. (2018) ที่ทดสอบการยับยั้งการเจริญจากสารสกัดจากพืช 5 ชนิด

ได้แก่ *Cumimum cymimum*, *Punica granatum*, *Syzygium aromaticum*, *Thymus vulgaris* และ *Zingiber officinales* ได้โซนยับยั้งต่อ *S. aureus* ที่กว้างกว่า *B. cereus* อย่างชัดเจน ในการดำเนินการวิจัยนี้ยังพบว่าสารสกัดจากแปะและมะกอกโคกทั้งส่วนกิ่งและใบ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญด้วยการแสดงโซนใสต่อ *E. coli* ได้ ซึ่งสอดคล้องเช่นเดียวกับสารสกัดจากพืชทั้ง 5 ชนิดที่ Mostafa, A.A. et al. (2018) รายงาน อย่างไรก็ตามสารสกัดจากพืชบางชนิด ได้แก่ *Cumimum cymimum*, *Thymus vulgaris* และ *Zingiber officinales* ที่ไม่สามารถแสดงการเกิดโซนยับยั้ง *E. coli* ได้

ปัจจัยของแกรมแบคทีเรียก่อโรคไม่ใช่ปัจจัยอย่างเดียว หรือไม่ใช่ปัจจัยสำคัญต่อการยับยั้งได้ด้วยสารสกัดจากพืช โดยจากการดำเนินการในที่นี่ จะเห็นว่าสารสกัดจากกิ่งและใบของแปะ และสารสกัดจากกิ่งของต้นมะกอกโคกสามารถแสดงการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ได้ดี แต่การเกิดโซนยับยั้งต่อ *S. aureus* ได้น้อยกว่า ทั้งที่แบคทีเรีย *B. cereus* และ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้ สารสกัดจากกิ่งมะกอกโคกยังสามารถเกิดโซนยับยั้งต่อแบคทีเรีย *E. coli* และ *B. cereus* ได้ชัดเจนกว่าโซนการยับยั้งบน *S. aureus* ซึ่งผลการทดสอบในที่นี่ สอดคล้องกับรายงานผลการทดสอบของ Mostafa, A.A. et al. (2018) ที่แสดงว่าสารสกัดจากพืชบางชนิด เช่น *Cumimum cymimum* สามารถให้โซนยับยั้งต่อ *S. aureus* ขณะที่ไม่เกิดโซนยับยั้งทั้งบน *B. cereus* และ *E. coli*

4.5 ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากต้นแปะและมะกอกโคก

สารสกัดจากกิ่งและใบของแปะและมะกอกโคกถูกนำมาเตรียมลงในอาหาร Nutrient broth ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 500 300 150 100 80 60 40 15 10 และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยมีแบคทีเรียก่อโรคที่มีค่าความขุ่น 0.05 แล้วนำมาบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อทดสอบการเจริญได้ของแบคทีเรียในสารสกัดแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้น โดยผลการทดสอบพบว่า เมื่อสารสกัดที่ความเข้มข้นสูง จะพบการเจริญได้น้อยลง

สารสกัดจากกิ่งแปะที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญได้ของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด (*B. cereus*, *S. aureus* และ *E. coli*) ส่วนสารสกัดจากใบแปะที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* และ *S. aureus* ได้ และที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ สำหรับกิ่งมะกอกโคก

พบว่าที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ ขณะที่สารสกัดจากใบมะกอกโคกความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้ และ ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *E. coli* ได้ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.7 ความเข้มข้นต่ำสุด ของสารสกัดในการยับยั้ง (MIC) แบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด

ชนิดสารสกัด	แบคทีเรีย	โซนยับยั้งจากสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)									
		500	300	150	100	80	60	40	15	10	5
กิงแปะ	<i>B. cereus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ใบแปะ	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
กิงมะกอกโคก	<i>B. cereus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ใบมะกอกโคก	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ – คือไม่พบความขุ่นที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (Visible observation) และ + คือพบความขุ่นที่มองเห็นด้วยตาเปล่า ความขุ่นนี้เทียบกับความขุ่นของหลอดที่มีสารแขวนลอยแบคทีเรียก่อโรคที่ปราศจากการเติมสารสกัด

จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียได้ จะเห็นว่ากิงแปะให้สารที่ออกฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่ำสุด 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากใบแปะมีความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* ได้ที่ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ ความเข้มข้นในการยับยั้งต่อ *E. coli* ที่ความเข้มข้นสารสกัดต่ำสุดคือ 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งผลการทดสอบนี้เป็นไปในแนวโน้มเดียวกับโซนยับยั้งที่ แสดงในผลการทดสอบที่ 4.6 ส่วนความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดกิงมะกอกโคก คือ 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นสารสกัดจากใบ

มะกอกโคก คือ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดมะกอกโคกที่ยับยั้ง *S. aureus* และ *E. coli* ได้ คือ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการทดสอบนี้มีความสอดคล้องกับโซนยับยั้งของสารสกัดจากกิ่งและใบมะกอกโคก โดยการเกิดโซนยับยั้งของสารสกัดจากกิ่งมะกอกโคกเกิดโซนยับยั้งเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่าสารสกัดจากใบมะกอกโคก

4.6 ความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายแบคทีเรียของสารสกัดจากต้นแปะและมะกอกโคก

อาหารแขวนลอยแบคทีเรียที่บ่มร่วมกับสารสกัดจากกิ่งและใบของแปะและมะกอกโคกถูกนำมาหยดทดสอบ (Drop plate) บนอาหาร NA ใหม่อีกครั้ง แล้วบ่มที่สภาวะเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเจริญได้บนอาหาร ซึ่งจากผลการทดสอบแสดงว่าที่ความเข้มข้นสูง ๆ ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด นอกจากนี้ได้สังเกตการเจริญได้เมื่อใช้ความเข้มข้นลดลง

สารสกัดจากกิ่งของแปะที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรสามารถทำให้ไม่พบการเจริญได้อีกของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด ส่วนใบแปะที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำให้แบคทีเรีย *B. cereus* และ *S. aureus* ไม่สามารถเจริญได้อีก ส่วนที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีผลในการทำลายการเจริญของ *E. coli* ได้ สำหรับการใส่สารสกัดจากใบมะกอกโคกที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) สามารถทำลายการเจริญของ *B. cereus* ได้ สารสกัดจากใบมะกอกโคกความเข้มข้นต่ำสุด คือ 60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถทำลายการเจริญของ *S. aureus* ได้ และนอกจากนี้ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดมะกอกโคก ที่ 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ก็สามารถทำลายการเจริญได้ของ *E. coli* (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการทำลายแบคทีเรีย (MBC) ก่อโรคทั้ง 3 ชนิด

ชนิดสารสกัด	แบคทีเรีย	โซนยับยั้งจากสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)									
		500	300	150	100	80	60	40	15	10	5
กิ่งแปะ	<i>B. cereus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ใบแปะ	<i>B. cereus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
กิ่งมะกอกโคก	<i>B. cereus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
ใบมะกอกโคก	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ – คือไม่พบการเจริญได้ของแบคทีเรียบน NA และ + คือพบการเจริญอีกบนอาหาร NA

ต้นแปะและมะกอกโคก ไม่มีผลการวิจัยที่แพร่หลายเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ในพืชจีนัสเดียวกันมีการแสดงว่าพืชในจีนัสเดียวกันสามารถออกฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดย *Vitex agnus-cactus* L. สามารถออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียและราก่อโรคได้ ซึ่งออกฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* ได้น้อยที่สุด แต่สามารถยับยั้งการเจริญ *B. subtilis* และ *Candida albicans* ด้วยความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง 15 และ 7.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Bakr et al. 2020) ซึ่งต้นแปะหรือชื่อวิทยาศาสตร์ *Vitex scabra* อยู่ในจีนัส *Vitex* เช่นกัน

นอกจากนี้สำหรับสารสกัดจากมะกอกโคก (*Schrebera swietenoides*) สามารถต้านการเจริญจุลินทรีย์ได้เช่นกัน โดย Niranjan, M.H. et al. (2010) ได้แสดงว่าสารสกัดจากมะกอกโคกสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ทั้ง 14 ชนิดได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการต้านแบคทีเรียในที่นี้จะเห็นว่าสารสกัดจากใบมะกอกโคกสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 3 ชนิด ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายการเจริญ คือ 40-15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัดจากพืชสามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายประการ ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ การต้านอักเสบ และการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ในการแสดงการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ของสารสกัดเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดจุลินทรีย์ก่อโรค ชนิดสารสกัด ปริมาณสารสกัด และชนิดของสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในสารสกัดด้วย ตัวอย่างพืชในจีนัส *Vitex* เช่น น้ำมันหอมระเหยของ *Vitex agnus-cactus* L. มีสารสำคัญหลายชนิดและสารสำคัญบางชนิด เช่น Sabinene, 1,8-cineole และ Linalool ออกฤทธิ์ในการต้านการเจริญจุลินทรีย์ได้ (Kustrak et al., 1994) นอกจากนี้ ในสารสกัดจากใบมะกอกโคกยังสามารถพบสารสำคัญบางชนิดได้ซึ่งออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรค เช่น Oleanolic (Tulliballi et al., 2013) ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากมะกอกโคกที่ดำเนินการในที่นี้

จากผลการดำเนินการที่กล่าวมาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าใบแปะและมะกอกโคกมีความสามารถดีในการต้านการเจริญ ทำลายการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ทั้ง 3 ชนิดได้ดี ผลการดำเนินการนี้สำคัญอย่างยิ่งต่อการเข้าใจคุณสมบัติและประโยชน์ของพืชท้องถิ่น และโครงการวิจัยนี้

สามารถนำไปสู่การต่อยอดต่อไปได้ ทั้งการจำแนกประเภทสารสำคัญ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง
เข้าใจและการอนุรักษ์ร่วมกับการใช้ประโยชน์ของพันธุ์พืชท้องถิ่นต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลองการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะกอกโคกและแปะ

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นเนื้อเยื่อตาข้างและกิ่งอ่อนของมะกอกโคกที่ให้ผลดีที่สุด และลดการปนเปื้อนจากเชื้อราได้มากที่สุดคือสูตรที่นำเนื้อเยื่อมาแช่ในแคปแทนนาน 15 นาที ตามด้วยแช่ในเบตาดีนนาน 15 นาที แช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% นาน 20 วินาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 20% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 20 นาที และสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 10% ร่วมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยดนาน 10 นาที เชยาส่งมาเสมอพบว่าอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 87.23 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการปนเปื้อน 12.77 เปอร์เซ็นต์ และเป็น การปนเปื้อนจากเชื้อราทั้งหมดโดยไม่พบการปนเปื้อนจากแบคทีเรียเลย การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของมะกอกโคกประสบปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อราค่อนข้างสูง แต่เมื่อมีการเพิ่มขั้นตอนการแช่สารกันราแคปแทน และแช่ในเบตาดีน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อที่ติดมากับชิ้นส่วนของพืชได้

ผลการชักนำชิ้นเนื้อเยื่อให้เกิดการสร้างแคลลัสพบว่าชิ้นเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 20 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เร็วและมีขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อบันทึกผลการทดลองในเวลา 8 สัปดาห์ โดยผลของฮอร์โมน BA สามารถชักนำให้ชิ้นเนื้อเยื่อมะกอกโคกเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสตามความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มมากขึ้น แคลลัสของมะกอกโคกจะมีสีเขียวและเกาะกันแน่น

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นเนื้อเยื่อตาข้างของต้นแปะที่ให้ผลดีที่สุด และลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้มากที่สุดคือสูตรที่แช่ชิ้นเนื้อเยื่อใน แอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 20 วินาที แล้วฟอกในสารละลายไฮเตอร์ 15% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที และสารละลายไฮเตอร์ 10% ร่วมกับ Tween-20 จำนวน 2-3 หยด เป็นเวลา 10 นาที เชยาลดการฟอกฆ่าเชื้อ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 80% และมีอัตราการปนเปื้อนน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอื่น นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารละลายไฮเตอร์ขึ้น พบว่าการปนเปื้อนลดน้อยลง แต่ชิ้นเนื้อเยื่อมีลักษณะเปื้อนยุบเนื่องจากการกัดทำลายของน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ

ผลการชักนำขึ้นเนื้อเยื่อต้นแปะให้เกิดการสร้างแคลสซิฟิเคชันเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลสซิฟิเคชันได้เร็วและมีขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อ บันทึกผลการทดลองในเวลา 8 สัปดาห์ โดยผลของฮอร์โมน BA ที่เหมาะสมสามารถชักนำให้ขึ้นเนื้อเยื่อต้นแปะเปลี่ยนแปลงเป็นแคลสซิฟิเคชันได้ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฮอร์โมนขึ้นขนาดของแคลสซิฟิเคชันจะลดลงและเกิดการสร้างเป็นยอดอ่อนเล็กๆจำนวนหลายยอดบนผิวด้านนอกของแคลสซิฟิเคชัน

5.2 ผลที่ได้และลักษณะสารสกัดของกิ่งและใบมะกอกโคก

5.2.1 ผลได้สารสกัด และลักษณะของสารสกัด มีดังนี้

5.2.1.1 ในการสกัดสารจากกิ่งแปะ ได้ผลได้ร้อยละ 6.35 (สารสกัด/ปริมาณตัวอย่างสด) และสารสกัดมีลักษณะสีน้ำตาลปนเขียว

5.2.1.2 การสกัดสารจากใบแปะ ได้ผลได้ ร้อยละ 9.65 (สารสกัด/ปริมาณตัวอย่างสด) และสารสกัดมีลักษณะสีเขียวขุ่น และสีเขียวมีความเข้มข้น

5.2.1.3 การสกัดสารจากกิ่งมะกอกโคก ได้ผลได้ ร้อยละ 5.00 (สารสกัด/ปริมาณตัวอย่างสด) และสารสกัดมีลักษณะสีน้ำตาลปนเขียว

5.2.1.4 การสกัดสารจากใบมะกอกโคก ได้ผลได้ ร้อยละ 11.85 (สารสกัด/ปริมาณตัวอย่างสด) และสารสกัดมีลักษณะสีเขียวขุ่น และมีความเข้มข้น

5.3 การออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ของสารสกัดจากต้นแปะและมะกอกโคก

ในการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในการดำเนินการนี้ทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *E. coli* โดยใช้สารสกัดหยาบแต่ละชนิด ด้วยความเข้มข้น 500 300 และ 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

5.3.1 โชนยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจากสารสกัดจากต้นแปะและมะกอกโคก มีดังนี้

5.3.1.1 สารสกัดจากกิ่งแปะที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ความเข้มข้น สามารถเกิดโชนยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ได้โชนยับยั้งเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดกว้างกว่าโชนยับยั้งต่อ *S. aureus* และ *E. coli*

5.3.1.2 สารสกัดจากใบแปะที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ความเข้มข้น สามารถเกิดโชนยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *B. cereus* ได้โชนยับยั้งเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดกว้างกว่าโชนยับยั้งต่อ *S. aureus*

5.3.1.3 สารสกัดจากกิ่งมะกอกโคกที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ความเข้มข้น สามารถเกิด โชนยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* และ *E. coli* ได้ โชนยับยั้งเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดกว้างกว่าโชนยับยั้ง ต่อ *S. aureus*

5.3.1.4 สารสกัดจากใบมะกอกโคกที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ความเข้มข้น สามารถเกิด โชนยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus*, *S. aureus* และ *E. coli* ได้กว้าง และกว้างกว่าสารสกัด 3 ชนิด ข้างต้น

5.4 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากต้นแปะและมะกอกโคกในการยับยั้งแบคทีเรียได้

ในการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในการดำเนินการนี้ทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *E. coli* โดยการใช้สารสกัดหยาบแต่ละชนิด ด้วยความเข้มข้น 500 300 150 100 80 60 40 15 10 และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

5.4.1 ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจากสารสกัดจากต้นแปะและมะกอกโคก มีดังนี้

5.4.1.1 สารสกัดจากกิ่งแปะที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิดได้

5.4.1.2 สารสกัดจากใบแปะที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *B. cereus* และ *S. aureus* ได้ และความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* ได้

5.4.1.3 สารสกัดจากกิ่งมะกอกโคกที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิดได้

5.4.1.4 สารสกัดจากใบมะกอกโคกที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* และความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ได้

5.4.1.5 สารสกัดจากใบมะกอกโคกแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีกว่าสารสกัดอีก 3 ชนิด

5.5 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากต้นแปะและมะกอกโคกในการทำลายแบคทีเรีย

ในการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในการดำเนินการนี้ทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *E. coli* โดยการใช้สารสกัดหยาบแต่ละชนิด ด้วยความ

เข้มข้น 500 300 150 100 80 60 40 15 10 และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วทดสอบการเจริญบนอาหารหลังจากการบ่มแบคทีเรียร่วมกับสารสกัดแล้ว

5.5.1 ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจากสารสกัดจากต้นแปะและมะกอกโคก มีดังนี้

5.5.1.1 สารสกัดจากกิ่งแปะที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายการเจริญแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิดได้

5.5.1.2 สารสกัดจากใบแปะที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายแบคทีเรียก่อโรค *B. cereus* และ *S. aureus* ได้ และความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายการเจริญแบคทีเรีย *E. coli* ได้

5.5.1.3 สารสกัดจากกิ่งมะกอกโคกที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิดได้

5.5.1.4 สารสกัดจากใบมะกอกโคกที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายการเจริญแบคทีเรีย *B. cereus* และ *E. coli* และความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus*

5.5.1.5 สารสกัดจากใบมะกอกโคกแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ดีกว่าสารสกัดอีก 3 ชนิด

5.6 ข้อเสนอแนะ

5.6.1 ควรศึกษาในระดับพันธุกรรมของมะกอกโคก เนื่องจากเนื้อเยื่อมะกอกโคกถูกชักนำให้เป็นแคลลัสด้วยฮอร์โมนที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูง ซึ่งมีรายงานว่าพืชที่ชักนำโดยฮอร์โมนที่มีความเข้มข้นสูงนั้นมีแนวโน้มเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมที่สูงขึ้น

5.6.2 ควรมีการชักนำให้แคลลัสเกิดการสร้างเป็นต้นอ่อนทั้งในมะกอกโคกและต้นแปะ เนื่องจากการทดลองในครั้งนี้สิ้นสุดระยะเวลาการรับทุน ทั้งนี้อายุและขนาดของแคลลัสยังไม่เหมาะสมที่จะย้ายอาหารที่ชักนำให้เป็นต้นได้

5.6.3 สารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิดสามารถเกิดการยับยั้งการเจริญแบบคิเรียก่อโรคได้ ดังนั้นการเข้าใจชนิดสารออกฤทธิ์จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาต่อไปเกี่ยวกับการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์พืชท้องถิ่นนี้

5.6.4 สารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิดสามารถเกิดการยับยั้งการเจริญแบบคิเรียก่อโรคได้ นอกจากนี้หากมีความเข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ จะเป็นประโยชน์มากขึ้นด้วย

เอกสารที่ใช้อ้างอิง

- Bakr, R.O., Zaghloul, S.S., Hassan, R.A., Sonousi, A., Wasfi, R., and Fayed, M.A. (2020). Antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* essential oil and molecular docking study of its major constituents. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(1), 184-193.
- Chotchoungchatchaia, S., Saralampa, P., Jenjittikulb, T., Pornsiripongsec, S. and Prathantururug, S. (2012). Medicinal plants used with Thai Traditional Medicine in modern healthcare services: A case study in Kabchoeng Hospital, Surin Province, Thailand. *Journal of Ethnopharmacology* 141(1): 193–205.
- Kustrak, D., Kuftinec, J., and Blazević, N. (1994). Composition of the Essential Oil of *Vitex agnus-castus* L. *Journal of Essential Oil Research*, 6(4), 341-344.
- Mitra, S.K., Sundaram, R., Venkataranganna, M.V., Gopumadhavan, S., Prakash, N.S., Jayaram, H.D., Sarma, D.N.K. (2000). Anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activity of Ophthacare brand, an herbal eyedrops. *Phytomedicine* 7(2) : 123-127.
- Mostafa, A.A., Al-Askar, A.A., Almaary, K.S., Dawoud, T.M., Sholkamy, E.N., and Bakri, M.M. (2018). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi journal of biological sciences*, 25(2), 361-366.
- Naidoo, C.M., Naidoo, Y., Dewir, Y.H., Singh, M., Daniels, A.N., and El-Ramady, H. (2022). In Vitro investigation of the antioxidant and cytotoxic potential of *Tabernaemontana ventricosa* hochst. Ex A. DC. Leaf, stem, and latex extracts. *Horticulturae*, 8(2), 91.
- Niranjan, M.H., Kavitha, H.U., Sreedharamurthy, S., and Sudarshana, M.S. (2010). Antibacterial activity of *Schrebera swietenoides* Roxb. against some human pathogenic bacteria. *Journal of Pharmacy Research*, 3(8), 1779-1781.
- Pranom Chantaranothai. (2011). A Revision of the Genus *Vitex* (Lamiaceae) in Thailand *Tropical Natural History*. 11(2) : 91-118.

- Tulliballi, S., and Seru, G. (2013). Hepatoprotective and in vitro antimicrobial activities and phytochemical analysis of *Schrebera swietenoides* (Roxb). Journal of Pharmacy Research, 6(4), 466-469.
- Velavarthipati, A.D. and Mallikarjuna, K. (2015). Screening and quantification of phytochemicals in leaf extracts of *Schrebera swietenoides* and *Homalium zeylanicum*. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 6(4): 521-529.
- Wajid, S. and Mohammed, T. (2017). Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antipyretic Activities of Ethyl Acetate Fraction of Ethanolic Extract of *Schrebera swietenoides* Roxb. Root. European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences. 4(12) : 473-477.
- ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์. (2565). สืบค้นเมื่อ 28 สิงหาคม 2565
http://www.qsbg.org/Database/Botanic_Book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=1127
- มานี เตื้อสกุล. (2550). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชเพื่อการเกษตร. สงขลา: คณะเทคโนโลยีการเกษตรมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.
- รองเดช ตั้งตระการพงษ์ และ จุลจิตร ตั้งตระการพงษ์. (2559).ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากใบสะระแหน่โดยตัวทำละลายเอทานอล. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 44(1) : 79-87.
- วรภาพ วีระพลากร. (2551). อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อขึ้นส่วนยอดมะคัง (*Vitex scabra* Wall. Ex Schauer) ในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิจัยรามคำแหง.11(1) : 75-84.
- มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ การขยายพันธุ์ขุนไผ่ศาลทักซิณ. (ม.ป.ป.). สืบค้นเมื่อวันที่ 1 เมษายน 2565.
https://kukr.lib.ku.ac.th/kukr_es/index.php?/BKN/search_detail/result/260744.
- สำนักงานประชาสัมพันธ์จังหวัดบุรีรัมย์. (2564). สืบค้นเมื่อวันที่ 1 เมษายน 2565.
<https://buriram.prd.go.th/th/page/item/index/id/12>.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สูตรอาหารดัดแปลง Murashige and Skoog (1962)

Chemical	Concentration (g/liter stock)
Nitrate stock	
Ammonium nitrate, NH_4NO_3	165.0
Potassium nitrate, KNO_3	190.0
Sulfate stock	
Magnesium sulfate, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37.0
Manganous sulfate, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.69
Zinc sulfate, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86
Cupric sulfate, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025
Halide stock	
Calcium chloride, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44.0
Potassium iodide, KI	0.083
Cobalt chloride, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025
PBMo stock	
Potassium phosphate, KH_2PO_4	17.0
Boric acid, H_3BO_3	0.620
Sodium molybdate, $2\text{H}_2\text{O}$	0.025
NaFeEDTA stock	
Ferrous sulfate, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.784
Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt, Na_2EDTA	3.724

การเตรียมอาหาร 1 L จาก stock solutions

โดยในขั้นแรกเราจะต้องทำการเตรียม stock solution ก่อน ดังนี้ การเตรียม stock solution ของ MS medium

Stock Solution 1 Macronutrients (10 x concentration)

ละลายสารเคมีเหล่านี้ในน้ำกลั่น 1 L :

NH_4NO_3 16.5 g

KNO_3 19.0 g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.4 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.7 g

KH_2PO_4 1.7 g

Stock Solution 2 Micronutrients (100 x concentration)

ละลายสารเคมีเหล่านี้ในน้ำกลั่น 1 L :

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2.2300 g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.8600 g

H_3BO_3 0.6200 g

KI 0.0830 g

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0250 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0025 g

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0025 g

Stock Solution 3 Vitamins (100 x concentration)

ละลาย vitamins เหล่านี้ในน้ำกลั่น 100 mL :

Glycine 0.020 g

Nicotinic acid 0.005 g

Pyridoxine HCl 0.005 g

Thiamine HCl 0.001 g

Myo-Inositol 1 g

Stock Solution 4 Fe-EDTA (100 x concentration)

ละลายสารเคมีเหล่านี้ในน้ำกลั่น 100 mL:

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.373 g

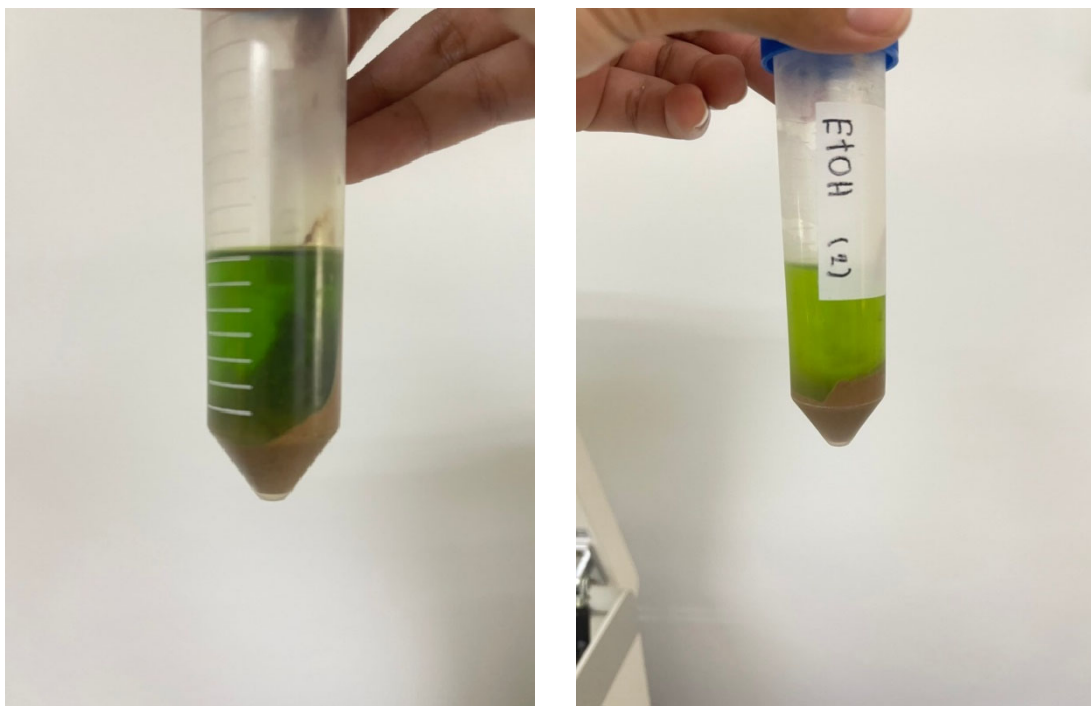
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.278 g

ละลาย EDTA ก่อน แล้วค่อยละลาย Iron

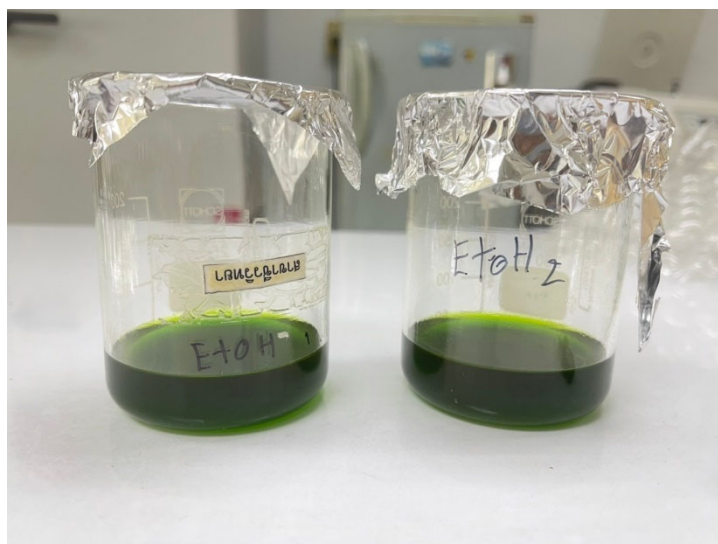
เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียมอาหารสูตร MS 1 L จาก stock solutions

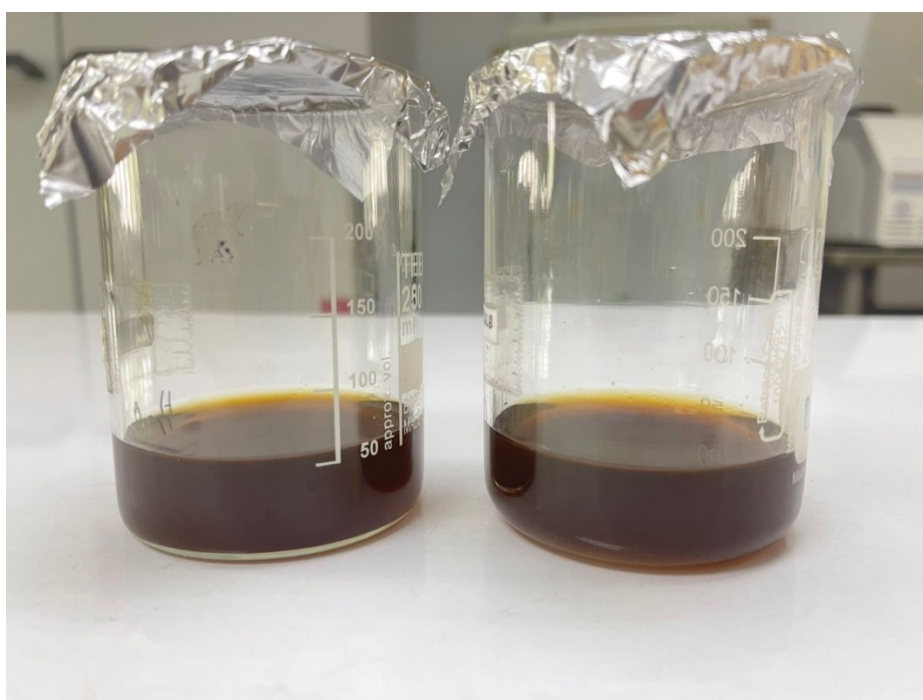
ก. เทน้ำสะอาดลงในบีกเกอร์ ให้มีปริมาตรประมาณ 600 mL



ภาพภาคผนวกที่ 1 สารสกัดใบมะกอกโคกที่สกัดด้วยเอทานอล

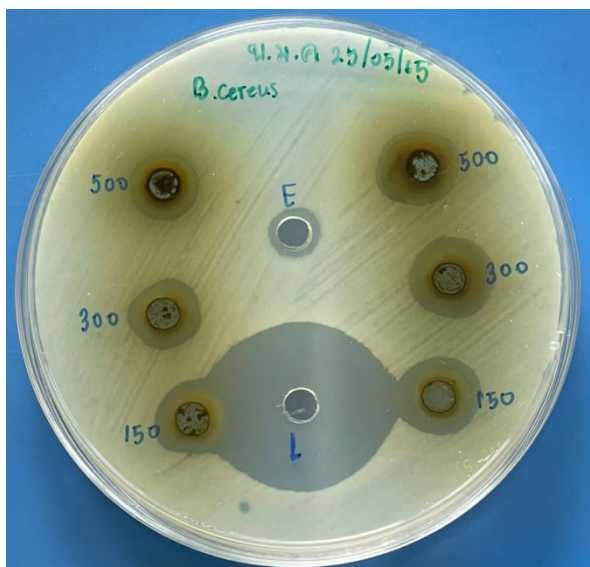


(f)

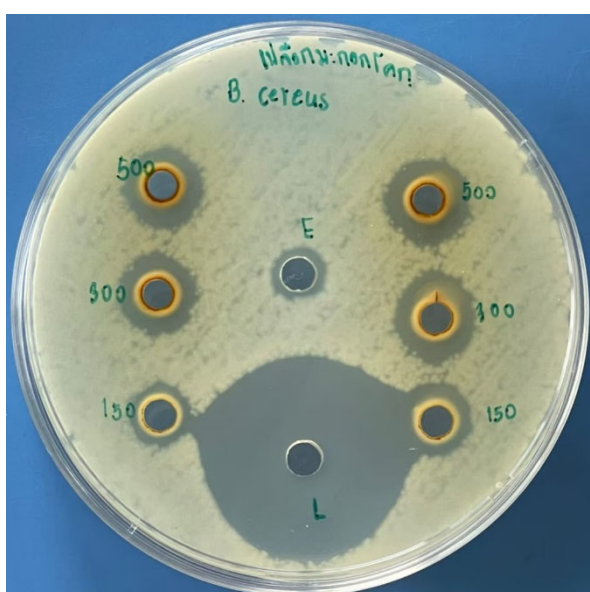


(g)

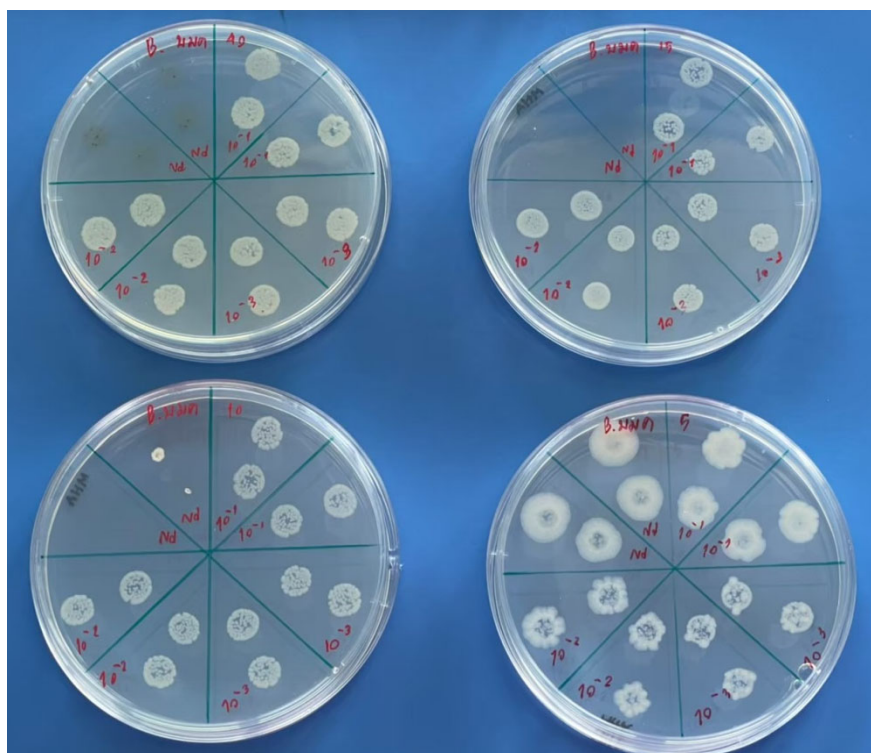
ภาพภาคผนวกที่ 2 (ก) สารสกัดใบมะกอกโคกที่สกัดด้วยเอทานอล และ (ข) สารสกัดใบมะกอกโคกที่สกัดด้วยน้ำ



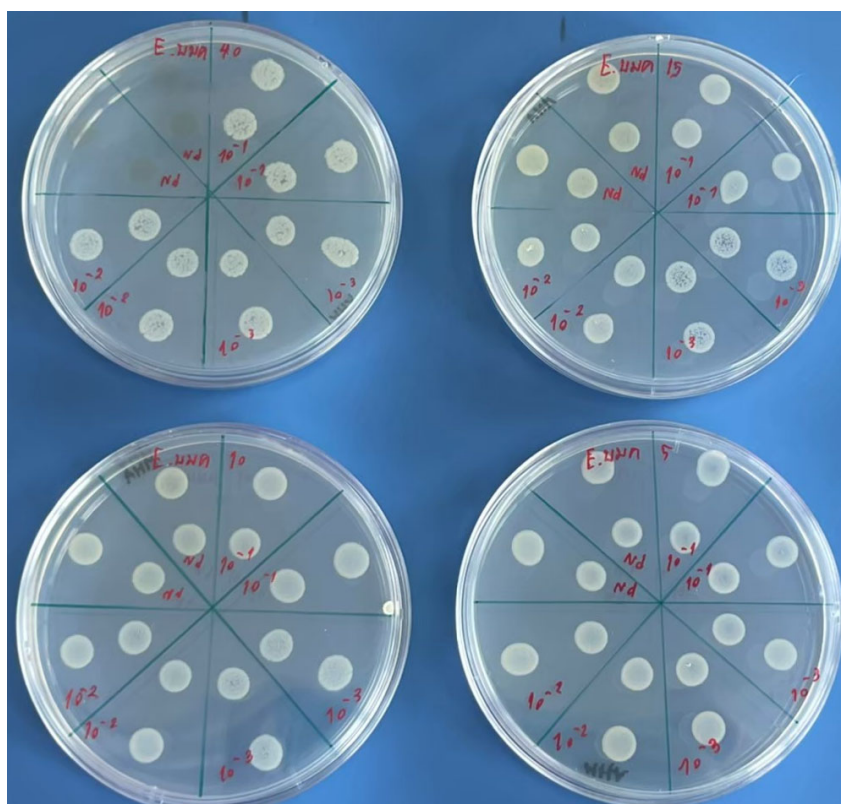
ภาพภาคผนวกที่ 3 การเกิดโซนยับยั้งต่อ *Bacillus cereus* บนอาหาร Mueller hinton agar ด้วยวิธีการทดสอบ Agar diffusion จากการใส่สารสกัดใบมะกอกโคกความเข้มข้น 500 300 และ 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



ภาพภาคผนวกที่ 4 การเกิดโซนยับยั้งต่อ *Bacillus cereus* บนอาหาร Mueller hinton agar ด้วยวิธีการทดสอบ Agar diffusion จากการใช้สารสกัดกิงมะกอกโคกความเข้มข้น 500 300 และ 150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



ภาพภาคผนวกที่ 5 การเกิดโซนยับยั้งต่อ *Bacillus cereus* บนอาหาร NA ด้วยวิธีการทดสอบ Drop plate จากการใช้สารสกัดใบมะกอกโคกความเข้มข้น 500 300 150 100 80 60 40 15 10 และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แสดงว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ลายการเจริญของ *Bacillus cereus* ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



ภาพภาคผนวกที่ 6 การเกิดโซนยับยั้งต่อ *Escherichia coli* บนอาหาร NA ด้วยวิธีการทดสอบ Drop plate จากการใช้สารสกัดใบมะกอกโคกความเข้มข้น 500 300 150 100 80 60 40 15 10 และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แสดงว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำลายการเจริญของ *Bacillus cereus* ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร