ผลของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดจากใบน้อยหน่า บัวบก และตำลึงต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

โดย

นางสาววราภรณ์ อู่ทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ผลของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดจากใบน้อยหน่า บัวบก และตำลึงต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

โดย
นางสาววราภรณ์ อู่ทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF CRUDE EXTRACTS OF LEAVES OF SUGAR APPLE, ASIATIC PENNYWORT AND IVY GOURD AGAINST *XANTHOMONAS ORYZAE* PV. *ORYZAE*

By

MISS Waraporn U-THONG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (ENVIRONMENTAL SCIENCE)
Department of ENVIRONMENTAL SCIENCE
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2017

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	ผลของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดจากใบน้อยหน่า บัวบก และตำลึงต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*
โดย	วราภรณ์ อู่ทอง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. กัณฑรีย์ ศรีพงศ์พันธุ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(ดร. ดาวรุ่ง สังข์ทอง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. กัณฑรีย์ ศรีพงศ์พันธุ์)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ดร. กาญจนา หริ่มเพ็ง)

57311319 : วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย, ใบน้อยหน่า, ใบบัวบก, ใบตำลึง, XANTHOMONAS ORYZAE PV. ORYZAE

นางสาว วราภรณ์ อู่ทอง: ผลของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดจากใบน้อยหน่า บัวบก และตำลึงต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ดร. กัณฑรีย์ ศรีพงศ์พันธุ์

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคขอบใบแห้งในข้าวด้วยสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึงที่สกัดด้วย methanol ทำการศึกษาโดยวิธี disk diffusion method ซึ่งเป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพเพื่อทดสอบความไวต่อการทดสอบของเชื้อ รวมทั้งทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ตลอดจนทดสอบอิทธิพลของปัจจัยทางด้านอุณหภูมิ (25-35°ซ) และ ช่วงแสง:ช่วงมืด (10:14 ชม., 12:12 ชม. และ 14:10 ชม.) ต่อการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ของสมุนไพรนั้น ๆ ด้วยวิธี broth macrodilution พบว่า สารสกัดจากใบพืชที่ทดสอบทั้ง 3 ชนิดสามารถยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยระดับการยับยั้งเชื้อด้วยสารสกัดแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบ และพบว่าสารสกัดจากใบน้อยหน่าและสารสกัดจากใบบัวบก มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ คือ ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/disc ทำให้เกิด inhibition zone ที่มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 9 และ 8 มม. ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากใบตำลึงที่ยับยั้งเชื้อได้ คือ ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/disc ซึ่งทำให้เกิด inhibition zone ที่มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 8 มม. ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากใบน้อยหน่าและใบบัวบกมีค่าเท่ากัน คือ มีค่าเท่ากับ 12,500 ไมโครกรัม/มล. และ 25,000 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ ส่วนค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากใบตำลึง มีค่าเท่ากับ 25,000 ไมโครกรัม/มล. และ 50,000 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากค่า MIC ที่ได้ พบว่าที่อุณหภูมิช่วง 25-30°ซ และทุกช่วงแสง:ช่วงมืดที่ทดสอบ ไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนี้ด้วยสารสกัดจากพืชที่ทดสอบ แต่ที่ 35°ซ ทำให้แบคทีเรียที่ทดสอบตาย

57311319 : Major (ENVIRONMENTAL SCIENCE)
Keyword : ANTIBACTERIAL ACTIVITIES, SUGAR APPLE LEAVES, ASIATIC PENNYWORT LEAVES, IVY GOURD LEAVES, XANTHOMONAS ORYZAE PV. ORYZAE

MISS WARAPORN U-THONG : ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF CRUDE EXTRACTS OF LEAVES OF SUGAR APPLE, ASIATIC PENNYWORT AND IVY GOURD AGAINST *XANTHOMONAS ORYZAE* PV. *ORYZAE* THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR GUNTHAREE SRIPONGPUN

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* is the causal agent of rice bacterial blight disease. The current research aimed to investigate the antibacterial activities of the methanol crude extracts of leaves of sugar apple, Asiatic pennywort and ivy gourd against this kind of bacteria. Antibacterial activities were tested by using disc diffusion method (Kirby-Bauer) and broth macrodilution method in order to achieve the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of the crude extracts. In addition, the effects of temperature (25-35°C) and photoperiodic regime (light: dark period of 10:14, 12:12 and 14:10 h) on the antibacterial activities of crude extracts of tested plants against *X. oryzae* pv. *oryzae* were also investigated. It was found that the methanol extracts of all tested plant leaves showed antibacterial activity against *X. oryzae* pv. *oryzae*. There was a direct correlation between antibacterial activity and the extract concentration of tested plant. The leave extracts of sugar apple and Asiatic pennywort at the minimum concentration of 500 mg/disc exhibited the activity against *X. oryzae* pv. *oryzae with* the inhibition zone diameter of 9 and 8 mm, respectively. While the leave extract of ivy gourd at the minimal concentration of 1,000 mg/disc showed antibacterial activity with the inhibition zone diameter of 8 mm. The MIC and MBC values of the crude extracts of sugar apple and Asiatic pennywort were the same at the concentrations of 12,500 mg/ml and 25,000 mg/ml, respectively; while the MIC and MBC values of that of ivy gourd were at the concentrations of 25,000 mg/ml and 50,000 mg/ml, respectively. According to the MIC values, the temperature range between 25-30°C and all tested photoperiodic regimes exhibited no effect on the antibacterial activity of the crude extract of tested plants against the bacterium. But the bacterial death

was observed at 35°C.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กัณฑรีย์ ศรีพงศ์พันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับงานวิจัย ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รวมทั้ง อาจารย์ ดร. ดาวรุ่ง สังข์ทอง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร. กาญจนา หริ่มเพ็ง กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ ส่งผลให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้ ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยสะดวกในการใช้เครื่องมือห้องปฏิบัติการและงานเอกสารต่าง ๆ ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ครอบครัว และทุกคนที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการสนับสนุน และเป็นกำลังใจให้คำปรึกษา คำแนะนำ ทำให้งานวิจัยประสบความสำเร็จได้ด้วยดี

วราภรณ์ อู่ทอง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ซ

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญรูป ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา 4

1.3 สมมติฐานของการศึกษา 4

1.4 ขอบเขตการศึกษา 4

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5

1.6 ขั้นตอนการศึกษา 5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6

2.1 พืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย 6

2.1.1 น้อยหน่า 6

2.1.2 บัวบก 6

2.1.3 ตำลึง 7

2.2 การสกัดสารด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction) 7

2.2.1 การสกัดสารจากของแข็ง 7

2.2.2 การสกัดสารจากของเหลว 8

2.2.3 การเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการแยก 8
2.2.4 หลักการสกัดสารด้วยตัวทำละลาย 9
2.2.5 ประโยชน์ของการสกัดด้วยตัวทำละลาย 9
2.3 การทำสารสกัดให้เข้มข้น 9
2.4 โรคขอบใบแห้งของข้าว (Bacterial Blight) 11
2.5 แบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 12
2.6 วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ 13
2.6.1 Agar Diffusion Test 14
2.6.2 Dilution Susceptibility Test 14
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 23
3.1 การสกัดสารจากสมุนไพร 23
3.2 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 23
3.3 การเตรียมสารแขวนลอย *X. oryzae* pv. *oryzae* 24
3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของสมุนไพรที่ศึกษาในการยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยวิธี Disc Diffusion 24
3.5 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า *X. oryzae* pv. *oryzae* (MBC) 25
3.5.1 การหาค่า Minimum Inhibition Concentration (MIC) 25
3.5.2 การหาค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) 26
3.6 การทดสอบผลของสภาวะทางกายภาพในการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร 26
3.6.1 อุณหภูมิ 26
3.6.2 ช่วงแสง 27
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย 28

4.1 Yield Percentage ของสารสกัดจากพืชที่ทดสอบ 28
4.2 ประสิทธิภาพของพืชที่ทดสอบในการยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* เมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc Diffusion 28
4.4 ผลของสภาวะทางกายภาพต่อการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยสารสกัดหยาบจากพืชที่ทดสอบ ด้วยวิธี Broth Macrodilution 40
4.4.1 อุณหภูมิ 40
4.4.2 ช่วงแสง 40
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ 42
สรุปผลการวิจัย 42
ข้อเสนอแนะ 42
รายการอ้างอิง 44
ประวัติผู้เขียน 50

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยสารสกัดเมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc Diffusion 29

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบการยังยั้ง *Xanthomonas* sp. ของสารสกัดของพืชชนิดต่าง ๆ ด้วย Methanol เมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc Diffusion 33

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบอัตราส่วน MBC/MIC ของสารสกัดจากพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิด 36

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบการทดสอบหาค่า MIC และค่า MBC ของเชื้อ *Xanthomonas* sp. ที่ทดสอบกับสารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ ด้วย Methanol 39

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 เครื่องระเหยแห้งลดความดันแบบหมุน 10

รูปที่ 2 อาการ kresek ของต้นข้าว 11

รูปที่ 3 การป้ายเชื้อบนผิวหน้าอาหาร MHA ในลักษณะทั้ง 3 ทิศทาง 24

รูปที่ 4 บริเวณที่ *X. oryzae* pv. *oryzae* ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดจากใบพืชที่ทดสอบ 30

รูปที่ 5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* (MIC) 37

รูปที่ 6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า *X. oryzae* pv. *oryzae* (MBC) 38

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศกสิกรรม ประชาชนส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรเป็นหลัก ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจหลักชนิดหนึ่งที่มีการเพาะปลูกมาก เนื่องจากข้าวเป็นธัญพืชอาหารหลักที่สำคัญประชากรโลกมากกว่าครึ่งบริโภคข้าวเป็นอาหาร ค่าเฉลี่ยความต้องการบริโภคข้าวทั่วโลกในปี พ.ศ. 2552-2553 มีค่าเป็น 438.73 ล้านตันข้าวสาร แล้วมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 468.63 ล้านตันข้าวสารในปีพ.ศ. 2555-2556 (เพิ่มขึ้น 6.81%) และ 479.96 ล้านตันข้าวสารในปีพ.ศ. 2556-2557 (เพิ่มขึ้น 2.42%) โดยปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการปลูกข้าวและการส่งออกข้าวของไทยนั้นมีหลายปัจจัย หนึ่งในปัจจัยหลัก คือ การระบาดของโรค ซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียผลผลิตทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก

โรคขอบใบแห้ง (bacterial blight) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จัดเป็นโรคที่สำคัญมากโรคหนึ่ง เนื่องจากส่งผลต่อการลดลงของผลผลิตและคุณภาพของข้าวทั่วโลก โดยพบการระบาดของโรคในแหล่งปลูกข้าวทั่วไป ทั้งพื้นที่นาน้ำฝนและในเขตชลประทาน อีกทั้งในช่วงปี พ.ศ. 2551-2555 ที่ทำการสำรวจโดยการสุ่มในแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทยจำนวน 28 จังหวัด พบว่า มีจำนวนถึง 25 จังหวัดที่มีการระบาดของโรคนี้ (สุจินต์ ภัทรภูวดล, 2555) โดยทั่วไปเกษตรกรนิยมใช้สารเคมีในการแก้ไขปัญหาโรคระบาด จึงอาจก่อให้เกิดปัญหาที่สำคัญอื่น ๆ ตามมา เช่น ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกร หรือผู้สัมผัสสารเคมีโดยตรง ซึ่งอาจทำให้เกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน หรือพิษแบบสะสมเป็นเวลานาน และทำให้เกิดปัญหาสุขภาพได้ในอนาคต การสะสมของสารเคมีในห่วงโซ่อาหาร และการทำลายสมดุลของระบบนิเวศ เป็นต้น จึงมีความพยายามที่จะหาวิธีการควบคุมโรคที่เหมาะสม เพื่อลดปัญหาที่จะตามมาจากการใช้สารเคมี (สุธาสินี อั้งสูงเนิน, 2558)

การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยในการควบคุมโรคพืชเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากเป็นวิธีการแก้ปัญหาที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และมีความปลอดภัยต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภค สมุนไพรไทยหลายชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ เช่น จากการศึกษาของ Nanasombat and Teckchuen (2009) ที่ทดสอบด้วยวิธี disc diffusion พบว่าใบขี้เหล็ก (*Cassia siamea*) ใบชะมวง (*Garcinia cowa*) ใบผักแขยง (*Limnophila aromatica*)

และใบผักแพว (*Polygonum odoratum*) ที่สกัดด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 400 mg/ml มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดี โดยเมื่อทดสอบกับ *Bacillus cereus* ทำให้เกิดบริเวณที่ถูกยับยั้ง (inhibition zone) ที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 9.3±1.6 mm, 20.2±3.6 mm, 21.0±5.2 mm และ 15.3±5.5 mm ตามลำดับ ส่วนเมื่อทดสอบกับ *Listeria monocytogenes* ทำให้เกิด inhibition zone ที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 7.5±0.5 mm, 11.0±1.0 mm, 12.2±3.4 mm และ 11.5±0.9 mm ตามลำดับ อีกทั้งสารสกัดของใบชะมวง ใบผักแขยง และใบผักแพว ที่ความเข้มข้นดังกล่าว สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* โดยทำให้เกิด inhibition zone ที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 10.2±0.3 mm, 12.5±2.5 mm และ 11.2±2.9 mm ตามลำดับ นอกจากนี้ วัชรา สุวรรณ์อาศน์ และ ศศิธร วุฒิวณิชย์ (2553) ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร 20 ชนิดด้วย 95% ethanol ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* ที่เป็นสาเหตุโรคเน่าเละของผักในระดับห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี paper disc agar diffusion พบว่า พืช 8 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดย 3 ลำดับแรกที่ให้ผลดีที่สุด ได้แก่ สารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก (*Terminalia bellirica*) ผลเบญกานี (*Quercus infectoria Olivier*) และเปลือกผลทับทิม (*Punica granatum*) โดยให้ค่าเฉลี่ย inhibition zone เท่ากับ 0.41, 0.33 และ 0.25 cm ตามลำดับ อีกทั้งประทุมพร ปลอดภัย, จิตติมา โสตถิวิไลพงศ์, วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ และ ดุสิต อธินุวัฒน์ (2558) ประเมินประสิทธิภาพสารสกัดจากพืช 6 ชนิด ได้แก่ ย่านาง (*Tiliacora triandra*) สาบเสือ (*Chromolaena odorata*) พิลังกาสา (*Ardisia polycephala*) มังคุด (*Garcinia mangostana*) ชะมวง และกาฝาก (*Helixanthera parasitica*) ด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate และ 95% ethanol ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (ECC) ที่เป็นสาเหตุโรคเน่าเละของคะน้าด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดจากใบชะมวงด้วย ethyl acetate ที่ความเข้มข้น 1,000,000 ส่วนในล้านส่วน (ppm) สามารถยับยั้งการเจริญของ ECC ได้สูงที่สุด โดยมีค่าความยาวเฉลี่ยของ inhibition zone เท่ากับ 1.2 cm

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงสนใจทดสอบผลของสารสกัดจากใบน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึง ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้งในข้าว ด้วยวิธี disc diffusion เพื่อทดสอบความไวของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ต่อสารสกัดหยาบจากใบพืชทั้ง 3 ชนิดที่ทดสอบ อีกทั้งทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC)

และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ตลอดจนทดสอบอิทธิพลของปัจจัยทางด้านอุณหภูมิ และช่วงแสง:ช่วงมืด ต่อการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยสมุนไพรนั้น ๆ เมื่อทดสอบด้วยวิธี broth macrodilution ซึ่งผลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืชได้อีกทางเลือกหนึ่ง

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

(1) ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่า (*Annona squamosal* L.) ใบบัวบก (*Cebtekka asuatuca* L. Urban) และใบตำลึง (*Coccinia grandis* L. Voigt) ที่สกัดด้วย methanol เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

(2) ทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และค่า minimum bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดจากใบน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึง ด้วยตัวทำละลาย methanol ต่อการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยวิธี broth macrodilution

(3) ศึกษาปัจจัยทางด้านอุณหภูมิ และช่วงแสงที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยสารสกัดจากพืชสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย methanol ด้วยวิธี broth macrodilution

1.3 สมมติฐานของการศึกษา

(1) สารสกัดจากพืชสมุนไพรต่างชนิดกัน คือ ใบน้อยหน่า บัวบก และตำลึงด้วยตัวทำละลาย methanol สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้แตกต่างกัน

(2) ปัจจัยต่าง ๆ ที่ต่างกัน เช่น อุณหภูมิ และช่วงแสงที่แตกต่างกันมีผลต่อสารสกัดจากพืชสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย methanol ที่ทดสอบ มีผลยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้แตกต่างกัน

1.4 ขอบเขตการศึกษา

(1) ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรแต่ละชนิด ได้แก่ ใบน้อยหน่า บัวบก และตำลึง ด้วยตัวทำละลาย methanol ต่อการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยวิธี disc diffusion ตามวิธีการของ Kirby-Bauer

(2) ทดสอบหาค่า MIC และค่า MBC ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรแต่ละชนิด ได้แก่ ใบน้อยหน่า บัวบก และตำลึง ด้วยตัวทำละลาย methanol ต่อการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* เมื่อทดสอบด้วยวิธี broth macrodilution (Jose, 2005)

(3) ทดสอบปัจจัยทางด้านอุณหภูมิ และช่วงแสงที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยสารสกัดจากพืชสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย methanol

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ คือ ทำให้ทราบถึง

(1) ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึง ที่สกัดด้วย methanol เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion

(2) ค่า MIC และค่า MBC ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรใบน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึง ด้วยตัวทำละลาย methanol ต่อการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยวิธี broth macro dilution

(3) สามารถทราบปัจจัยที่เหมาะสมทางด้านอุณหภูมิ และช่วงแสงในการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยสารสกัดจากพืชสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย methanol ด้วยวิธี broth macro dilution

1.6 ขั้นตอนการศึกษา

(1) ค้นคว้า สืบค้นข้อมูล

(2) รวบรวมข้อมูล

(3) วางแผนการวิจัยและเขียนโครงร่างวิจัย

(4) ขออนุมัติหัวข้อและโครงการวิทยานิพนธ์

(5) ดำเนินงานศึกษาวิจัย วิเคราะห์ข้อมูล สรุปและอภิปรายผล

(6) เขียนวิทยานิพนธ์

(7) เสนอวิทยานิพนธ์

(8) สอบวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย

2.1.1 น้อยหน่า

สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (2559a) รายงานว่า น้อยหน่าเป็นพืชในวงศ์ (family) Annonaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Annona squamosa* L. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก แตกกิ่งก้านสาขา เปลือกต้นเกลี้ยง สีเทาอมน้ำตาล ลำต้นสูงประมาณ 8 m ใบเดี่ยวรูปรี ปลายและโคนใบแหลม กว้างประมาณ 2.54-6.35 cm ยาว 7.62-15.24 cm สีเขียว ก้านใบยาว 1.27 cm เรียงสลับไปตามข้อต้น ดอกเดี่ยว ออกตามซอกใบห้อยลง กลีบเลี้ยง 3 กลีบ กลีบดอก สีเหลืองอมเขียว รูปหอก มี 6 กลีบ เรียง 2 ชั้น ชั้นละ 3 กลีบ หนาอวบน้ำ เกสรตัวผู้และรังไข่จำนวนมาก ผลเป็นผลกลุ่ม รูปกลมป้อม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 7.62-10.16 cm เปลือกผลเป็นสีเขียว ผิวขรุขระ เป็นปุ่มกลมนูนเชื่อมต่อกัน เนื้อผลสีขาว เมล็ดรูปไข่ สีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม สารสำคัญที่พบในใบน้อยหน่า ได้แก่ แอลคาลอยด์ (เช่น anonaine) และน้ำมันหอมระเหย (เช่น borneol, camphene, camphor, carbone, eugenol, geraniol, thymol, menthone และ pinene)

2.1.2 บัวบก

บัวบกเป็นพืชล้มลุกขนาดเล็ก อยู่ในวงศ์ Umbelliferae มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Centella asiatica* L. Urban ชื่อสามัญ Gotu kola ชื่อภาษาอังกฤษ Asiatic Pennywort เป็นผักพื้นบ้านและสมุนไพรที่มีอายุหลายปี ปลูกง่ายเลื้อยยาวไปตามพื้นดิน แตกรากตามข้อใบ ใบเป็นรูปไต ขอบใบหยัก กว้าง 1.5-5 cm ยาว 1-5 cm ก้านยาว 1-25 cm ดอกเป็นช่อ ออกตามซอกใบ ขนาดเล็ก 2-3 ดอก กลีบดอกสีม่วง ผลแบน บัวบกชอบขึ้นตามพื้นที่ชื้นแต่ไม่แฉะมากหรือน้ำท่วม ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด หรือตัดแยกไหลที่มีต้นอ่อนและราก นำไปปลูกในที่มีแสงแดดพอควรจะเจริญเติบโตได้ดี พบมากในประเทศแถบยุโรปเรื่อยมาจนถึงแถบแอฟริกาใต้ อินเดีย ปากีสถาน และศรีลังกา สารสำคัญที่พบในใบบัวบกจัดอยู่ในกลุ่ม triterpenoid glycoside ซึ่งประกอบด้วย asiatic acid, asiaticoside, madecassic acid หรือ สาร madecassol (จันทรพร ทองเอกแก้ว, 2556)

2.1.3 ตำลึง

สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (2559b) รายงานว่า ตำลึงเป็นพืชในวงศ์ Cucurbitaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Coccinia grandis* L. Voigt โดยมีลักษณะเป็นไม้เลื้อยเนื้อแข็ง ใบเดี่ยว เรียงสลับ มีมือเกาะเป็นเส้นยาวออกตรงข้ามใบ รูปค่อนข้างกลม หักเป็นห้ามุมหรือเว้าลึกเป็นแฉก 3 หรือ 5 แฉก กว้างและยาว 5-8 cm โคนใบเว้าเป็นรูปหัวใจ ดอกเดี่ยวหรือช่อ 2-3 ดอก ออกที่ซอกใบ แยกเพศ อยู่คนละต้น กลีบดอกสีขาว รูประฆัง ผลเป็นผลสด รูปทรงกระบอก โดยมีประโยชน์ทางยา คือ ใช้ใบแก้ไข้ โดยเป็นส่วนผสมในยาเขียว รากแก้ไข้ ใบสดขยี้ทาแก้คัน ถอนพิษปวดแสบปวดร้อน ตำรายากลางบ้านใช้ผลแก้เบาหวาน มีรายงานการทดลองในสัตว์ ระบุว่าสารสกัดเถาด้วยแอลกอฮอล์ น้ำคั้นผลดิบและผงใบแห้งมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด ซึ่งในใบตำลึงมีสาระสำคัญที่พบ คือกรด อมิโนหลายชนิด และสาร β-sitosterol ซึ่งมีรายงานว่ามีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดได้ในเวลาอันสั้น

2.2 การสกัดสารด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction)

การสกัดสารและแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟฟี เป็นการทำให้สารมีความบริสุทธิ์ขึ้น โดยอาศัยการละลายที่แตกต่างกัน และเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกสารต่าง ๆ ออกจากสารผสม การแยกสารบางชนิดออกจากสารผสมโดยใช้ตัวทำละลายสกัดออกมาเป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมากทางด้านเคมีอินทรีย์ สารผสมที่นำมาสกัดเป็นสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สารจากการสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ หรือสารจากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม โดยอาศัยสมบัติของการละลายของสารที่ต่างกันในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ สารผสมที่นำมาสกัดอาจเป็นได้ทั้งของแข็งและของเหลว แต่ตัวทำละลายที่ใช้สกัดมักเป็นของเหลว การสกัดทำได้หลายวิธี เช่น

2.2.1 การสกัดสารจากของแข็ง

สารผสมที่เป็นของแข็งมีมากมาย โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เป็นพืชและสัตว์ เช่น ใบไม้ ดอกไม้ เปลือกไม้ รากไม้ ผลไม้ เมล็ด และอื่น ๆ การสกัดโดยทั่วไปนั้น ทำให้ของแข็งแห้งเพื่อขจัดน้ำออกก่อน แล้วจึงบดให้ละเอียดเพื่อทำให้มีพื้นที่ผิวมาก ซึ่งจะสกัดสารออกมาได้มากที่สุด จากนั้นจึงนำไปแช่ในตัวทำละลาย หรือต้มที่อุณหภูมิจุดเดือดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด ตัวทำละลายที่ใช้ เช่นhexane, ether, methylene chloride, chloroform, acetone, alcohol หรือ น้ำ เมื่อ

แช่หรือต้มในระยะเวลาหนึ่ง กรองของแข็งออก และนำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออก จะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) ส่วนของแข็งที่เหลืออาจนำไปสกัดต่อได้อีก สำหรับการสกัดขั้นแรกด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เมื่อจะสกัดต่อจะใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้น วิธีนี้จะทำให้ได้สารสกัดหยาบที่มีสารผสมหลายชนิด เมื่อนำไปแยกต่อจะได้สารบริสุทธิ์ ซึ่งสามารถนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้างต่อไป

2.2.2 การสกัดสารจากของเหลว

เมื่อสารที่ต้องการสกัดเป็นของเหลว หรือเป็นสารที่อยู่ในตัวทำละลาย การสกัดจะต้องเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ ไม่ละลายกับตัวทำละลายที่มีอยู่เดิม แต่แยกชั้นออกจากกัน และต้องละลายสารที่ต้องการได้ดีกว่าตัวทำละลายเดิม ตามหลักการกระจายสาร (distribution law) การละลายของสารใดสารหนึ่งในตัวทำละลายสองชนิด จะมีการกระจายตัวของสารในตัวทำละลายทั้งสองชนิดในอัตราส่วนคงที่ ซึ่งขึ้นกับค่าคงที่ของการกระจาย (distribution coefficient or partition coefficient, K) เช่น สาร X ที่ละลายได้ทั้งในตัวทำละลาย A และ B จะทำให้มีค่า K ดังนี้

$$K = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารละลาย X ใน A}}{\text{ความเข้มข้นของสารละลาย X ใน B}}$$

เมื่อสกัดสาร X ออกจากตัวทำละลาย A โดยใช้ตัวทำละลาย B ปริมาณของ X ใน A จะลดลง นำสารละลายที่เหลือที่มี X ลดลงนี้ มาสกัดต่อด้วยตัวทำละลาย B อีก สาร X ในตัวทำละลาย A จะลดลงอีก ดังนั้นเมื่อใช้ตัวทำละลาย B ทีละน้อย แต่ใช้หลาย ๆ ครั้ง ก็จะทำให้ได้สาร X มาอยู่ในตัวทำละลาย B มากขึ้น และถ้า K มีค่ามากกว่า 1 แสดงว่าสาร X ละลายใน A ได้ดีกว่า B การใช้ B สกัดสาร X จะต้องทำหลายครั้ง แต่ถ้า K มีค่าน้อยกว่า 1 แสดงว่า สาร X ละลายใน B ได้ดีกว่าใน A การสกัดจึงไม่ต้องใช้ B หลายครั้ง (นิคริน ปุยนุเคราะห์, 2550)

2.2.3 การเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการแยก มีหลักการดังนี้ (สุวัฒนา ดันน์, 2561)

(1) ตัวทำละลายสามารถละลายสารที่ต้องการสกัดได้

(2) ตัวทำละลายจะต้องไม่ละลายสารอื่น ๆ ที่เราไม่ต้องการสกัด

(3) ตัวทำละลายจะต้องไม่ทำปฏิกริยากับสารที่เราต้องการสกัด ตัวทำละลาย สามารถแยกออกจากสารที่เราต้องการสกัดได้ง่าย มีจุดเดือดต่ำ ระเหยง่าย

(4) ตัวทำละลายไม่เป็นพิษ และมีราคาถูก

2.2.4 หลักการสกัดสารด้วยตัวทำละลาย

หลักการสกัดสารด้วยตัวทำละลาย มีหลักการดังนี้

เติมตัวทำละลายที่เหมาะสมลงในสารที่เราต้องการสกัด จากนั้นเขย่าแรง ๆ หรือนำไปต้มเพื่อให้สารที่เราต้องการจะสกัดละลายในตัวทำละลายที่เราเลือกไว้ สารที่เราสกัดได้ยังเป็นสารละลายอยู่ ถ้าเราต้องการทำให้บริสุทธิ์ เราควรจะนำสารที่ได้ไปแยกตัวทำละลายออกก่อน อาจจะนำไประเหยหรือนำไปกลั่นต่อไป เช่น การสกัดน้ำขิงจากขิง การสกัดคลอโรฟีลล์ของใบไม้

2.2.5 ประโยชน์ของการสกัดด้วยตัวทำละลาย

(1) ใช้สกัดน้ำมันพืชจากเมล็ดพืช เช่น น้ำมันงา รำ ถั่ว ปาล์ม นุ่น บัว นิยมใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย

(2) สกัดสารมีสีออกจากพืช

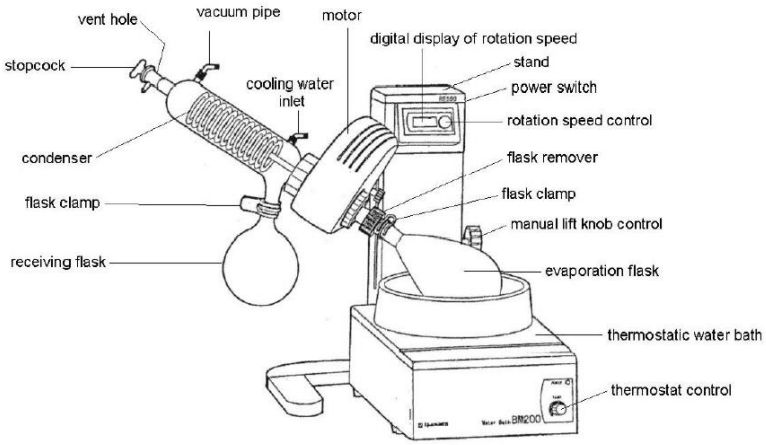
(3) ใช้สกัดน้ำมันหอมระเหยออกจากพืช

(4) ใช้สกัดยาออกจากสมุนไพร

2.3 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

เมื่อกำจัดตัวทำละลายออกจากสารสกัด จะได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น และเมื่อกำจัดตัวทำละลายออกจนหมด จะได้ของเหลวหนืด เรียกว่า สารสกัดหยาบ

การระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดด้วยเครื่องระเหยลดความดันแบบหมุน (rotary evaporator) โดยเครื่องจะต่อกับปั๊มสุญญากาศเพื่อลดความดันให้เกือบเป็นสุญญากาศ เครื่องมือประกอบด้วย 3 ส่วน ดังนี้ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 เครื่องระเหยแห้งลดความดันแบบหมุน
ที่มา: Ralph, Joan, and Patty (2001)

ส่วนที่ 1 ส่วนให้ความร้อน และกลั่นแยก ประกอบด้วยหม้ออังไอน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ภาชนะที่จะกลั่น (distillation flask) บรรจุสารสกัด เครื่องควบแน่นที่ส่วนปลายมีก๊อกปิด-เปิด (stopcock) ระบบสุญญากาศ และภาชนะรองรับ (receiving flask) โดยในส่วนนี้สามารถควบคุมความเร็วในการหมุนและปรับระดับเลื่อนขึ้น-ลงได้

ส่วนที่ 2 ส่วนลดความดันหรือทำสุญญากาศ ซึ่งระบบจะต่อกับปั๊ม

ส่วนที่ 3 ส่วนควบคุมอุณหภูมิภายในระบบ จะเป็นอ่างน้ำหมุนเวียนที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง โดยต่อสายน้ำเข้าเครื่องควบแน่น

หลักการทำงานของเครื่องระเหยแห้งลดความดันแบบหมุน เริ่มจากเปิดส่วนควบคุมอุณหภูมิให้น้ำเย็นเข้าเครื่องควบแน่น นำขวดก้นกลมที่มีสารสกัดปริมาตรไม่ควรเกิน 2 ใน 3 ส่วนต่อเข้ากับเครื่องมือดังรูปที่ 1 จากนั้นเปิดปั๊มเพื่อให้เกิดระบบสุญญากาศ ปิดระบบสุญญากาศตรงปลายเครื่องควบแน่น และให้ความร้อนกับหม้ออังไอน้ำ แล้วเลื่อนให้ขวดก้นกลมสัมผัสกับน้ำในหม้ออังไอน้ำพร้อมกับหมุนตลอดเวลา เพื่อให้เกิดการกระจายความร้อนอย่างสม่ำเสมอในสารสกัด จนกระทั่งตัวทำละลายระเหยกลายเป็นไอผ่านไปยังเครื่องควบแน่น ซึ่งจะต่อกับระบบน้ำหล่อเย็น ทำให้ไอควบแน่นกลายเป็นของเหลวตกลงสู่ภาชนะรองรับ กรณีเกิดฟองอากาศเนื่องจากการเดือดของสารสกัดในขวดก้นกลม ให้เปิดระบบสุญญากาศชั่วขณะ แล้วรีบปิด เพื่อช่วยลดความดันบรรยากาศในขวดก้นกลม มิฉะนั้นสารสกัดจะพุ่งเข้าไปในเครื่องได้ (Thongruk & Youpensuk, 2009)

2.4 โรคขอบใบแห้งของข้าว (Bacterial Blight)

โรคขอบใบแห้งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* โรคนี้เกิดได้ตั้งแต่ระยะกล้า แตกกอ จนถึงออกรวง ต้นกล้าก่อนนำไปปักดำจะมีจุดเล็ก ๆ ลักษณะช้ำที่ขอบใบของใบล่าง ต่อมาประมาณ 7-10 วัน จุดช้ำนี้จะขยายกลายเป็นทางสีเหลืองยาวตามใบข้าว ใบที่เป็นโรคจะแห้งเร็วและสีเขียวจะจางลงเป็นสีเทา ๆ อาการในระยะปักดำจะแสดงหลังปักดำแล้วหนึ่งเดือนถึงเดือนครึ่ง ใบที่เป็นโรคนี้จะมีรอยขีดช้ำ ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ที่แผลมีหยดน้ำสีครีมคล้ายยางสนกลม ๆ ขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุด ต่อมาจะกลายเป็นสีน้ำตาลและหลุดไปตามน้ำหรือฝน ซึ่งจะทำให้โรคสามารถระบาดต่อไปได้ แผลจะขยายไปตามความยาวของใบ บางครั้งขยายเข้าไปข้างในตามความกว้างของใบ โดยขอบแผลมีลักษณะเป็นขอบลายหยัก แผลนี้เมื่อนานไปจะเปลี่ยนเป็นสีเทา ใบที่เป็นโรคขอบใบแห้งจะแห้งและม้วนตามความยาว ในกรณีที่ต้นข้าวมีความอ่อนแอต่อโรคและเชื้อโรคมีปริมาณมาก จะทำให้ท่อน้ำท่ออาหารอุดตัน ต้นข้าวจะเหี่ยวเฉาและแห้งตายทั้งต้นโดยรวดเร็ว เรียกอาการของโรคนี้ว่า kresek (รูปที่ 2)

รูปที่ 2 อาการ kresek ของต้นข้าว
ที่มา: ศูนย์บริหารศัตรูพืชจังหวัดสุพรรณบุรี (2556)

เชื้อสาเหตุโรคสามารถแพร่ไปกับน้ำในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูงและในสภาพที่มีฝนตกลมพัดแรง จะช่วยให้โรคแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางรวดเร็ว

การป้องกันกำจัดโรคนี้ ควรปฏิบัติดังนี้

ไม่ควรใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมากในดินที่อุดมสมบูรณ์อยู่แล้ว

ไม่ควรระบายน้ำจากแปลงที่เป็นโรคไปสู่แปลงอื่น

ควรเฝ้าระวังการเกิดโรคถ้าปลูกข้าวพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคนี้ เช่น พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 กข6 เหนียวสันป่าตอง พิษณุโลก 2 และชัยนาท 1 เมื่อเริ่มพบอาการของโรคบนใบข้าว ให้ใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช เช่น Streptomycin sulfate ผสม oxytetracycline hydrochloride หรือ copper hydroxide หรือ isoprothiolane (ศูนย์บริหารศัตรูพืชจังหวัดสุพรรณบุรี, 2556)

2.5 แบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Common Name (s) : bacterial leaf blight (BLB), kresek disease and bacterial blight (BB)

Type of Pest : Plant pathogenic bacterium

Taxonomic Position

Class : Gammaproteobacteria

Order : Xanthomonodales

Family: Xanthomonodaceae

Scientific Name : *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* มีลักษณะเป็นท่อน ปลายมน แกรมลบ แต่ละเซลล์มีความยาวประมาณ 0.7-2.0 µm และความกว้าง 0.4-0.7 µm เซลล์เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagella colony ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลกลูโคสจะมีลักษณะกลม นูน มีลักษณะ mucoid คือ พื้นผิวของ colony เป็นเมือกเยิ้ม และมีสีเหลือง สร้าง pigment Xanthomonadincapsul ของแบคทีเรียชนิดนี้ประกอบด้วย extracellular polysaccharide (EPS) จำนวนมาก ทำหน้าที่เป็น virulence factor ที่ทำให้เชื้อนี้มีความรุนแรง

X. oryzae pv. *oryzae* เจริญได้ในภาวะที่มีอากาศ หรือมีออกซิเจนเท่านั้น แต่ไม่สร้างสปอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 25-30°C ให้ผลบวกต่อการทดสอบ catalase ไม่สามารถ reduce ไนเตรท แต่สามารถผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรตได้เล็กน้อย (David, Ronald, & Bogdanove, 2006)

ใบที่ติดเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จะมีแผลสีเหลืองคลุมอยู่ที่ขอบของใบ ซึ่งแผลจะขนานไปตามใบ และอาจครอบคลุมทั้งใบ (Samanta, Das, & Samanta, 2014) เชื้อนี้มักเข้าไปในใบข้าวโดยผ่านทาง hydathodes ที่ปลายใบและขอบใบ เซลล์แบคทีเรียที่อยู่บนพื้นผิวใบอาจแขวนลอยอยู่ในของเหลว ซึ่งของเหลวนี้จะระเหยออกไปในรูปของหยดน้ำจากพืชในเวลากลางคืน เมื่อน้ำระเหยไปหมด เซลล์แบคทีเรียเหล่านี้จะตกค้างอยู่ที่ใบ และเคลื่อนที่เข้าสู่พืชโดยใช้ polar flagella หรืออยู่ที่ใบ ในขณะที่ของเหลวถูกระเหยไปหมดจากใบไม้ในตอนเช้า แบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนในช่องว่างระหว่างเซลของเซลล์เยื่อบุผิว จากนั้นจะเข้าสู่ xylem ผ่านทางแผล หรือช่องที่เกิดจากรากที่เกิดขึ้นใหม่ที่ฐานของกาบใบ ภายใน xylem โดยสันนิษฐานว่า เชื้อมีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์ parenchyma และเคลื่อนที่ไปตามแนวตั้งของใบ รวมทั้งอาจจะเจริญไปยังพื้นที่ข้างเคียงโดยผ่านทาง commissural veins ภายในไม่กี่วันเซลล์แบคทีเรียและ EPS (extracellular polysaccharide) จะเข้าไปในท่อ xylem และหลั่งออกมาจาก hydathodes จากนั้นจะสร้างตัวเป็นเม็ดหรือเส้นใยหลั่งออกมาบนผิวใบ และเมื่อเชื้อแบคทีเรียมีการพัฒนาขึ้นในพืช ก็สามารถแพร่กระจายไปยัง mesophyll ต่อไป (Niño-Liu, Darnielle, & Bogdanove, 2006)

X. oryzae pv. *oryzae* สามารถมีชีวิตรอดได้ในตอซังข้าว และในวัชพืช อีกทั้งยังสามารถอยู่รอดได้ในระยะเวลาสั้น ๆ ในเมล็ดพืชที่ติดเชื้อ และในดิน เชื้อแบคทีเรียนี้สามารถแพร่ระบาดได้โดยทางชลประทาน ฝนที่กระหน่ำ หรือลมกระโชกแรง การสัมผัสจากพืชต่อพืช การตัดแต่งเครื่องมือที่ใช้ในการปลูก และการจัดการพืชระหว่างการย้ายปลูก (Mew, 1992)

2.6 วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการที่นิยมมี 2 วิธี ได้แก่ agar diffusion test และ dilution susceptibility test

2.6.1 Agar Diffusion Test

Disc diffusion method (Kirby-Bauer) เป็นวิธีทดสอบที่นิยม เนื่องจากสะดวก ประหยัดและใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถรายงานผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ แต่ไม่อาจทราบค่า minimum inhibitory concentration (MIC) หรือ minimal lethal concentration (MLC) ได้ และไม่เหมาะสำหรับการทดสอบเชื้อที่เจริญช้าและเชื้อที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ หลักการทั่วไปของวิธีนี้ คือ การทำให้สารสกัดสมุนไพรบนแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อไว้ในจำนวนที่เหมาะสมแล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญ รายงานผลด้วยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสรอบ ๆ แผ่น disc ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแปรตามขนาดของ inhibition zone วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบสมุนไพรเพียงความเข้มข้นเดียว และใช้เป็นการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในเบื้องต้น นอกจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบแล้ว ยังอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพร ความสามารถในการละลายหรือซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของสารสกัดจากสมุนไพร อัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรด-ด่าง และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อ วิธีการนี้ เรียกว่า disc sensitivity test หรืออาจเปลี่ยนจากแผ่น disc เป็นหลุมที่เจาะลงในเนื้อ agar (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญบุตร, & สาธร พรตระกูลพิพัฒน์ , 2551)

2.6.2 Dilution Susceptibility Test หรือ การทดสอบ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี dilution test เป็นการทดสอบในเชิงปริมาณที่ทำให้ทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่สามารถทำลายเชื้อได้ นิยมใช้ทดสอบเชื้อที่เจริญได้ช้า และใช้ทดสอบยืนยันผลจากการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion ที่ให้ความไวปานกลาง เพื่อให้สามารถใช้สารสกัดสมุนไพรในความเข้มข้นที่สูง ๆ ได้ และใช้ทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ (anaerobe) หลักการโดยทั่วไปของวิธีทดสอบแบบ broth และ agar dilution susceptibility test จะคล้ายคลึงกัน คือ จะเจือจางสารสกัดสมุนไพรใน medium ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นจึงใส่เชื้อลงใน/บน medium ที่มีสารสกัดสมุนไพร แล้วนำไปบ่มเชื้อ ผล

การทดสอบด้วยวิธี MIC รายงานโดยการสังเกตจากความขุ่นหรือใสของ broth และมีหรือไม่มีเชื้อเจริญบน agar

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชลิดา เล็กสมบูรณ์, นิพนธ์ ทวีชัย และ วิชัย โฆสิตรัตน (2541) ศึกษาสารสกัดของพืชสมุนไพรไทย 8 ชนิด คือ ใบเสลดพังพอนตัวเมีย (*Clinacanthus nutans*) ใบทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) ใบสาบเสือ (*Eupatorium odoratum*) ลำต้นพะยอม (*Shorea roxburghii*) ใบเปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius*) ใบกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus subdariffa*) ใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) และใบชะพลู (*Piper sarmentosum*) ที่สกัดใบด้วยน้ำในอัตราส่วนใบสด 1 g : น้ำ 2 ml ยกเว้น *S. roxburghii* ที่ทดสอบกับสารสกัดลำต้นด้วยน้ำ ในอัตราส่วนลำต้นแห้ง 1 g : น้ำ 10 ml นำสารสกัดของพืชดังกล่าวมาทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช 14 สายพันธุ์จาก 3 genera (*Xanthomonas*, *Pseudomonas* และ *Erwinia*) ได้แก่ *X. campestris* pv. *campestris* Xc1, *X. campestris* pv. *campestris* Xci11, *X. campestris* pv. *campestris* Xci12, *X. campestris* pv. *citri* Xcg1, *X. campestris* pv. *glycines* Xcm9, *X. campestris* pv. *glycines* Xc41, *X. campestris* pv. *manihotis* Xcv21, *X. campestris* pv. *manihotis* J3, *X. campestris* P220, *X. campestris* pv. *vesicatoria* Ps5, *X. campestris* pv. *vesicatoria* Pss1, *Pseudomonas solanacearum* PE, *Pseudomonas syringae* pv. *sesame*, *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* ในสภาพห้องทดลอง เมื่อทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion บนอาหาร nutrient agar พบว่ามีเพียงสารสกัดจากพืช 3 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ ฝรั่ง พะยอม และกระเจี๊ยบแดง ที่เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 20 และ 30 µl/disc สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบได้ พบว่า สารสกัดจากใบฝรั่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกชนิด ซึ่งทำให้ได้ inhibition zone ที่มีขนาด 1-3.5 mm ส่วนสารสกัดจากลำต้นพะยอมสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ 6 ชนิด ซึ่งทำให้เกิด inhibition zone ที่มีขนาด 0.8-6 mm และสารสกัดจากใบกระเจี๊ยบแดงสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ 9 ชนิด ซึ่งทำให้เกิด inhibition zone ที่มีขนาด 0.8-1.2 mm อีกทั้งพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดให้สูงขึ้น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นด้วย เช่น ที่สารสกัดจากใบฝรั่งที่ความเข้มข้น 10 µl/disc

สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ 9 ชนิด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากใบฝรั่งเป็น 20 และ 30 µl/disc สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกชนิด

Benkeblia (2004) ศึกษาฤทธิ์การต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยจากหัวหอม (สีเขียว สีเหลือง และสีแดง) และกระเทียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (50, 100, 200, 300 และ 500 ml/L) ต่อแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *S. enteritidis* และรา 3 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* และ *Fusarium oxysporum* เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion test พบว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย 200, 300 และ 500 ml/L *S. enteritidis* มีความไวต่อน้ำมันหอมระเหยมากกว่า *S. aureus* และพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระเทียมมีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียได้สูงกว่าน้ำมันหอมระเหยจากหัวหอม ส่วนการยับยั้งรา (*A. niger, P. cyclopium* และ *F. oxysporum*) พบว่า *A. niger* ถูกยับยั้งได้น้อยด้วยน้ำมันหอมระเหยจากหัวหอมสีเขียว และหัวหอมสีเหลืองที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ คือ 50 และ 100 ml/L แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม ส่วนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดควบคุมเชิงลบ คือ ที่ความเข้มข้น 200, 300 และ 500 ml/L สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากหัวหอมสีเขียว และหัวหอมสีเหลือง รวมทั้งทุกความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากหัวหอมสีแดงและกระเทียม โดย *P. cyclopium* และ *A. niger* มีความไวต่อน้ำมันหอมระเหยจากหัวหอม และกระเทียมใกล้เคียงกัน ซึ่งผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระเทียมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียและราได้สูงที่สุด แต่น้ำมันหอมระเหยจากหัวหอมสีเขียวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ต่ำสุด

Dewanjee et al. (2007) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากผลมะพลับ ใบตำลึง และเปลือกมะฮอกกานีด้วย methanol และศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ เมื่อทดสอบโดยวิธี disc diffusion assay และ tube dilution method โดยศึกษาฤทธิ์การยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทั้งหมด 24 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* 29737, *S. aureus* ML 267, *Sarcina luteus* 9341, *B. pumilus* 8241, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* VC Sonawave 3:37 C, *E. coli* CD/99/1, *E. coli* RP4, *E. coli* 18/9, *E. coli* K88, *S. dysenteriae* 1, *S. soneii* 1, *S. soneii* BCH 217, *S. flexneri* type 6, *S.boydii* 937, *P. aeruginosa* ATCC 25619, V. *cholerae* 2, *V. cholerae* 785, *V. cholerae* 1037, *C. albicans* ATCC 10231, *A. niger* ATCC 6275**,** *P. notatum* ATCC 11625 และ *P. funiculosum* NCTC 287 ผลการศึกษา

พบว่า ผลมะพลับ และเปลือกมะฮอกกานีมีความไวในการยับยั้ง *E. coli* สูงที่สุด ส่วน *Sarcina luteus* และ *Bacillus* spp มีความต้านทานต่อสารสกัดจากผลมะพลับ ส่วนใบตำลึงมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus*, *E. coli*, *S. dysenteriae*, *S. soneii* และ *P. aeruginosa* แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. flexneri* และ *S. boydii*

Jayshree and Kumar (2008) ศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ของสารสกัดของใบน้อยหน่าด้วย methanol, chloroform, petroleum ether และน้ำ โดยวิธี agar diffusion method พบว่าสารสกัดจากใบน้อยหน่าด้วย methanol มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด (MIC=130 µg/ml) ตามมาด้วยสารสกัดของใบน้อยหน่าด้วย petroleum ether ในการยับยั้ง *P. aeruginosa* (MIC=165 µg/ml) และสารสกัดด้วย methanol ในการยับยั้ง *E. coli* (MIC=180 µg/ml)

เบญจมาศ เขตรดง และ ปรัชญากร ชูตระกูล (2553) ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา (holy basil, *Ocimum sanctum* L.) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 18 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *Lactobacillus sakei* subsp. *Sakei* JCM 1157, *Lactobacillus sakei* TISTR 890, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* JCM 6124, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* TISTR 942, *Enterococcus faecalis* JCM 5803, *Enterococcus faecalis* TISTR 888, *Streptococcus* sp. TISTR 1030, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Escherichia coli* TISTR 780, *S. aureus* TISTR 118, *Enterococcus faecalis* JCM 5803, *Enterococcus faecalis* TISTR 888, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5963, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358, *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321, *Listeria innocua* ATCC 33090 และ *Brochotrix Campestris* NBRC 11547 ด้วยวิธี agar diffusion method พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกะเพราสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ทุกสายพันธุ์และสามารถยับยั้ง *L. sakei* TISTR 890 ได้ดีที่สุด

Arumugam, Ayyanar, Pillai, and Sekar (2011) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบและแคลลัสของบัวบกด้วย methanol, acetone, chloroform และน้ำ ในการยับยั้ง *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus* และ *P. aeruginosa* โดยวิธี agar plate well diffusion พบว่าสารสกัดจากใบและแคลลัสของบัวบกมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่สารสกัดจากใบ

บัวบกที่สกัดด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* สูงสุด โดยทำให้เกิด inhibition zone ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 30 mm และยับยั้ง *B. cereus* โดยทำให้เกิด inhibition zone ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 29 mm ส่วนสารสกัดจากใบบัวบกที่สกัดด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* และ *S. aureus* โดยทำให้เกิด inhibition zone ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากัน คือ เท่ากับ 28 mm

จิราภรณ์ บุราคร และ เรือนแก้ว ประพฤติ (2555) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* ATCC25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC27736, *S. aureus* ATCC6538 และ *S. epidermidis* ATCC12228 ด้วยสมุนไพรพื้นบ้านไทยจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ ผักชีฝรั่ง ชะพลู สะระแหน่ ฟักแม้ว โหระพา กะเพรา และเตย ที่สกัดสารด้วยน้ำ methanol และ ethanol เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion กับสารสกัดที่ความเข้มข้น 30 µg/plate จำนวนทั้งหมด 28 ตัวอย่าง พบว่าชนิดของสมุนไพร และสารละลายที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยการสกัดสมุนไพรด้วย methanol มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ได้มากที่สุดจำนวน 21 ตัวอย่าง ในขณะที่การสกัดด้วยน้ำมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *K. pneumoniae*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้น้อยที่สุดเพียงจำนวน 9 ตัวอย่าง และพบว่าสารสกัดใบชะพลูด้วย methanol ยับยั้ง *K. pneumonia* และ *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เท่ากับ 19.15 mm และ 24.77 mm ตามลำดับ เมื่อทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี microdilution assay พบว่า ค่า MIC ของสารสกัดจากใบชะพลูสามารถยับยั้ง *K. pneumonia* และ *S. aureus* โดยมีค่า MIC เท่ากัน คือ เท่ากับ 15.62 mg/ml ในขณะที่ค่า MIC ของสารปฏิชีวนะ chloramphenicol ที่สามารถยับยั้ง *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. epidermidis* และ *S. aureus* มีค่าเท่ากับ 15, 7, 31 และ 7 µg/ml ตามลำดับ

Shivalingaiaha and Sateesh (2013) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืช 6 ชนิด คือ สะเดา, กอมก้อใบเทา, ตีนเป็ด, เคราฤาษี, จำปา และหญ้าขัดใบป้อม ด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัดต่าง ๆ ได้แก่ hexane, toluene, chloroform และ methanol เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ทั้งในหลอดทดลอง และในพืชทดลอง พบว่าในบรรดาสารสกัดจากพืชทั้งหมด สารสกัดจากใบเคราฤาษีด้วย chloroform ให้ผลต้าน *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ การทดสอบพิษ และผลของสารสกัดจากใบเคราฤาษีด้วย

chloroform ต่อการงอก และความแข็งแรงของต้นกล้าของข้าวในเรือนกระจก พบว่าพืชทดลองมีการงอกของเมล็ดพันธุ์เพิ่มขึ้น และต้นกล้ามีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทดสอบกับสารสกัดจากใบเคราฤาษีที่สกัดด้วย chloroform โดยต้นกล้ามีการงอกของเมล็ดพันธุ์เพิ่มขึ้นเป็น 68% ในขณะที่ชุดควบคุมเชิงลบ มีค่าเป็น 60% และเมื่อทดสอบความเป็นพิษกับต้นข้าวสายพันธุ์อ่อนแอ พบว่าสารสกัดจากใบเคราฤาษีที่สกัดด้วย chloroform ไม่แสดงความแตกต่างจากชุดควบคุมเชิงลบอย่างมีนัยสำคัญ ในด้านความสูงของพืช รูปร่างใบ สี และความยาวของใบ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบเคราฤาษีไม่เป็นพิษกับต้นข้าว และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้งในข้าว

สิริวรรณ สมิทธิอาภรณ์ และ ฐานันดร วิริยะเกียรติ (2557) ทดสอบสารสกัดหยาบของพืช 10 ชนิดที่สกัดด้วย 95% ethanol ได้แก่ เปลือกทุเรียน (*Durio zibethinus*) ใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) เปลือกกล้วยน้ำว้า (*Musa ABB* cv. Kluai 'Namwa') เปลือกทับทิม (*Punica granatum*) เปลือกส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulate Blanco* cv. 'KhieoWann') เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana*) กานพลู (*Syzygium aromaticum*) หัวกลีบกระเทียม (*Allium sativum*) ใบสะเดา (*Azadirachta indica* var. *siamensis*) และใบยอ (*Morinda citrifolia*) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* Xac-Hys ที่เป็นสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มเมื่อทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm พบว่าสารสกัดจากพืช 4 ชนิดมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Xac-Hys โดยสารสกัดจากเปลือกมังคุด กานพลู ใบฝรั่ง และเปลือกทับทิมมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibion zone เท่ากับ 1.11, 0.90, 0.88 และ 0.71 cm ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นที่ 25,000 ppm พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Xac-Hys โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 1.23 cm รองลงมา คือ สารสกัดจากใบฝรั่ง กานพลู และเปลือกทับทิมที่มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 1.13, 0.93 และ 0.85 cm ตามลำดับ

Gowdhami, Sarkar, and Ayyasamy (2014) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบและเมล็ดของน้อยหน่า เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion method เมื่อใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ น้ำ, methanol, chloroform, petroleum ether และ hexane ในการยับยั้งแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *E. coli, Vibrio cholera, Salmonella typhi, S. paratyphi, Klebsiella pneumonia* และ *Proteus mirabilis* โดยเปรียบเทียบผลกับชุดควบคุมเชิงบวก (ยาปฏิชีวนะ)

พบว่าสารสกัดจากเมล็ดและใบของน้อยหน่าด้วยน้ำ methanol และ hexane ให้ผลการยับยั้งที่ดี โดยสารสกัดใบน้อยหน่าด้วยน้ำยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ที่ทำให้เกิด inhibition zone ที่มีขนาดสูงสุด

Rani and Singh (2014) ศึกษาการควบคุมโรคขอบใบแห้งในข้าวจาก *X. oryzae* โดยสารสกัดจากพืชสมุนไพร 2 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากใบว่านหางจระเข้ และสารสกัดจากเมล็ดขี้เหล็ก ด้วยวิธี disc diffusion method พบว่าสารสกัดจากใบว่านหางจระเข้และสารสกัดจากเมล็ดขี้เหล็กสามารถยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* โดย inhibition zone ที่เกิดจากสารสกัดหยาบของใบว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้น 100% มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 mm และ inhibition zone ที่เกิดจากสารสกัดของเมล็ดขี้เหล็กที่ความเข้มข้น 30, 60 และ 120 mg/ml มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5, 9 และ 12 mm ตามลำดับ

จิราภรณ์ โสดาจันทร์, บันลือ สังข์ทอง และ สกุลรัตน์ รัตนาเกียรติ (2558) ศึกษาองค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรในสกุล (genus) *Ocimum* spp. คือ กะเพราขาวและกะเพราแดง ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ และทำลายแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*, *S. pyogenes*, *S. aureus* และรา *Candida albicans* เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar disk diffusion และทดสอบหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งและทำลายจุลชีพ (minimum inhibitory concentration, MIC และ minimum bactericidal concentration, MBC หรือ minimal fungicidal concentration, MFC) เมื่อทดสอบด้วยวิธี broth dilution method พบว่ากะเพราขาวมีค่า MIC หรือ MFC ต่อ *C. albicans* ที่ 1.56 mg/ml ส่วนกะเพราแดงมีค่า MIC หรือ MBC ต่อ *S. pyogenes* ที่ 0.78 mg/ml แต่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. mutans* ในระดับปานกลาง (ค่า MIC หรือ MBC มีค่า 100 mg/ml) และยับยั้ง *S. aureus* ได้น้อย (ค่า MIC หรือ MBC มีค่า >200 mg/ml)

Dhiman, Aggarwal, Aneja, and Kaur (2015) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Bacillus cereus*, *Serratia* sp., *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aspergillus flavus* และ *Penicillium citrinum* ของสารสกัดจากขมิ้นชัน ขิง สะระแหน่ โสมอินเดีย ระย่อมน้อย สมอ มะขามป้อม และ ใบบัวบก ที่สกัดด้วย acetone, methanol, ethanol และน้ำ เมื่อทดสอบโดยวิธี agar diffusion method พบว่า *B. cereus* มีความไวต่อสารสกัดมากที่สุด และ *R. mucilaginosa* ทนต่อสารสกัดมากที่สุด โดยสารสกัดจากใบบัวบกที่สกัดด้วย ethanol และ methanol ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์สูงสุด โดย

ทำให้เกิด inhibition zone ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 12.3-29.3 mm สารสกัดจากใบบัวบกที่สกัดด้วย methanol ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Serratia* sp. ได้สูงสุด ทำให้เกิด inhibition zone ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 15.3 mm ขณะที่สารสกัดจากใบบัวบกที่สกัดด้วย ethanol ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* ได้สูงสุด โดยทำให้เกิด inhibition zone ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 29.3 mm

Kala, Soosairaj, Mathiyazhagan, and Raja (2015) ศึกษาสมบัติการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบของยอป่า ใบและผลมะเขือบ้าดอกขาว ใบกะเพรา ใบรัก ใบคนทีเขมา และ ใบหยีทะเล ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ hexane, ethyl acetate, ethanol และน้ำ ต่อเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคใบไหม้ที่แยกจากนาข้าว เมื่อทดสอบโดยวิธี well diffusion method พบว่า 100% ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 6 ชนิดที่สกัดด้วย ethyl acetate ยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* มากกว่าชุดควบคุมเชิงลบ โดยยอป่า ยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบได้อย่างโดดเด่นเป็นพิเศษ ก่อให้เกิด inhibition zone ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 28.33±1.88 mm ตามมาด้วยสารสกัดจากใบคนทีเขมา สารสกัดจากใบและผลของมะเขือบ้าดอกขาวที่สกัดด้วย ethanol ที่ก่อให้เกิด inhibition zone ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 17.33±1.52 mm และ 16.66±0.57 mm ตามลำดับ

Rahman et al. (2015) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดใบตำลึงที่สกัดด้วยน้ำ methanol และ ethanol ในการยับยั้ง *S. aureus, B. cereus, B. subtilis, S. pyogenes, E. coli, Agrobacterium* sp, *Shigella dysenteriae, Shigella sonnei* และ *Salmonella typhi* พบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียน้อยกว่าสารสกัดที่สกัดด้วย methanol และ ethanol อีกทั้งพบว่าสารสกัดที่สกัดด้วย methanol มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงที่สุดและสูงกว่าสารสกัดที่สกัดด้วย ethanol โดยสารสกัดของใบพืชที่สกัดด้วย methanol พบว่ามีฤทธิ์ต้าน *S. dysenteriae*, *Agrobacterium*, *S. aureus*, *E. coli* และ *S. pyogenes* สูงมาก (13.0, 11.8, 12, 10.2 และ 9.2 mm ตามลำดับ) แต่มีฤทธิ์ปานกลางต่อ *B. cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi* และ *B. subtilis* (4.0, 5.2, 7.6 และ 7.8 mm ตามลำดับ) สำหรับสารสกัดที่สกัดด้วย ethanol มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลางต่อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบที่ทดสอบ ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ปานกลางต่อ *S. dysenteriae*, *S. sonnei* และ *S. typhi* (โดยทำให้เกิด inhibition zone ที่มีขนาดเส้นผ่าน

ศูนย์กลาง เท่ากับ 8.8, 7.6 และ 7.8 mm ตามลำดับ) แต่ไม่มีฤทธิ์ต้าน *E. coli*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. pyogenes*, *S. aureus* และ *Agrobacterium* sp.

Samidha and Sasangan (2017) ตรวจคัดกรองพฤกษเคมีเบื้องต้น พบว่าสารสกัดจากใบน้อยหน่าสดประกอบด้วยสารต่าง ๆ ได้แก่ alkaloids, tannins, saponins, flavonoids, glycosides, phenolic compounds, terpenoids และ steroids ส่วนฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบน้อยหน่า ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus subtilis* และ *Streptococcus pyogenes*) แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *Vibrio cholera* และ *Enterobacter aerogenes*) และยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida albicans*) ใบน้อยหน่าสดที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, acetone, ethanol, methanol และ น้ำ เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion method และ agar disc diffusion method โดยพิจารณาจากบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น พบว่าสารสกัดใบน้อยหน่าที่สกัดด้วย ethanol, methanol และ น้ำ มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์สูง โดยสารสกัดที่สกัดด้วย methanol มีฤทธิ์ยับยั้งที่สูงสุด ซึ่งทำให้เกิด inhibition zone ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 12-17 mm เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion method และได้เส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone เท่ากับ 9-14 mm เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion method

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การสกัดสารจากสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่ทดสอบ ได้แก่ ใบน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึง วิธีการสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ดัดแปลงมาจากวิธีการของศศิธร วุฒิวณิชย์ (2546) โดยนำสมุนไพรที่ทดสอบมาอบแห้งในตู้อบที่ 45°C นาน 48 ชม. ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้ง 200 g บดให้ละเอียดใส่ลงในขวดแก้ว เติม 95% methanol ปริมาตร 1,000 ml (ใช้อัตราส่วน พืช:ตัวทำละลาย = 1:5) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30-32°C) ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 3 วัน กรองผ่านผ้าขาวบาง และตามด้วยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำของเหลวที่ผ่านการกรองไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งลดความดันแบบหมุน (rotary evaporator) คำนวณ % yield ดังสมการที่ 1

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักคงเหลือหลังระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator} \times 100}{\text{น้ำหนักแห้งของสมุนไพรที่นำมาสกัด}} \quad (1)$$

เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ไว้ในขวดแก้วเก็บสาร (vial) ขนาด 5 ml ที่ -20°C เพื่อนำมาใช้ในการทดลองต่อไป การวิจัยนี้เลือกใช้ methanol เป็นตัวทำละลายในการสกัดพืชที่ทดสอบ เนื่องจากการศึกษาในอดีต พบว่า ในบรรดาตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดพืชทั้ง 3 ชนิดในการวิจัยนี้ (ใบบัวบก ใบน้อยหน่า และใบตำลึง) เพื่อทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าการสกัดด้วย methanol ให้ผลดีที่สุด (Dhiman et al., 2015; Rahman et al., 2015; Samidha & Sasangan, 2017) อย่างไรก็ตาม การสกัดพืชทั้ง 3 ชนิดที่ทดสอบเพิ่มเติมด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ ก็น่าจะช่วยให้ผลการทดลองที่ได้สามารถครอบคลุมเนื้อหาได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เนื่องจากตัวทำละลายที่แตกต่างกันอาจสามารถสกัดองค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ ในพืชที่ทดสอบได้แตกต่างกัน

3.2 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

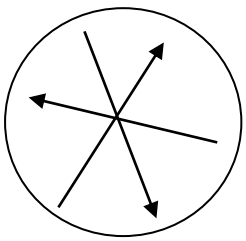
นำสารสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 1 มาเจือจางด้วย 95% methanol ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 400, 200, 100, 50, 25 และ 12.5 mg ของสารสกัดหยาบ/ml แล้วนำมาทดสอบทันที

3.3 การเตรียมสารแขวนลอย *X. oryzae* pv. *oryzae*

นำเชื้อบริสุทธิ์ของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ซื้อมาจากหน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร มาเพาะเลี้ยงบน nutrient agar (NA) slant เก็บ stock เชื้อที่อุณหภูมิ 4°C และแต่ละเดือนทำการ subculture เชื้อ การเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อที่ทดสอบ โดยนำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้จากที่เลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA นาน 18-24 ชม. มาเจือจางด้วย 0.85% NaCl จนได้สารแขวนลอยเชื้อที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อประมาณ 1.5×10^{8} cfu/ml ซึ่งทดสอบได้โดยการนำเชื้อที่เตรียมนี้ไปเจือจางจนถึง 10^{-8} และใช้ปริมาตร 1 ml ไป pour plate นำไปบ่มเชื้อที่ 35°C นาน 16-18 ชม. นับจำนวนเชื้อ เพื่อให้ทราบความเข้มข้นตั้งต้นของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ (José, 2005)

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของสมุนไพรที่ศึกษาในการยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยวิธี Disc Diffusion

3.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของส่วนของพืชที่ศึกษาในการยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยวิธี disc diffusion (ตามวิธีของ Kirby-Bauer ที่อ้างถึงใน Hudzicki (2013) ดำเนินการโดยเตรียมอาหารแข็ง Mueller-Hinton agar (MHA) ในจานเพาะเชื้อ จุ่มไม้พันสาลีที่ปราศจากเชื้อลงในสารแขวนลอยเชื้อที่ปรับความเข้มข้นที่ต้องการในข้อ 3.3 แล้วป้าย (swab) บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ให้ทั่วจานเพาะเชื้อทั้ง 3 ทิศทางดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 การป้ายเชื้อบนผิวหน้าอาหาร MHA ในลักษณะทั้ง 3 ทิศทาง

จากนั้นดูดสารสกัดแต่ละระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบปริมาตร 20 µl ปล่อยลงบนแผ่นทดสอบ (disc) (ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm) พักไว้ 3-5 นาที วางแผ่นทดสอบลงบนผิวหน้า

อาหารเลี้ยงเชื้อ MHA สำหรับชุดควบคุมเชิงบวก (positive control, +Control) ใช้สารปฏิชีวนะ streptomycin ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ส่วนชุดควบคุมเชิงลบ (negative control, -control) ใช้ 95% methanol แทนสารสกัด ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ นำจานเพาะเชื้อเหล่านี้ไปบ่มที่ 27°C เป็นเวลา 16-18 ชม. แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ถูกยับยั้งเป็น mm

3.4.2 การทดสอบทางสถิติ

รายงานผลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) วิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย one-way ANOVA และ Duncan's multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (Ab Rahman, Siman, Omar, & Wahab, 2016; De Britto & Gracelin, 2011; Gracelin, De Britto, & Kumar, 2012)

3.5 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า *X. oryzae* pv. *oryzae* (MBC)

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า *X. oryzae* pv. *oryzae* (MBC) ดำเนินการตามวิธีของ (ธนภพ โสตรโยม et al., 2558)

3.5.1 การหาค่า Minimum Inhibition Concentration (MIC)

การทดสอบนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว คือ mueller-Hinton broth (MHB) นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 มาหาค่า MIC โดยเลือกความเข้มข้นของสารสกัดน้อยสุดที่ทำให้เกิด inhibition zone ในข้อ 3.4 ของแต่ละตัวอย่างสารสกัดมาทดสอบจากนั้นเจือจางแบบ two-fold serial dilutions จะได้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 100 µg/ml, 50 µg/ml, 250 µg/ml, 12.5 µg/ml, 6.25 µg/ml, 3.13 µg/ml, 1.56 µg/ml, 0.78 µg/ml และ 0.39 µg/ml ตามลำดับ ส่วน positive control คือ หลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว ไม่มีสารสกัด จากนั้นเติมจุลินทรีย์ประมาณ 1.5×10^6 cfu/ml ที่เตรียมไว้ลงไปในทุกหลอด จำนวนหลอดละ 1 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดหยดสีรีซาซูริน (Resazurin) ที่เจือจาง (1:10) ปริมาตร 30 µl ลงในหลุมทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27°C อีก 3 ชม. อ่านผลการทดสอบโดยสังเกตสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ หากสารสกัดยับยั้งเชื้อทดสอบได้

อาหารจะยังคงมีสีน้ำเงินเช่นเดิม แต่หากสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ เซลล์ของแบคทีเรียที่ทดสอบมีการเจริญ จะรีดิวซ์รีซาซูริน ทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพู หรือได้สารละลายใส ไม่มีสี ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ โดยอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของหลอดที่ยังคงมีสีน้ำเงินเป็นค่า MIC บันทึกหน่วยเป็น mg/ml

3.5.2 การหาค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

การหาค่า MBC ดำเนินการต่อเนื่องจากการหาค่า MIC ซึ่งการวิจัยนี้ใช้วิธี drop plate โดยนำสารละลายในหลอดที่ให้ผลว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย จากการหาค่า MIC จากข้อ 3.5.1 มาหยดลงบนจานอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) โดยแต่ละจุดใช้ปริมาตร 10 µl และปล่อยให้แห้งบนอาหาร MHA นาน 10-15 นาที แล้วนำเข้าตู้บ่มที่ 27°C เป็นเวลา 24 ชม. หากสารสกัดจากพืชที่ความเข้มข้นใดสามารถฆ่าแบคทีเรียได้ก็จะแสดงผลเป็นลบ คือ ไม่ปรากฏการเจริญของแบคทีเรียบนจานอาหารทดสอบ ซึ่งความเข้มข้นน้อยสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียทดสอบได้ คือ ค่า MBC บันทึกหน่วยเป็น mg/ml

3.6 การทดสอบผลของสภาวะทางกายภาพในการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร

3.6.1 อุณหภูมิ

เตรียมแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยดำเนินการเช่นเดียวกับการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในข้อ 3.5 และเตรียมสารสกัดหยาบให้ได้ความเข้มข้นที่ระดับค่า MIC ของการทดลองที่ 3.5.1 ด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้สกัด คือ methanol ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบโดยวิธี broth macrodilution โดยดำเนินการเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.5.1 ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C ทดสอบ 3 ซ้ำ (อุณหภูมิที่เลือกใช้ในการทดสอบนี้ เป็นตัวแทนของอุณหภูมิที่สามารถพบได้ในนาข้าว โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ ทิวา พาโคกทม, ณัฐพล ชมพูบุตร และนงภัทร ไชยชนะ (2557) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิอากาศ และอุณหภูมิน้ำในนาข้าว พบว่าอุณหภูมิน้ำจากสถานีตรวจวัดสภาพอากาศนอกโรงเรือนและในโรงเรือนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต

กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ในช่วงเวลา 6:00-18:00 น. มีค่าอยู่ระหว่าง 17.30-41.10°C และ 18.00-54.40°C ตามลำดับ)

3.6.2 ช่วงแสง

ดำเนินการเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.6.1 แต่นำไปบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24 ชม. โดยทดสอบที่ optimal temperature จากผลการทดลองในข้อ 3.6.1 และทำการทดสอบที่ช่วงแสง (photoperiod) 3 ช่วง ที่สามารถพบได้ในเขตอากาศร้อนชื้น ได้แก่ ช่วงสว่าง:ช่วงมืด (ชม.) = 10:14 ชม., 12:12 ชม. และ 14:10 ชม. ทดสอบ 3 ซ้ำ โดยแหล่งกำเนิดแสงที่ใช้เป็นแสงจากหลอดไฟ daylight Fluorescent 7400 Lux และทดสอบใน growth chamber (รุ่น KBW, WTB Binder, Germany; บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชั่น จำกัด, ประเทศไทย)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 Yield Percentage ของสารสกัดจากพืชที่ทดสอบ

การสกัดด้วยวิธีดังกล่าวมาแล้ว ทำให้ได้ yield percentage ของใบน้อยหน่า ใบบัวบก และ ใบตำลึง เท่ากับ 8.85, 16.91 และ 15.07% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม อาจทำให้ % yield เพิ่มขึ้นได้ตามวิธีการของ Arumugam et al. (2011) โดยทำการสกัดที่อุณหภูมิห้องใน ultrasonic bath (Sartorius, Labsonic®M, 33 KHz) นำมาระเหยจนแห้ง เติม methanol ลงไป นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 rpm นาน 10 นาที โดย Arumugam et al. (2011) รายงานว่า ในบรรดาตัวทำละลายที่ศึกษา (methanol, acetone, chloroform, น้ำ) พบว่าสารสกัดใบบัวบกด้วย 90% methanol ตามวิธีการดังกล่าวสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (*P. aeruginosa*, *E. coli*) ได้ดีที่สุด โดยได้ % yield ของสารสกัดใบบัวบกด้วย methanol ถึง 26.3% แม้จะได้ % yield สูงกว่าที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ แต่ก็ต้องเพิ่มขั้นตอนในการสกัดและการเตรียมสารสกัด รวมทั้งต้องอาศัยเครื่องมือเพิ่มขึ้น คือ ultrasonic bath และใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงที่สามารถหมุนได้ถึง 14,000 rpm โดยเครื่อง ultrasonic bath นี้ จะมีคลื่น ultrasonic ที่ประกอบด้วยช่วงอัดและช่วงขยาย ในช่วงขยาย เมื่อคลื่นเคลื่อนที่ผ่านตัวทำละลายจะทำให้เกิดฟองของตัวทำละลายขนาดเล็กจำนวนมาก จากนั้นเมื่อฟองได้รับแรงจากคลื่นในช่วงอัด จะทำให้ฟองนั้นแตกออก และเกิด microjet ที่มีความแรงมาก จนสามารถเจาะทำลายผนังเซลล์ได้ เมื่อผนังเซลล์แตกออกจะทำให้เพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้การทำให้ขนาดของตัวอย่างเล็กลงทำให้เพิ่มการสัมผัสกับตัวทำละลายได้เพิ่มขึ้นด้วย (อรัญญา พรหมกูล, วรัญญา วงศ์ไชยสิทธิ์, ไอรดา อักษ์เสน, & เกรียงไกร พัทยากร, 2558) ดังนั้น ผู้ปฏิบัติจึงควรพิจารณาตามความเหมาะสมหรือข้อจำกัดของผู้ปฏิบัติด้วย

4.2 ประสิทธิภาพของพืชที่ทดสอบในการยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* เมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc Diffusion

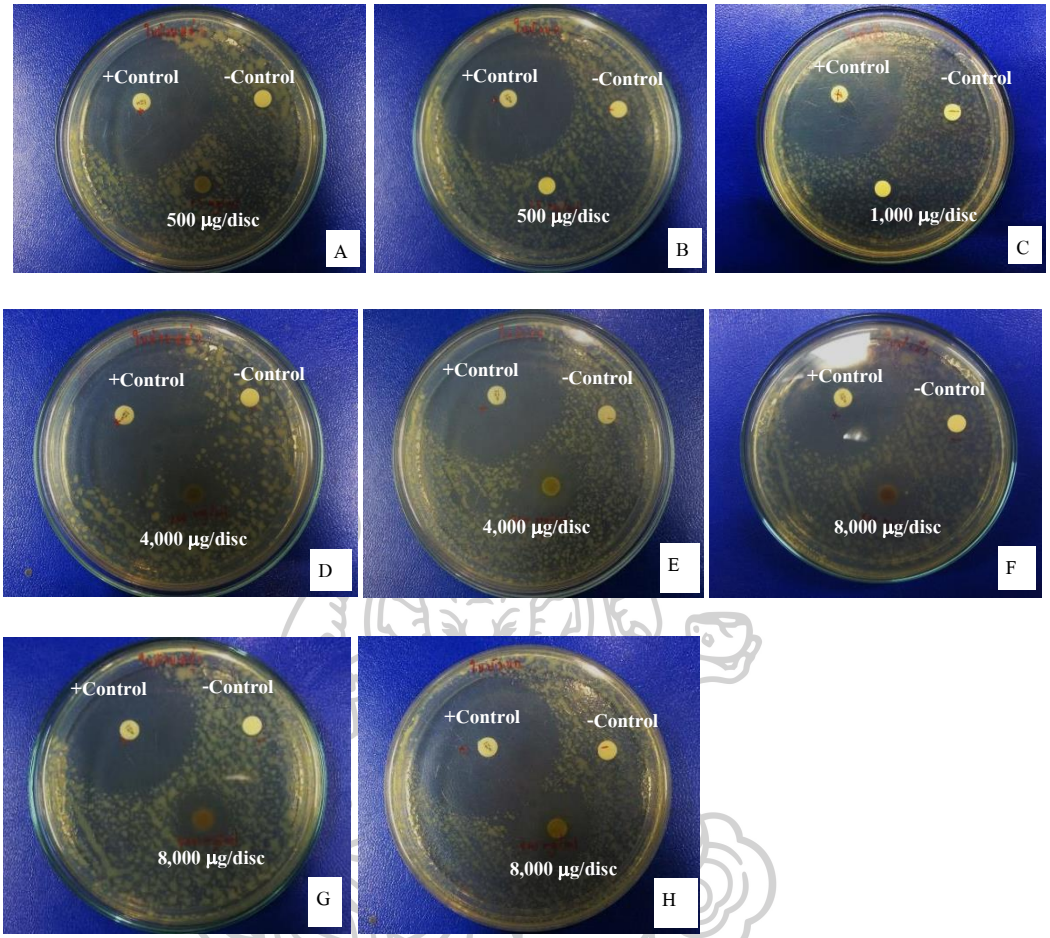
เมื่อนำสารสกัดที่สกัดด้วย methanol ของพืชทั้ง 3 ชนิด (ใบน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึง) มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยวิธี disc diffusion ผลการทดลองแสดงดังในตารางที่ 1 และรูปที่ 4

ตารางที่ 1 การยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยสารสกัดเมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc Diffusion

Disc Concentration (µg)	ค่าเฉลี่ยบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง±SD (mm) เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจาก		
	ใบน้อยหน่า	ใบบัวบก	ใบตำลึง
250 µg ของสารสกัด	0^{a}±0.0	0^{A}±0.0	0^{I}±0.0
500 µg ของสารสกัด	9.0^{b}±0.0	8.0^{B}±0.0	0^{I}±0.0
1,000 µg ของสารสกัด	11.7^{c}±0.6	10.7^{C}±0.6	8.0^{II}±0.0
2,000 µg ของสารสกัด	13.7^{d}±0.6	13.0^{D}±1.0	11.7^{III}±0.6
4,000 µg ของสารสกัด	20.7^{e}±0.6	19.0^{E}±0.0	14.7^{IV}±0.6
8,000 µg ของสารสกัด	24.7^{f}±0.6	23.0^{F}±1.0	20.7^{V}±0.6
10 µg Streptomycin (+Control)	45.0^{g}±0.0	45.0^{G}±0.0	45.0^{VI}±0.0
95%methanol (-Control)	0^{a}±0.0	0^{A}±0.0	0^{I}±0.0

หมายเหตุ ตัวอักษรกำกับที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน (column) หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อวิเคราะห์ด้วย ANOVA และ Duncan's multiple range test

มหาวิทยาลัยศิลปากร



รูปที่ 4 บริเวณที่ *X. oryzae* pv. *oryzae* ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดจากใบพืชที่ทดสอบ

A น้อยหน่าที่ 500 µg/disc B บัวบกที่ 500 µg/disc C ตำลึงที่ 1,000 µg/disc

D น้อยหน่าที่ 4,000 µg/disc E บัวบกที่ 4,000 µg/disc F ตำลึงที่ 8,000 µg/disc

G น้อยหน่าที่ 8,000 µg/disc H บัวบกที่ 8,000 µg/disc

Control + คือ 10 µg Streptomycin

Control - คือ 95% methanol

จากตารางที่ 1 และรูปที่ 4 พบว่าสารสกัดจากพืชที่ทดสอบทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งด้วยสารสกัด ซึ่งจะปรากฏเป็นวงใสรอบแผ่น disc (inhibition zone) บนตัวกลางที่ทดสอบ พบว่าสารสกัดจากใบน้อยหน่า และสารสกัดจากใบบัวบก มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งเชื้อได้ คือ ที่ 500 µg/disc ที่ทำให้เกิด inhibition zone ที่มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางสำหรับสารสกัดจาก

ใบน้อยหน่าและใบบัวบกเท่ากับ 9 และ 8 mm ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากใบตำลึงที่ความเข้มข้น 1,000 µg/disc ทำให้เกิด inhibition zone ขนาด 8 mm ซึ่งจากผลการทดลองนี้ สรุปได้ว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือสารสกัดจากใบน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึงมีฤทธิ์ยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ แต่ไม่สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดชนิดไหนมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อที่ดีกว่ากัน แต่การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดควรทำการทดสอบด้วยวิธี MIC และ MBC ต่อไป เนื่องจากการทดสอบประสิทธิภาพของพืชทดสอบในการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี disc diffusion นั้น มีปัจจัยต่าง ๆ หลายอย่างที่ส่งผลกระทบต่อขนาดของ inhibition zone เช่น

(1) อัตราการแพร่กระจายของสารสกัดหยาบบน agar โดยคุณสมบัติการแพร่ และการละลายของสารสกัดใน agar และน้ำหนักโมเลกุลของสารสารสกัดหยาบ มีผลต่ออัตราการแพร่กระจายของสารสกัดหยาบ โดยโมเลกุลขนาดใหญ่จะกระจายตัวในอัตราที่ช้ากว่าสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่า

(2) ความหนาแน่นของเชื้อทดสอบ หากแบคทีเรียความหนาแน่นน้อยเกินไปโซนการยับยั้งจะมีขนาดใหญ่ แม้ว่าความไวของเชื้อจะไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งสายพันธุ์ที่ทนทานอาจรายงานว่าอ่อนแอตรงกันข้าม หากหัวเชื้อความหนาแน่นเกินไป ขนาดของ inhibition zone จะลดลง และสายพันธุ์อ่อนแออาจถูกรายงานว่ามีความทนทาน

(3) ระยะเวลาของการวางแผ่น disc หากหลังจาก inoculation เชื้อลงบน agar แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานานกว่าเวลามาตรฐาน ก่อนจะนำมาทดสอบ จะทำให้เส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ลดลง และอาจส่งผลให้สายพันธุ์อ่อนแอถูกรายงานว่ามีความต้านทาน

(4) ขนาดจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ความลึกของ agar และระยะห่างของแผ่น disc โดยการทดสอบความไวของเชื้อทดสอบต่อสารสกัด มักจะดำเนินการกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีขนาด 9-10 cm และใส่ไม่เกิน 6 หรือ 7 แผ่น disc ของยาที่ใช้ทดสอบในแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าต้องการใช้ disc ยาทดสอบจำนวนมาก ควรใช้ 2 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 cm และหาก agar ที่ใช้ทดสอบบางเกินไปอาจทำให้เกิด inhibition zone ที่ใหญ่ ในทางกลับกัน หาก agar ที่ใช้ทดสอบหนาเกินไป ก็ทำให้เกิด inhibition zone ที่เล็กกว่าที่ควรเป็นจริง อีกทั้งการเว้นระยะห่างที่เหมาะสมของแผ่น disc ก็เป็นสิ่งสำคัญ เพื่อหลีกเลี่ยงการทับซ้อนกันของ inhibition zone ที่เกิดขึ้น (World Health Organization, 1991)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารสกัดด้วย methanol ของพืชชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. เมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion กับผลการศึกษาในอดีตสรุปไว้ในตารางที่ 2 อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion สามารถบอกได้อย่างคร่าว ๆ เท่านั้น หากต้องการให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องยิ่งขึ้น ควรทำการทดสอบควบคู่ไปกับการทดสอบอย่างอื่นด้วย เช่น MIC และ MBC อีกทั้งการนำสารสกัดจากใบน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึงมาใช้ก็นับว่ามีความน่าสนใจ เนื่องจากมีรายงานว่าสามารถยับยั้งเชื้ออย่างอื่นได้ด้วย เช่น สารสกัดที่สกัดด้วย methanol ของใบของน้อยหน่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดี เช่น *Escherichia coli* (MTCC 46), *Salmonella typhi* (MTCC 3216), *Salmonella paratyphi* (MTCC 735), *Vibrio cholera* (MTCC 3906), *Proteus mirabilis* (MTCC 3310) และ *Klebsiella pneumonia* ได้ (Gowdhami, Sarkar, & Ayyasamy, 2014) สารสกัดจากใบบัวบกก็สามารถยับยั้ง *Xanthomonas compestries* ได้ (Vadlapudi et al., 2012) รวมทั้งสารสกัดที่สกัดด้วย methanol ของใบตำลึงสามารถยับยั้ง *Shigella dysenteriae*, *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้ด้วย (Khatun, Pervin, Karim, Ashraduzzaman, & Rosma, 2012)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบการยังยั้ง *Xanthomonas* sp. ของสารสกัดของพืชชนิดต่าง ๆ ด้วย Methanol เมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc Diffusion

Xanthomonas Bacteria	พืชที่ทดสอบ	Concentration (µg/disc)	Inhibition Zone Diameter (mm)	อ้างอิง
X. oryzae pv. *oryzae* KX019	ใบมะเกี๋ยง (*Cleistocalyx nervosum* var. paniala)	1,500	10.0±0	Bajpai et al. (2010)
X. oryzae pv. *oryzae*	ใบชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.)	1,000	13.7±0.6	Ab Rahman et al. (2016)
X. oryzae pv. *oryzae*	ผลชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.)	1,000	16.3±0.6	Ab Rahman et al. (2016)
X. oryzae	ใบฝรั่ง (*Psidium guajava* L.)	10,000	25.0±0	Sarah et al. (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ดอกมะม่วง (*Mangifera indica* L.)	80	13.6±0.6	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบน้อยหน่า (*Annona squamosa* L.)	80	15.7±0.5	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบทับทิม (*Punica granatum* L.)	80	18.7±0.3	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบมะละกอ (*Carica papaya* L.)	80	21.7±0.8	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบฝรั่ง (*Psidium guajava* L.)	80	15.4±0.8	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบเก๊กฮวย (*Chrysanthemum indicum* L.)	80	15.0±0.9	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบมะลิลา (*Jasminum sambac* L. Aiton)	80	13.9±0.8	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบมะลิก้านแดง (*Jasminum grandiflorum* L.)	80	15.8±0.5	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบชบา (*Hibiscus rosa-sinensis* L.)	80	14.6±0.5	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบกระถินหางกระรอก (*Prosopis juliflor*a Sw. DC)	80	14.3±0.8	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบรำเพย (*Thevetia peruviana* Pers. K. Schum)	80	14.0±0.6	Gracelin et al., (2012)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบการยังยั้ง *Xanthomonas* sp. ของสารสกัดของพืชชนิดต่าง ๆ ด้วย Methanol เมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc Diffusion (ต่อ)

Xanthomonas Bacteria	พืชที่ทดสอบ	Concentration (µg/disc)	Inhibition Zone Diameter (mm)	อ้างอิง
X. campestris pv. *centellae*	ใบสะเดา (*Azadiracta indica* A Juss.)	80	11.5±0.5	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบ *Cassia auriculata* L.	80	11.5±0.3	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบหางนกยูงไทย (*Caesalpinia pulcherrima* L Sw.)	80	18.7±0.8	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบกุหลาบ (*Rosa indica* L.)	80	15.5±0.5	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบวัชพืช *Parthenium hysterophorus* L.	80	14.3±0.8	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบสังกรณีใบมัน (*Crossandra infundibuliformis* L. Nees)	80	13.3±0.8	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus* L G. Don)	80	20.7±0.5	Gracelin et *al*., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบรัก (*Calotropis gigantea* L.)	80	19.6±0.5	Gracelin et a*l*., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบยี่โถ (*Nerium oleander* L.)	80	13.3±0.8	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *campestris* KC94-17	ใบมะเกี๋ยง (*Cleistocalyx nervosum* var. paniala)	1,500	12.0±0	Bajpai et al. (2010)
X. campestris pv. *vesicatoria* YK93-4	ใบมะเกี๋ยง (*Cleistocalyx nervosum* var. paniala)	1,500	13.0±0	Bajpai et al. (2010)
X. campestris	ใบหญ้านกเค้า (*Leucas aspera* Willd spreug.)	100	14.0±0.8	De Britto and Gracelin (2011)
X. campestris	ใบรัก (*Calotropis gigantia* L. W.T.Aiton)	100	10.0±0.5	De Britto and Gracelin (2011)
X. campestris	ใบกะเพรา (*Ocimum sanctum* L.)	100	16.0±0.5	De Britto and Gracelin (2011)
X. campestris	ใบเสนียด (*Adathoda vasic*a Nees)	100	24.3±0.5	De Britto and Gracelin (2011)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบการยังยั้ง *Xanthomonas* sp. ของสารสกัดของพืชชนิดต่าง ๆ ด้วย Methanol เมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc Diffusion (ต่อ)

Xanthomonas Bacteria	พืชที่ทดสอบ	Concentration (µg/disc)	Inhibition Zone Diameter (mm)	อ้างอิง
X. campestris	ใบแมงลักคา (*Hyptis suaveolens* L. Piot)	100	20.3±0.8	De Britto and Gracelin (2011)
X. campestris	ใบครามป่า (*Teprosia purpurea* L. pers.)	100	14.7±0.6	De Britto and Gracelin (2011)
X. campestris	ใบผักเสี้ยนผี (*Cleome viscosa* L.)	100	7.6±0.5	De Britto and Gracelin (2011)
X. campestris	ใบผักเสี้ยน (*Cleome gynandra* L.)	100	10.3±0.6	De Britto and Gracelin (2011)
X. campestris	ใบปอทะเล (*Hibiscus tiliaceus*)	200	26.6 ± 0.2	Usha Rani et al. (2016)
X. phaseoli	ใบ *Boenninghausenia albiflora* Reichb.	1,000	8	Khulbe and Sati (2009)
Xanthomonas sp. SK12	ใบมะเกี๋ยง (*Cleistocalyx nervosum* var. paniala)	1,000	13.0±0	Bajpai et al. (2010)

4.3 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ ***X. oryzae*** **pv. *oryzae*** **(MIC)** และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ ***X. oryzae*** **pv. *oryzae*** **(MBC)** ด้วยวิธี Broth Macrodilution

เมื่อนำสารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิด (ใบน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึง) มาหาค่า MIC และค่า MBC ต่อเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* พบว่าค่า MIC ของสารสกัดที่สกัด methanol ของใบน้อยหน่า และใบบัวบกต่อแบคทีเรียที่ทดสอบมีค่าเท่ากัน คือ เท่ากับ 12,500 µg/ml และค่า MBC ที่เท่ากัน คือ เท่ากับ 25,000 µg/ml ส่วนสารสกัดจากใบตำลึงมีค่า MIC ต่อแบคทีเรียที่ทดสอบเท่ากับ 25,000 µg/ml และค่า MBC เท่ากับ 50,000 µg/ml และพบว่าแบคทีเรียที่ทดสอบสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 95% methanol (รูปที่ 5 และรูปที่ 6) และเมื่อเปรียบเทียบค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิดในการวิจัยนี้ โดยหาอัตราส่วน MBC/MIC เพื่อให้ทราบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของสารสกัด พบว่า สารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบบ bactericidal (MBC/MIC ≤ 4 = bactericidal, MBC/MIC > 4 = bacteriostatic) (Wald-Dickler, Holtom, & Spellberg, 2018) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบอัตราส่วน MBC/MIC ของสารสกัดจากพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิด

ชนิดของพืช	ค่า MIC (µg/ml)	ค่า MBC (µg/ml)	MBC/MIC	ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด
ใบน้อยหน่า	12,500	25,000	2	bactericidal agent
ใบบัวบก	12,500	25,000	2	bactericidal agent
ใบตำลึง	25,000	50,000	2	bactericidal agent

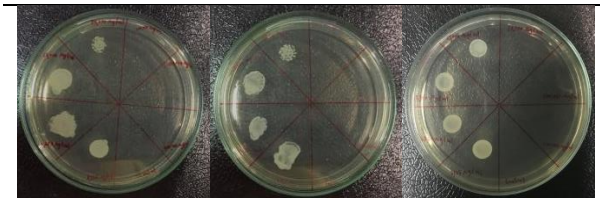
เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารสกัดของพืชชนิดต่าง ๆ ที่สกัดด้วย methanol ในการยับยั้งแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* เมื่อทดสอบด้วยการหาค่า MIC และค่า MBC ในการวิจัยครั้งนี้ กับผลการศึกษาในอดีตที่สรุปไว้ในตารางที่ 4 ผลการทดลองครั้งนี้ พบว่าสารสกัดจากใบน้อยหน่าและใบบัวบกมีค่าเท่ากัน โดยมีค่า MIC เท่ากับค่า MIC ที่ได้จากการศึกษาของ Ab Rahman et al. (2016) ที่ใช้สารสกัดจากใบชะพลูในการยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* แต่ค่า MBC ของสารสกัดจากใบน้อยหน่าและใบบัวบกในการฆ่าแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ มีค่าสูงกว่า ค่า MBC ของสารสกัดจากใบชะพลูที่ได้จากการศึกษาของ Ab Rahman et al. (2016)

ถึง 2 เท่า ส่วนค่า MIC และ MBC ของสารสกัดของใบตำลึงต่อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ มีค่าสูงกว่าค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากใบชะพลูที่ได้จากการศึกษาของ Ab Rahman et al. (2016) เช่นกัน ดังนั้นสารสกัดจากใบชะพลูจึงมีประสิทธิภาพยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึงที่ได้ในการวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งเมื่อพิจารณาจากค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากใบพืชทั้ง 3 ชนิดก็พบว่ามีค่าสูงกว่าค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากใบมะเกี๋ยง ต่อ *X. oryzae* pv. *oryzae* เช่นกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดจากใบมะเกี๋ยงก็มีประสิทธิภาพยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ดีกว่าสารสกัดจากในน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึงที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ด้วย

ชนิดของพืช	ภาพแสดงการทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัด	Control	ค่า MIC (µg/ml)
ใบน้อยหน่า	25000 12500 6250 3130 1560 780 390		12,500
ใบบัวบก	25000 12500 6250 3130 1560 780 390		12,500
ใบตำลึง	50000 25000 12500 6250 3130 1560 780		25,000

รูปที่ 5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* (MIC)

หมายเหตุ control = ชุดทดสอบที่เติม 95% methanol แทนสารสกัด

ภาพแสดงการทดสอบหาค่า MBC ของสารสกัด	ค่า MBC (µg/ml)
 ใบน้อยหน่า ใบบัวบก ใบตำลึง	ใบน้อยหน่า = 25,000 ใบบัวบก = 25,000 ใบตำลึง = 50,000

รูปที่ 6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า *X. oryzae* pv. *oryzae* (MBC)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบการทดสอบหาค่า MIC และค่า MBC ของเชื้อ *Xanthomonas* sp. ที่ทดสอบกับสารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ ด้วย Methanol

Xanthomonas Bacteria	พืชที่ทดสอบ	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	อ้างอิง
X. oryzae pv. *oryzae* KX019	ใบมะเกี๋ยง (*Cleistocalyx nervosum* var. paniala)	250	500	Bajpai et al. (2010)
X. oryzae pv. *oryzae*	ใบชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.)	12,500	12,500	Ab Rahman et al. (2016)
X. oryzae pv. *oryzae*	ผลชะพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.)	12,500	25,000	Ab Rahman et al. (2016)
X. oryzae	ใบฝรั่ง (*Psidium guajava* L.)	391	ไม่ได้ทดสอบ	Sarah et al. (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบทับทิม (*Punica granatum* L.)	64	ไม่ได้ทดสอบ	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบมะละกอ (*Carica papaya* L.)	8	ไม่ได้ทดสอบ	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบรำเพย (*Thevetia peruviana* Pers. K. Schum)	128	ไม่ได้ทดสอบ	Gracelin et al., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus* L G. Don)	16	ไม่ได้ทดสอบ	Gracelin et *al*., (2012)
X. campestris pv. *centellae*	ใบรัก (*Calotropis gigante*a L.)	32	ไม่ได้ทดสอบ	Gracelin et a*l*., (2012)
X. campestris pv. *campestris* KC94-17	ใบมะเกี๋ยง (*Cleistocalyx nervosum* var. paniala)	250	500	Bajpai et al. (2010)
X. campestris pv. *vesicatoria* YK93-4	ใบมะเกี๋ยง (*Cleistocalyx nervosum* var. paniala)	250	500	Bajpai et al. (2010)
X. campestris	ใบกะเพรา (*Ocimum sanctum* L.)	128	ไม่ได้ทดสอบ	De Britto and Gracelin (2011)
X. campestris	ใบเสนียด (*Adathoda vasic*a Nees)	32	ไม่ได้ทดสอบ	De Britto and Gracelin (2011)
X. campestris	ใบแมงลักคา (*Hyptis suaveolens* L. Piot)	64	ไม่ได้ทดสอบ	De Britto and Gracelin (2011)
Xanthomonas sp. SK12	ใบมะเกี๋ยง (*Cleistocalyx nervosum* var. paniala)	500	1,000	Bajpai et al. (2010)

4.4 ผลของสภาวะทางกายภาพต่อการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยสารสกัดหยาบจากพืชที่ทดสอบ ด้วยวิธี Broth Macrodilution

4.4.1 อุณหภูมิ

การศึกษาผลของอุณหภูมิช่วงที่ทดสอบ (25, 30 และ 35°C) ต่อการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยสารสกัดหยาบจากพืชที่ทดสอบ ผลการทดลองของชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) ที่มีเพียงเชื้อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่มีสารสกัดที่ทดสอบ พบว่าเฉพาะที่ 35°C เท่านั้น ที่สีของอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงมีสีน้ำเงินเช่นเดิม แสดงว่าเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 35°C ดังนั้น ในสภาพพื้นที่จริงที่ 35°C อาจไม่เสี่ยงต่อการเกิดโรคขอบใบแห้งในข้าวที่มีสาเหตุจาก *X. oryzae* pv. *oryzae* เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 35°C ส่วนเมื่อทดสอบที่ 25 และ 30°C ได้ผลไม่แตกต่างกัน คือ ได้ค่า MIC เท่ากันสำหรับทุกสารสกัดที่ทดสอบ โดยสารสกัดที่สกัดด้วย methanol ของใบน้อยหน่า และใบบัวบกมีค่า MIC เท่ากัน คือ มีค่าเท่ากับ 12,500 µg/ml และสารสกัดจากใบตำลึงมีค่า MIC เท่ากัน คือ มีค่าเท่ากับ 25,000 µg/ml

4.4.2 ช่วงแสง

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากพืชทั้ง 3 ชนิด (ใบน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึง) มาทดสอบผลของช่วงแสง (ช่วงสว่าง:ช่วงมืด (ชม.) = 10:14 ชม., 12:12 ชม. และ 14:10 ชม.) ต่อการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยใช้ค่า MIC ของสารสกัดที่ได้จากการทดลองที่ 3.5.1 มาทดสอบ พบว่า ช่วงแสงที่ทดสอบทั้ง 3 ช่วง ให้ผลไม่แตกต่างกัน คือ สามารถยับยั้งเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ และได้ค่า MIC เท่ากันสำหรับทุกสารสกัดที่ทดสอบ โดยสารสกัดที่สกัดด้วย methanol ของใบน้อยหน่า และใบบัวบกมีค่า MIC เท่ากัน คือ มีค่าเท่ากับ 12,500 µg/ml และสารสกัดจากใบตำลึงมีค่า MIC เท่ากัน คือ มีค่าเท่ากับ 25,000 µg/ml จึงสรุปได้ว่าช่วงแสงในช่วงที่ทดสอบ ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่ทดสอบ

ผลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้เป็นผลการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น หากจะนำไปใช้จริงในพื้นที่นาข้าว ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น ควรมีการทดลองในเรือนกระจก (ที่สามารถควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ได้) ดังเช่น การทดลองของ Shivalingaiaha and Sateesh (2013) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของสาร

สกัดจากเคราฤาษี ที่สกัดด้วย chloroform ในการยับยั้ง *X. oryzae* pv. *oryzae* ภายใต้สภาวะเรือนกระจก อีกทั้งควรมีการทดลองเพิ่มเติมในสภาพพื้นที่จริงด้วย เนื่องจากในสภาพพื้นที่จริงมีปัจจัยต่าง ๆ อีกมาก (นอกเหนือจาก อุณหภูมิ และช่วงแสง) ที่อาจมีผลต่อการใช้สารสกัดจากพืชในการยับยั้งแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae*

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ผลการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดด้วย methanol ของใบน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้

ส่วนการทดลองเพื่อหาค่า MIC และค่า MBC ของสารสกัดหยาบจากพืชทั้ง 3 ชนิด ที่ทดสอบในการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยวิธี broth macrodilution พบว่าค่า MIC ของสารสกัดจากใบน้อยหน่า และใบบัวบกต่อแบคทีเรียที่ทดสอบมีค่าเท่ากัน คือ มีค่าเท่ากับ 12,500 µg/ml และค่า MBC มีค่าเท่ากัน คือ มีค่าเท่ากับ 25,000 µg/ml ส่วนสารสกัดจากใบตำลึง มีค่า MIC และค่า MBC ที่มีค่าเท่ากับ 25,000 µg/ml และ 50,000 µg/ml ตามลำดับ

อีกทั้งการศึกษาผลของสภาวะบางประการทางกายภาพในการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยสารสกัดหยาบจากพืชที่ทดสอบ พบว่าอุณหภูมิ (25 และ 30°C) และช่วงแสงที่ทดสอบ (ช่วงสว่าง:ช่วงมืด (ชม.) = 10:14 ชม., 12:12 ชม. และ 14:10 ชม.) มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ไม่แตกต่างกัน แต่ที่อุณหภูมิ 35°C พบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการสกัดพืชทั้ง 3 ชนิดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ ด้วย ซึ่งจะช่วยให้ได้ผลการทดลองที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น เนื่องจากตัวทำละลายที่แตกต่างกันอาจสามารถสกัดองค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ ในพืชที่ทดสอบได้แตกต่างกัน

2. ควรศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบ

3. ควรมีการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึง ในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิด อื่น ๆ ด้วย

4. การทดสอบผลของสภาวะทางกายภาพต่อการยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ด้วยสารสกัดหยาบจากพืชทดสอบ ควรทำการทดสอบเพิ่มเติม โดยเพิ่มความเข้มข้นของสาร

สกัดที่ใช้ทดสอบ ทั้ง1/2 MIC และ 2 เท่าของค่า MIC เพื่อทดสอบว่าแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดนั้นมีฤทธิ์ synergistic หรือ antagonistic หรือไม่

รายการอ้างอิง

จันทรพร ทองเอกแก้ว. (2556). บัวบก: สมุนไพรมากคุณประโยชน์. วารสารวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 15(3), 70-75.

จิราภรณ์ บุราคร, & เรือนแก้ว ประพฤติ. (2555). ผลของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยจำนวน 7 ชนิด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 10(1), 11-22.

จิราภรณ์ โสดาจันทร์, บันลือ สังข์ทอง, & สกุลรัตน์ รัตนาเกียรติ. (2558). องค์ประกอบหลักทางเคมีและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพกอโรคในชองปากของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสกุล *Ocimum* spp. . วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน, 11, 304-310.

ชลิดา เล็กสมบูรณ์, นิพนธ์ ทวีชัย, & วิชัย โฆสิตรัตน. (2541). ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยต่อการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช. Paper presented at the รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทิวา พาโคกทม, ณัฐพล ชมภูบุตร, & นงภัทร ไชยชนะ. (2557). ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิอากาศและอุณหภูมิน้ำในนาข้าว. Paper presented at the การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52, กรุงเทพฯ.

ธนภพ โสตรโยม, เกศรินทร์ เพ็ชรรัตน์, นพพร สกุลยืนยงสุข, ดวงกมล ตั้งสถิตพร, ดวงรัตน์ แซ่ตั้ง, & กิตติ ช้องประเสริฐ. (2558). การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* ของสารสกัดจากหัวหอมใหญ่. (วิทยาศาสตรบัณฑิต), มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.

นิครินทร์ ปุยนุเคราะห์. (2550). การสกัดสารแคโรทีนอยด์จากใบมันสำปะหลัง. (วิทยาศาสตรบัณฑิต), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เบญจมาศ เขตรดง และ ปรัชญากร ชูตระกูล. (2553). ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา โหระพา ตะไคร้หอม และแมงลักในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์. (วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี), สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ประทุมพร ปลอดภัย, จิตติมา โสตถิวิไลพงศ์, วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ, & ดุสิต อธินุวัฒน์. (2558). การควบคุมแบคทีเรีย *Erwinia carotovora subsp. Carotovorum* สาเหตุโรคเน่าเละของผักคะน้าด้วยสารสกัดจากพืช. Paper presented at the การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญบุตร, & สาธร พรตระกูลพิพัฒน์. (2551). การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ. Paper presented at the การประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นครั้งที่ 9, คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วัชรา สุวรรณ์อาศน์ และ ศศิธร วุฒิวณิชย์. (2553). ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละของผักในเรือนทดลอง. Paper presented at the การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศศิธร วุฒิวณิชย์. (2546). การจัดการดินโดยใช้น้ำสกัดหยาบและกากของพืชเพื่อลดปริมาณเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดเขียวปลี. วิทยาสารกำแพงแสน, 1(1), 10-18.

ศูนย์บริหารศัตรูพืชจังหวัดสุพรรณบุรี. (2556). โรคขอบใบแห้งของข้าว (Bacterial Leaf Blight or Bacterial Blight). ข่าวเตือนการระบาดศัตรูพืช, 3(7), 1-3.

สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. (2559a). น้อยหน่า. Retrieved from http://www.medplant.mahidol.ac.th/pharm/botanic.asp?bc=0315&kw=%B9%E 9%CD%C2%CB%B9%E8%D2*

สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. (2559b). ตำลึง. Retrieved from http://www.medplant.mahidol.ac.th/pharm/botanic.asp?bc=0399&kw=%B5%D3%C5%D6%A7*

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. (2557). สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2557. Retrieved from http://www.oae.go.th/download/journal/trends_FEB2557.pdf

สิริวรรณ สมิทธิอาภรณ์, & ฐานันดร วิริยะเกียรติ. (2557). ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชบางชนิดในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ในพืชตระกูลส้ม. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 45(3/1), 169-172.

สุจินต์ ภัทรภูวดล. (2555). โรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำของข้าวกับแนวทางป้องกันกำจัด. Paper presented at the การประชุมวิชาการข้าวแห่งชาติ ครั้งที่ 2, กรุงเทพมหานคร.

สุธาสินี อั้งสูงเนิน. (2558). ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชียฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 9(1), 50-63.

สุวัฒนา ดันน์. (2561). การสกัดด้วยตัวทำละลาย. Retrieved from http://www.suwattana.net/separation/page8.html

อรัญญา พรหมกูล, วรัญญา วงศ์ไชยสิทธิ์, ไอรดา อักษ์เสน, & เกรียงไกร พัทยากร. (2558). การใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคในการสกัดแอนโทไซยานินจากกากเม่า. แก่นเกษตร, 43(1), 831-835.

Ab Rahman, S. F. S., Siman, K., Omar, D., & Wahab, M. Z. A. (2016). Identification of phenolic compounds and evaluation of antibacterial properties of *Piper sarmentosum* Roxb. Against rice pathogenic bacteria. *Malaysian Journal of Microbiology,* 12(6), 475-484.

Arumugam, T., Ayyanar, M., Pillai, Y. J. K., & Sekar, T. (2011). Phytochemical screening and antibacterial activity of leaf and callus extracts of *Centella asiatica*. *Journal of the Bangladesh Pharmacological Society*(6), 55-60.

Bajpai, V. K., Duang, N. T., Suh, H. J., & Kang, S. C. (2010). Antibacterial activity of essential oil and extracts of *Cleistocalyx operculatus* buds against the bacteria of *Xanthomonas* spp. *Journal of the American Oil Chemists' Society*(87), 1341-1349.

Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Food Science and Technology,* 37, 263-268.

David, Ronald, & Bogdanove. (2006). *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Molecular plant pathology,* 7(5), 303-324.

De Britto, A. J., & Gracelin, D. H. S. (2011). Phytochemical screening and antibacterial activity of a few medical plants against *Xanthomonas campestris*. *Pharmacologyonline,* 2, 271-277.

Dewanjee, S., Kundu, M., Maiti, A., Majumdar, R., Majumdar, A., & Mandal, S. (2007). In Vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Crude Extract from Plants *Diospyros peregrina*, *Coccinia grandis* and *Swietenia macrophylla*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research,* 6(3), 773-778.

Dhiman, R., Aggarwal, N., Aneja, K. R., & Kaur, M. (2015). In Vitro Antimicrobial Activity of Spices and Medicinal Herbs against Selected Microbes Associated with Juices. *International Journal of Microbiology*, 1-9.

Gowdhami, M., Sarkar, B. L., & Ayyasamy, P. M. (2014). Screening of Phytochemicals and Antibacterial Activity Of *Annona Squamosa* Extracts. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention,* 3(7), 30-39.

Gracelin, D. H. S., De Britto, A. J., & Kumar, P. B. J. R. (2012). Anti-bacterial evaluation of few south Indian medicinal flowers against plant pathogenic *Xanthomonas* bacteria. *Internatioanl Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,* 4(Suppl 1), 474-478.

Hudzicki, J. (2013). Kirby-Bauer disk diffusion dusceptibility test protocol. *American Society for Microbiology*, 1-23.

Jayshree, D. P., & Kumar, V. (2008). *Annona squamosa* L.:Phytochemical analysis and Antimicrobial Screening. *Journal of Pharmacy Research,* 1(1), 34-38.

José, H. O. (2005). Disk diffusion testing *Manual of antimicrobial susceptibility testing* (pp. 39-52). Washington, USA.

Kala, A., Soosairaj, S., Mathiyazhagan, S., & Raja, P. (2015). Isolation and identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* the causal agent of rice bacterial leaf blight and its activities against of six medicinal plants. *Asian Journal of Plant Science and Research,* 5(6), 80-83.

Khatun, S., Pervin, S., Karim, M. R., Ashraduzzaman, M., & Rosma, A. (2012). Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Coccinia cordifolia* L. plant. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences,* 25(4), 757-761.

Mew, T. W. (1992). Bacterial Blight. *American Phytopathological Society,* 1992, 10-11.

Nanasombat, S., & Teckchuen, N. (2009). Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *Journal of Medicinal Plants Research,* 3(5), 443-449.

Niño-Liu, D. O., Darnielle, L., & Bogdanove, A. J. (2006). *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Molecular plant pathology,* 7(5), 303-324.

Rahman, M. S., Asaduzzaman, M., Munira, S., Rahman, M. M., Hasan, M., Siddique, A. H., . . . Islam, M. A. (2015). Evaluation of phytochemical, antibacterial, antioxidant, and cytotoxic properties of *Coccinia cordifolia* leaves. *International Journal of Advanced Research,* 3(8), 384-394.

Ralph, J. F., Joan, S. F., & Patty, F. (2001). Organic laboratory techniques (3 ed.). Belmont, USA: Nelson education, Ltd.

Rani, M., & Singh, N. (2014). Control of rice bright pathogen *Xanthomonas orezae* through herbal plant extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research,* 5(12), 5469-5473.

Samanta, T. T., Das, A., & Samanta, P. (2014). Isolation and Characterization of *Xanthomonas oryzae* isolates from different regions of Midnapore district of West Bengal and their ecofriendly management by some medicinal plant extracts. *International Journal of Phytomedicine,* 6(1), 29-42.

Samidha, M. P., & Sasangan, K. C. (2017). Preliminary Phytochemical and Invitro Antimicrobial analysis of *Annona squamosa* Linn. leaf extract. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research,* 9(5), 618-623.

Sarah, S. N., Sijam, K., & Omar, D. (2012). Antibacterial activity of *Psidium guajava* L. methanol leaf extract against plant pathogenic bacteria in the genera *Pectobacterium* and *Xanthomonas*. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology,* 3(1), 246-252.

Shivalingaiaha, S. U., & Sateesh, M. K. (2013). *Cocculus hirsutus* extract inhibits the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. *Archives of Phytopathology and Plant Protection,* 46(15), 1885-1894.

Thongruk, W., & Youpensuk, S. (2009). *Effects of Some Herbal Extracts on Colletotrichum gloeosporioides.* Paper presented at the The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology, Bangkok.

Usha Rani, P., Prasanna Laxmi, K., Vadlapudi, V., & Sreedhar, B. (2016). Phytofabrication of silver nanoparticles using the mangrove associate, Hibiscus tiliaceus plant and its biological activity against certain insect and microbial pests. *Journal of Biopesticides,* 9(2), 169-179.

Vadlapudi, V., Behara, M., Kaladhar, D. S. V. G. K., Suresh Kumar, S. V. N., Seshagiri, B., & John, M. (2012). Antimicrobial profile of crude extracts *Calotropis procera* and *Centrlla asatica* against some important pathogens. *Indian Journal of Science and Technology,* 5(8), 3132-3136.

Wald-Dickler, N., Holtom, P., & Spellberg, B. (2018). Busting the Myth of "Static vs Cidal": A Systemic Literature Review. *Clinical Infectious Diseases,* 66(9), 1470-1474.

World Health Organization. (1991). Technical factors influencing the size of the zone in the disc diffusion method. Retrieved from http://helid.digicollection.org/en/d/Jwho01e/4.10.8.html

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	วราภรณ์ อู่ทอง
วัน เดือน ปี เกิด	19 ธันวาคม 2533
สถานที่เกิด	จ.สิงห์บุรี
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
ที่อยู่ปัจจุบัน	เลขที่ 18/191 ซ.ออมทรัพย์ ถ.ร่มเกล้า แขวงแสนแสบ เขตมีนบุรี กทม. 10510
ผลงานตีพิมพ์	กัณฑรีย์ ศรีพงศ์พันธุ์ และวราภรณ์ อู่ทอง. 2561. การยับยั้งแบคทีเรีย Xanthomonas oryzae pv. oryzae ด้วยสารสกัดจากใบน้อยหน่า ใบบัวบก และใบตำลึง ด้วยวิธี disc diffusion. ใน การประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาระดับชาติ และนานาชาติ ครั้งที่ 8 เรื่อง “ประเทศไทย 4.0 นวัตกรรมสร้างสรรค์สู่การพัฒนาที่ยั่งยืน”. วันที่ 28-29 มิถุนายน 2561 ณ ศูนย์มานุษยวิทยาสิรินธร (องค์การมหาชน) ตลิ่งชัน กรุงเทพ ฯ. หน้า 5203-5218.

มหาวิทยาลัยศิลปากร