



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

สัปดาห์	สัปดาห์
สาขา	ภาควิชา
เรื่อง	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากตะไคร้ (<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf.)
Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Lemon Grass <i>Cymbopogon citratus</i> Stapf. Extract	
นามผู้วิจัย	นางสาวจันทร์จิรา ไต๊ะขวัญแก้ว
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย	
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จำเริญ เทียงธรรม, Ph.D.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(รองศาสตราจารย์สมเกียรติ ประสานพานิช, วท.ค.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ฤทธิ วัฒนชัยยิ่งเจริญ, ปร.ค.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กันทิมาณี พันธุ์เขียว, วท.ค.)
หัวหน้าภาควิชา	(รองศาสตราจารย์ชัยภูมิ บัญชาศักดิ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากตะไคร้
(*Cymbopogon citratus* Stapf.)

Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Lemon Grass
Cymbopogon citratus Stapf. Extract

โดย

นางสาวจันทร์จิรา โต๊ะขวัญแก้ว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จันทร์จิรา โต๊ะขวัญแก้ว 2553:ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและความเป็นพิษต่อเซลล์ของ
สารสกัดจากตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf.) ปริญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(เกษตรศาสตร์) สาขาสัตวบาล ภาควิชาสัตวบาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
ผู้ช่วยศาสตราจารย์จำเริญ เทียงธรรม, Ph.D. 75 หน้า

วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาถึงการใช้น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบ
จากตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf.) ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของมดลูกอักเสบ
และเยื่อบุผนังมดลูกอักเสบในโคนมในห้วงปฏิบัติการ ซึ่งให้ผลการทดลองดังต่อไปนี้ วิธีการสกัด
ด้วยวิธี Sonication ร่วมกับ Freeze dryer มีเปอร์เซ็นต์การผลิตเท่ากับ 17.71 เปอร์เซ็นต์ และวิธีการกลั่น
ด้วยไอน้ำ มีเปอร์เซ็นต์การผลิตเท่ากับ 4.38 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอม
ระเหยและสารสกัดหยาบจากตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf.) ในการยับยั้งการเจริญเติบโต
ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุมดลูกอักเสบและเยื่อบุผนังมดลูกอักเสบ ได้แก่เชื้อ *Arcanobacterium*
pyogenes, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี Micro dilution method พบว่า
น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดในความเข้มข้นต่ำกว่า
สารสกัดหยาบ โดยให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *A. pyogenes* และ *E. coli* ที่ระดับความเข้มข้น 1.5625
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* ที่ระดับความเข้มข้น 0.7813 ไมโครกรัมต่อ
มิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *A. pyogenes* และ *S. aureus* ที่ระดับความเข้มข้น
62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli* ที่ระดับความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อ
มิลลิลิตร และจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ลิโพไซต์ พบว่า ค่า IC_{50} ที่ได้จากการทดสอบ
ความเป็นพิษด้วยวิธี Trypan blue dye exclusion assay ที่เวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ
16.77, 9.87, 1.68 และ 1.63 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี
MTT reduction assay ให้ค่า IC_{50} ที่เวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 44.24, 11.94, 1.99 และ
1.13 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและการ
ทดสอบความเป็นพิษต่อลิโพไซต์ จึงสามารถคำนวณค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่
สามารถนำไปใช้ โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของมดลูกอักเสบ
และเยื่อบุผนังมดลูกอักเสบ และไม่เป็นพิษต่อลิโพไซต์ของโค

Janjira Tohkwankaew 2010: Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Lemon Grass
Cymbopogon citratus Stapf. Extract. Master of Science (Agriculture), Major Field:
Animal Science, Department of Animal Science. Thesis Advisor: Assistant Professor
Jamroen Thiengtham, Ph.D. 75 pages.

The objectives of this research was studies in the use of lemon grass *Cymbopogon citratus* Stapf. essential oils and Crude Extract as antibacterial agent causing bovine uterine infection *in vitro*. Percent yields of the lemon grass, with the water extracted and freeze dried method and water distilled with condenser method were 17.71 and 4.38 percent. The comparative antimicrobial activity test between essential oil and crude extract from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) against *A. pyogenes*, *E. coli* and *S. aureus* as potential causes of bovine uterine infection using Micro dilution method was conducted. The result shows lower concentration of essential oil than crude extract at an effective concentration to inhibit those 3 microbes (1.5625 µg/ml against *A. pyogenes* and *E. coli* and 0.7813 µg/ml against *S. aureus* for essential oil; vs 62.5 µg/ml against *A. pyogenes* and *S. aureu* and 125 µg/ml against *E. coli* for crude extract).The cytotoxicity test on bovine lymphocyte was done by Trypan blue dye exclusion assay. The results found that the mortality rates of lymphocyte cells in each concentrations (0.1, 1, 10 and 100 µl/ml) of oil in the same period were significantly different ($p<0.05$). The linear regression equations at 12, 24, 48, 72 hours indicate IC_{50} values as 16.77, 9.87, 1.68 and 1.63 µl/ml for each above concentrations respectively. The MTT reduction assay found that the mortality rates of lymphocyte cells in each concentrations (0.1, 1, 10 and 100 µl/ml) of oil in the same period were significantly different ($p<0.05$). The linear regression equations at 12, 24, 48, 72 hours indicate IC_{50} values as 44.24, 11.94, 1.99 and 1.13 µl/ml for each above concentrations respectively. The antimicrobial activity test and the cytotoxicity test on bovine lymphocyte results can be used to find the appropriate concentrations of essential oil from lemongrass that can be used as non-toxic to lymphocyte with an antibacterial property against microbes causing uterine infection in cattle.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จำเริญ เทียงธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ประสานพานิช ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฤทธิ์ วัฒนชัยยิ่งเจริญ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กันทิมาณี พันธุ์เขียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำในด้านการวิจัย ตลอดจนช่วยเหลือวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาสัตวบาลทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอน และให้การถ่ายทอดความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

ขอขอบคุณเครือข่ายวิจัยภาคกลางตอนบน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เงินทุนบางส่วนในการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร ห้องปฏิบัติการสัตววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการวิจัยมา ณ โอกาสนี้

สิ่งสำคัญที่สุดขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่สนับสนุนและให้โอกาสในการศึกษา ตลอดจนเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยมาตลอด

จันทร์จิรา โต๊ะขวัญแก้ว

เมษายน 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	21
อุปกรณ์	21
วิธีการ	24
ผลและวิจารณ์	33
สรุป	45
ข้อเสนอแนะ	46
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	47
ภาคผนวก	59
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสาร	60
ภาคผนวก ข ข้อมูลการทดลอง	64
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	75

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจำแนกประเภทของแบคทีเรียที่เพาะแยกได้จากมดลูกโค	7
2	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ <i>Cymbopogon citratus</i>	14
3	ค่าเมล็ดเลือดขาวในโค	19
4	อัตราส่วนนิวโทรฟิลต่อลิมโฟไซต์ในสัตว์เลี้ยงต่างๆ	20
5	ลักษณะ สี กลิ่น และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้จากการสกัด	33
6	แสดงผลการหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้	35
7	แสดงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ทดสอบการต้านเชื้อ <i>A. pyogenes</i> <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i>	37
8	อัตราการตายของลิมโฟไซต์โคนมจากการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี trypan blue dye exclusion assay	38
9	อัตราการตายของลิมโฟไซต์โคนมจากการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี MTT reduction assay	40
10	ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากตะไคร้ ที่ทำให้ลิมโฟไซต์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงเวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	43
 ตารางผนวกที่		
ก1	สารละลายมาตรฐาน McFarland	63
ข1	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) โดยวิธี microbroth dilution	65
ข2	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) โดยวิธี microbroth dilution	66

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ตัดส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในมดลูกช่วง 60 วันแรกภายหลังคลอด	5
2	ลักษณะของเมือกจากช่องคลอดตามระดับคะแนน ระดับ 1. เมือกใสมีหนองสีขาวปนเหลืองเป็นจุดเล็กน้อย ระดับ 2. เมือกมีหนองสีขาวปนเหลืองน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ระดับ 3 เมือกมีหนองสีขาวปนเหลืองมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บางครั้งอาจปนเลือด	9
3	โครงสร้างทางเคมีของ myrcene, geraniol, nerol, geranial และ neral	13
4	แสดงอัตราการตายของลิมโฟไซต์เมื่อได้รับน้ำมันหอมระเหยในระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ที่ช่วงเวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี trypan blue dye exclusion assay	39
5	แสดงอัตราการตายของลิมโฟไซต์เมื่อได้รับน้ำมันหอมระเหยในระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ที่ช่วงเวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT reduction assay	42
ภาพผนวกที่		
ข1	การคำนวณหาค่า IC50 จากกราฟ	67

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC	=	American type culture collection
CFU	=	colony forming unit
CRD	=	completely randomized design
DMRT	=	Duncan's new multiple range test
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
FSH	=	follicle stimulating hormone
GnRH	=	gonadotropin releasing hormone
hCG	=	human chorionic gonadotropins hormone
IC50	=	inhibitory concentration 50
Ig	=	immunoglobulin
IL	=	interleukin
LC50	=	lethal concentration 50
MBC	=	minimal bactericidal concentration
MIC	=	minimal inhibitory concentration
MTT assay	=	3-(4, 5-dimethylthiazole-2-yl) – 2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide assay
NK cells	=	natural killer cells
PGF _{2α}	=	prostaglandin F _{2α}
PMN	=	polymorphonuclear neutrophilic leukocytes
SAS	=	statistical analysis system
SEM	=	standard error of mean
TSA	=	tryptic soy agar
TSB	=	tryptic soy broth
TTC	=	2, 3, 5-triphenyltetrazolium chlorid

ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากตะไคร้

(*Cymbopogon citratus* Stapf.)

Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Lemon Grass *Cymbopogon citratus*

Stapf. Extract

คำนำ

การเลี้ยงโคนมในปัจจุบัน มักประสบปัญหาแม่โคนมผสมไม่ติดภายหลังการคลอด ซึ่งทำให้ต้นทุนในการเลี้ยงโคนมสูงขึ้น ปัญหาการผสมไม่ติดอาจเกิดจากหลายสาเหตุ แต่สาเหตุที่มักเป็นปัญหาในฟาร์มเกษตรกรคือ การเกิดมดลูกอักเสบและภาวะเยื่อผนังมดลูกอักเสบ ซึ่งเป็นปัญหาที่แฝงอยู่ในฝูงโค มักเกิดกับโคที่เคยให้ลูกมาแล้ว ปัญหาดังกล่าวเกิดจากการติดเชื้อภายในมดลูกของแม่โคภายหลังการคลอด ทำให้แม่โคไม่เป็นสัดหลังคลอด ผสมไม่ติดเพราะมดลูกไม่พร้อมรับการฝังตัวของคัพภะโดยส่วนใหญ่แม่โคไม่แสดงอาการออกมาให้เห็นอย่างเด่นชัด จึงมักถูกมองข้ามไม่ได้รับการรักษา และเป็นผลให้เกิดอาการที่รุนแรงตามมา ด้วยเหตุนี้จึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดในการรักษาและใช้ล้างมดลูกภายหลังการคลอด แต่พบว่าการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะมีข้อจำกัดและต้องกระทำด้วยความระมัดระวัง การใช้ยาปฏิชีวนะบางชนิดอาจทำให้เกิดการดื้อยาและอาจต้องดองนมหลังการใช้ จึงควรเลือกทำเฉพาะในแม่โคที่มีอาการรุนแรงเท่านั้น

ในปัจจุบันจึงมีการวิจัยและพัฒนาวิธีการรักษาการอักเสบของเยื่อผนังมดลูกหลังคลอดในโค โดยการใช้พืชสมุนไพร ที่มีองค์ประกอบทางเคมีซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดมดลูกอักเสบ ตะไคร้แกง *Cymbopogon citratus* Stapf. เป็นพืชสมุนไพรทางเลือกหนึ่ง ซึ่งหาได้ง่าย และได้มีการศึกษาค้นพบว่ามดลูกอักเสบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ซึ่งน่าจะนำมาใช้เป็นยาเฉพาะที่ ในรูปสารละลายชะล้างมดลูกแม่โคที่พบอาการติดเชื้ออักเสบของมดลูกและเยื่อผนังมดลูกได้ ดังนั้นการนำตะไคร้มาวิจัยเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของมดลูกอักเสบและเยื่อผนังมดลูกอักเสบและการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในครั้งนี้ น่าจะเป็นประโยชน์ และเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาดังกล่าวให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดตะไคร้ที่เหมาะสม สำหรับทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่เป็นสาเหตุของมดลูกอักเสบ (metritis) และเยื่อบุผนังมดลูกอักเสบ (endometritis) ของโคนมในห้องปฏิบัติการ
2. ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดหยาบจากตะไคร้ในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต และฆ่าเชื้อ *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ในห้องปฏิบัติการ
3. ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อเซลล์ภูมิโไฟไซต์ของโคนม ในห้องปฏิบัติการ

การตรวจเอกสาร

1. มดลูกอักเสบ และเยื่อผนังมดลูกอักเสบในโคนม

มดลูกอักเสบ (metritis) และเยื่อผนังมดลูกอักเสบ (endometritis) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความผิดปกติในระบบสืบพันธุ์โคนม (Sheldon *et al.*, 2008) ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น (Drillich *et al.*, 2001) โดยส่วนใหญ่แม่โคนมไม่ว่าคลอดแบบปกติหรือผิดปกติมักมีการติดเชื้อและอักเสบภายในมดลูก ซึ่งพบว่าภายใน 2 สัปดาห์หลังคลอด แม่โคนมเกิดการอักเสบติดเชื้อภายในมดลูกสูงถึง 85-93 เปอร์เซ็นต์ (Studer and Morrow, 1978) และยังคงมีการอักเสบติดเชื้อต่อไปอีก 45-60 วัน ประมาณ 10-25 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 1 (Studer and Morrow, 1978; Sheldon and Dobson, 2004) ทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ของฝูงลดลง โดยสังเกตพบจากค่าสมรรถภาพทางการสืบพันธุ์ (Reproductive performance) ของฝูงมีค่าลดต่ำจากค่าปกติ (Oltenacu *et al.*, 1984)

1.1 การอักเสบของมดลูก (Inflammation of uterus)

Endometritis เป็นการอักเสบของเยื่อผนังมดลูก (Endometrium) พบในโคทั้งที่เคี้ยวท้องมาแล้วและโคสาวในขณะที่อยู่ในระยะ luteal phase ของ estrus cycle เนื่องจากการผสมพันธุ์หรือติดเชื้อที่แพร่มาจากปากช่องคลอด (vulva) และช่องคลอด (vagina) สภาพการอักเสบนี้ไม่รุนแรงนัก แต่มักทำให้ตัวอ่อนตาย (early embryonic death) การแท้ง (abortion) การสะสมหนอง (pus accumulation) (อัจฉริยา, 2547) ในรายที่มีการอักเสบระดับไม่รุนแรง จะมีของเหลว (discharges) เป็นเมือกขุ่นๆ (mucopurulent) ไหลออกมา ในกรณีที่รุนแรงมากขึ้นจะทำให้เนื้อเยื่อของผนังมดลูกตาย การสะสมหนองและเมือก ที่มีสีขาวปนเทา (LeBlanc, 2008)

Metritis เป็นการอักเสบของผนังมดลูก (wall of uterus) เกิดจากการคลอด เช่นการช่วยคลอดเนื่องจากสภาพคลอดยาก (dystocia) เป็นต้น มดลูกกลับคืนสู่สภาพเดิม (uterine involution) ช้ากว่าปกติ มีเนื้อเยื่อตายเนื่องจากการหลุดลอกของรก (placental debris) ทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียตามมา (Sheldon *et al.*, 2006) การอักเสบของผนังมดลูกอาจเนื่องมาจากการอักเสบที่แพร่กระจายมาจากชั้น endometrium (LeBlanc, 2008) หรือมาตามกระแสเลือด (hematogenous spread) เมื่อดูด้วยตาเปล่าจะพบว่าผนังมดลูกมีการคั่งเลือด (congestion) และบวมน้ำ (edema) และมี

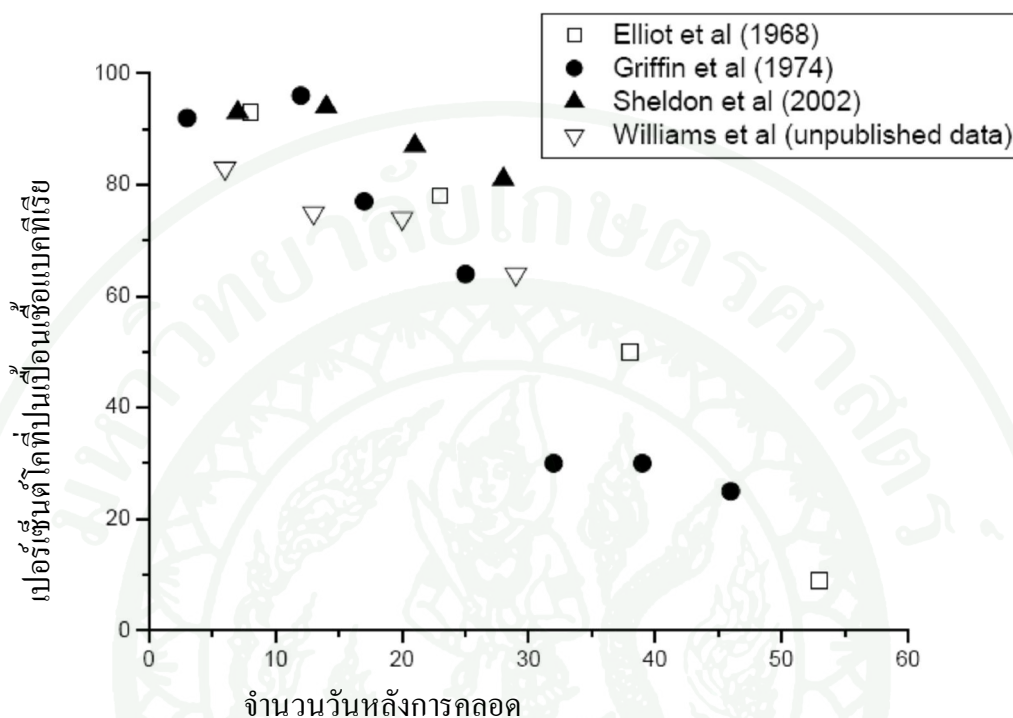
การหลุดลอกของเยื่อชั้นใน (mucosa) เยื่อผนังมดลูกหลุดลอกออกมาร่วมกับรก เนื้อเยื่อและของเหลวต่างๆ ที่ลอกหลุดออกมามีกลิ่นเหม็นคาว จากการอักเสบของผนังมดลูกเป็นสาเหตุทำให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic endometritis) มดลูกเป็นหนอง (pyometra) และการผสมติดต่ำ (low infertility) ตามมา (อัจฉริยา, 2547)

1.2 สาเหตุของโรค

สาเหตุของโรคเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียระหว่างคลอดหรือภายหลังการคลอด เพราะเป็นช่วงที่ปากมดลูกยังไม่ปิด จึงง่ายต่อการติดเชื้อต่างๆ (Foldi *et al.*, 2006) การติดเชื้อมักเกิดจากการจัดการระหว่างคลอด การช่วยคลอดที่ไม่ถูกวิธี หรือการใส่อุปกรณ์ไม่สะอาด เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคนี้อยู่หลายกลุ่ม บางกลุ่มเจริญได้ในภาวะที่มีออกซิเจน บางกลุ่มเจริญได้ในภาวะที่ไร้ออกซิเจน และบางกลุ่มสามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน ได้แก่ *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium perfringens* และ *Porphyromonas levii* เป็นต้น (Drillich *et al.*, 2001) แต่ภาวะเยื่อผนังมดลูกอักเสบรุนแรง จะพบ *A. pyogenes* ปรากฏอยู่เสมอ (Miller *et al.*, 2007) การเกิดรกค้าง คลอดยาก แท้งลูก ลูกตายในท้อง มดลูกทะลัก หรือการขาดสารอาหารต่างๆ ได้แก่ วิตามินอี วิตามินเอ และแร่ธาตุ อาจเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิดการติดเชื้อได้ง่าย (Drillich *et al.*, 2001) นอกจากนี้โรคต่างๆ ได้แก่ บรูเซลโลซิส (Brucellosis) เมลลอยโดซิส (Meliodosis) เลปโตสไปโรซิส (Leptospirosis) แคมไพโลแบคทีเรีย (Campylobacteriosis) และทริโคโมนีเอซิส (Trichomoniasis) อาจก่อให้เกิดภาวะมดลูกอักเสบในโคได้เช่นกัน (ทัศนีย์ และคณะ, 2539)

แบคทีเรียก่อให้เกิดโรคได้ โดยการผลิตชีวพิษ (toxin) ซึ่งก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อตัวให้อาศัย (host) และเกิดการอักเสบขึ้น (สว่าง, 2552) ชีวพิษแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ชีวพิษภายในตัว (endotoxin) ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ เป็นสารประเภทฟอสโฟลิปิด (phospholipid) เมื่อเซลล์แบคทีเรียตาย สารพิษจะถูกปล่อยออกมา มีผลกระทบต่อระบบการไหลเวียนเลือด ทำให้เกิดลิ่มเลือดภายในหลอดเลือด และมีเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ กรณีที่สัตว์ได้รับชีวพิษปริมาณน้อยจะทำให้สัตว์มีไข้และมีเม็ดเลือดขาวสูง ชีวพิษอีกชนิดหนึ่ง คือชีวพิษภายนอกตัว (exotoxin) ซึ่งเป็นผลผลิตจากเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียที่ปล่อยออกมาในขณะที่แบคทีเรียยังมีชีวิตอยู่ มีผลต่อสัตว์คือทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำลายเซลล์ (cytotoxin) และยับยั้งเมแทบอลิซึมของเซลล์ โดยชีวพิษจะ

เข้าไปจับกับตัวรับ (receptor) ที่ผิวเซลล์ก่อนเข้าไปก่อกการสร้างโปรตีนของเซลล์ (จินตนา, 2549; คมกฤษ, 2552)



ภาพที่ 1 สัดส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในมดลูกช่วง 60 วันแรกภายหลังคลอด

ที่มา: Sheldon and Dobson (2004)

1.3 สันฐานวิทยาของแบคทีเรียสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรค

1.3.1 *Arcanobacterium pyogenes* (*A. pyogenes*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน ขนาดสั้น ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เต็มที่เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (Jost and Billington, 2005) โคโลนีมีขนาดเล็ก ผิวโคโลนีแห้ง (เรืองทอง, 2543; Quinn *et al.*, 1994) เชื้ออาศัยอยู่ทั่วไปในเยื่อเมือกหรือสารคัดหลั่ง ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบแบบเรื้อรัง เยื่อบุผนังและมดลูกอักเสบในโค (Carter and Chengappa, 1991) เป็นเชื้อฉวยโอกาส ก่อให้เกิดฝี ปอดอักเสบ ข้อมอักเสบ แท้ง ในสัตว์เคี้ยวเอื้องและสุกร (Nagaraja *et al.*, 1996; Lewis, 1997)

1.3.2 *Escherichia coli* (*E. coli*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน ขนาดสั้น ปลายมน เรียงตัวแบบเดี่ยว เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน (นงลักษณ์ และปรีชา, 2544) ในสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นภาวะเหมาะสมที่สุด โคโลนีของเชื้อนูน และมีกลิ่นเหม็น (เรืองทอง, 2543) เชื้อนี้อาศัยอยู่ในลำไส้และบริเวณเยื่อเมือกของร่างกายคน และสัตว์เลือดอุ่น จัดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น ในสภาวะที่ร่างกายอ่อนแอหรือมีการติดเชื้อจากภายนอกจะทำให้เชื้อ *E. coli* สามารถก่อโรคได้ โดยสร้างเอนไซม์และชีวพิษทั้งชีวพิษในตัวและนอกตัว ทำให้เซลล์ตายและแตก (Sirivasan *et al.*, 2007)

1.3.3 *Staphylococcus* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (grape-like) ไม่เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สามารถสร้าง coagulase ได้ บางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูล และทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) เชื้อหลักที่สำคัญ คือ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน โคโลนีมีสีขาวจนถึงสีเหลืองทอง การติดเชื้อเป็นทั้งแบบที่เป็นสาเหตุแรกของการติดเชื้อ (primary infection) หรือการติดเชื้อแทรกซ้อนภายหลัง (secondary infection) การติดเชื้อก่อให้เกิดทอนซิลอักเสบ ปอดอักเสบ เต้านมอักเสบ มดลูกอักเสบ และข้ออักเสบ (เรืองทอง, 2543; จินตนา, 2549)

1.3.4 *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นท่อน ไม่เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (Nagaraja *et al.*, 2005) พบเชื้อได้ในช่องปาก ทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ และทางเดินระบบสืบพันธุ์ของมนุษย์และสัตว์ (Smith *et al.*, 1991; Nagaraja *et al.*, 2005) การก่อโรคในสัตว์พบว่าทำให้เกิดภาวะท้องเสียในลูกโค ฝืนดับ เต้านมอักเสบ มดลูกอักเสบและเยื่อผนังมดลูกอักเสบในโคนม (Sheldon *et al.*, 2004a) เป็นต้น

1.3.5 *Prevotella* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อหลักของ *Prevotella* sp. ที่ก่อให้เกิดภาวะเยื่อผนังมดลูกอักเสบ คือ *Prevotella melaninogenica* มีรูปร่างเป็นแท่ง สามารถสร้างสารสีดำ (black-pigmenting bacilli; Allison and Hillman, 1997; Kasimanickam *et al.*, 2005) เจริญได้ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน พบเชื้อได้ในช่องปาก ทางเดินอาหาร และทางเดินระบบสืบพันธุ์ของมนุษย์และสัตว์ การติดเชื้อทำให้เกิดการอักเสบในช่องปากและปอด ตลอดจนทางเดิน อาหาร และระบบสืบพันธุ์ภายใน มีผลยับยั้งการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยอาศัย leukocyte inhibitory factor และสร้างสารที่ทำลายให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกในมนุษย์และสัตว์ (Haraldsson *et al.*, 2005)

1.3.6 แบคทีเรียอื่นที่พบหลักฐานว่าสามารถก่อโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบและมดลูกอักเสบ ได้แก่ *Bacillus* sp. และ *Clostridium* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างแบบแท่ง สร้างสปอร์และแคปซูลได้ซึ่งทำให้ทนทานต่อการถูกทำลาย (Sheldon *et al.*, 2002, 2004a, 2004b) *Bacillus* sp.สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วน *Clostridium* sp. เจริญได้ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนเท่านั้น (เรืองทอง, 2543; Noakes *et al.*, 1991; Zerbe *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังพบ *Salmonella* sp. และ *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน ซึ่งเชื้อแต่ละชนิดจะสร้างชีวพิษที่ต่างกัน โดยจะทำลายและสร้างความเสียหายให้กับเซลล์ (Singh *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียชนิดอื่นๆ อีกที่เพาะแยกได้จากมดลูกโค (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การจำแนกประเภทของแบคทีเรียที่เพาะแยกได้จากมดลูกโค

เชื้อสาเหตุของมดลูกอักเสบ	เชื้อก่อโรคเกี่ยวกับมดลูก	เชื้อที่ไม่ก่อโรคเกี่ยวกับมดลูก
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Micrococcus</i> sp.
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Proteus</i> spp.	<i>Peptostreptococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.
	<i>Staphylococcus aureus</i>	coagulase negative
	Non-haemolytic	α -Haemolytic Streptococci
	Streptococci	<i>Streptococcus acidominimus</i>

ที่มา: Williams *et al.* (2007)

1.4 อาการของโรค

โคที่มีภาวะมดลูกอักเสบจะมีไข้ ชีมีของเหลวหรือหนอง มีกลิ่นเหม็นไหลออกมาจากช่องคลอด (ภาพที่ 2) อัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้น กินอาหารน้อยลงและน้ำนมลด (Miller *et al.*, 2007; LeBlanc, 2008) ทำให้มดลูกกลับเข้าอุ้งสำ (Sheldon *et al.*, 2006) ในรายที่ไม่รุนแรงสัตว์จะไม่แสดงอาการผิดปกติจนกระทั่งเมื่อเป็นสัปดาห์แล้วจึงพบว่าน้ำเมือกจากช่องคลอดมีลักษณะข้น

และมีกลิ่นเหม็น (LeBlanc, 2008) โคที่สามารถแสดงอาการเป็นสัปดาห์และตกไข่ได้ แต่สภาพของมดลูกยังไม่พร้อมรับการฝังตัวของตัวอ่อน เป็นสาเหตุทำให้แม่โคผสมไม่ติด กลายเป็นโคที่ผสมซ้ำหลายครั้ง ซึ่งเกษตรกรจะสังเกตเห็นได้ยากและมักถูกมองข้าม ไม่ได้ได้รับการรักษา (Hajurkal *et al.*, 2005) ในรายที่ป่วยรุนแรง จะมีอาการหนาวสั่น ขนลุกชัน ไม่กินอาหาร ไข้สูง ซิพจรเต้นเร็ว เลือดท้อง โคจะตายใน 2-5 วัน เนื่องจากเลือดเป็นพิษ และในรายที่ป่วยเรื้อรังจะมีหนองในมดลูก หนองมีลักษณะข้นขาวหรือสีแดงคล้ำหรือเทาดำไหลออกเป็นครั้งคราว มีกลิ่นเหม็น สังเกตเห็นได้ที่บริเวณโคนหาง ก้น โคนขาหลังจะเปียกและโคจะซุบซอม (Sheldon *et al.*, 2006) สามารถแบ่งอาการตามการแสดงออกและช่วงระยะเวลาการเกิดหลังคลอดได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1.4.1 ชนิดแสดงอาการ (clinical sign) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

1.4.1.1 มดลูกอักเสบหลังคลอด (puerperal metritis) เกิดภายหลังการคลอดประมาณ 10 – 14 วัน อาการที่พบ คือ มีหนองไหลออกมาจากช่องคลอด หนองมีสีน้ำตาลแดง กลิ่นเหม็น มีไข้ เมื่อล้วงคลำผ่านทางทวารหนักจะพบว่าผนังมดลูกหนาขึ้น (Lewis, 1997; Sheldon *et al.*, 2006)

1.4.1.2 เยื่อบุผนังมดลูกอักเสบเรื้อรัง (chronic endometritis) เกิดภายหลังการคลอดประมาณ 21 วัน และมักพบเป็นระยะเวลานาน ในช่วงแรกอาจแสดงอาการไม่ชัดเจน ทำให้สังเกตอาการได้ยาก อาการที่สังเกตได้ชัดในระยะต่อมา คือ มีหนองหรือเมือกปนหนองไหลออกมาจากช่องคลอด และปากมดลูกขยายใหญ่ขึ้น (Sheldon *et al.*, 2006)

1.4.2 ชนิดไม่แสดงอาการ (subclinical sign) เยื่อบุผนังมดลูกอักเสบชนิดไม่แสดงอาการ (subclinical endometritis) ภาวะนี้แฝงอยู่ในฝูงโค และจะไม่แสดงอาการออกมาชัดเจน อาจพบมีไข่ต่ำๆ (Sheldon *et al.*, 2006) โคยังสามารถแสดงอาการเป็นสัปดาห์และตกไข่ได้ แต่สภาพมดลูกไม่พร้อมต่อการฝังตัวของตัวอ่อน จึงทำให้ผสมไม่ติด เยื่อบุผนังมดลูกอักเสบชนิดนี้เป็นปัญหามากที่สุดในฟาร์มของเกษตรกร เนื่องจากยากต่อการสังเกตอาการ ทำให้สัตว์ถูกละเลยในการรักษาอย่างทันท่วงที จนเกิดสภาพการผสมติดยากและผสมซ้ำ (ปราจีน, 2541)



ภาพที่ 2 ลักษณะของเมือกจากช่องคลอดตามระดับคะแนน ระดับ 1. เมือกใสมีหนองสีขาวปนเหลืองเป็นจุดเล็กน้อย ระดับ 2. เมือกมีหนองสีขาวปนเหลืองน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ระดับ 3 เมือกมีหนองสีขาวปนเหลืองมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บางครั้งอาจปนเลือด

ที่มา: Sheldon (2007)

1.5 กลไกในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่คลุกโค

กลไกในการป้องกันการติดเชื้อ เกิดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ที่เคลื่อนตัวมายังบริเวณที่มีการอักเสบ โดยการเหนี่ยวนำทางเคมี (chemotaxis) สิ่งดึงดูดทางเคมีเรียกว่า chemoattractant ซึ่ง chemoattractant แต่ละชนิดจะมีผลในการดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างกัน เพื่อความเหมาะสมในการทำลายเชื้อ หรือสิ่งแปลกปลอมแต่ละชนิดให้มีประสิทธิภาพอย่างเต็มที่ (สว่าง, 2552) นิวโทรฟิล (neutrophils) เป็นเซลล์ป้องกันการอักเสบด่านแรก (first line of defense) ที่มีคุณสมบัติในการเก็บกิน (phagocytosis) ต่อต้านการกระจายตัวของเชื้อจุลินทรีย์ (Singh *et al.*, 2007) สามารถแบ่งตัวได้รวดเร็ว แต่มีอายุค่อนข้างสั้น เมื่อเกิดการสะสมของนิวโทรฟิลจะเกิดหนอง (purulent) เมื่อเวลาผ่านไปโมโนไซต์ (monocyte) ซึ่งเปลี่ยนรูปร่างเป็นมาโครฟาจ (macrophages) จะเข้ามาทำหน้าที่เก็บกิน debris และจุลชีพที่เหลือ (สว่าง, 2552)

หากมีการคงอยู่ของจุลชีพ และก่อให้เกิดการกระตุ้นอยู่ตลอดเวลาจะก่อให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรัง ชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่พบในการอักเสบเรื้อรัง มักเป็นมาโครฟาจ ลิมโฟไซต์ และพลาสมาเซลล์ (plasma cell) มาโครฟาจมีความสามารถในการเก็บกินสูง สามารถแบ่งตัวเพิ่ม แต่ส่วนใหญ่มักเปลี่ยนรูปร่างมาจากโมโนไซต์ในกระแสเลือด ลิมโฟไซต์มักพบกระจายทั่วไปในบริเวณรอยโรคที่มีการอักเสบแบบเรื้อรัง มีความสำคัญที่สุดต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

พลาสมาเซลล์ คือ บี-ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) มีคุณสมบัติในการสร้างภูมิคุ้มกันตามแต่ละชนิดของ lymphokine ที่มากระตุ้น มักพบเมื่อมีการอักเสบไประยะหนึ่งแล้ว (สว่าง, 2552)

กระบวนการตั้งท้องมีอิทธิพลอย่างมากต่อระบบภูมิคุ้มกันภายในมดลูกและประชากรลิมโฟไซต์และมาโครฟาจ ซึ่งมีปริมาณที่แตกต่างกันไปตามระยะเวลาของการตั้งท้อง (Skopets *et al.*, 1992) ในช่วงต้นและช่วงกลางของการตั้งท้อง จำนวนของลิมโฟไซต์และมาโครฟาจในมดลูกจะลดลง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการหลีกเลี่ยงการไม่ยอมรับตัวอ่อน ในช่วงท้ายของการตั้งท้อง ลิมโฟไซต์และมาโครฟาจจะพบได้ใน inter-caruncle ในเยื่อผนังมดลูก แต่ไม่พบใน caruncle ซึ่งเหตุการณ์นี้แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันนั้น มีทั้งแบบเฉพาะที่และจำเพาะต่อบริเวณใกล้กับเนื้อเยื่อของตัวอ่อนหรือสิ่งแปลกปลอม (Wooding, 1992) ในช่วงระยะเวลาใกล้คลอด ระดับของฮอร์โมนคอร์ติซอลที่เพิ่มขึ้น จะนำไปสู่การสลายตัวของเม็ดเลือดขาวและทำให้เกิดภาวะที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดมีจำนวนน้อยกว่าปกติ (Singh *et al.*, 2007) คุณสมบัติในการฆ่าทำลายและ oxidation burst activity ของนิวโทรฟิลจะลดลงในระหว่างที่มีการคลอด (Kim *et al.*, 2005) แต่ในช่วงสัปดาห์แรกภายหลังคลอดนิวโทรฟิลจะเพิ่มขึ้นและจะเคลื่อนตัวไปยังช่องว่างในมดลูกโดยทันที องค์ประกอบอื่นๆ รวมทั้ง ลิมโฟไซต์ อีโอสิโนฟิล มาสเซลล์ และมาโครฟาจ จะมีการเคลื่อนที่และถูกกระตุ้นในมดลูกในช่วงระยะนี้ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากมดลูก (Singh *et al.*, 2007) จากกลไกดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าลิมโฟไซต์ และ antigenpresenting macrophage สามารถแทรกซึมผ่านเยื่อผนังมดลูกได้ ซึ่งมีความสำคัญในการจดจำและเกิดกระบวนการตอบสนองต่างๆ ต่อสิ่งแปลกปลอม รวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคที่เข้าไปในมดลูกด้วย (Leung *et al.*, 2000)

1.6 การตรวจวินิจฉัยโรค

การตรวจวินิจฉัยโรค สามารถทำได้โดยการสังเกตอาการ ร่วมกับการล้วงคลำมดลูกผ่านทางทวารหนักภายหลังการคลอด เพื่อประเมินความหนาของผนังมดลูก และอุณหภูมิภายในมดลูก (ทัสนีย์ และคณะ, 2539) สามารถตรวจสอบอย่างละเอียดได้โดยการนำของเหลวจากช่องคลอดมาตรวจสอบด้วยวิธี uterine swab โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า metrichcek เพื่อประเมินลักษณะของเหลวว่าจัดอยู่ในภาวะใด (Sheldon *et al.*, 2006) หรือเก็บหนองที่ไหลออกจากช่องคลอด หรือตัวอย่างเนื้อเยื่อมดลูก (endometrial biopsy; Singh *et al.*, 1983) มาตรวจสอบอย่างละเอียดในห้องปฏิบัติการ เพื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแล้ววิเคราะห์เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค (Sheldon *et al.*, 2006) แต่วิธีการตรวจสอบเหล่านี้ไม่สามารถปฏิบัติเป็นงานประจำวันได้ เนื่องจากมีขั้นตอนในการ

ตรวจสอบหลายขั้นตอน และต้องทำด้วยความระมัดระวัง เพื่อป้องกันการปนเปื้อน การตรวจ haptoglobin จากระบบเลือดสามารถบ่งชี้ถึงภาวะเยื่อพผนังมดลูกได้ ซึ่ง haptoglobin เป็นโปรตีนที่สังเคราะห์จากตับ เพื่อตอบสนองต่อเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย โดย haptoglobin จะมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในโคที่เป็นมดลูกอักเสบชนิดรุนแรง (Dhaliwal *et al.*, 2001)

1.7 การป้องกันและการรักษา

การป้องกัน โดยการรักษาความสะอาดโรงเรือนรอกคลอด การช่วยเหลือการคลอดที่ถูกสุกลักษณะ ตรวจดูอาการผิดปกติหลังคลอด (Sheldon *et al.*, 2008) การให้สัตว์ได้รับโภชนาที่เพียงพอ รวมไปถึงวิตามินและแร่ธาตุในช่วงเวลาวิกฤติ ซึ่งอาจมีผลทางอ้อมต่อสุขภาพของมดลูก เพื่อลดความเสี่ยงต่อภาวะการฉีกและการอักเสบ

การรักษา เป็นการยากที่จะกำหนดรูปแบบการรักษาประจำในโคหลังคลอด เพราะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรคและความสามารถในการต้านทานโรคของโค ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการใช้ยาปฏิชีวนะรักษาโรคในมดลูกให้ได้ผล เช่น ข้อจำกัดเกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ป่วย และความเข้มข้นของยาในระดับที่ให้ผลในการรักษาในเลือด ในผนังมดลูกและในมดลูก ซึ่งขึ้นอยู่กับวิธีการให้ และชนิดของยา เป็นต้น เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย การรักษาจึงเป็นแบบเฉพาะตัวตามลักษณะอาการของโรค และคำนึงถึงผลสูงสุดในการรักษา(สุวิชัย, 2538)

โดยทั่วไปเกษตรกรนิยมใช้วิธีการล้างมดลูกด้วยยาต้านจุลชีพ ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ (LeBlanc, 2008) เช่น tetracycline (Azawi, 2008), oxytetracycline (Foldi *et al.*, 2006; Azawi, 2008), penicillin (Lewis, 1997), cephalosporin (Dohmen *et al.*, 1995), cefquinime (Amiridis *et al.*, 2003), aminoglycosides (Baron, 2004; Sheldon *et al.*, 2004), gentamicin, spectinomycin sulfonamides, nitrofurazone (Gilbert, 1992) หรือยาฆ่าเชื้อภายนอกแบบเจือจาง ได้แก่ ไอโอดีน และอาจมีการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับน้ำเกลือ (Kumar *et al.*, 2005) ในรายที่มีอาการไม่รุนแรงการให้ยาปฏิชีวนะหรือซัลฟาสดเข้าสู่ช่องคลอดก็เป็นการเพียงพอ แต่ในรายที่มีอาการรุนแรงสัตว์แสดงอาการป่วยร่วมด้วย ควรให้ยาปฏิชีวนะหรือซัลฟาฉีดเข้าเส้นเลือดหรือกล้ามเนื้อพร้อมทั้งสอดยาเข้ามดลูกเพื่อขับหนองออกจากมดลูกด้วย (Sheldon and Dobson, 2004) และได้มีการวิจัยและพัฒนาวิธีการควบคุมรักษามดลูกอักเสบหลังคลอดโดยใช้ฮอร์โมน ได้แก่ การใช้ prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) เพื่อช่วยให้มดลูกเข้าสู่ได้เร็วขึ้น และช่วยขับของเหลวหรือสิ่งแปลกปลอมที่อยู่ภายในออกมา (Paisley *et al.*, 1986) แต่อย่างไรก็ตามการรักษามดลูกอักเสบติดเชื้อภายหลังคลอดโดยการ

ใช้ยาปฏิชีวนะ หรือใช้ฮอร์โมนเพียงอย่างเดียวอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือใช้ร่วมกันทั้ง 2 อย่าง ต้องคำนึงถึงการตกค้างของยาในน้ำนมและปัญหาการดื้อยา การใช้ฮอร์โมนจำเป็นต้องเลือกใช้อย่างระมัดระวัง เพราะอาจมีผลข้างเคียงของฮอร์โมนแต่ละชนิด และยังต้องคำนึงถึงข้อจำกัดต่างๆ ในการเลือกใช้ จึงเป็นสาเหตุที่ต้องมีการศึกษาหาทางเลือกอื่นในการควบคุมป้องกันการติดเชื้อในโคนมโดยใช้สมุนไพร เพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดในการใช้ให้มีผลกระทบต่อผลผลิตน้ำนม และต่อตัวสัตว์น้อยที่สุด

2. ตะไคร้

ตะไคร้ (Lemon grass) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cymbopogon citratus* จัดอยู่ในวงศ์ Gramineae (ศิริเพ็ญ, 2549) มีชื่อท้องถิ่นว่า จะไคร (ภาคเหนือ) ไคร (ภาคใต้) คาหอม (แม่ฮ่องสอน) ตะไคร้มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินโดนีเซีย ศรีลังกา พม่า อินเดีย ไทย และในทวีปอเมริกาใต้ (ยุวดี, 2550) จัดเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยารักษาโรคทางระบบขับเบา ขับเหงื่อ ลดความดันโลหิต และยังมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและรา (Onawunmi, 1987)

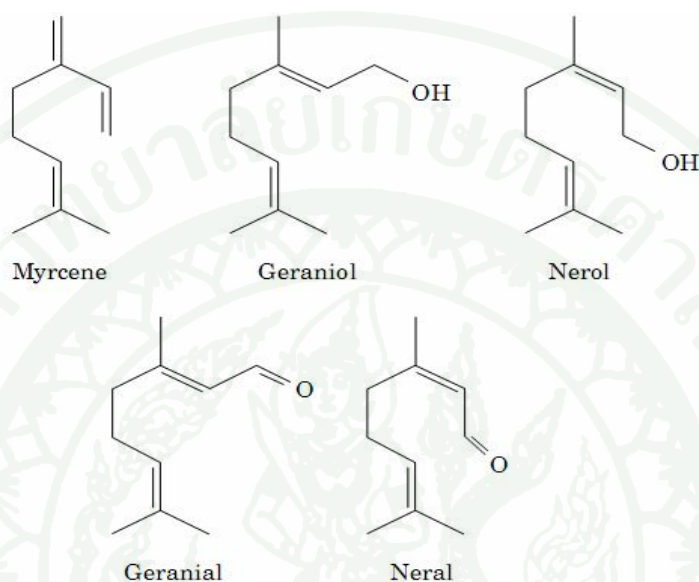
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตะไคร้

ตะไคร้ จัดเป็นพืชล้มลุก มีอายุหลายปี ลักษณะลำต้นขึ้นเป็นกอ รูปทรงกระบอก แข็ง เกลี้ยง สูงได้ถึง 120 เซนติเมตร ตามข้อมีใบปกคลุม สามารถขยายพันธุ์โดยการแตกกอ (นิจิติริ, 2534) ลำต้นใต้ดินเป็นเหง้า มีกลิ่นเฉพาะตัว มีสีขาวนวลหรือสีขาวปนม่วง ใบเป็นใบเดี่ยวคล้ายใบหญ้า รูปขอบขนานแคบ แผ่นใบสากและคม มีสีเขียวแกมเทา ปลายใบค่อนข้างแหลม ตามข้อมีขนเล็กน้อย เมื่อขยี้ใบจะมีกลิ่นฉุน เนื่องจากมีน้ำมันหอมระเหย ดอกขนาดเล็กเป็นช่อกระจาย ช่อดอกย่อยมีก้านออกเป็นคู่ๆ ดอกหนึ่งมีก้าน อีกดอกไม่มีก้าน รากเป็นระบบรากฝอย ปลูกได้ในดินทุกชนิด ยกเว้นดินเหนียว และปลูกได้ในทุกฤดูกาล (รุ่งรัตน์, 2540)

2.2 องค์ประกอบทางเคมีของตะไคร้

ตะไคร้สดหรือแห้งมีน้ำมันหอมระเหย 0.2-0.4 เปอร์เซ็นต์ สารเคมีที่พบอยู่ในส่วนของน้ำมันหอมระเหย น้ำมันนี้จะมีสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอม ปริมาณน้ำมันขึ้นอยู่กับแหล่งที่ปลูก อายุ และส่วนที่นำมาสกัด ส่วนในใบอ่อนมีปริมาณของน้ำมันหอมระเหยมากกว่าใบแก่ องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ citral 70-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมี 2 อนุพันธ์ คือ geranial (α -citral) และ neral (β -citral) และยังพบสารอื่นๆ อีก (อรชร, 2547) ดังแสดงในภาพที่

3 และตารางที่ 2 ส่วนองค์ประกอบที่ไม่ระเหยที่พบในตะไคร้ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ เช่น ลูทีโอลิน (luteolin) และกลัยโคไซด์ โฮโม-โอเรียนติน (homo - orientin) กรดคลอโรจีนิก (chlorogenic acid) กรดคาเฟอิก (caffeic acid) และกรดพาราคูมาริก (p - coumaric acid) เป็นต้น ไทรเทอร์ปีนส์ เช่น ซิมโบโปกอน (cymbopogon) และซิมโบโปโกนอล (cymbopogonol; Hiller *et al*, 1999) เป็นต้น



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ myrcene, geraniol, nerol, geranial และ neral

ที่มา: Lewinsohn *et al*. (1998)

Citral เป็นสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยของตะไคร้ จัดเป็น aliphatic alpha-beta unsaturated aldehyde (บังอร และวันเย็น, 2523) มีคุณสมบัติด้านเชื้อจุลินทรีย์ 5 เท่าของฟีนอล (Gruenwald *et al*., 2000) ใช้เป็นวัตถุดับหรือสารเริ่มต้นในการผลิตไอโอโนน (ionone) และวิตามินเอ ทั้งนี้เพราะ citral ที่พบในน้ำมันหอมระเหยของตะไคร้สามารถเปลี่ยนแปลงเป็น เบต้า-ไอโอโนน (β -ionone) ได้ สารนี้จะนำไปใช้เป็นสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอต่อไป (ปัญญติ, 2549)

อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจะมากหรือน้อยนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ส่วนที่มีน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด คือ ใบ โดยจะมีมากในใบอ่อน แต่ปริมาณ citral จะพบมากในใบแก่ โดยใบอ่อนพบ citral 77-79 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใบแก่พบ 83 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณ citral จะสูงสุดเมื่อดินมีความชื้น 60-80 เปอร์เซ็นต์ (วิไล, 2495)

สภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิต่ำปริมาณน้ำมันหอมระเหยจะลดลง (นันทวัน, 2530) และปริมาณน้ำมันหอมระเหยจะมีมากที่สุดในฤดูแล้ง (บังอร และวันเย็น, 2523)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ *Cymbopogon citratus*

องค์ประกอบทางเคมี	เปอร์เซ็นต์ที่พบ	องค์ประกอบทางเคมี	เปอร์เซ็นต์ที่พบ
geranial	53.6	terpinolene	0.1
neral	36.1	α -terpineol	0.1
caryophyllene oxide	1.2	citronellal	0.1
citronellyl acetate	0.9	geranyl acetate	0.1
β -caryophyllene	0.7	α -humulene	0.1
linalool	0.5	β -bisabolene	0.1
6-methyl-5-hepten-2-one	0.5	myrcene	0.1
isopulegol	0.5	α -phellandrene	0.1
limonene	0.3	(Z)- β -ocimene	0.1
β -elemene	0.3	(E)- β -ocimene	0.1
geraniol	0.2	borneol	0.1
camphor	0.2	terpinen-4-ol	0.1
para-cymene	0.1	citronellol	0.1
		total	96.1

คัดแปลงจาก: อรชร (2547)

2.3 สรรพคุณของตะไคร้

ตะไคร้เป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ได้ทุกส่วนไม่ว่าจะเป็นเหง้า ใบสด รากและต้น เป็นเครื่องเทศที่ใช้ปรุงแต่งกลิ่นและรสอาหาร และมีสรรพคุณทางการรักษาโรค โดยลำต้นมีสรรพคุณช่วยขับลม แก้เบื่ออาหาร แก้โรคทางเดินปัสสาวะและนิ่ว เหง้ามีสรรพคุณใช้ขับปัสสาวะ แก้นิ่ว รักษาเกลื้อน แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ (กระทรวงสาธารณสุข, 2530) ใบสดมีสรรพคุณ ลดความดันโลหิตสูง เป็นยาขับลม แก้ผมแตกปลาย ช่วยให้ลมแบ่งในขณะคลอดลูก แก้เบื่ออาหาร แก้โรคทางเดิน

ปัสสาวะ และรักษานิ้ว (อานันท์, 2540; มนตรี, 2545) รากมีสรรพคุณ แก้จุกเสียดแน่นบริเวณหน้าอก ปวดกระเพาะปัสสาวะ (Pereira *et al.*, 2004)

ในอินเดียใช้ส่วนเหนือดินแห้งของตะไคร้เป็นยาพื้นบ้าน แก้เบื่ออาหาร ลำไส้และท้องอืด ในบราซิลใช้บรรเทาอาการกระวนกระวาย มีไข้ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ใช้เป็นเครื่องเทศ แก้ปวด รักษาอาการผิดปกติของระบบประสาทและระบบทางเดินอาหาร แก้ไข้ แก้อาเจียน แก้ไอ แก้ท้องเสีย และบรรเทาข้ออักเสบรูมาตอยด์ น้ำมันหอมระเหยจากใบใช้ขับลม รักษาอาการท้องอืด ใช้กันยุง แก้ปวดท้อง ในอินเดียใช้แก้ท้องร่วง ทาแก้ข้ออักเสบ ปวดบริเวณเอว เคล็ดขัดยอก กลากเกลื่อนเชื้อราที่เท้า เหา หิด (Hiller *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้รักษาสัตว์ เช่น ใช้ตะไคร้ทุบแล้วดองเกลือให้โค กระบือ กินช่วยรักษาโรคพยาธิใบไม้ในกระเพาะได้ (กรมปศุสัตว์, 2547) และน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ มีฤทธิ์ฆ่าเห็บโค และพยาธิ หมด เป็นต้น (ณรงค์ และคณะ, 2542)

2.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของตะไคร้

หนูที่ได้รับสารสกัดตะไคร้ พบว่ามีการทำงานของเอนไซม์ aminopyrine demethylase เพิ่มขึ้น และทำให้ aflatoxin B1 (AFB1) เปลี่ยนเป็น aflatoxin Q1 (AFQ1) ซึ่งเป็นเมแทบอลิซึมของ AFB 1 ที่มีฤทธิ์ก่อการกลายน้อยลง สารสกัดตะไคร้มีฤทธิ์ยับยั้งการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียที่เหนียวหนาโดยสารก่อมะเร็ง AFB 1 และสามารถป้องกันการเกิดรอยโรคก่อนเกิดมะเร็งที่ได้รับสารก่อมะเร็ง Azoxymethane (AOM) ในลำไส้หนูขาว (Lomsri., 1993) นอกจากนี้เมื่อทดสอบสารสกัดตะไคร้ด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายในการทดสอบกับเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA98 และ TA100 (Vinitketkumnuen *et al.*, 1994)

การศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อเชื้อแบคทีเรียโดยการสกัดด้วยวิธี steam extraction พบว่า α -citral และ β -citral สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Onawunmi *et al.* 1987) สารเคมีในน้ำมันหอมระเหย คือ citral, citronellol, geraneol และ cineole มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ได้แก่ เชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียได้ (Cimanga *et al.*, 2002) สารเคมีที่ออกฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ คือ menthol, cineole, camphor และ linalool จึงลดอาการแน่นจุกเสียด และมีสารช่วยในการขับน้ำดีเพื่อช่วยย่อย คือ borneol, fenchone และ cineole (Evans *et al.*, 1978) การศึกษาความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วยวิธี agar disc diffusion พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E.coli*, *S. aureus* (Wannissorn *et al.*,

2005) *Citrobacter diversus*, *Klebsiella oxytoca* K. *pneumonia*, *Proteus vulgaris* และ *Salmonella typhimurium* ได้ (Cimanga et al., 2002)

นอกจากนี้จากการทดสอบการหาค่า MIC โดย Sacchetti et al., (2005) ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ อีก ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 48274, *Rhodotorula glutinis* ATCC 16740, *Yarrowia lypolitica* ATCC 16617 *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 60232 และ *Saccharomyces cerevisiae*, ATCC 2365 โดยให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *Candida albicans* ATCC 48274, *Rhodotorula glutinis* ATCC 16740 และ *Yarrowia lypolitica* ATCC เท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ค่า MIC ต่อ *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 60232 และ *Saccharomyces cerevisiae* เท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากงานวิจัยของ Wannissorn et al., (2005) ซึ่งได้ทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* 0157 โดยวิธี disc diffusion assay พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ โดยมี Inhibition zone เท่ากับ 16 มิลลิเมตร และจากงานวิจัยของ Cimanga et al., (2002) ที่ได้ทำการทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris* และ *S. aureus* ที่เพาะแยกได้จากมดลูก พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้โดย *Bacillus subtilis* มี Inhibition zone เท่ากับ 13 มิลลิเมตร ส่วน *E. coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris* และ *S. Aureus* มี Inhibition zone เท่ากับ 15 มิลลิเมตร

citral และ myrcene สามารถต้านเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Epidermophyton floccosum* และ *Microsporum gypseum* ที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังเช่น กลากเกลื้อนได้ด้วยวิธี Agar dilution (บัณฑิตย์ และคณะ, 2530) สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่แยกจากยุงนางข้าวสาร ให้ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งและฆ่าเชื้อราเท่ากับ 0.6 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Paranagama et al., 2003) ในการทดสอบความสามารถด้านยีสต์ พบว่าสารสกัดตะไคร้ด้วยเอทานอล และน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ความเข้มข้น 40 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถต้านยีสต์ *Candida albicans* ได้ (บัณฑิตย์ และคณะ, 2530)

2.5 การทดสอบความเป็นพิษของตะไคร้

จากการให้น้ำมันหอมระเหยเข้าทางกระเพาะอาหารกระต่าย พบว่ามีค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) มากกว่า 5 กรัมต่อกิโลกรัม เมื่อป้อนสารสกัดใบด้วยแอลกอฮอล์และน้ำ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ขนาด 460 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้ากระเพาะอาหารหนูถีบจักร พบว่าก่อให้เกิดพิษ แต่สารสกัดใบด้วยน้ำ ขนาด 20-40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อให้ทางปากไม่พบพิษ ไม่เป็นพิษต่อตัวอ่อน และไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวของหนูขาว (Para *et al.*, 2001) และจากการทดลองของ Manosroi *et al.*, (2006) ซึ่งทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อ murine leukemia (P388) โดยวิธี MTT assay พบว่าให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0746 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

การป้อนยาของตะไคร้ให้หนูขาวในขนาด 20 เท่าของขนาดที่ใช้ในคนเป็นเวลา 2 เดือน ไม่พบความเป็นพิษ (Souza *et al.*, 1986) การศึกษาพิษเฉียบพลันของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ขนาด 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เป็นเวลา 60 วัน พบว่าหนูขาวกลุ่มที่ได้รับตะไคร้ โตเร็วกว่ากลุ่มควบคุม และค่าเคมีเลือดไม่เปลี่ยนแปลง (Mishra *et al.*, 1992) มีผู้ทดสอบพิษของชาที่เตรียมจากตะไคร้พบว่า เมื่อให้อาสาสมัครสุขภาพดีรับประทานชาตะไคร้ 1 ครั้ง หรือรับประทานวันละครั้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในเลือดและปัสสาวะ มีบางรายเท่านั้นที่ปริมาณบิลิรูบิน และ amylase เพิ่มขึ้นเล็กน้อย จึงนับว่าปลอดภัย (Leite *et al.*, 1986)

3. การตรวจสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นวิธีการที่ใช้เซลล์ทดสอบกับสาร แล้ววัดความมีชีวิต เพื่อประเมินหาความเป็นพิษต่อเซลล์ ปัจจุบันเซลล์สัตว์เป็นแบบจำลองที่เริ่มใช้มากขึ้นในสัตว์ทดลอง ทำให้การประเมินความเป็นพิษของสารทำได้รวดเร็วและประหยัดมากกว่าใช้สัตว์ทดลอง การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงยังเอื้อประโยชน์ต่อการเก็บตัวอย่างได้สม่ำเสมอ และให้ผลทดลองเหมือนเดิมได้เมื่อทำซ้ำ สามารถควบคุมสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าในสัตว์ทดลอง เนื่องจากในสัตว์ทดลองมีระบบหมุนเวียนระบบขับถ่ายกำจัดสารพิษหรือสารทดสอบ จึงทำให้การควบคุมปัจจัยที่ศึกษาทำได้ยาก (กัลยาณี และนวนอนงค์, 2550)

3.1 วิธีทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์

เป็นการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์โดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) และเซลล์ที่ตาย (dead cell) หรือทดสอบจากการทำงานของไมโทคอนเดรีย และคำนวณเซลล์ที่มีชีวิตเป็นเปอร์เซ็นต์ของความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) วิธีที่นิยมทดสอบ คือ Trypan blue dye exclusion assay และ MTT reduction assay

3.1.1 Trypan blue dye exclusion assay เป็นการจำแนกเซลล์มีชีวิตและไม่มีชีวิตด้วยการย้อมสี เซลล์ที่ตายเยื่อหุ้มเซลล์จะแตกออกทำให้สีผ่านเข้าไปดูซับโปรตีนในเซลล์และติดสี เซลล์ที่มีชีวิตและสุขภาพดีจะมีลักษณะกลม ไม่ติดสี สีที่นิยมใช้คือ trypan blue ซึ่งเป็น acid azo dye ที่มีความสามารถในการติดสีเซลล์สัตว์ เซลล์ที่ตายจะดูดซับสีปรากฏเป็นสีฟ้า สามารถนับจำนวนเซลล์ตายและเซลล์มีชีวิตด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ hemocytometer (Emgard *et al.*, 2002) ซึ่งภายหลังจากการย้อมสีแล้วควรนับทันที เพราะเซลล์อาจแตกก่อนหรือเกาะกลุ่ม ทำให้ผลการนับผิดพลาด และควรนับเซลล์ให้เสร็จภายใน 3-5 นาที หากใช้เวลาในการนับนานเกินไป ก็ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์ตายเพิ่มมากขึ้นด้วย (กัลยาณี, 2548) และเมื่อนำมาคำนวณค่าความมีชีวิตของเซลล์ เทียบกับเซลล์ทั้งหมดเป็นเปอร์เซ็นต์ จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ ที่เป็นผลมาจากสารทดสอบได้ (กัลยาณี และนวนอนงค์, 2550)

3.1.2 MTT reduction assay เป็นการทดสอบการทำงานของเซลล์จากความสามารถของไมโทคอนเดรียในการรีดักชันสาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตและมีการทำงานของไมโทคอนเดรียปกติ เอนไซม์ dehydrogenase และ cofactor ในไมโทคอนเดรียจะรีดิวซ์ MTT ให้กลายเป็น formazan (Abe and Saito, 1999) การทดสอบทำได้โดยละลาย MTT ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์แล้วเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ นำสารละลาย MTT ไปบ่มในเซลล์ที่ต้องการทดสอบ เซลล์ที่ไมโทคอนเดรียทำงานปกติจะรีดิวซ์ MTT ให้เป็น formazan (Mosmann, 1983; Hamid *et al.*, 2004; Aziz *et al.*, 2005) การตรวจวัดต้องละลาย formazan crystal ในตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ dimethyl sulfoxide (DMSO) ได้สารละลายสีม่วง น้ำเงินและสามารถตรวจหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตได้โดยใช้ microplate reader ที่ความยาวคลื่นที่ 570 นาโนเมตร (วีระ, 2546)

3.2 เซลล์ลิมโฟไซต์

ลิมโฟไซต์ เป็นเซลล์ส่วนใหญ่ที่พบในกระแสเลือดของโค มีค่าเฉลี่ย 58 เปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาว (ตารางที่3) มีขนาด 8-10 ไมโครเมตร รูปร่างกลม มีนิวเคลียสกลมใหญ่ ประกอบด้วย heterochromatin อัดกันแน่น มี cytoplasm บางๆ อยู่รอบนิวเคลียส ซึ่งประกอบด้วย mitochondria, ribosome และ lysosome อยู่กระจัดกระจาย (สุรนนท์, 2539) ลิมโฟไซต์ต่างจากเม็ดเลือดขาวชนิดอื่นตรงที่เมื่อออกจากกระแสเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อแล้วจะมีการกลับสู่กระแสเลือดอีก (recirculate) ในสัตว์ทุกชนิดส่วนใหญ่ของลิมโฟไซต์ในกระแสเลือดเป็น ที-ลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte) ซึ่งเป็น memory cell ส่วนบี-ลิมโฟไซต์จะออกสู่กระแสเลือดบ้าง แต่ส่วนใหญ่จะอยู่ในเนื้อเยื่อน้ำเหลือง ลิมโฟไซต์มีหน้าที่สร้างแอนติบอดี สร้าง lymphokine และทำหน้าที่ cytotoxicity (เจลิยว, 2548)

ในสัตว์แต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันทั้งจำนวนเม็ดเลือดขาวและอัตราส่วนของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด เช่น ในคน สุนัข แมว มีจำนวนนิวโทรฟิลมากกว่าเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น ในม้าจำนวนนิวโทรฟิลมากกว่าลิมโฟไซต์เพียงเล็กน้อย ในขณะที่สัตว์เคี้ยวเอื้องมีจำนวนลิมโฟไซต์มากกว่านิวโทรฟิล เป็นต้น (ตารางที่ 4) (เจลิยว, 2548)

ตารางที่ 3 ค่าเม็ดเลือดขาวในโค

	จำนวนเม็ดเลือดขาวต่อไมโครลิตร		เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาว	
	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย
Leukocyte	4,000-12,000	8000	(-)	(-)
Neutrophil (band)	0-120	20	0-2	0.5
Neutrophil (segmenter)	600-4,000	2,000	15-45	28.0
Lymphocyte	2,500-7,500	4,500	45-75	58.0
Monocyte	25-850	400	2-7	4.0
Eosinophil	0-2,400	700	0-20	9.5
Basophil	0-200	50	0-2	0.5

ที่มา: เจลิยว (2548)

ตารางที่ 4 อัตราส่วนนิวโทรฟิลต่อลิมโฟไซต์ในสัตว์เลี้ยงชนิดต่างๆ

ชนิด	นิวโทรฟิล : ลิมโฟไซต์ (โดยประมาณ)
สุนัข	70 : 20
แมว	59 : 20
โค	28 : 58
แกะ	30 : 62
ม้า	53 : 39
สุกร	37 : 53

ที่มา: เกลียว (2548)

การวิจัยนี้มุ่งศึกษาผลการใช้สารสกัดตะไคร้ในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำมาปรับใช้เป็นสารละลายชะล้างมดลูกแม่โคที่พบอาการติดเชื้ออักเสบของเยื่อผนังมดลูกหลังคลอด ตามคุณสมบัติขององค์ประกอบทางเคมีที่พบอยู่ในสารสกัดตะไคร้ เช่น ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสาเหตุมดลูกอักเสบ และเพื่อให้มีความปลอดภัยต่อตัวโคในการนำไปใช้จริงในฟาร์มเกษตรกร จึงทำการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบของมดลูก

จากการศึกษาจึงได้เลือกลิมโฟไซต์เป็นเซลล์ที่นำมาทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดตะไคร้ เนื่องจากพบว่าลิมโฟไซต์เป็นเซลล์หลักของระบบภูมิคุ้มกัน และเป็นเซลล์ที่ก่อให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อสิ่งต่างๆ หลากหลาย (ไพศาล, 2548) หากสารสกัดที่นำมาใช้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์ ก็จะมีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันของสัตว์ และการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ นอกจากนี้ในกระบวนการอักเสบของมดลูกชนิดเรื้อรัง (chronic inflammation) ยังพบลิมโฟไซต์กระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณรอยโรค และมีความสำคัญที่สุดในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน การรับรู้ต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย และเป็นเซลล์ที่ตอบสนองต่อแอนติเจนอย่างจำเพาะ (สว่าง, 2552) จากที่ได้กล่าวข้างต้นการเลือกเซลล์ลิมโฟไซต์มาทดสอบความเป็นพิษ จึงสอดคล้องกับเป้าหมายที่จะนำไปใช้ภายในฟาร์มเกษตรกร เพราะส่วนใหญ่แม่โคภายหลังการคลอด จะพบว่าการอักเสบของมดลูกชนิดเรื้อรัง มักไม่แสดงอาการให้เห็นเด่นชัด และมักถูกมองข้ามไม่ได้รับการรักษา การใช้สารสกัดตะไคร้เพื่อต้องการควบคุมจำนวนเชื้อไม่ให้สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ เพื่อให้ภูมิคุ้มกันของตัวแม่โคได้ฟื้นคืนและกำจัดเชื้อได้เอง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตะไคร้

ตะไคร้แกงหรือตะไคร้บ้าน (*Cymbopogon citratus* Stapf.) สดทั้งต้น เลือกใช้เฉพาะส่วนลำต้นถึงส่วนใบ

2. เครื่องมือในการสกัด

- 2.1 ชุดกลั่นแบบ condenser
- 2.2 เครื่องอบแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze dryer)
- 2.3 เครื่องอบแห้ง (Hot air oven)

3. แบคทีเรียทดสอบ

- 3.1. *Arcanobacterium pyogenes* ATCC 8104
- 3.2. *Escherichia coli* ATCC 25922
- 3.3. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 4.1 Brain heart infusion Soy Agar (BHIA; Difco, USA)
- 4.2 Brain heart infusion broth (BHIB; Difco, USA)
- 4.3 Tryptic Soy Agar (TSA; Difco, USA)
- 4.4 Tryptic Soy Broth (TSB; Difco, USA)

5. สารเคมีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ และประสิทธิภาพของสารสกัดต่อแบคทีเรีย

- 5.1 barium chloride (BaCl_2 ; Prolabo, USA)
- 5.2 sulfuric acid (H_2SO_4 ; Merck, Germany)
- 5.3 sodium chloride (NaCl ; Oxoid, England)
- 5.4 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)
- 5.5 dimethyl sulfoxide (DMSO; Merck, Germany)
- 5.6 defibrinated sheep blood
- 5.7 ยาปฏิชีวนะ tetracycline hydrochloride (Sigma-Aldrich, England)
- 5.8 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

6. วัสดุอุปกรณ์สำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์ และประสิทธิภาพของสารสกัดต่อแบคทีเรีย

- 6.1 ตู้ปราศจากเชื้อแบบ Laminar Flow Class II
- 6.2 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 6.3 Autoclave
- 6.4 Vortex mixer
- 6.5 Anaerobic jar (Vacu-Quik Jar, Almore International, Inc., USA)
- 6.6 Autopipette (Labmate High Tech Lab, Poland) ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- 6.7 Tip พร้อมกล่อง (CLP Neptune, USA) ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- 6.8 96 microwell (Corning Incorporated, Costa3599, USA)
- 6.9 Gas pack (Becton, Dickinson and Company, USA)
- 6.10 จานเพาะเชื้อ (petri dish; Pyrex, USA) ขนาด 90 x 15 มิลลิเมตร
- 6.11 กระบอกฉีดยา (Nipro disposable syringe; Japan)
- 6.12 กระดาษกรอง ขนาด 0.22 ไมโครเมตร (cellulose acetate filter; Sartorius, Germany)
- 6.13 หลอดทดลองพร้อมฝาเกลียว ขนาด 16 x 160 มิลลิเมตร
- 6.14 stainless test tube rack ขนาด 5 x 10 ช่อง
- 6.15 หัวเข็มเชื้อ (loop)

7. สารเคมีที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อลิมโฟไซต์ของโคนม

- 7.1 RPMI 1640 (GibcoBRL, USA)
- 7.2 Activated fetal bovine serum (Soral, Brazil)
- 7.3 Phytohemagglutinin (PHA; Biological Industries, Isreal)
- 7.4 Antibiotic-Antimycotic (Pen-Strep; Biological Industries, Isreal)
- 7.5 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Gibco, USA)
- 7.6 Dimethyl sulfoxide (DMSO; Merck, Germany)
- 7.7 Ficoll (GE Healthcare, Sweden)
- 7.8 MTT powder
- 7.9 Trypan blue dye

8. วัสดุอุปกรณ์สำหรับใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อลิมโฟไซต์ของโคนม

- 8.1 ตู้ปราศจากเชื้อแบบ Laminar Flow (Microflow Peroxide Class II; England)
- 8.2 ตู้บ่มเชื้อแบบ CO₂ incubator (Forma Scientific, Canada)
- 8.3 Centrifuge (Hettich Universal 32R; England)
- 8.4 Autoclave
- 8.5 96 microwell plate (Corning Incorporated, Costa3599, USA)
- 8.6 Autopipette (Labmate High Tech Lab, Poland) ขนาด 20, 100 และ 200 ไมโครลิตร
- 8.7 Tip พร้อมกล่อง ขนาด 20 และ 200 ไมโครลิตร
- 8.8 Hemocytometer
- 8.9 Pasteur pipette
- 8.10 Pipette ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 8.11 กระบอกฉีดยา (Nipro disposable syringe; Japan)
- 8.12 ขวดเลี้ยงเซลล์พร้อมจุก

วิธีการ

1. วิธีการเตรียมสารสกัดจากตะไคร้ เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

1.1 การสกัดตะไคร้ด้วยวิธีการสกัดด้วยวิธี Sonication ร่วมกับ Freeze dryer

1.1.1 การเตรียมตะไคร้

นำตะไคร้สดมาล้างให้สะอาดแล้วผึ่งให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นขนาด 0.5 ถึง 1.0 เซนติเมตร อบให้แห้งด้วยตู้อบความชื้นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน นำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (blender) เก็บใส่ถุงพลาสติกปิดให้มิดชิดเพื่อป้องกันความชื้น ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาสกัด

1.1.2 ขั้นตอนการสกัด

ชั่งผงตะไคร้แห้งปริมาณ 50 กรัม ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนตะไคร้ผงต่อสารละลาย เท่ากับ 1 ต่อ 5 นำเข้าเครื่อง sonication ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที เพื่อช่วยในการสกัด กรองเอาส่วนของเหลวออกจากกากด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรองหมายเลข 1 (Whatman no.1) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนกากที่เหลือนำมาสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเดิมอีก 1 ครั้ง นำสารสกัดทั้งหมดมารวมกัน นำไปประเหยแห้งโดยใช้เครื่อง freeze dryer (Savant SuperModulyo and LABCONCO Stoppering Tray Dryer)

1.2 การสกัดน้ำมันหอมระเหยตะไคร้โดยการกลั่นด้วยไอน้ำ

1.2.1 การเตรียมตะไคร้

นำตะไคร้สดทั้งต้นมาล้างทำความสะอาด แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด ใส่ภาชนะปิดให้มิดชิดเพื่อป้องกันการระเหยของสารประกอบอินทรีย์ที่อยู่ในตะไคร้

1.2.2 ขั้นตอนการสกัดน้ำมันหอมระเหย

ซังตะไคร้สดที่บดแล้วใส่ใน flask กันกลม โดยมีตะไคร้สด 200 กรัม เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนต่อตะไคร้ เท่ากับ 1 ต่อ 3 นำ flask วางบนเตาให้ความร้อน ซึ่งต่ออยู่กับเครื่องควบแน่น ส่วนปลายของเครื่องควบแน่นนี้จะมี flask เพื่อรองรับน้ำมันหอมระเหยและน้ำ ที่ผ่านมาจากเครื่องควบแน่น เปิดน้ำให้ไหลผ่านคอนเดนเซอร์โดยให้น้ำเข้าทางที่ต่ำแล้วไหลออกทางที่สูง ให้ความร้อนแก่ตัวทำละลายไปเรื่อยๆ จนกระทั่งอัตราการกลั่นคงที่ คือได้สารที่กลั่นประมาณ 2-3 หยด ต่อวินาที ให้สารที่กลั่นได้นี้ไหลลงในภาชนะรองรับ การกลั่นต้องดำเนินต่อไปจนกระทั่งเหลือสารอยู่ใน flask กลั่นเพียงเล็กน้อยอย่ากลั่นให้แห้ง นำสารสกัดที่ได้จากการกลั่น มาใส่ในกรวยแยก โดยธรรมชาติ น้ำและน้ำมันจะไม่รวมตัวกัน หลังจากปล่อยให้ส่วนคั่นของน้ำมันหอมระเหยจะลอยอยู่ชั้นบน ไขเอาส่วนของน้ำที่อยู่ชั้นล่างออกให้หมด จะได้ส่วนของน้ำมันหอมระเหย

1.3 การบันทึกข้อมูล

ตรวจสอบลักษณะ สี และกลิ่นของสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวทำละลาย บันทึกน้ำหนักตะไคร้สดและภายหลังการอบแห้ง เพื่อหาเปอร์เซ็นต์วัตถุดิบแห้ง และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้จากการสกัด (extract yield; Phrompittayarat *et al.*, 2007) จากสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{Extract yield (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้}}{\text{น้ำหนักตะไคร้เริ่มต้น}} \times 100$$

2. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimal inhibitory concentration, MIC) ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Broth Microdilution test

2.1 การเตรียมเชื้อ (Bauer *et al.*, 1966)

2.1.1 นำเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ คือ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 6538P จาก stock เชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ทำให้เชื้อกระจายในอาหารโดยใช้ vortex mixer นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ถึง 24 ชั่วโมง

2.1.2 นำเชื้อ *A. pyogenes* ATCC 8104 จาก stock เชื้อ มาเลี้ยงใน BHIB ที่ผสม 5% defibrinated sheep blood นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิเดียวกับข้อ 1 ในสภาวะ anaerobic condition นาน 48 ถึง 72 ชั่วโมง

2.1.3 เมื่อครบระยะเวลาบ่มแล้ว นำห้วงเชื้อเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* 1 loop มา streak บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ส่วนเชื้อ *A. pyogenes* streak บนอาหาร BHIA ที่ผสม defibrinated sheep blood 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่สภาวะและระยะเวลาเดิม

2.1.4 นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *A. pyogenes* ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB และ BHIB อีกครั้ง บ่มที่สภาวะและระยะเวลาเดิม

2.1.5 นำเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบทั้งหมดมาปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลาย McFarland no. 0.5 โดยใช้สารละลายนอร์มัลซาล์นปลอดเชื้อ (sterile sodium chloride 0.85 เปอร์เซ็นต์) จะทำให้ได้เชื้อประมาณ 1.5×10^8 colony forming unit (CFU) ต่อมิลลิลิตร (Bauer *et al.*, 1966)

2.2 การเตรียมสารละลายของน้ำมันหอมระเหย

เตรียมน้ำมันหอมระเหยในความเข้มข้นต่างๆ โดยละลายในตัวทำละลายที่มี DMSO 10 เปอร์เซ็นต์ และ Tween80 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางแบบ two-fold dilution ให้ได้ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.781, 0.391, 0.195, 0.098 และ 0.049 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.3 วิธีการหา MIC ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้

2.3.1 ทำการทดสอบใน 96 microwell plate โดยในแต่ละหลุม ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB สำหรับ *E. coli* และ *S. aureus* อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHIB สำหรับ *A. pyogenes* ปริมาณ 90 ไมโครลิตร สารละลายของน้ำมันหอมระเหยที่เจือจางแล้วปริมาณ 100 ไมโครลิตร สารละลาย TTC 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 5 ไมโครลิตร และสารละลายเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 5 ไมโครลิตร จะได้ปริมาณทั้งหมดในหลุม 200 ไมโครลิตร ทดสอบความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ

2.3.2 ให้แถว A เป็นแถว control โดยไม่ต้องใส่สารละลายเชื้อแบคทีเรีย ให้ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 95 ไมโครลิตรแทน

2.3.3 ชุดควบคุมทางลบ (negative control) ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 190 ไมโครลิตรแทนสารละลายน้ำมันหอมระเหย

2.3.4 ชุดควบคุมทางบวก (positive control) เติมนยาปฏิชีวนะ tetracycline hydrochloride 10 ความเข้มข้นๆ ละ 100 ไมโครลิตรแทนสารละลายน้ำมันหอมระเหย

2.3.5 นำ 96 microwell plate ของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *A. pyogenes* บ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน ในสภาวะ anaerobic condition นาน 48 ถึง 72 ชั่วโมง

2.3.6 เมื่อบ่มเชื้อจนครบระยะเวลาแล้ว ให้สังเกตหลุมที่ไม่มีการเปลี่ยนสีของ TTC จากไม่มีสีเป็นสีชมพูแดง หลุมสุดท้ายที่ไม่เปลี่ยนสีคือหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ให้บันทึกเป็นค่า MIC

2.3.7 หาค่า MBC โดยการใส่ micropipette คูณสารละลาย 100 ไมโครลิตร ในหลุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญทุกหลุม นำไป pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้น TSA สำหรับเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *A. pyogenes* นำไป pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้น BHIA บ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน ในสภาวะ anaerobic condition นาน 48 ถึง 72 ชั่วโมง

2.3.8 เมื่อบ่มจนครบระยะเวลาแล้ว ให้สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อให้บันทึกเป็นค่า MBC

2.4 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB และ BHIB ใน 96 microwell plate ภายหลังการบ่มเพาะเชื้อเป็นค่า MIC และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่

ไม่พบการเจริญของเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA และ BHIA ภายหลังจากบ่มเพาะเชื้อเป็น MBC

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติวิจัย ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

วิเคราะห์ค่าสถิติเชิงพรรณนา (ค่าเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์ของข้อมูล) ของระดับความเข้มข้นของสารสกัดในรูปน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 ชนิด

3. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากตะไคร้ต่อลิมโฟไซต์ของโคนม

3.1 การเตรียมลิมโฟไซต์

เคลือบกระบอกฉีดยาด้วยเฮพาริน (heparin) เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว แล้วเจาะเลือดโคปริมาณ 10 มิลลิลิตร แยกลิมโฟไซต์ โดยใช้ Ficoll มีขั้นตอนดังนี้

3.1.1 นำเลือดโคปริมาณ 2 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย HBS 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน นำมาใส่หลอดทดลองที่มี Ficoll ปริมาณ 3 มิลลิลิตร

3.1.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 400xg นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส

3.1.3 เลือดที่ปั่นเหวี่ยงแล้วจะแยกเป็นชั้นๆ คือชั้นของ HBS ผสมกับพลาสมา ชั้นลิมโฟไซต์ ชั้น Ficoll และชั้นเม็ดเลือดแดง จากชั้นบนถึงชั้นล่าง ตามลำดับ แยกลิมโฟไซต์ โดยใช้ pasture pipette ดูดชั้นพลาสมาทิ้งไป จากนั้นดูดเฉพาะส่วนของลิมโฟไซต์ นำไปใส่หลอดทดลองที่มีสารละลาย HBS ปริมาณ 6 มิลลิลิตร

3.1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 100xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส

3.1.5 หลังจากปั่นเหวี่ยงแล้ว ส่วนของเม็ดเลือดขาวจะตกตะกอนอยู่บริเวณก้นหลอดทดลอง คุณสารละลาย HBS ที่อยู่ส่วนบนทิ้งไป แล้วล้างเซลล์โดยการเติม HBS ปริมาณ 6 มิลลิลิตรอีกครั้ง

3.1.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 100xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส เพื่อล้างเซลล์อีกครั้ง

3.1.7 หลังจากปั่นเหวี่ยงแล้ว คุณสารละลาย HBS ที่อยู่ส่วนบนทิ้งไป ให้เหลือเฉพาะส่วนของลิมโฟไซต์ เพื่อใช้ในการเลี้ยงเซลล์ต่อไป

3.2 การเลี้ยงลิมโฟไซต์

3.2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย RPMI 1640, fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ PHA 2 เปอร์เซ็นต์ และ Antibiotic-Antimycotic 1 เปอร์เซ็นต์

3.2.2 นำลิมโฟไซต์ที่ได้จากการแยกด้วย Ficoll ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์บรรจุอยู่ 5 มิลลิลิตร ขวดละ 0.5 มิลลิลิตร

3.2.3. นำไปบ่มใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง

3.2.4 นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวหลังจากบ่มนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ เจือจางลิมโฟไซต์ให้มีจำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Manosroi *et al.*, 2003)

3.2.5 นำเซลล์ที่เจือจางแล้วใส่ในภาชนะเพาะเลี้ยงชนิด 96 microwell plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง (Verma *et al.*, 2010)

3.3 การหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) โดยวิธี Trypan blue dye exclusion assay

3.3.1 เจือจางน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ด้วย Tween 80 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ให้ได้ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เพื่อหาช่วงของความเข้มข้นที่เป็นพิษ (IC_{50})

3.3.2 นำน้ำมันหอมระเหยที่เจือจางแล้ว และกรองด้วยแผ่นกรองขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร ใส่ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 microwell plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตรแทนสารสกัดเป็นกลุ่มควบคุม

3.3.3 นับจำนวนเซลล์ทั้งหมดและเซลล์ตายทุกระดับความเข้มข้นที่ 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ Hemocytometer เจือจางเซลล์ด้วยสี trypan blue ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ที่ตายจะติดสีฟ้าอ่อนของ trypan blue คำนวณเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ตาย ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

3.4 การหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) โดยวิธี MTT reduction assay

3.4.1 เจือจางสารสกัดจากตะไคร้ในระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

3.4.2 นำน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่เจือจางแล้ว และกรองด้วยแผ่นกรองขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร ใส่ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 microwell plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตรแทนสารสกัดเป็นกลุ่มควบคุม ทำการทดลองระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

3.4.3 ตรวจวิเคราะห์ทุกระดับความเข้มข้น โดยวิธี MTT assay ที่ 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก และใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 100 ไมโครลิตร เติม MTT reagent 10 ไมโครลิตร ปิดภาชนะเพาะเลี้ยงด้วยอะลูมิเนียมฟลอยด์ เพื่อป้องกันแสงสว่าง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ นาน 4 ชั่วโมง (Hamid *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2009)

3.4.4 เมื่อครบ 4 ชั่วโมง จะเกิดผลิตภัณฑ์สีม่วงของ formazan ที่กั้นภาชนะเพาะเลี้ยง จากนั้นดูดสารละลายด้านบนทิ้ง โดยระวังไม่ให้ผลิตภัณฑ์สีม่วงฟุ้งกระจายหรือติดออกไป (Fischer *et al.*, 2009)

3.4.5 เติมสารละลาย DMSO 150 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลิตภัณฑ์สีม่วงของ formazan จนหมด จะได้สารละลายสีม่วงอ่อน (Hamid *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2010)

3.4.6 นำภาชนะเพาะเลี้ยงไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 และ 640 นาโนเมตร (Manosroi *et al.*, 2003; Verma, 2010) ด้วยเครื่อง microplate reader อ่านค่าจากโปรแกรม Gen5

3.5 การบันทึกผล

1. บันทึกจำนวนเซลล์ตาย จำนวนเซลล์มีชีวิต และจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับด้วยกล้องจุลทรรศน์โดย hemocytometer จากวิธี Trypan blue dye exclusion assay

2. บันทึกค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร จากโปรแกรม Gen5 ที่อ่านได้จากเครื่อง microplate reader

3.6 การวิเคราะห์ผล

1. นับจำนวนเซลล์เพื่อคำนวณค่าเฉลี่ยของเซลล์เริ่มต้น ในหน่วยเซลล์ต่อมิลลิลิตร

$$\text{จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} \times 10^4 \times \text{ค่าการเจือจาง}}{4}$$

จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของลิมโฟไซต์ โดยมีสูตรดังนี้ (กัลยาณี และนวลอนงค์, 2550)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ตาย}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Analysis of variance และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยชุดคำสั่งในโปรแกรม

สำเร็จรูป SAS (SAS, 2003) และคำนวณค่า Inhibition Concentration (IC_{50}) ด้วยสมการ linear regression โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5

2. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ที่อ่านได้จากโปรแกรม Gen5 มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของลิมโฟไซต์ โดยมีสูตรดังนี้ (Prayong *et al.*, 2008)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดลอง} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม}}$$

วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Analysis of variance และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยชุดคำสั่งในโปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 2003) ซึ่งมีหุ่นจำลองทางสถิติ ดังนี้

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}, \quad i = 1, 2, \dots, a$$

$$j = 1, 2, \dots, r$$

เมื่อ Y_{ij} = ค่าสังเกตจากทรีทเมนต์ที่ i ซ้ำที่ j ($j = 1, 2, 3$ และ 4)

μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมดของสิ่งตัวอย่าง

τ_i = อิทธิพลเนื่องจากชนิดของตัวทำละลาย

ε_{ij} = ค่าความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง $\sim NID(0, \sigma^2)$

จากนั้นคำนวณค่า Inhibition Concentration (IC_{50}) ด้วยสมการ linear regression โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5

ระยะเวลาในการทดลอง

เดือนพฤศจิกายน 2551 ถึงมกราคม 2553 รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 14 เดือน

สถานที่ทำการทดลอง

1. ศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และทดสอบเกี่ยวกับจุลชีววิทยาทำการทดลองที่ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ทำที่ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ผลและวิจารณ์

1. การเตรียมสารสกัดตะไคร้

จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างตะไคร้สดที่นำมาศึกษามีเปอร์เซ็นต์วัตถุดิบแห้ง 22.48 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดตะไคร้จากการสกัดด้วยวิธี Sonication ร่วมกับ Freeze dryer พบลักษณะของสารสกัดเป็นสารข้นเหนียว มีสีน้ำตาลเข้มและมีกลิ่นหอมฉุนเล็กน้อย ส่วนวิธีการสกัดด้วยไอน้ำ พบลักษณะของสารสกัดในรูปของเหลว มีสีเหลืองอ่อน และมีกลิ่นหอมฉุนของน้ำมันหอมระเหย

เปอร์เซ็นต์การผลิตที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี Sonication ร่วมกับ Freeze dryer พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การผลิตเท่ากับ 17.71 ± 2.10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดที่ได้จากวิธีสกัดด้วยไอน้ำพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การผลิตเท่ากับ 4.38 ± 0.47 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ลักษณะ สี กลิ่น และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้จากการสกัด ของสารสกัดจากตะไคร้

วิธีการสกัด	ลักษณะ สี กลิ่น	เปอร์เซ็นต์การผลิต
สกัดด้วย Sonication ร่วมกับ Freeze dryer	สารข้นเหนียว สีน้ำตาลเข้ม กลิ่นหอมฉุน	17.71 ± 2.10
สกัดด้วยไอน้ำ (Steam distillation)	ของเหลว สีเหลือง กลิ่นหอมฉุน	4.38 ± 0.47

การเตรียมสารสกัดด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน ทำให้ได้สารสกัดออกมาในรูปแบบที่ต่างกัน คือการสกัดด้วยวิธี Sonication ร่วมกับ Freeze dryer ทำให้ได้สารสกัดในรูปของสารสกัดหยาบ ส่วนวิธีการสกัดด้วยไอน้ำ ทำให้ได้สารสกัดออกมาในรูปของน้ำมันหอมระเหย

จากวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน แม้ว่าจะใช้ตัวทำละลายน้ำ ซึ่งเป็นตัวทำละลายชนิดมีขั้วที่เหมือนกันทั้ง 2 วิธี แต่ก็ยังส่งผลต่อปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีที่อยู่ในสารสกัดด้วย การสกัดด้วยวิธี Sonication ร่วมกับ Freeze dryer ตะไคร้ที่ใช้ในการสกัดต้องผ่านการอบแห้งเสียก่อน จึงอาจสูญเสียองค์ประกอบทางเคมีบางชนิดที่อยู่ในรูปของน้ำมันหอมระเหยออกไป อีกทั้งวิธีนี้ไม่ได้ใช้

ความร้อนและความดันในการสกัด องค์ประกอบทางเคมีบางชนิดจึงไม่ถูกสกัดออกมา ส่วนวิธีการสกัดด้วยไอน้ำ การสกัดโดยวิธีนี้ใช้ความร้อนและความดันในการสกัดสารออกมา ดังนั้นจึงอาจทำให้องค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีนี้มากกว่าการสกัดด้วยวิธี Sonication ร่วมกับ Freeze dryer และการสกัดโดยวิธีนี้เป็นแบบระบบปิดทั้งหมด ดังนั้นโอกาสที่จะเกิดการสูญเสียองค์ประกอบทางเคมีจึงมีน้อย ส่งผลให้น้ำมันหอมระเหยที่ได้มีองค์ประกอบทางเคมีในสัดส่วนที่มากกว่าสารสกัดในรูปแบบของสารสกัดหยาบ

ส่วนของสารสกัดที่ได้มีความแตกต่างกัน เนื่องจากในกระบวนการอบแห้งตะไคร้เกิดปฏิกิริยาของฟีนอลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือ polyphenol oxidase (PPO) ทำให้เมื่อถูกสกัดด้วยตัวทำละลายจึงละลายออกมาในสารสกัดด้วย (รุ่งรัตน์, 2540) ส่วนในน้ำมันหอมระเหยมีองค์ประกอบของตะไคร้ที่เป็นส่วนของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีสีเหลือง น้ำตาลอ่อน หรือเหลืองปนน้ำตาลอ่อน เป็นต้น (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2541)

2. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimal inhibitory concentration, MIC) ของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. pyogenes*, *E. coli* และ *S. aureus* โดยวิธี Broth Microdilution test

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Micro dilution method เพื่อหาค่า MIC พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ดีว่าสารสกัดหยาบ โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่าสารสกัดหยาบ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *A. pyogenes* และ *E. coli* เท่ากับ 1.5625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 0.7813 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบจากตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้เช่นกัน แต่ต้องใช้ในระดับความเข้มข้นสูง ซึ่งสารสกัดหยาบจากตะไคร้ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *A. pyogenes*, *E. coli*, *S. aureus* เท่ากับ 62.5, 125 และ 15.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงผลการหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อเชื้อ
Arcanobacterium pyogenes, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

ระดับความเข้มข้น	การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย					
	<i>A.pyogenes</i>		<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>	
	Cr	Eo	Cr	Eo	Cr	Eo
1/2	-	-	-	-	-	-
1/4	-	-	-	-	-	-
1/8	-	-	+	-	-	-
1/16	+	-	+	-	-	-
1/32	+	-	+	-	-	-
1/64	+	-	+	-	+	-
1/128	+	-	+	-	+	-
1/256	+	+	+	+	+	-
1/512	+	+	+	+	+	+
1/1024	+	+	+	+	+	+
-ve	+	+	+	+	+	+
+ve	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: กำหนดให้ Eo = น้ำมันหอมระเหย Cr = สารสกัดหยาบ

+ = มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้น (อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นหรือเปลี่ยนเป็นสีแดง)

- = ไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้น (อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่นหรือไม่เปลี่ยนสี)

- ve control คือ สารละลาย 5 % ของ Tween 80® และสารละลาย 10 % ของ DMSO

+ ve control คือ tetracycline

ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย คือ

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ คือ

1/2 = 100 µg/ml 1/64 = 3.1250 µg/ml 1/2 = 250 µg/ml 1/64 = 7.8125 µg/ml

1/4 = 50 µg/ml 1/128 = 1.5625 µg/ml 1/4 = 125 µg/ml 1/128 = 3.9062 µg/ml

1/8 = 25.5 µg/ml 1/256 = 0.7813 µg/ml 1/8 = 62.5 µg/ml 1/256 = 1.9531 µg/ml

1/16 = 12.5 µg/ml 1/512 = 0.3906 µg/ml 1/16 = 31.25 µg/ml 1/512 = 0.9766 µg/ml

1/32 = 6.25 µg/ml 1/1024 = 0.1953 µg/ml 1/32 = 15.625 µg/ml 1/1024 = 0.4883 µg/ml

เมื่อทำการทดสอบหาค่า MBC ของน้ำมันหอมระเหยพบว่าค่า MBC ต่อเชื้อ *A. pyogenes*, *E. coli*, *S. aureus* เท่ากับ 3.1250, 6.25 และ 1.5625 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ ส่วนค่า MBC ของสารสกัดหยาบจากตะไคร้พบว่า ค่า MBC ต่อเชื้อ *A. pyogenes* และ *E. coli* เท่ากับ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ดังแสดงในตารางที่ 7

ผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่าน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่าสารสกัดหยาบ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับความเข้มข้นต่ำ จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารเคมีสำคัญที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจะอยู่ในรูปของน้ำมันหอมระเหยในสัดส่วนที่มากกว่าในรูปสารสกัดหยาบ ซึ่งสอดคล้องกับ จิตกร (2552) ที่ได้ทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุบางชนิดของมดลูกอักเสบและเยื่อผนังมดลูกอักเสบในโคนม ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* และ *A. pyogenes* โดยวิธี broth dilution และ agar disc diffusion ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบจากตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 6 ชนิดได้ แต่ต้องใช้ในระดับความเข้มข้นสูง ซึ่งมีหน่วยเป็นหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิตร

ส่วนน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับ Tzortzakis (2007) และ Onawunmi (1987) ที่รายงานว่าองค์ประกอบทางเคมีที่อยู่ในน้ำมันหอมระเหย คือ citronellol, myrcene และ citral ซึ่งมี 2 อนุพันธ์ คือ neral และ geranial เป็นองค์ประกอบทางเคมีสำคัญที่อยู่ในรูปของน้ำมันหอมระเหย มีฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิดได้ และจากงานวิจัยของ Moleyar and Narasimham (1992) ซึ่งทำการทดลองแยกองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหย เช่น citral, geranial, citronellol เป็นต้น เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp. และ *Enterobacter* sp. โดยใช้องค์ประกอบทางเคมีจากน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี citral และ geranial เป็นส่วนประกอบในความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp. และ *Enterobacter* sp. ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี citronellol เป็นส่วนประกอบในความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp. และ *Enterobacter* sp. จะเห็นว่าองค์ประกอบที่อยู่ในน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับความเข้มข้นต่ำ จึงสรุปได้ว่าองค์ประกอบทาง

เคมีสำคัญที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย จะอยู่ในรูปของน้ำมันหอมระเหยมากกว่าอยู่ในรูปของสารสกัดหยาบ นอกจากนี้ Viana *et al.* (1999) และ Figueirinha *et al.* (2008) ยังพบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่อยู่ในรูปน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสาร ประเภท flavonoid สามารถด้านการอักเสบได้

ผลจากการทดลองนี้ จึงเลือกน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มาทดสอบความเป็นพิษต่อลิมโฟไซต์ของโคนมในการทดลองที่ 3 ถึงแม้ว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี Sonication ร่วมกับ Freeze dryer จะให้ปริมาณของสารสกัดมากกว่า แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียต่ำกว่าน้ำมันหอมระเหย ซึ่งสารสกัดหยาบต้องใช้ในระดับความเข้มข้นสูงกว่าน้ำมันหอมระเหย 3 ถึง 5 เท่า จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ ส่วนน้ำมันหอมระเหยใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำก็สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยจึงมีประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดหยาบ

ตารางที่ 7 แสดงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อเชื้อ *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

รูปแบบของสารสกัด	<i>A. pyogenes</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
สารสกัดหยาบ ($\mu\text{g/ml}$)	62.5	125	125	125	15.625	62.5
น้ำมันหอมระเหย ($\mu\text{g/ml}$)	1.5625	3.1250	1.5625	6.25	0.7813	1.5625

3. การทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อลิมโฟไซต์ของโคนม

3.1 การทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อลิมโฟไซต์ของโคนมโดยวิธี Trypan blue dye exclusion assay

จากการหาเปอร์เซ็นต์การตายของลิมโฟไซต์โดยการย้อมสี Trypan blue เพื่อบันทึกจำนวนเซลล์ตายของลิมโฟไซต์ เมื่อได้รับน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10

และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร นาน 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 อัตราการตายของลิมโฟไซต์โคนมจากการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี Trypan blue dye exclusion assay

ความเข้มข้นของ น้ำมันหอมระเหย ($\mu\text{l/ml}$)	อัตราการตายของลิมโฟไซต์ (เปอร์เซ็นต์)			
	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
control	23.53 ± 1.97^d	25.00 ± 1.47^c	25.80 ± 1.06^d	28.13 ± 4.43^d
0.1	33.33 ± 2.09^c	41.67 ± 0.98^b	42.86 ± 1.66^c	47.19 ± 3.82^c
1	38.88 ± 2.01^b	43.63 ± 2.02^b	44.44 ± 2.34^c	$52.48 \pm 8.25^{b,c}$
10	43.75 ± 2.02^a	45.00 ± 2.22^b	50.00 ± 3.54^b	$61.57 \pm 9.66^{a,b}$
100	45.53 ± 1.50^a	50.25 ± 4.44^a	62.19 ± 4.59^a	72.38 ± 8.57^a

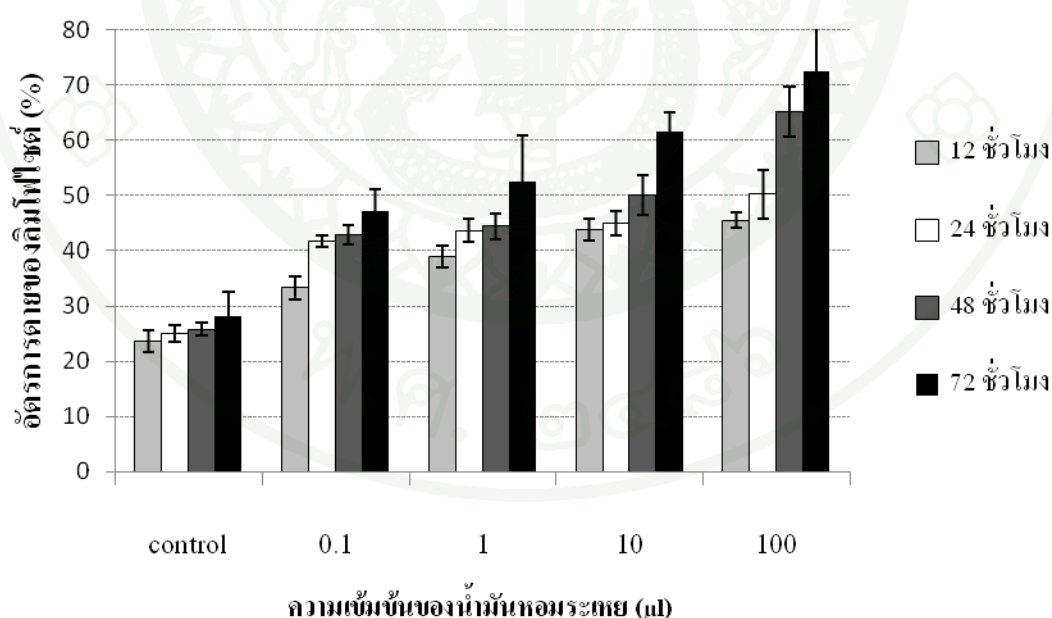
หมายเหตุ a,b,c,d ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ standard deviation)

3.1.1 ช่วงเวลา 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร อัตราการตายของลิมโฟไซต์เพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยมีอัตราการตายเฉลี่ย 33.33 ± 2.09 , 38.88 ± 2.01 และ 43.75 ± 2.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนอัตราการตายของลิมโฟไซต์ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรเพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ซึ่งลิมโฟไซต์ที่มีอัตราการตายเฉลี่ยสูงสุดคือลิมโฟไซต์ที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร โดยมีอัตราการตายของลิมโฟไซต์ 45.53 ± 1.50 เปอร์เซ็นต์

3.1.2 ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นที่ 0.1, 1 และ 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ลิมโฟไซต์มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) โดยมีอัตราการตายของลิมโฟไซต์เฉลี่ย 41.67 ± 0.98 , 43.63 ± 2.02 และ 45.00 ± 2.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ลิมโฟไซต์มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยมีอัตราการตายสูงสุดอยู่ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ซึ่งอัตราการตายของลิมโฟไซต์เท่ากับ 50.25 ± 4.44 เปอร์เซ็นต์

3.1.3 ช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นที่ 0.1 และ 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร ลิมโฟไซต์มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) โดยมีอัตราการตายเฉลี่ย 42.86 ± 1.66 และ 44.44 ± 2.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร ลิมโฟไซต์มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยมีอัตราการตายเฉลี่ย 44.44 ± 2.34 , 50.00 ± 3.54 และ 62.19 ± 4.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีอัตราการตายสูงสุดอยู่ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร

3.1.4 ช่วงเวลา 72 ชั่วโมง ความเข้มข้นที่ 0.1 และ 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร ลิมโฟไซต์มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) โดยมีอัตราการตายเฉลี่ย 47.19 ± 3.82 และ 52.48 ± 8.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นที่ 1 และ 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร ลิมโฟไซต์มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) เช่นกัน โดยมีอัตราการตายเฉลี่ย 52.48 ± 8.25 และ 61.57 ± 9.66 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นที่ 10 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร ลิมโฟไซต์มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) เช่นเดียวกัน โดยมีอัตราการตายสูงสุดอยู่ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร ซึ่งอัตราการตายของลิมโฟไซต์เท่ากับ 72.38 ± 8.57 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4 อัตราการตายของลิมโฟไซต์เมื่อได้รับน้ำมันหอมระเหยในระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร ที่ช่วงเวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี Trypan blue dye exclusion assay

จากผลการทดลองจึงบ่งชี้ได้ว่าลิโมนโฟไซด์มีอัตราการตายมากขึ้น เมื่อได้รับน้ำมันหอมระเหยในระดับความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกันทุกช่วงความเข้มข้นและทุกช่วงเวลาทั้ง 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 4)

3.2 การทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อลิโมนโฟไซด์ของโคนมโดยวิธี MTT reduction assay

จากการหาเปอร์เซ็นต์การตายของลิโมนโฟไซด์โดยวิธี MTT reduction assay เมื่อได้รับน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร นาน 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองได้แสดงดังในตารางที่ 9

3.2.1 ช่วงเวลา 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นที่ 0.1, 1 และ 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ลิโมนโฟไซด์มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) โดยมีอัตราการตายของลิโมนโฟไซด์เฉลี่ย 19.31 ± 6.13 , 26.53 ± 9.56 และ 27.58 ± 2.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ลิโมนโฟไซด์มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 27.58 ± 2.15 และ 40.67 ± 6.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีอัตราการตายสูงสุดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 9 อัตราการตายของลิโมนโฟไซด์โคนมจากการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี MTT reduction assay

ความเข้มข้นของ น้ำมันหอมระเหย ($\mu\text{l/ml}$)	อัตราการตายของลิโมนโฟไซด์ (เปอร์เซ็นต์)			
	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
0.1	19.31 ± 6.13^b	28.02 ± 8.30^b	39.64 ± 14.72^b	46.07 ± 1.86^b
1	26.53 ± 9.56^b	28.78 ± 2.16^b	40.02 ± 12.26^b	47.81 ± 8.39^b
10	27.58 ± 2.15^b	33.90 ± 3.42^b	$52.78 \pm 5.04^{a,b}$	56.36 ± 7.14^b
100	40.67 ± 6.11^a	50.92 ± 1.83^a	62.21 ± 2.02^a	68.60 ± 6.54^a

หมายเหตุ a,b,c,d ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ standard deviation)

3.2.2 ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นที่ 0.1, 1 และ 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ลิโปโซมมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) โดยอัตราการตายของลิโปโซมเฉลี่ย 28.02 ± 8.30 , 28.78 ± 2.16 และ 33.90 ± 3.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ลิโปโซมมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) โดยอัตราการตายสูงสุดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ซึ่งอัตราการตายของลิโปโซมเท่ากับ 50.92 ± 1.83 เปอร์เซ็นต์

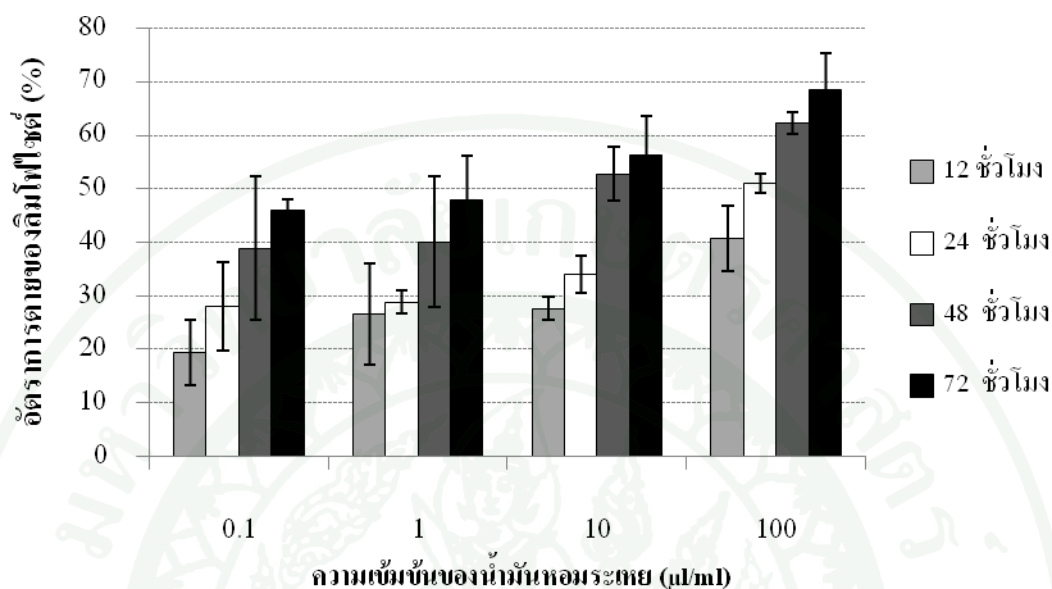
3.2.3 ช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นที่ 0.1, 1 และ 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ลิโปโซมมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) โดยอัตราการตายของลิโปโซมเฉลี่ย 39.64 ± 14.72 , 40.02 ± 12.26 และ 52.78 ± 5.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ลิโปโซมมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) โดยอัตราการตายสูงสุดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ซึ่งอัตราการตายของลิโปโซมเท่ากับ 62.21 ± 2.02 เปอร์เซ็นต์

3.2.4 ช่วงเวลา 72 ชั่วโมง ความเข้มข้นที่ 0.1, 1 และ 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ลิโปโซมมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) โดยอัตราการตายของลิโปโซมเฉลี่ย 46.07 ± 1.86 , 47.81 ± 8.39 และ 56.36 ± 7.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ลิโปโซมมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยอัตราการตายสูงสุดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ซึ่งอัตราการตายของลิโปโซมเท่ากับ 68.60 ± 6.54 เปอร์เซ็นต์

ผลจากการทดลอง ด้วยวิธี MTT reduction assay จึงบ่งชี้ได้ว่าลิโปโซมมีอัตราการตายมากขึ้น เมื่อได้รับน้ำมันหอมระเหยในระดับความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกันทุกช่วงความเข้มข้นและทุกช่วงเวลาทั้ง 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 5) เช่นเดียวกับวิธีการทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยต่อลิโปโซมด้วยวิธี Trypan blue dye exclusion assay

จากการทดลองหาค่าความเป็นพิษต่อลิโปโซมพบว่าวิธีการย้อมสี Trypan blue ในกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายเกิดขึ้นด้วย ปัจจัยที่ทำให้เกิดการตายในกลุ่มควบคุม อาจมีหลายปัจจัย เช่น การตายของเซลล์เนื่องจากการปรับตัวของเซลล์ต่อสภาพแวดล้อมหรืออาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญของเซลล์ จะเห็นว่าในช่วง 12 ถึง 24 ชั่วโมง ในกลุ่มควบคุมมีการเพิ่มอัตราการตายน้อยกว่าในช่วง 48 ถึง 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นไปตามการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงเนื่องจากในช่วง 12 ถึง 24 ชั่วโมง การเจริญเติบโตของเซลล์ยังอยู่ในระยะ log phase และ stationary phase อัตราการตายของ

เซลล์จะน้อยกว่าในช่วง 48 ถึง 72 ชั่วโมง ที่อยู่ระยะ decline phase ซึ่งมักเกิดจากการขาดอาหารและ
 อีกหลายปัจจัย (กัลยาณี และนวนอนงค์, 2550)



ภาพที่ 5 อัตราการตายของลิมโฟไซต์เมื่อได้รับน้ำมันหอมระเหยในระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ที่ช่วงเวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT reduction assay

จากการทดลองทั้ง 2 วิธี พบว่าอัตราการตายของลิมโฟไซต์ให้ผลสัมพันธ์กัน คือ ลิมโฟไซต์มีอัตราการเพิ่มขึ้น เมื่อได้รับน้ำมันหอมระเหยในระดับความเข้มข้นสูงขึ้น โดยในช่วงเข้มข้น 0.1 และ 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร อัตราการตายของลิมโฟไซต์ในทุกช่วงเวลาของการทดลองทั้ง 2 วิธี มีอัตราเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่ในระดับความเข้มข้นสูง คือ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร พบอัตราการตายของลิมโฟไซต์สูงมาก ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณสารที่ก่อให้เกิดพิษที่อยู่ในน้ำมันหอมระเหยมีสัดส่วนที่มากขึ้นด้วย เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารที่ก่อให้เกิดพิษในระดับความเข้มข้นสูง จึงทำให้เซลล์มีอัตราการตายสูงขึ้น

แม้ผลที่ได้จากการทดลองทั้ง 2 วิธี จะมีความสัมพันธ์กัน แต่อัตราการตายของลิมโฟไซต์ที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยในความเข้มข้นเดียวกัน และบ่มไว้ในช่วงเวลาเท่ากัน มีอัตราการตายของลิมโฟไซต์ไม่เท่ากัน เนื่องจากทั้ง 2 วิธีมีหลักการในการทดสอบไม่เหมือนกัน วิธี Trypan blue dye exclusion assay เป็นวิธีการนับจำนวนเซลล์ตายที่ติดสีของ Trypan blue ได้โดยตรง

ใช้ตรวจสอบการเป็นเนื้อเดียวกัน (integrity) ของเซลล์เมมเบรน ซึ่งเซลล์มีชีวิตสามารถป้องกันไม่ให้สีเข้าไปภายในเซลล์ เซลล์ตายจึงติดสีฟ้าของ Trypan blue วิธีนี้อาจทำให้การประเมินผิดพลาดได้ เนื่องจากอาจมีการทำลาย ที่ทำให้เซลล์ตายเกิดขึ้นภายหลังจากการตรวจว่ามีชีวิตแล้ว (กัลยาณี และนวลอนงค์, 2550) หรืออาจมีจำนวนเซลล์ตายเพิ่มมากขึ้น ภายหลังจากการย้อมสี เนื่องจาก Trypan blue มีความเป็นพิษต่อเซลล์สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ หรือไปทำให้วงจรของเซลล์ชะงัก (Kwok, 2004) หากใช้เวลาในการนับนานเกินไป ก็ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์ตายเพิ่มมากขึ้นด้วย (กัลยาณี, 2548) ส่วนการทดสอบโดยวิธี MTT assay ใช้หลักการความมีชีวิตของเซลล์ในการประเมิน โดยการทำงานของ mitochondrial succinic dehydrogenases ในการรีดักชันสาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ให้กลายเป็นสารประกอบสีม่วงของ formazan สัดส่วนของเซลล์มีชีวิต จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้น (Hamid *et al.*, 2004) ดังนั้นจึงไม่มีความคลาดเคลื่อนจากผู้สังเกตในการทดลอง (Pieters *et al.*, 1989) ผลที่ได้จึงมีความแม่นยำสูงกว่าวิธี Trypan blue dye exclusion assay

จากการทดสอบความเป็นพิษทั้ง 2 วิธี สามารถนำอัตราการตายของลิโฟไซต์ในแต่ละช่วงเวลา มาหาค่า Inhibition Concentration 50 (IC_{50}) โดยสร้างกราฟเส้นตรงระหว่างค่า $\log_{10}$ ของความเข้มข้นของสาร (แกน x) กับ %Lethality (แกน y) คำนวณค่า IC_{50} โดยแทนค่า $y = 50$ ลงในสมการกราฟเส้นตรง จะหาได้ค่า x และ antilog x จะเป็นค่า IC_{50} ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ค่า Inhibition Concentration 50 (IC_{50}) ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ โดยวิธีการทดสอบ Trypan blue dye exclusion assay และ MTT reduction assay

วิธีการทดสอบความเป็นพิษ	ค่า IC_{50} ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อลิโฟไซต์โคนม			
	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72
Trypan blue dye exclusion assay	16.77	9.87	1.68	1.63
MTT reduction assay	44.24	11.94	1.99	1.13

ค่า IC_{50} ที่ได้จากการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี Trypan blue dye exclusion assay ที่เวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 16.77, 9.87, 1.68 และ 1.63 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT reduction assay ให้ค่า IC_{50} ที่เวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 44.24, 11.94, 1.99 และ 1.13 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองเบื้องต้นจึงควรเลือกใช้ค่า IC_{50} ที่ได้จากวิธี MTT reduction assay ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลการทดลองแม่นยำกว่าวิธี Trypan blue dye exclusion assay และจากการทดสอบการหาค่า MIC และค่า IC_{50} จึงทำให้สามารถคำนวณปริมาณความเข้มข้นที่สามารถนำไปใช้กับสัตว์ได้อย่างปลอดภัย โดยคำนวณหาค่าประมาณ 3 เท่าของค่า MIC เนื่องจากในการนำไปใช้ต้องคำนึงถึงพื้นที่ภายในมดลูกที่สารเข้าสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียซึ่งอาจมีของเหลวที่อยู่ภายในมดลูกทำให้ความเข้มข้นของสารสักระหว่างการขับถ่ายและการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแต่ละระดับความเข้มข้นที่นำไปใช้ก็ไม่ควรก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อลิพโซโซม โดยระดับความเข้มข้นที่ใช้ไม่ควรเกินค่า IC_{50} ของเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งความเข้มข้นที่สามารถนำไปใช้ได้คือ 4.68 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นที่นำไปใช้จริงจากการคำนวณที่ได้นั้นต่ำกว่าค่า IC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง ดังนั้นจึงไม่เป็นอันตรายต่อลิพโซโซมที่แทรกอยู่ตามเนื้อเยื่อมดลูก ลิพโซโซมเหล่านี้จึงสามารถทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อการอักเสบต่อไปได้ และถึงแม้ว่าภายหลังการใช้สารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ไล่แมลงแล้วปากมดลูกปิด แต่มดลูกก็ยังสามารถขับของเหลวซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอมรวมทั้งสารละลายน้ำมันหอมระเหยออกได้ ดังนั้นระดับความเข้มข้นที่คำนวณได้นี้สามารถนำไปใช้กับสัตว์โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของมดลูกอักเสบและเชื่อมมดลูกอักเสบทั้ง 3 ชนิดและไม่เป็นพิษต่อลิพโซโซม

ผลจากการทดลองนี้จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถให้ข้อมูลเบื้องต้นในระดับเซลล์ได้ ซึ่งสารที่จะนำมาใช้เป็นยาจำเป็นต้องมีข้อมูลความปลอดภัยก่อนนำมาใช้ โดยเฉพาะระดับความเข้มข้นที่ร่างกายยอมรับได้ หรือระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์

สรุป

จากการศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดตะไคร้ วิธี Sonication ร่วมกับ Freeze dryer ทำให้ได้สารสกัดออกมาในรูปสารสกัดหยาบ ส่วนวิธี Steam distillation ทำให้ได้สารสกัดออกมาในรูปน้ำมันหอมระเหย ผลจากการทดสอบการหาค่า MIC พบว่าน้ำมันหอมระเหยโดยให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *A. pyogenes* และ *E. coli* เท่ากับ 1.5625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 0.7813 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *A. pyogenes*, *E. coli*, *S. aureus* เท่ากับ 62.5, 125 และ 15.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลจากการทดสอบจึงสรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ขณะที่สารสกัดหยาบต้องใช้ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า ดังนั้นจึงควรเลือกน้ำมันหอมระเหยเพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด

ส่วนผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ลิโพไซต์พบว่า วิธี Trypan blue dye exclusion assay ให้ค่า IC_{50} ที่เวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 16.77, 9.87, 1.68 และ 1.63 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT reduction assay ให้ค่า IC_{50} ที่เวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 44.24, 11.94, 1.99 และ 1.13 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากวิธีการทดสอบที่แตกต่างกันจึงทำให้ได้ค่า IC_{50} ไม่เท่ากัน จึงเลือกใช้ค่า IC_{50} จากวิธีที่มีความแม่นยำมากที่สุดคือวิธี MTT reduction assay ทำให้ทราบค่าความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยต่อลิโพไซต์ และสามารถคำนวณค่าที่นำไปใช้จริง คือระดับความเข้มข้น 4.68 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าความปลอดภัยในการนำไปใช้เนื่องจากเป็นค่าที่ต่ำกว่าค่า IC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของมดลูกอักเสบและภาวะเยื่อบุมดลูกอักเสบทั้ง 3 ชนิด

จากการทดสอบหาความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของมดลูกอักเสบและการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ลิโพไซต์ จึงเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดที่จะนำไปใช้จริงในฟาร์มเกษตรกร เพื่อความคุ้มค่าในการเปิดปากมดลูก ความปลอดภัยต่อตัวสัตว์และผู้บริโภค เนื่องจากไม่มีสารเคมีตกค้าง ไม่มีผลข้างเคียง ไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อมดลูกหลังการใช้ และสามารถแก้ปัญหาการเป็นสัดหลังคลอดได้

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองวิธีการสกัดด้วยไอน้ำ มีความเหมาะสมในการนำไปใช้มากกว่าวิธีการสกัดด้วยวิธี Sonication ร่วมกับ Freeze dryer ซึ่งมีผลต่อรูปแบบของสารสกัดและองค์ประกอบทางเคมีที่อยู่ในสารสกัด อีกทั้งวิธีการสกัดด้วยไอน้ำยังเป็นวิธีที่ง่ายและแพร่หลายกว่าวิธี Sonication ร่วมกับ Freeze dryer ซึ่งเกษตรกรสามารถดัดแปลงอุปกรณ์ในการสกัดให้เหมาะสมกับการผลิตได้ อีกทั้งน้ำมันหอมระเหยยังเก็บไว้ใช้ได้ยาวนานกว่าในรูปของสารสกัดหยาบ ซึ่งสารสกัดหยาบต้องเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และหากเก็บไว้นานจะเกิดความชื้น ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการสูญเสียองค์ประกอบทางเคมีบางชนิด แต่อย่างไรก็ตามในสารสกัดหยาบอาจมีองค์ประกอบทางเคมีหรือสารอินทรีย์ที่แตกต่างจากน้ำมันหอมระเหย และอาจให้ผลตอบสนองใน *in vivo* แตกต่างจาก *in vitro* ก็เป็นไปได้ จึงควรมีการศึกษาใน *in vivo* ต่อไป

การนำน้ำมันหอมระเหยไปใช้กับสัตว์ ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยสามารถนำไปใช้ได้หลายระดับ ซึ่งระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยต้องมากกว่าค่า MIC เนื่องจากต้องคำนึงถึงพื้นที่ภายในมดลูกที่สารเข้าสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรีย และของเหลวที่อยู่ภายในมดลูก แต่ต้องคำนึงถึงค่า IC_{50} ด้วย เพื่อให้มีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้นควรมีการศึกษาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุมดลูกของโคนมต่อไป เนื่องจากเยื่อบุมดลูกเป็นส่วนที่สัมผัสกับสารละลาย

จากผลการศึกษาในห้องทดลอง สามารถนำน้ำมันหอมระเหยไปในรูปสารละลายชะล้างมดลูกแม่โคที่พบอาการติดเชื้ออักเสบของมดลูกและเยื่อบุผนังมดลูก เพื่อเป็นการควบคุมจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เกิดมดลูกอักเสบและภาวะเยื่อบุมดลูกอักเสบไม่ให้เพิ่มจำนวนมากขึ้น และสามารถใช้เป็นสารละลายล้างมดลูกภายหลังการคลอด เพื่อเป็นการป้องกันการติดเชื้อภายในมดลูก อีกทั้งน้ำมันหอมระเหยยังมีความปลอดภัยและไม่ทำให้เกิดการตกค้างในน้ำนม ดังนั้นขณะมีการใช้ยาจึงไม่ต้องงดส่งนม ดังนั้นการใช้สารละลายน้ำมันหอมระเหยจึงน่าจะเป็นประโยชน์ และเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาดังกล่าวให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. ภูมิปัญญาไทย สมุนไพรสำหรับโค-กระบือ.

โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

กระทรวงสาธารณสุข. 2530. สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน. โรงพิมพ์องค์การ

สงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพฯ.

กัลยาณี จิตรีพวงศ์พันธ์ และนวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ. 2548. ความรู้พื้นฐานการเพาะเลี้ยง

เซลล์สัตว์. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.

คมกฤษ เทียนคำ. 2552. สาเหตุของโรคทางการติดเชื้อ ปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์และ

จุลชีพก่อโรค, น. 7-34. ใน อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ บรรณาธิการ. พยาธิวิทยาพื้นฐาน

ทางสัตวแพทย์. ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลปอยท์ กราฟิค. กรุงเทพฯ.

จินตนา อาจสันเทียะ. 2549. จุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยาสำหรับพยาบาล. ห้างหุ้นส่วน

จำกัดบางกอกบลิ๊อค, กรุงเทพฯ.

เจลิยว ศาลากิจ. 2548. โลหิตวิทยาทางสัตวแพทย์. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรม

การเกษตรแห่งชาติ, นครปฐม.

จิตติกร ดวงอุปมา. 2552. การใช้สารสกัดตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf.) ในการ ควบคุม

เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของมดลูกอักเสบและเยื่อผนังมดลูกอักเสบในโคนมใน

ห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,

บางเขน, กรุงเทพฯ.

ณรงค์ จิงสมานญาติ, ธเนศวร ทิพย์รักษ์ และทวีรัตน์ ทศนวัฒน์. 2542. การผลิตสารสกัด

จากพืชที่มีฤทธิ์ฆ่าเห็บโค. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ทัศนีย์ ชมพูจันทร์, มนัสนันท์ ประสิทธิ์รัตน์ และมนยา เอกทนต์. 2539. คู่มือการดูแล

สุขภาพโคนม. ฟีนีฟับบลิชิง, กรุงเทพฯ.

- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- นันทวัน บุญยะประภัทร. 2530. **ก้าวไปกับสมุนไพร**. ชารมกลการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- นิจศิริ เรืองรังษี. 2534. **เครื่องเทศ**. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- บ้งอร กรณายาวงค์ และวันเย็น ศศิธรโรจนชัย. 2523. **น้ำมันตะไคร้ (Lemongrass oil)**. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. 2549. **สารสกัดจากตะไคร้กับการป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่**. บทความวิทยการวิทยาศาสตร์เพื่อประชาชน, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา. ชลบุรี.
- บัณฑิตย์ สิมปนชัยพรกุล, สุมาลี เหลืองสกุล และธารารัตน์ สุขศิริ. 2530. คุณสมบัติของสมุนไพรบางชนิดที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง. น. 526-7. **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 13**, สงขลา.
- ปราจีน วีรกุล. 2541. **การทบทวนเอกสารด้านความสมบูรณ์พันธุ์ และปัญหาการผสมติดยากในโคนม**. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, กรุงเทพฯ.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548. **วิทยานิพนธ์สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย**. บริษัทพิมพ์ดี จำกัด, กรุงเทพฯ.
- มนตรี แสนสุข. 2545. **สมุนไพรผักพื้นบ้านเพื่อชีวิตและสุขภาพ**. สำนักพิมพ์อนิเมทกรุ๊ป, กรุงเทพฯ.
- ยุวดี จอมพิทักษ์. 2550. **รักษาโรคด้วยสมุนไพร**. สำนักพิมพ์หอสมุดกลาง 09. มหาวิทยาลัยบูรพา, กรุงเทพฯ.
- รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ. 2540. **พืชเครื่องเทศและสมุนไพร**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

เรืองทอง กิจเจริญปัญญา. 2543. **วิทยาแบคทีเรีย**. คณะสัตวแพทยศาสตร์.
มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

วิไล เทวกุล. 2495. ต้นตะไคร้. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร** (12): 25-28.

วีระ วงศ์คำ. 2546. **เทคนิคพื้นฐานการเลี้ยงเซลล์สัตว์ในห้องปฏิบัติการ**. คณะวิทยาศาสตร์,
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

ศิริเพ็ญ จริเกษม. 2549. **น้ำมันหอมระเหยไทย 1**. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรนนท์ ศิริวัฒนพงษ์. 2539. ลิ้มโพลีไซต์และอวัยวะของระบบสร้างภูมิคุ้มกัน, น. 16-32.
ใน **นิตยสาร สกฤตกรรมรุ่ง บรรณาธิการ. วิทยาภูมิคุ้มกัน**. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

สว่าง เกษแดงสกุลวุฒิ. 2552. การอักเสบ, น. 119-152. ใน **อนุเทพ รังสีพิพัฒน์
บรรณาธิการ. พยาธิวิทยาพื้นฐานทางสัตวแพทย์**. ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคล
ปอยท์ กราฟิค, กรุงเทพฯ.

สุวิชัย โรจนเสถียร. 2538. การติดเชื้อภายในมดลูกของโค (uterine infection in cows), น.
163-183. ใน **เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การดูแลสุขภาพและ
ระบบสืบพันธุ์ในโค**. คณะสัตวแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, วิทยาเขต
กำแพงแสน, นครปฐม.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2541. **มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำมัน
ตะไคร้**. มอก. 1681-2541

อรรช เอกภาพสากล. 2547. **มหัศจรรย์น้ำมันหอมระเหย**. สำนักพิมพ์เพชรการเรือน,
กรุงเทพฯ.

อังกริยา ไสละสุต. 2547. พยาธิวิทยาของระบบอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย, น. 307-341.
ใน **คณฤช เทียนคำ และธีระยุทธ แก้วอมดวงศ์ บรรณาธิการ. พยาธิวิทยาเฉพาะ
ระบบทางสัตวแพทย์**. ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลปอยท์ กราฟิค, กรุงเทพฯ.

อนันท์ หล้าหนัก. 2540. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของตะไคร้. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Abe, K. and H. Saito. 1999. Both oxidative stress-dependent and independent effects of amyloid b protein are detected by 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl.-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).reduction assay. **Brain Research** 830: 146–154.

Allison, H.E. and J.D. Hillman. 1997. Cloning and characterization of a *Prevotella melaninogenica* hemolysin. **Infect. Immun.** 68: 2765-2771.

Amiridis, G.S., G.C. Fthenakis, J. Dafopoulos, T. Papanikplaou and V.S. Mavrogianni. 2003. Use of cefquinome for prevention and treatment of bovine endometritis. **J. Vet. Pharmacol. Ther.** 26: 387-390.

Azawi, O.I. 2008. Postpartum uterine infection in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 105: 187-208.

Aziz, D.M., L. Ahlswede. and H. Enbergs. 2005. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. **Theriogenol.** 64: 1350–1356.

Baron, S. 2004. **Medical microbiology**. Texas university medical branch, Galveston, Texas.

Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am. J. Clin. Pathol.** 45: 493-496.

Carter, G.R. and M.M Chegappa. 1991. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. Lea and Febiger, Philadelphia.

- Cimanga, K., K. Kambu, L. Tona, S. Apers, T. De Bruyne and N.Hermans. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **J. Ethnopharmacol.** 79: 213-220.
- Dhaliwal, G.S., D. Murray and Z. Woldehiwet. 2001. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. **Anim. Reprod. Sci.** 67: 135-152.
- Dohmen, M.J.W., J.A.C.M. Lohuis, G. Huszenicza, P. Nagy and M. Gacs. 1995. The relationship between bacteriological and clinical findings in cows with subacute/chronic endometritis. **Theriogenol.** 43: 1379-1388.
- Drillich, M., O. Beetz, A. Pfitzner, M. Sabin, H.J. Sabin P. Kutzer, H. Nattermann, and W. Heuwieser. 2001. Evaluation of a Systemic Antibiotic Treatment of Toxic Puerperal Metritis in Dairy Cows. **J. Dairy Sci.** 84: 2010–2017.
- Emgard, M., K. Blomgren and P. Brundin. 2002. Characterisation of cell damage and death in embryonic mesencephalic tissue:a study on ultrastructure, vital stains and protease activity. **Neuroscience** 115: 1177-1187.
- Evans, B.K., K.C. James and D.K. Luscombe. 1978. Quantitatives structure-activity relationships and carminative activity. **J. Pharm. Sci.** 67: 277.
- Foldi, J., M. Kulcsár, A. Pécsi, B. Huyghe, C. de Sa, J.A.C.M. Lohuis, P. Cox and G. Huszenicza. 2006. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 96: 265-281.

- Figueirinha, A., A. Paranhos, J.J. Perez-Alonso, C. Santos-Buelga and M.T. Batista. 2008. Cymbopogon citratus leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. **Food Chemistry** 110: 718–728.
- Fischer, J., M.H. Prosenc, M. Wolff, N. Hort., R. Willumeit and F. Feyerabend. 2009. Interference of magnesium corrosion with tetrazolium-based cytotoxicity assays. **Acta. Biomater.** Article in press.
- Gilbert, R.O. 1992. Bovine endometritis: the burden of proof. **Cornell Vet.** 82: 11-14.
- Gruenwald J, T. Brendler and C. Jaenicke. 2000. **PDR for Herbal Medicines**. 2nd. Montvale: Medical Economics Company: 551-3.
- Hajurka, J., V. Macak and V. Hura. 2005. Influence of health status of reproductive organs on uterine involution in dairy cows. **Bull. Vet. Inst. Pulawy.** 49: 53-58.
- Hamid, R., Y. Rotshteyn, L. Rabadi, R. Parikh and P. Bullock. 2004. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicol in Vitro.** 18: 703–710.
- Haraldsson, G., J.H. Meurman, E. Kononen and W.P. Holbrook. 2005. Properties of hemagglutination by *Prevotella melaninogenica*. **Anaerobe** 11 (5): 285-289.
- Hiller, K., M.F. Melzig and Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen. 1999. **Spektrum Akademischer Verlag.** Heidelberg, Berlin,,: 234-5.
- Jost, B.H. and S.J. Billington. 2005. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. **Antonie van Leeuwenhoek** 88: 87-102.

- Kasimanickam, R., T.F. Duffield, R.A. Foster, C.J. Gartley, K.E. Leslie, J.S. Walton and W.H. Johnson. 2005. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. **Can. Vet. J.** 46: 255-259.
- Kim, I.H., K.J. Na and M.P. Yang. 2005. Immune response during the peripartum period in dairy cows with post-partum endometritis. **J. Reprod. Dev.** 51: 757-764.
- Kumar, A., P.K. Pankaj and S. Das. 2005. Bovine endometritis and therapeutic immunomodulation of uterine defence. **Dairy Planner** 1: 9-11.
- Kwok, A.K.H., C-K. Yeung, T.Y.Y. Lai, K-P. Chan and C.P. Pang. 2004. Effects of trypan blue on cell viability and gene expression in human retinal pigment epithelial cells. **J. Ophthalmol.** 88: 1590-1594.
- LeBlanc, S. J. 2008. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance. **The Vet. J.** 176: 102-114.
- Leite, J.R., M.D. Seabra and E. Maluf. 1986. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. **J. Ethnopharmacol.** 17: 75-83.
- Leung, S.T., K. Derecka, G.E. Mann, A.P.F. Flint and D.C. Wathes. 2000. Uterine lymphocyte distribution and interleukin expression during early pregnancy in cows. **J. Reprod. Fertil.** 119: 25-33.
- Lewis, G.S. 1997. Uterine health and disorders. **J. Dairy Sci.** 80: 984-994.
- Lomsri N. 1993. **Partial purification of antimutagenic substances from Lemongrass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) and their possible mechanism of inhibition.** Master Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai.

- Manosroi, A., A. Saraphanchotiwitthaya and J. Manosroi. 2003. Immunomodulatory activities of fractions from hot aqueous extract of wood from *Clausena excavate*. **Fitoterapia** 75: 302–308.
- Manosroi, J., P. Dhumtanom, A. Manosroi. 2006. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Lett.** 235: 114–120.
- Moleyar, V. and P. Narasimham. 1992. Antibacterial activity of essential oil components. **J. Food Microbiol.** 16: 337-342.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.** 65: 55–63.
- Miller, A.N.A., E.J. Williams, K. Sibley, S. Herath, E.A. Lane, J. Fishwick, D.M. Nash, A.N. Rycroft, H. Dobson, C.E. Bryant and I.M. Sheldon. 2007. The effects of *Arcanobacterium pyogenes* on endometrial function in vitro, and on uterine and ovarian function in vivo. **Theriogenol.** 68: 972–980.
- Mishra, A.K., N. Kishore, N.K. Dubey and J.P.N. Chansouria. 1992. An evaluation of the toxicity of the oils of *Cymbopogon citratus* and *Citrus medica* in rats. **Phytother.Res.** 6:279-81.
- Nagaraja, T.G., S.K. Narayanan, G.C. Stewart and M.M. Chengappa. 2005. *Fusobacterium necrophorum* infectious in animals: pathogenesis and pathogenesis mechanisms. **Anaerobe** 11: 239-246
- Oltenacu, P.A., J.H. Britt, R. K. Braun and R.W. Mellenberger. 1984. Effect of health status on culling and reproductive performance of Holstein cows. **J. Dairy Sci.** 66: 612-619.

- Onawunmi, G.O. 1987. Effect of dimethyl sulfoxide on the anti-bacterial activity of lemongrass oil. **Microbios. Lett.** 36 (134-144): 105-111.
- Paisley, L.G., W.D. Mickelsen and P.B. Anderson. 1986. Mechanism and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: A review. **Theriogenol.** 25: 353-381.
- Paranagama, P.A., K.H.T. Abeysekera, K. Abeywickrama and L. Nugaliyadde. 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. **Lett. Appl. Microbiol.** 37: 86-90.
- Parra, A.L., R.S. Yhebra, I.G. Sardinas and L.I. Buela. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine** 8 (5): 395-400.
- Pereira, R.O., T.C. Sumita, M.R. Furlan, A.O.C. Jorge and M. Ueno. 2004. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. **Rev. Saúde.Pública.** 38 (2): 1-3.
- Phrompittayarat, W., W. Putalun, H. Tanaka, K. Jetiyanon, S. Wittaya-areekul and K. Ingkaninan. 2007. Comparison of various extraction methods of *Bacopa monnien*. **Naresuan University J.** 15 (1): 29-34.
- Pieters, R., D.R. Huismans, A. Leyva and A.J. Veerman. 1989. Comparison of the rapid automated MTT-assay with a dye exclusion assay for chemosensitivity testing in childhood leukaemia. **Br. J. Cancer.** 59(2): 217-20.
- Prayong, P., S. Barusrux and N. Weerapreeyakul. 2008. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. **Fitoterapia** 79: 598-601.

- Quinn, P.J., M.E. Cater, B.K. Markey and G.R. Carter. 1994. **Clinical veterinary microbiology**. Mosby-Year book Europe Limited, London.
- Sacchetti, G., S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice and R. Bruni. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chem.** 91: 621–632.
- SAS, 2003. **SAS OnlineDoc 9.1.3**. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sheldon, I.M. 2007. Endometritis in cattle: pathogenesis, consequences for fertility, diagnosis and therapeutic recommendations. **Reprod. management bulletin.** 2(1): 1-5.
- Sheldon, I.M. and H. Dobson. 2004. Postpartum uterine health in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 82-83: 295-306.
- _____, J.W. Erin, N.A. Aleisha, D.M. Miller and S.H. Nash. 2008. Uterine diseases in cattle after parturition. **J.Vet.** 176: 115–121.
- _____, D.E. Noakes, A.N. Rycroft and H. Dobson. 2004. Effect of intrauterine of estradiol on postpartum uterine bacterial infection in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 81: 13-23.
- _____, G. Lewis, S. LeBlanc and R. Gilbert. 2006. Defining postpartum uterine disease in dairy cattle. **Theriogenol.** 65: 1516-1530.
- Singh, A.K., J.M. Nigam and D.N. Sharma. 1983. Histological observation on endometrial gland of cows and buffaloes in relation to fertility. **Trop. Vet. Anim. Sci. Res.** 1: 37-41.
- Singh, J., R.D. Murray, G. Mshelia and Z. Woldehiwet. 2007. The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. **J.Vet.** 175: 301–309.

- Sirivasan, V., B.E. Gillespie, M.J. Lewis, L.T. Nguyen, S.I. Headrick, Y.H. Schukken and S.P. Oliver. 2007. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. **Vet. Microbiol.** 124: 319-328.
- Skopets, B., J. Li, W.W. Thatcher, R.M. Roberts and P.J. Hansen. 1992. Inhibition of lymphocyte proliferation by bovine trophoblast protein-1 (type 1 trophoblast interferon) and bovine interferon α 1. **Vet. Immuno. Immunopatho.** 34: 81-96.
- Smith, G.R., S.A. Barton and L.M. Wallace. 1991. A sensitive method for isolating *Fusobacterium necrophorum* from faeces. **Epidermol. Infect.** 106: 311-317.
- Souza, F.M.L.O., H.M. Lodder, O.G. Filho, T.M.S. Ferreira and E.A. Carlini. 1986. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). II. Effects of daily two month administration in male and female rats and in offspring exposed "in utero". **J. Ethnopharmacol.** 17 (1): 65-74.
- Studer, E. and D.A. Morrow. 1978. Postpartum evaluation of bovine reproductive potential: Comparison of findings from genital tract examination per rectum, uterine culture and endometrial biopsy. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 172: 489-494.
- Tzortzakis, N.G. and Costas D.E. 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technologies.** 8: 253-258.
- Verma, A., K.N. Prasad, A.K. Singh, K.K. Nyati, R.K. Gupta and V.K. Paliwal. 2010. Evaluation of the MTT lymphocyte proliferation assay for the diagnosis of neurocysticercosis. **J. Microbiol. Methods.** Article in press.

- Viana, G.S.B., T.G. Vale, R.S.N. Pinho and F.J.A. Matos. 2000. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. **J Ethnopharmacol.** 70: 323-7.
- Vinitketkumnue, U., R. Puatanachokchai, P. Kongtawelert, N. Lertprasertsuke and T. Matsushima. 1994. Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) to various known mutagens in *Salmonella* mutation assay. **Mutat. Res.** 341 (1): 71-75.
- Wannissorn, B., S. Jarikasem, T. Siriwangchai and S. Thubthimthed. 2005. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia** 76: 233-236.
- Williams, E.J., D.P. Fischer, D.E. Noakes, G.C.W. England, A. Rycroft., H. Dobson and I.M. Sheldon. 2007. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenol.** 68: 549–559.
- Wooding, F.B.P. 1992. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta** 13: 101–113.





ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเซลล์และการเตรียมสาร

1. ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic soy broth (TSB)

- 1.1 casein enzymatic hydrolysate 17.0 กรัม
- 1.2 papaic digest of soybean meal 3.0 กรัม
- 1.3 sodium chloride 5.0 กรัม
- 1.4 dipotassium phosphate 2.5 กรัม
- 1.5 dextrose 2.5 กรัม

2. ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tryptic soy agar (TSA)

- 2.1 pancreatic digest of casein 15.0 กรัม
- 2.2 enzymatic digest of soybean meal 5.0 กรัม
- 2.3 sodium chloride 5.0 กรัม
- 2.4 agar 15.0 กรัม

3. ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion Broth (BHIB)

- 3.1 Calf Brains, Infusion from 200 g 7.7 กรัม
- 3.2 Beef Heart, Infusion from 250 g 9.8 กรัม
- 3.3 Proteose Peptone 10.0 กรัม
- 3.4 Dextrose 2.0 กรัม
- 3.5 Sodium Chloride 5.0 กรัม
- 3.6 Disodium Phosphate 2.5 กรัม

4. ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Agar (BHIA)

- 4.1 Calf Brains, Infusion from 200 g 7.7 กรัม
- 4.2 Beef Heart, Infusion from 250 g 9.8 กรัม
- 4.3 Proteose Peptone 10.0 กรัม
- 4.4 Dextrose 2.0 กรัม
- 4.5 Sodium Chloride 5.0 กรัม

4.6 Disodium Phosphate 2.5 กรัม

4.7 Agar 15.0 กรัม

สูตรอาหารทั้งสองจะใช้อัตราส่วนผสมต่อน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยความร้อนแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที จะทำให้ได้ pH สุดท้าย เท่ากับ 7.32 ± 0.2

5. อาหารเลี้ยงเชื้อผสม 5% defibrinated sheep blood

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งไว้ให้อุณหภูมิของอาหารอยู่ที่ประมาณ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นผสม defibrinated sheep blood ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารที่เตรียม เขย่าให้เข้ากัน คอยนำไปใช้ทันที

6. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ชนิด Powder ประกอบด้วย L-glutamine ที่ไม่มี sodium bicarbonate วิธีการเตรียมใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ 10.4 กรัมต่อน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เติมน sodium bicarbonate 2 กรัม เติมน fetal bovine serum ที่ผ่านการ inactivate แล้ว 10 เปอร์เซ็นต์ PHA 2 เปอร์เซ็นต์ และ antibiotic 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นกรองอาหารผ่าน membrane 0.22 ไมโครเมตร แบบสุญญากาศในตู้ปลอดเชื้อ เก็บอาหารที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. การเตรียม Trypan blue 0.4 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง Trypan blue 0.4 กรัม ละลายใน PBS 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ pH เท่ากับ 7.2 แบ่งเก็บใส่ขวด ขวดละ 25 มิลลิลิตร

8. การเตรียม MTT (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ชั่งสาร MTT ปริมาณ 125 มิลลิกรัม ละลายด้วย 1xPBS 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำมากรองผ่าน membrane 0.22 ไมโครเมตร แบบสุญญากาศในตู้ปลอดเชื้อใส่หลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หุ้มหลอดด้วย foil เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. การเตรียม PBS [1x Phosphate-Buffered saline]

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.24	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.44	กรัม

ผสมให้เข้ากันในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย HCl จนได้ pH เท่ากับ 7.4 และเติมน้ำกลั่นจนครบ 990 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน membrane 0.22 ไมโครเมตร แบบสุญญากาศ

10. การเตรียมสารละลาย McFarland

ตารางผนวกที่ ก1 สารละลายมาตรฐาน McFarland

	Tube number										
	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1% barium sulfate (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
1% sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9
Approx. cell density (x 10 ⁸ /ml)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

11. การเตรียมสารละลาย 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 0.05 เปอร์เซ็นต์

1. ชั่ง TTC 0.05 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ vortex mixer จะทำให้ได้ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์

2. ทำให้ปลอดเชื้ออีกครั้งโดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ใส่ลงในขวดสีชาปลอดเชื้อ ก่อนนำไปใช้งาน



1. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย(MIC) โดยวิธี
macrobroth dilution

ตารางผนวกที่ ข1 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย
(MIC) โดยวิธี microbroth dilution (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

รูปแบบของ สารสกัด	แบคทีเรีย	ซ้ำที่				
		1	2	3	4	5
สารสกัดหยาบ	<i>A. pyogenes</i>	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
	<i>E. coli</i>	125	125	125	125	125
	<i>S. aureus</i>	15.625	15.625	15.625	15.625	15.625
น้ำมันหอมระเหย	<i>A. pyogenes</i>	1.5625	1.5625	1.5625	1.5625	1.5625
	<i>E. coli</i>	1.5625	1.5625	1.5625	1.5625	1.5625
	<i>S. aureus</i>	0.7813	0.7813	0.7813	0.7813	0.7813
Positive control (tetracycline)	<i>A. pyogenes</i>	-	-	-	-	-
	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-
Negative control (อาหารเลี้ยงเชื้อ)	<i>A. pyogenes</i>	/	/	/	/	/
	<i>E. coli</i>	/	/	/	/	/
	<i>S. aureus</i>	/	/	/	/	/

หมายเหตุ สัญลักษณ์ / แทน เชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA
- แทน เชื้อไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA

2. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย(MBC) โดยวิธี macrobroth dilution

ตารางผนวกที่ ข2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย
(MBC) โดยวิธี microbroth dilution (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

รูปแบบของ สารสกัด	แบคทีเรีย	ซ้ำที่				
		1	2	3	4	5
สารสกัดหยาบ	<i>A. pyogenes</i>	125	125	125	125	125
	<i>E. coli</i>	125	125	125	125	125
	<i>S. aureus</i>	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
น้ำมันหอมระเหย	<i>A. pyogenes</i>	3.1250	3.1250	3.1250	3.1250	3.1250
	<i>E. coli</i>	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
	<i>S. aureus</i>	1.5625	1.5625	1.5625	1.5625	1.5625

3. การนับจำนวนเซลล์ด้วย Hemocytometer

Hemocytometer เป็นแผ่นสไลด์แก้วที่มีตารางเป็นช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็กๆ 9 ช่อง แต่ละช่องมีพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร เมื่อปิดด้วย cover slip เฉพาะของมันในตำแหน่งที่ถูกต้อง จะให้ความลึก 0.1 มิลลิเมตร ดังนั้นปริมาตรใน 1 ช่องตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัสเท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร ซึ่งก็คือจำนวนเซลล์ในปริมาตร 1 ตารางเซนติเมตร เท่ากับ 1×10^4 เมื่อ n คือจำนวนเซลล์ที่นับได้ใน 1 ช่อง การนับเซลล์ควรนับทั้ง 5 ช่อง เพื่อให้ได้ค่าที่ถูกต้องมากขึ้น

3.1 วิธีคำนวณจำนวนเซลล์

$$\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)} = (\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} / 5) \times 10^4$$

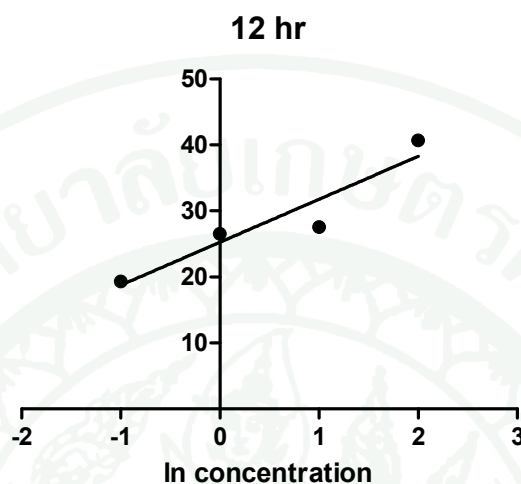
3.2 กรณีที่เซลล์ถูกเจือจาง

$$\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)} = (\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} / 5) \times 10^4 \times \text{dilution factor}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต} = (\text{จำนวนเซลล์มีชีวิต} / \text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}) \times 100$$

4. การคำนวณหาค่า IC_{50} จากกราฟ

ภาพผนวกที่ ข1 การคำนวณหาค่า IC_{50} จากกราฟ



การคำนวณค่า IC_{50} ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธี MTT

จากสมการ $Y = 6.531x + 25.27$ $R^2 = 0.8938$

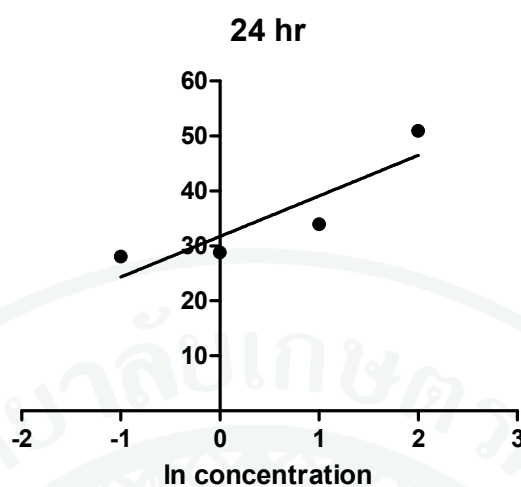
ให้ $y = 50$; $50 = 6.531x + 25.27$

$$6.531x = 24.73$$

$$x = 3.79$$

เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ 50 % เท่ากับ $\ln 3.79$

ดังนั้นเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่สัมผัสกับสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่ 50% เท่ากับ 44.24 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร



การคำนวณค่า IC_{50} ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธี MTT

จากสมการ $Y = 7.382x + 31.71$ $R^2 = 0.7981$

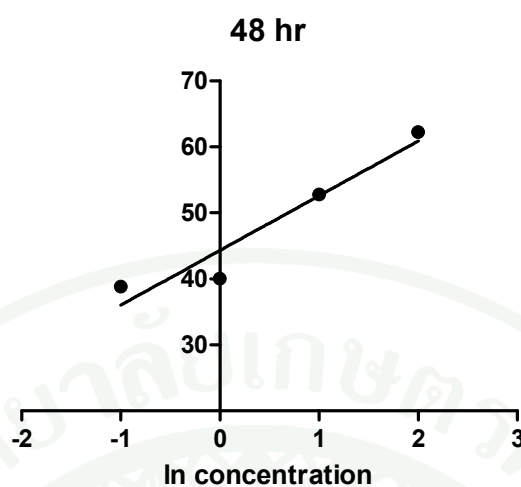
ให้ $y = 50$; $50 = 7.382x + 31.71$

$$7.382x = 18.29$$

$$x = 2.48$$

เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ 50 % เท่ากับ $\ln 2.48$

ดังนั้นเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่สัมพันธ์กับสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่ 50% เท่ากับ 11.94 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร



การคำนวณค่า IC_{50} ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธี MTT

จากสมการ $Y = 8.293x + 44.31$ $R^2 = 0.9247$

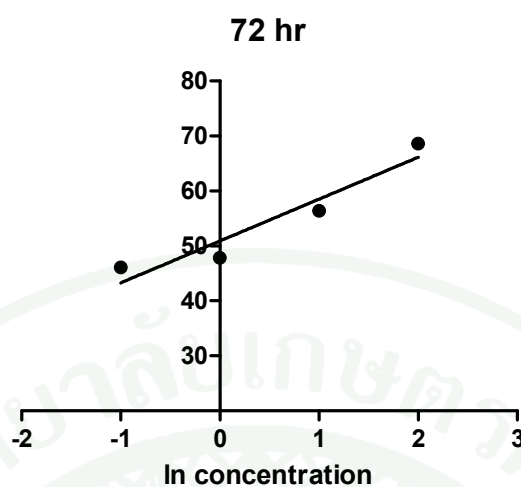
ให้ $y = 50$; $50 = 8.293x + 44.31$

$$8.293x = 5.69$$

$$x = 0.69$$

เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ 50 % เท่ากับ $\ln 0.69$

ดังนั้นเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่สัมพันธ์กับสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่ 50% เท่ากับ 1.99 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร



การคำนวณค่า IC_{50} ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่เวลา 72 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธี MTT

จากสมการ $Y = 7.614x + 50.90$ $R^2 = 0.9118$

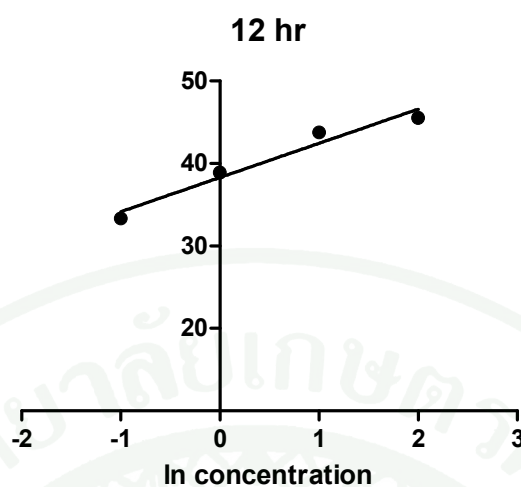
ให้ $y = 50$; $50 = 7.614x + 50.90$

$$7.614x = 0.90$$

$$x = -0.12$$

เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ 50 % เท่ากับ $\ln -0.12$

ดังนั้นเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่สัมพันธ์กับสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่ 50% เท่ากับ 1.13 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร



การคำนวณค่า IC_{50} ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธี Trypan blue dye exclusion

จากสมการ $Y = 4.147x + 38.30$ $R^2 = 0.9572$

ให้ $y = 50$; $50 = 4.147x + 38.30$

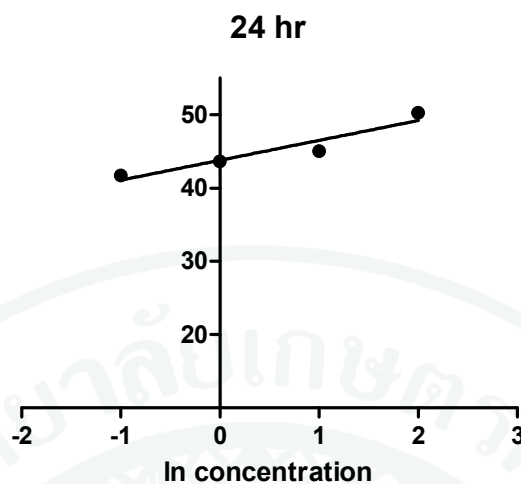
$$4.147x = 11.70$$

$$x = 2.82$$

เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ 50 % เท่ากับ $\ln 2.82$

ดังนั้นเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่สัมพันธ์กับสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่ 50%

เท่ากับ 16.77 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร



การคำนวณค่า IC_{50} ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธี Trypan blue dye exclusion

จากสมการ $Y = 2.711x + 43.78$ $R^2 = 0.9084$

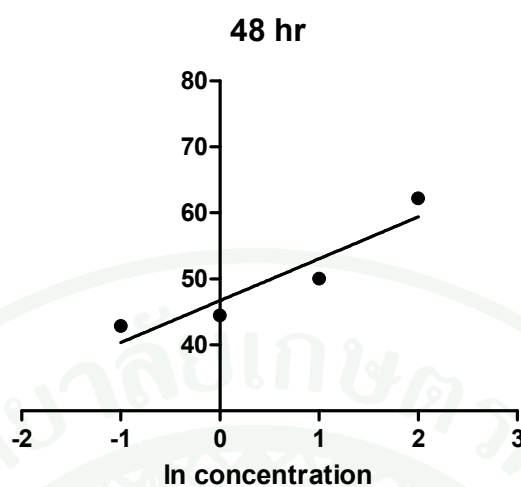
ให้ $y = 50$; $50 = 2.711x + 43.78$

$$2.711x = 6.22$$

$$x = 2.29$$

เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ 50 % เท่ากับ $\ln 2.29$

ดังนั้นเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่สัมพันธ์กับสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่ 50% เท่ากับ 9.87 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร



การคำนวณค่า IC_{50} ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธี Trypan blue dye exclusion

จากสมการ $Y = 6.355x + 46.70$ $R^2 = 0.8460$

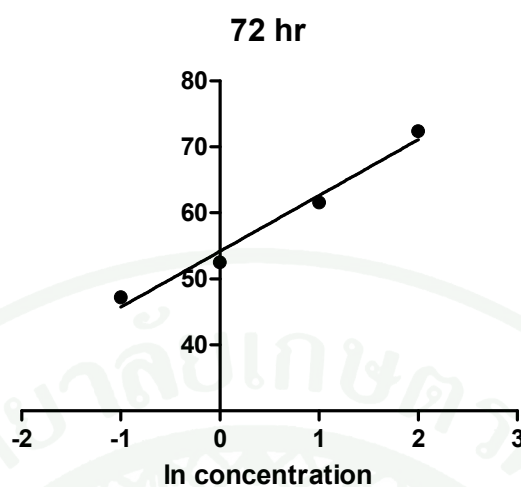
ให้ $y = 50$; $50 = 6.355x + 46.70$

$$6.355x = 3.30$$

$$x = 0.52$$

เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ 50 % เท่ากับ $\ln 0.52$

ดังนั้นเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่สัมพันธ์กับสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่ 50% เท่ากับ 1.68 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร



การคำนวณค่า IC_{50} ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่เวลา 72 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธี Trypan blue dye exclusion

จากสมการ $Y = 8.465x + 54.18$ $R^2 = 0.9787$

ให้ $y = 50$; $50 = 8.465x + 54.18$

$$8.465x = -4.18$$

$$x = -0.49$$

เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ 50 % เท่ากับ $\ln -0.49$

ดังนั้นเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่สัมผัสกับสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ที่ 50%

เท่ากับ 1.63 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวจันทร์จิรา โต๊ะขวัญแก้ว
วัน เดือน ปี ที่เกิด	21 มีนาคม 2526
สถานที่เกิด	อำเภอทุ่งตะโก จังหวัดชุมพร
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร) มหาวิทยาลัยรามคำแหง (พ.ศ. 2549)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

