



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

สัตว์บาล

สาขา

สัตว์บาล

ภาควิชา

เรื่อง การใช้สารสกัดตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf.) ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของมดลูกอักเสบและเยื่อผนังมดลูกอักเสบในโคนมในห้องปฏิบัติการ

Use of Lemon Grass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) Extracts as Antibacterial Agent in Dairy Cows Uterine Infection *in vitro*

นามผู้วิจัย นายฐิติกร ดวงอุปมา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จำเริญ เทียงธรรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ฤทธิ วัฒนชัยยิ่งเจริญ, วท.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ปราโมทย์ ศิริโรจน์, Dr.Agr.Sci.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ชัยภูมิ บัญชาศักดิ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้สารสกัดตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf.) ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของ
มดลูกอักเสบและเยื่อผนังมดลูกอักเสบในโคนมในห้องปฏิบัติการ

Use of Lemon Grass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) Extracts as Antibacterial Agent in Dairy
Cows Uterine Infection *in vitro*

โดย

นายจิตติกร ดวงอุปมา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2552

ฐิติกร ดวงอุปมา 2552: การใช้สารสกัดตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf.) ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของมดลูกอักเสบและเยื่อบุผนังมดลูกอักเสบในโคนมในห้วงปฏิบัติการ ปรินญาวิทยาสาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาสัตวบาล ภาควิชาสัตวบาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์จำเริญ เทียขรรธม, Ph.D.
127 หน้า

มดลูกอักเสบและเยื่อบุผนังมดลูกอักเสบในโคนมเป็นโรคทางระบบสืบพันธุ์ที่มีผลกระทบต่อลักษณะทางเศรษฐกิจในโคนม เช่น ความสมบูรณ์พันธุ์ และผลผลิตน้ำนมต่ำลง เป็นต้น จึงมีการนำเอาสมุนไพรหลายชนิดมาศึกษาเพื่อใช้ยับยั้งเชื้อสาเหตุของโรคมมากขึ้น การทดลองนี้ศึกษาการใช้ตะไคร้ซึ่งเป็นพืชที่น่าสนใจชนิดหนึ่ง โดยใช้ในรูปแบบสารสกัดหยาบจากตะไคร้ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ เอทานอลบริสุทธิ์ เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น) และน้ำกลั่น ได้ปริมาณสารสกัดหยาบ 9.44 20.20 24.67 และ 12.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทดสอบฤทธิ์และประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Salmonella typhimurium* ATCC 16809 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Arcanobacterium pyogenes* ATCC 8104 เบื้องต้น ด้วยวิธี agar disc diffusion พบว่าสารสกัดด้วยน้ำกลั่นให้ผลยับยั้งได้ดีต่อแบคทีเรียทั้งหมดที่ 500 มก./มล. จากการหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ด้วยวิธี broth dilution พบ macrobroth dilution ให้ค่า MIC เท่ากับ 9.28 18.56 18.56 9.28 37.13 และ 74.25 มก./มล. ตามลำดับ MBC มีค่ามากกว่า 148.50 มก./มล. (ยกเว้น *A. pyogenes* เท่ากับ 148.50 มก./มล.) microbroth dilution ให้ค่า MIC เท่ากับ 37.13 มก./มล. ต่อแบคทีเรียทั้งหมด MBC มีค่ามากกว่า 297.00 มก./มล. (ยกเว้น *A. pyogenes* เท่ากับ 74.25 มก./มล.) และจากการทดสอบความเป็นพิษต่อไรทะเล พบสารสกัดตะไคร้ด้วยน้ำกลั่นให้ค่า Lethal Concentration 50 (LC_{50}) หลังการเพาะเลี้ยง 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 1.82 1.55 1.38 และ 1.20 มก./มล. ตามลำดับ ผลการทดลองสรุปได้ว่า ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดตะไคร้ คือ น้ำ โดยใช้สัดส่วนความเข้มข้นของสารสกัดตะไคร้ต่อน้ำ เท่ากับ 37.13 มก./มล. ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุได้ทั้ง 6 ชนิด แต่ความเข้มข้นดังกล่าวยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยไรทะเล ดังนั้นจึงไม่ควรใช้วิธีชะล้างมดลูกที่ต้องแช่สารสกัดในช่องคลอดเป็นเวลานาน โดยจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาผลของการใช้งานในส่วนของการป้องกันการติดเชื้อในระดับฟาร์มทดลอง และฟาร์มเกษตรกรต่อไป

Thitikorn Duangupama 2009: Use of Lemon Grass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) Extracts as Antibacterial Agent in Dairy Cows Uterine Infection *in vitro*. Master of Science (Agriculture), Major Field: Animal Science, Department of Animal Science. Thesis Advisor: Assistant Professor Jamroen Thiengtham, Ph.D. 127 pages.

Dairy cattle uterine infection is common reproductive disease affecting an economic return relating to reduced fertility and milk yield. Medicinal plants have been the topic of many studies aiming at antimicrobial property of these plants. This experiment uses lemon grass as a very interesting crude extract from plant to test against bacterial agent causing bovine uterine infection *in vitro*. The lemon grass crude extract was obtained using absolute ethanol, 75% ethanol, commercial 40% ethanol and distilled water as solvent. The crude extract yield contained 9.44, 20.20, 24.67 and 12.20% of dry weight, respectively. In screening test, antibacterial properties of crude extract from each solvent were tested against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* ATCC 16809, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Arcanobacterium pyogenes* ATCC 8104 by agar disc diffusion. Lemon grass crude extract, using distilled water as solvent, shows antibacterial properties against all 6 microorganisms tested at 500 mg/ml. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) methods of all extracted samples were conducted using broth dilution. The results showed that distilled water extracted obtained the highest antibacterial activities in MIC using macrobroth dilution of 9.28, 18.56, 18.56, 9.28, 37.13 and 74.25 mg/ml, respectively and in MIC using microbroth dilution of 37.13 mg/ml. For the MBC in macrobroth dilution was greater than 148.50 mg/ml (except *A. pyogenes* at 148.50 mg/ml) and MBC in microbroth dilution was greater than 297.00 mg/ml (except *A. pyogenes* at 74.25 mg/ml). The results from cytotoxic test using brine shrimp lethality assay (Lethal Concentration 50; LC₅₀) at 6, 12, 24 and 48 h indicating that the concentrations of lemon grass extracted using distilled water as solvent were 1.82, 1.55, 1.38 and 1.20 mg/ml, respectively. In conclusion, it is expected that lemon grass crude extracted by water would be used at 37.13 mg/ml as an antibacterial agent in case of uterine infection treatment. Future *in vivo* study involving frequent bovine uterine flushing in case of a preventive measure under farm conditions, possibly using only small amount of crude extract to avoid any cell damage, is highly required.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จำเริญ เทียงธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฤทธิ์ วัฒนชัยยิ่งเจริญ และอาจารย์ ดร.ปราโมทย์ ศิริโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำที่ปรึกษาแนะนำในด้านการวิจัยและเรียบเรียงวิทยานิพนธ์ ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พรศรี ชัยรัตนายุทธ ประธานการสอบ และรองศาสตราจารย์ ดร. ไพโชค ปัญจะ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณเครือข่ายการวิจัยภาคกลางตอนบน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่ได้ให้งบประมาณการวิจัยในครั้งนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ให้แก่ข้าพเจ้า อันนำไปสู่กระบวนการความคิด วางแผน แก้ไขในการวิจัยให้สำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบคุณบุคลากรเจ้าหน้าที่ เพื่อนๆ และคนพิเศษ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต เจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ทุกท่าน รวมทั้งบุคคลที่ไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ ในระหว่างการวิจัย

สิ่งสำคัญที่สุดขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อทองสินธุ์ คุณแม่ศุภร และพี่ชมพูนุช ดวงอุปมา และญาติพี่น้องทุกท่าน ที่สนับสนุนและให้โอกาสในการศึกษา ตลอดจนเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง

จิตติกร ดวงอุปมา

พฤศจิกายน 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	27
อุปกรณ์	27
วิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	40
ผล	40
วิจารณ์	49
สรุปและข้อเสนอแนะ	55
สรุป	55
ข้อเสนอแนะ	55
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	56
ภาคผนวก	77
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสาร	78
ภาคผนวก ข ข้อมูลการทดลอง	81
ภาคผนวก ค ภาพจากการทดลอง	119
ประวัติการศึกษา และทำงาน	127

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจัดประเภทของแบคทีเรียทั้งกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน และไม่ใช้ออกซิเจนที่เพาะแยกมาจากมดลูกโคภายหลังคลอดระหว่าง 7 และ 28 วัน โดยวิธี uterine swab	6
2	ระดับคะแนนของภาวะมดลูกและเยื่อผนังมดลูกอักเสบ	12
3	ลักษณะ สี กลิ่น และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้จากการสกัด (extract yield) ของสารสกัดจากตะไคร้ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ	41
4	การทดสอบฤทธิ์ และประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดจากตะไคร้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุบางชนิดของมดลูกอักเสบ และเยื่อผนังมดลูกอักเสบในโคนม โดยวิธี agar disc diffusion	44
5	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุบางชนิดของมดลูกอักเสบและเยื่อผนังมดลูกอักเสบในโคนม โดยวิธี broth dilution (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	47
6	ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากตะไคร้ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ที่ทำให้ไรทะเลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (Lethal Concentration 50; LC ₅₀ ; มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	48
ตารางผนวกที่		
ก1	สารละลายมาตรฐาน McFarland	80
ข1	ค่าเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง (% dry matter)	82
ข2	การหาค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิต	83
ข3	ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้งของสารสกัดจากตะไคร้ด้วยตัวทำละลายต่างชนิดที่ระดับความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	84

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) โดยวิธี macrobroth dilution (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	87
ข5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ฆ่าแบคทีเรีย (MBC) โดยวิธี macrobroth dilution (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	89
ข6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) โดยวิธี microbroth dilution (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	91
ข7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ฆ่าแบคทีเรีย (MBC) โดยวิธี microbroth dilution (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	93
ข8 การคำนวณเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลังการเพาะเลี้ยงไรทะเล ด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 6 ชั่วโมง	95
ข9 การคำนวณเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลังการเพาะเลี้ยงไรทะเล ด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 12 ชั่วโมง	99
ข10 การคำนวณเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลังการเพาะเลี้ยงไรทะเล ด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 24 ชั่วโมง	103
ข11 การคำนวณเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลังการเพาะเลี้ยงไรทะเล ด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 48 ชั่วโมง	107

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	อวัยวะสืบพันธุ์ของโคเพศเมีย	4
2	มดลูกแบบไบคอร์นูเอต (bicornuate) ที่พบในโค	4
3	ลักษณะของหนองและเมือกที่ออกมาจากช่องคลอด ให้ระดับคะแนนเป็นไป ตามแสดงในตารางที่ 2	12
4	ตะไคร้	17
5	โครงสร้างทางเคมีของ myrcene, geraniol, nerol, geranial และ neral	18
6	ลักษณะ และสีของสารสกัดตะไคร้ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ	42

ภาพผนวกที่

ข1	การวาดกราฟเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลัง การเพาะเลี้ยงไรทะเลด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 6 ชั่วโมง	111
ข2	การวาดกราฟเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลัง การเพาะเลี้ยงไรทะเลด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 12 ชั่วโมง	113
ข3	การวาดกราฟเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลัง การเพาะเลี้ยงไรทะเลด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 24 ชั่วโมง	115
ข4	การวาดกราฟเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลัง การเพาะเลี้ยงไรทะเลด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 48 ชั่วโมง	117
ค1	แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>E. coli</i> ของสารสกัดจากตะไคร้ ด้วยตัวทำละลายต่างชนิด	120
ค2	แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>S. aureus</i> ของสารสกัดจากตะไคร้ ด้วยตัวทำละลายต่างชนิด	121
ค3	แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>B. subtilis</i> ของสารสกัดจากตะไคร้ ด้วยตัวทำละลายต่างชนิด	122

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ก4 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>S. typhimurium</i> ของสารสกัดจากตะไคร้ ด้วยตัวทำละลายต่างชนิด	123
ก5 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ของสารสกัดจากตะไคร้ ด้วยตัวทำละลายต่างชนิด	124
ก6 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>A. pyogenes</i> ของสารสกัดจากตะไคร้ ด้วยตัวทำละลายต่างชนิด	125
ก7 ตัวอย่างการหาค่า MIC ของสารสกัดจากตะไคร้ โดยวิธี macrobroth dilution	126
ก8 ตัวอย่างการหาค่า MIC ของสารสกัดจากตะไคร้ โดยวิธี microbroth dilution	126

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

<i>A. pyogenes</i>	=	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
ANOVA	=	analysis of variance
ATCC	=	American type culture collection
<i>B. melaninogenicus</i>	=	<i>Bacteroides melaninogenicus</i>
<i>B. subtilis</i>	=	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>C. albicans</i>	=	<i>Candida albicans</i>
<i>C. citratus</i>	=	<i>Cymbopogon citratus</i>
CA-9KB	=	human oral epidermoid carcinoma cell
CFU	=	colony forming unit
CLSI	=	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRD	=	completely randomized design
DMRT	=	Duncan's new multiple range test
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DMST	=	culture collection for medical microorganism
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
<i>F. necrophorum</i>	=	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
FA	=	murine ascites mammary carcinoma FM3A
FSH	=	follicle stimulating hormone
GnRH	=	gonadotropin releasing hormone
hCG	=	human chorionic gonadotropins hormone
IC ₅₀	=	inhibitory concentration 50
Ig	=	immunoglobulin
IL	=	interleukin
LC ₅₀	=	lethal concentration 50
MBC	=	minimal bactericidal concentration
MFC	=	minimal fungicidal concentration
MIC	=	minimal inhibitory concentration

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

MTT assay	=	3-(4, 5-dimethylthiazole-2-yl) – 2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide assay
NK cells	=	natural killer cells
NP	=	not performed
<i>P. aeruginosa</i>	=	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PGF _{2α}	=	prostaglandin F _{2α}
PMN	=	polymorphonuclear neutrophilic leukocytes
PS	=	murine lymphocytic leukemia P ₃₈₈
RAJI cell	=	human B lymphocyte cell
Rec-	=	nonrecombining lines
Rec+	=	recombining lines
S 9-mix	=	a liver-derived cell extract used in the Ames test to activate or inactivate chemicals in a test for mutagens and potential carcinogens
<i>S. aureus</i>	=	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. typhimurium</i>	=	<i>Salmonella typhimurium</i>
SAS	=	statistical analysis system
SEM	=	standard error of mean
TSA	=	tryptic soy agar
TSB	=	tryptic soy broth
TTC	=	2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride

**การใช้สารสกัดตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf.) ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่เป็น
สาเหตุของมดลูกอักเสบและเยื่อผนังมดลูกอักเสบในโคนมในห้องปฏิบัติการ**

**Use of Lemon Grass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) Extracts as Antibacterial Agent
in Dairy Cows Uterine Infection *in vitro***

คำนำ

การเลี้ยงโคนมเป็นอาชีพหนึ่งที่มีความสำคัญต่อประเทศไทย เนื่องจากเป็นอาชีพที่ให้ผลตอบแทนสูง เกษตรกรสามารถจำหน่ายน้ำนมดิบ มูลโค ลูกโค ให้เป็นรายได้ของฟาร์ม อย่างไรก็ตามต้นทุนการผลิตน้ำนมมีความผันแปรขึ้นอยู่กับการปัจจัยต่างๆ เช่น อายุโค ระยะของการให้นม จำนวนวันของการให้นมในแต่ละระยะ จำนวนวันในระยะแห้งนม ปริมาณอาหารที่ได้รับ สุขภาพ และความสมบูรณ์พันธุ์ ในฟาร์มขนาดเล็กเกษตรกรมักเผชิญกับปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ มีอัตราการผสมซ้ำสูง โคที่ผสมติดต่ำก็จะส่งผลทำให้ปริมาณน้ำนมที่ผลิตได้ตลอดช่วงชีวิตต่ำลงไปด้วย การติดเชื้อของมดลูก (metritis) และการอักเสบของเยื่อผนังมดลูก (endometritis) ในโคนมหลังคลอด เช่น *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* และ *Prevotella* sp. เป็นต้น เป็นสาเหตุทำให้แม่โคไม่เป็นสัดหลังคลอด ผสมไม่ติด เนื่องจากกัมภะตาย โคที่ติดเชื้อไม่แสดงอาการแบบเรื้อรังจะยังสามารถแสดงอาการเป็นสัด และตกไข่ แต่สภาพมดลูกยังไม่พร้อมรับการฝังตัวของกัมภะ จึงทำให้ผสมไม่ติด และกลายเป็นโคที่ผสมซ้ำหลายครั้ง ในกรณีที่ติดเชื้ออย่างรุนแรง อาจทำให้โคเป็นหมันถาวร และถูกคัดทิ้งในที่สุด การรักษามักใช้การล้างมดลูกด้วยยาต้านจุลชีพ หรือยาฆ่าเชื้อภายนอกแบบเจือจาง แต่การใช้อย่างนี้จำเป็นต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง เพราะอาจเกิดการฉีกของเยื่อสาเหตุหรือมีการตกค้างในโคนมระยะรีดนม และเพิ่มต้นทุนการผลิตของเกษตรกรด้วย ปัจจุบันเลี้ยงปัญหานี้โดยการใช้ฮอร์โมน หรือสารจากธรรมชาติ การนำสารสกัดจากตะไคร้ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและรา ควรจะสามารถนำมาใช้เป็นยาเฉพาะที่ในรูปแบบสารละลายชะล้างมดลูกโคที่พบอาการ ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาการนำสารสกัดตะไคร้มาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุของภาวะดังกล่าวในห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้เป็นแนวทางการนำไปใช้ศึกษาวิจัยในระดับฟาร์มทดลอง ตลอดจนสามารถใช้เป็นทางเลือกที่เป็นประโยชน์แก่ผู้เลี้ยงโคนมเพื่อลดปัญหาดังกล่าวได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดตะไคร้ที่เหมาะสม สำหรับทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่เป็นสาเหตุของมดลูกอักเสบ (metritis) และเยื่อผนังมดลูกอักเสบ (endometritis) ของโคนมในห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของฤทธิ์ และประสิทธิภาพการต้านและยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรคของสารสกัดตะไคร้ในห้องปฏิบัติการ
3. เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของสารสกัดตะไคร้ต่อไรทะเล

การตรวจเอกสาร

มดลูกอักเสบและเยื่อผนังมดลูกอักเสบในโคนม

มดลูกอักเสบ (metritis) และเยื่อผนังมดลูกอักเสบ (endometritis) ในโคนม เป็นโรคทางระบบสืบพันธุ์ที่สำคัญในโคนม ซึ่งมีผลทางเศรษฐกิจที่สำคัญ ทำให้ปริมาณน้ำนมลดลง หรือความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง เนื่องจากผสมไม่ติด เป็นต้น ภาวะโรคนี้พบได้ทั้งแบบรุนแรงและเรื้อรัง มักเกิดขึ้นในช่วง 10-14 วันหลังคลอด (ทัศนีย์ และคณะ, 2539)

1. กายวิภาคและสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์ในโคนมเพศเมีย

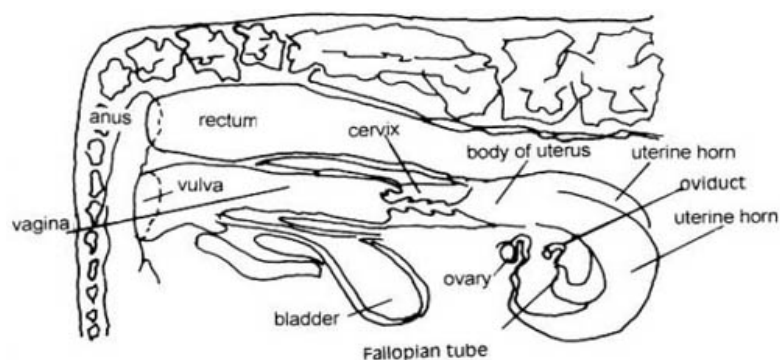
ความรู้พื้นฐานทางกายวิภาคและสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์ในโคนมเพศเมียจะช่วยให้เข้าใจถึงกระบวนการอักเสบของมดลูก และการเกิดเยื่อผนังมดลูกอักเสบ ระบบสืบพันธุ์ดังกล่าวประกอบไปด้วย รังไข่ (ovary) ท่อนำไข่ (oviduct หรือ Fallopian tubes) มดลูก (uterus) คอมดลูก (cervix) ช่องคลอด (vagina) และปากช่องคลอด (vulva; Sorensen, 1979; Bearden and Fuquay, 1992; Hafez and Hafez, 2000) โดยอวัยวะเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่สร้างไข่และนำไปผสมกับอสุจิ รวมทั้งขับเอาตัวอ่อนและของเสียออกไปจากร่างกาย

มดลูกเป็นอวัยวะที่เสี่ยงต่อภาวะการติดเชื้อ มีลักษณะเป็นท่อนกลม คล้ายถุงกล้ำเนื้อติดอยู่กับผนังช่องท้องและช่องเชิงกรานโดยเยื่อช่องท้อง ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของอสุจิไปผสมกับไข่ เป็นที่ฝังตัวของไข่ที่ถูกผสมแล้ว และเป็นที่พักพัฒนาการเจริญเติบโตของตัวอ่อนไปเป็นฟัตัส ตลอดทั้งขับเอาตัวอ่อนออกไปเมื่อถึงกำหนดคลอด แบ่งออกเป็น 2 ส่วน (ชัยสิทธิ์, 2529) ดังนี้

1.1 ปีกมดลูก (uterine horn) เป็นส่วนที่อยู่ต่อเนื่องจากท่อนำไข่ มีลักษณะเป็นท่อรูปทรงกระบอก พบ 2 ข้างวางอยู่ในช่องท้อง ตอนท้ายบริเวณใกล้กับขอบของกระดูกเชิงกราน ตอนปลายของท่อจะมาปิดรวมกันเป็นตัวมดลูก (uterine body) ในขณะที่โคไม่ได้ตั้งท้อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวจะอยู่ในขนาดปกติ (25-45 เซนติเมตร; Bearden and Fuquay, 1992) แต่ถ้าตั้งท้อง ขนาดและความยาวจะขยายใหญ่ขึ้นอย่างมาก (ชัยสิทธิ์, 2529)

1.2 ตัวมดลูก เป็นท่อร่วมของปีกมดลูกทั้งสองข้างมาบรรจบกัน มีขนาดสั้น อยู่ต่อจากทางแยกของปีกมดลูกทั้ง 2 ข้าง และส่วนใหญ่จะวางอยู่ในช่องเชิงกราน ด้านซ้ายของท่อจะเปิดเข้าสู่คอมดลูก ความยาวของตัวมดลูกในโคเท่ากับ 2-4 เซนติเมตร (Bearden and Fuquay, 1992; Hafez and Hafez, 2000)

ชนิดของมดลูกที่พบในโคเป็นแบบไบคอร์นูเอต (bicornuate) มีตัวมดลูกสั้น อยู่ทางด้านหน้าของคอมดลูก ปีกมดลูก 2 ข้างยาว และมีการเชื่อมกันของปีกมดลูก (Bearden and Fuquay, 1992; Hafez and Hafez, 2000)



ภาพที่ 1 อวัยวะสืบพันธุ์ของโคเพศเมีย

ที่มา: Eley (2008)



ภาพที่ 2 มดลูกแบบไบคอร์นูเอต (bicornuate) ที่พบในโค

ที่มา: Anonymous (2008)

2. แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค

สาเหตุสำคัญของการเกิดมดลูกอักเสบและเยื่อผนังมดลูกอักเสบ คือ ภาวะการติดเชื้อจากแบคทีเรียหลายกลุ่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มหลักที่มักพบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Arcanobacterium pyogenes* (*Actinomyces pyogenes* หรือ *Corynebacterium pyogenes*; Jost and Billington, 2005), *Pseudomonas* sp. และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดหนองที่เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic bacteria) เช่น *Fusobacterium necrophorum* และ *Prevotella* sp. เป็นต้น (Dohmen *et al.*, 1995; Sheldon *et al.*, 2004a; Drillich, 2006) แบคทีเรียบางชนิดจัดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) หรือเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) และพบแบคทีเรียชนิดอื่นอีก (ตารางที่ 1)

2.1 *Escherichia coli* (*E. coli*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างแบบท่อนขนาดสั้น ในบางครั้งอาจพบมีขนาดความยาวไม่เท่ากัน ปลายมน เรียงตัวแบบเดี่ยว ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2544) แบรียาอาศัยที่มีออกซิเจนเป็นภาวะเหมาะสมที่สุด โคโลนีของเชื้อบน และมิกลิ่งเหมีน ซึ่งจัดว่าเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ (เรืองทอง, 2543) เชื้อนี้อาศัยอยู่ในลำไส้และบริเวณเยื่อเมือกอื่นๆ ของร่างกายคน และสัตว์เลือดอุ่น จัดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น ในสภาวะที่ร่างกายอ่อนแอ หรือการติดเชื้อจากภายนอก จะทำให้เชื้อ *E. coli* สามารถก่อโรคได้ โดยจะสร้างเอนไซม์และสารพิษ ทั้งสารพิษในตัวเอง (endotoxin) และนอกตัว (exotoxin) ทำให้เซลล์ตายและแตก (cell lysis; Sirivasan *et al.*, 2007)

2.2 *Staphylococcus* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (grape-like) ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เชื้อหลักที่สำคัญคือ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) เชื้อสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน (เรืองทอง, 2543; นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2544; Sneath *et al.*, 1986) สีโคโลนีมีลักษณะเฉพาะเป็นสีเหลืองทองของสิรงควัตถุที่สร้างขึ้น การติดเชื้อเป็นทั้งแบบที่เป็นสาเหตุแรกของการติดเชื้อ (primary etiology) หรือการติดเชื้อแทรกซ้อนภายหลัง (secondary etiology) เชื้อก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ ติดเชื้อที่บาดแผล เกิดการอักเสบและมีหนอง เช่น ทอนซิลอักเสบ ปอดอักเสบ เต้านมอักเสบ มดลูกอักเสบ และข้ออักเสบ เชื้อสามารถสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง และสร้าง coagulase เพื่อให้เกิดการตกตะกอนจับตัวเป็นก้อนในพลาสมาของคนและสัตว์ ป้องกันการถูกทำลายจากกระบวนการ phagocytosis และสร้าง fibrinolysin ทำลาย fibrin ได้ เป็นต้น (เรืองทอง, 2543; นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2544)

ตารางที่ 1 การจัดประเภทของแบคทีเรียทั้งกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน และไม่ใช้ออกซิเจนที่เพาะแยกมาจากมดลูกโคภายหลังคลอดระหว่าง 7 และ 28 วัน โดยวิธี uterine swab

กลุ่มแบคทีเรีย		
1	2	3
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Aerococcus viridans</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Haemophilus sommus</i>	<i>Corynebacterium</i> sp.
<i>Prevotella</i> sp.	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Pastoreptococcus</i> sp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i> (coagulase +)	<i>Micrococcus</i> sp.
	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
		<i>Providencia stuartii</i>
		<i>Proteus</i> sp.
		<i>Propionibacterium granolosa</i>
		<i>Staphylococcus</i> sp. (coagulase -)
		α -haemolytic <i>Streptococcus</i> sp.
		<i>Streptococcus acidominimus</i>

- หมายเหตุ 1. เชื้อสาเหตุที่ก่อให้เกิดมดลูกอักเสบ
 2. เชื้อสาเหตุอื่นที่ก่อให้เกิดภาวะโรคเกี่ยวกับมดลูก
 3. แบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับมดลูก

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sheldon *et al.* (2002, 2004a, 2004b)

2.3 *Arcanobacterium pyogenes* (*A. pyogenes*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างแบบท่อนขนาดสั้น ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เต็ม (CO₂-enriched atmosphere) เหมาะสมที่สุด (Pascual Ramos *et al.*, 1997; Jost and Billington, 2005) โคโลนีมีขนาดเล็ก ผิวโคโลนีแห้ง (เรืองทอง, 2543;

Quinn *et al.*, 1994) เชื้ออาศัยอยู่ทั่วไปในเยื่อเมือกหรือสารคัดหลั่งของสัตว์กระเพาะรวม สุนัข และ สัตว์เลี้ยงอื่นๆ (Carter and Chengappa, 1991) นอกจากนี้ยังพบบริเวณผิวหนังของสัตว์ที่ไวต่อการ ติดเชื้อ (เรืองทอง, 2543) และเป็นเชื้อฉวยโอกาส ก่อให้เกิดฝี ปอดอักเสบ ข้ออักเสบ แห้ง ในสัตว์ เกี่ยวเนื่องและสุนัข รวมทั้งโคด้วย (Lechtenberg *et al.*, 1988; Nagaraja *et al.*, 1996; Lewis, 1997) และก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบแบบฝีเรื้อรัง เยื่อบุผนังและมดลูกอักเสบในโค Lewis (1997) รายงานว่า พบเชื้อ *A. pyogenes* ในโคที่เป็นโรคติดเชื้อในมดลูกได้ 27 ถึง 69 เปอร์เซ็นต์ และ สามารถใช้วัดความสมบูรณ์พันธุ์ได้ (Huszenicza *et al.*, 1999)

เมื่อ *A. pyogenes* เข้าสู่ร่างกายสัตว์จะเข้าไปเจริญ ขยายพันธุ์ ผลิตสารพิษออกมานอกเซลล์ มีผลให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงแบบเบต้า สร้าง leukotoxin factors ทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Ding and Lämmher, 1996)

2.4 *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่าง แบบท่อนหลายรูปแบบ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (Nagaraja *et al.*, 2005) และไม่ทำปฏิกิริยาทางชีวเคมีกับน้ำตาล ยกเว้น indole (Holdeman *et al.*, 1977) พบเชื้อได้ใน ช่องปาก ทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ และทางเดินระบบสืบพันธุ์ของมนุษย์และสัตว์ (Smith *et al.*, 1991; Nagaraja *et al.*, 2005) การก่อโรคในสัตว์เศรษฐกิจพบว่าทำให้เกิดภาวะ ท้องเสียในลูกโค ฝีในตับ กีบเน่าหูด (foot rot; วงศ์อนันต์ และคณะ, 2547) เต้านมอักเสบ เยื่อบุผนังและมดลูกอักเสบในโคนม (Sheldon *et al.*, 2004a) เป็นต้น นอกจากนี้ *F. necrophorum* แล้วยังมีเชื้อชนิดอื่นที่ก่อโรคร่วมด้วย เช่น *F. nucleatum*, *A. pyogenes* และ *Bacteroides melaninogenicus* (*B. melaninogenicus*) เป็นต้น (Lechtenberg *et al.*, 1988) เมื่อก่อโรคจะสร้าง leukotoxin ทำลาย neutrophils และ macrophages ซึ่งทำหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าร่างกาย และทำลายเซลล์ตับ ตลอดจนเยื่อบุผนังเซลล์ของสัตว์ ในสัตว์กระเพาะรวม (Tan *et al.*, 1994; Nagaraja *et al.*, 2005)

2.5 *Prevotella* sp. เป็นเชื้อที่มีชื่อเดิมว่า *Bacteroides* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อหลักที่ก่อให้เกิดภาวะเยื่อบุผนังมดลูกอักเสบ คือ *Prevotella melaninogenicus* มีรูปร่างแบบแท่งที่ สามารถสร้างสารสีดำ (black-pigmenting bacilli; Allison and Hillman, 1997; Kasimanickam *et al.*, 2005) เจริญได้ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน พบเชื้อได้ในช่องปาก ทางเดินอาหาร และทางเดินระบบ สืบพันธุ์ของมนุษย์และสัตว์ การติดเชื้อทำให้เกิดการอักเสบในช่องปากและปอด ตลอดจนทางเดิน

อาหารและระบบสืบพันธุ์ภายใน โดยมีผลต่อการสร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่น neuraminidase, collagenase, immunoglobulin G (IgG) และ IgA protease (Allison and Hillman, 1997) ยับยั้งการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยอาศัย leukocyte inhibitory factor และสร้างสารที่ทำลายให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกในมนุษย์และสัตว์ (Haraldsson *et al.*, 2005)

2.6 แบคทีเรียอื่นที่พบหลักฐานว่าอาจสามารถก่อโรคมดลูกและเยื่อบุผนังมดลูกอักเสบได้ (Sheldon *et al.*, 2002, 2004a, 2004b) เช่น *Bacillus* sp. และ *Clostridium* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างแบบแท่ง สร้างสปอร์และแคปซูลได้ ทำให้ทนทานต่อการถูกทำลาย *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*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน เชื้อแต่ละชนิดสร้างสารพิษหรือน้ำย่อยที่ต่างกันไป โดยจะทำลายและสร้างความเสียหายให้กับเซลล์ที่เชื้อก่อโรค (Del Vecchio *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2000)

3. ปัจจัยโน้มนำที่ทำให้เกิดโรค

การขาดสารอาหารและการอักเสบจากโรคอื่น เป็นปัจจัยโน้มนำให้เกิดการอักเสบของเยื่อบุผนังมดลูก การขาดสารอาหาร เช่น วิตามินเอ วิตามินอี แคลเซียม และซีลีเนียม เป็นต้น สารอาหารเหล่านี้ช่วยบำรุงรักษา ซ่อมแซมเนื้อเยื่อบุผนังมดลูก กระตุ้นให้มดลูกเข้าอู่ (uterine involution) ลดอัตราการเกิดรกค้าง และเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ในร่างกาย (สุวิชัย, 2538; ทศนีย์ และคณะ, 2539; Kuhlman and Gallup, 1942; Harrison *et al.*, 1984; Parkinson, 2001; O'Connor, 1996; Manspeaker, 2008) การอักเสบจากโรคอื่น เช่น brucellosis, melioidosis, campylobacteriosis, leptospirosis, trichomoniasis, bovine herpes virus, infectious bovine rhinotracheitis (IBR) และ infectious pustular vulvovaginitis (IPV) เป็นต้น ก่อให้เกิดความเสียหายต่อมดลูกและทำให้เชื้อสาเหตุที่แท้จริงเข้าไปก่อโรคได้ง่ายขึ้น (ทศนีย์ และคณะ, 2539; O'Connor, 1996; Manspeaker, 2008) รวมถึงการเกิดลูกแฝด และการเกิดรกค้างด้วย (Bell and Roberts, 2007) ดังนั้นการได้รับโภชนาที่เพียงพอ รวมไปถึงวิตามินและแร่ธาตุในช่วงเวลาวิกฤติอาจมีผลทางอ้อมต่อการบำรุงรักษาสุขภาพของมดลูก เพื่อไม่ให้เสี่ยงต่อภาวะการอักเสบ

4. พยาธิกำเนิดของโรค

4.1 การบุกรุกของแบคทีเรียเข้าสู่มดลูก มดลูกและเยื่อผนังมดลูกอักเสบเกิดขึ้นเมื่อเชื้อแบคทีเรียสามารถเล็ดลอดผ่านช่องเปิดของทางเดินระบบสืบพันธุ์และเข้าไปเพิ่มจำนวนในเนื้อเยื่อมดลูก โดยผ่านเข้าไปได้ในระหว่างคลอด ซึ่งอาจมาจากสถานที่และอุปกรณ์ทำคลอดที่ไม่สะอาด หรือการจัดการคลอดที่ไม่ถูกวิธี นอกจากนี้การบาดเจ็บของเนื้อเยื่อมดลูกอาจทำให้เชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น และแบคทีเรียฉวยโอกาสก่อโรคได้ (Noakes, 2001; Sheldon *et al.*, 2006)

4.2 การติดเชื้อและการทำลาย แบคทีเรียสามารถอาศัยอยู่ในมดลูกได้ขึ้นอยู่กับความสามารถยึดเกาะเยื่อผนังมดลูกของแบคทีเรีย เช่น *E. coli* ไม่สามารถยึดเกาะได้ดีแต่สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่ *Staphylococcus* sp. สามารถยึดเกาะเยื่อผนังได้ดี เป็นต้น (Sheldon *et al.*, 2006) การติดเชื้อขึ้นอยู่กับปฏิกริยาระหว่างแบคทีเรียกับเซลล์เม็ดเลือดขาวบริเวณเยื่อผนังมดลูก หน้าที่ของเม็ดเลือดขาว คือ เซมิบและทำลายแบคทีเรีย ถ้าเม็ดเลือดขาวสามารถกำจัดแบคทีเรียออกไปได้ การติดเชื้อก็จะไม่เกิดขึ้น แต่ถ้าแบคทีเรียยังอยู่การอักเสบก็จะเรื้อรังตามมา (Bondurant, 1999)

แบคทีเรียจะยึดเกาะกับเยื่อผนังมดลูกและสร้างความเสียหายให้กับเนื้อเยื่อในบริเวณนี้จนเกิดการอักเสบ และถ้าหากไม่มีการลดการติดเชื้อหรือลดการเพิ่มจำนวนของเชื้อได้ แบคทีเรียจะลุกลามเข้าไปในเซลล์และทำลายเซลล์จนเป็นการอักเสบทั้งตัวมดลูกหรือเรียกว่ามดลูกอักเสบ (Sheldon *et al.*, 2006) แบคทีเรียที่เข้าไปยึดเกาะผนังมดลูกจะสร้างสารพิษและสารที่ระคายเคืองเป็นผลให้มีการหลั่งสารซึ่งทำให้ผนังหลอดเลือดอ่อนแอ เพิ่มการซึมผ่านของพลาสมา เพิ่มการยึดเกาะของเม็ดเลือดขาวชนิดมีนิวเคลียสหลายรูปร่าง (polymorphonuclear neutrophilic leukocytes; PMN) ต่อผนังหลอดเลือด และให้มาสู่บริเวณที่มีการติดเชื้อ (Dhaliwal *et al.*, 2001)

4.3 การอักเสบของเนื้อเยื่อมดลูก การเคลื่อนตัวเข้ามาของ PMN องค์ประกอบของซีรัมเลือด และของเหลวต่างๆ เป็นส่วนประกอบที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อของการอักเสบ การอักเสบอย่างอ่อนมักไม่พบอาการที่แสดงให้เห็นชัด การเปลี่ยนแปลงเริ่มแรกที่สามารถเห็นได้ชัดคือ มีเมือกและหนองไหลออกมาจากช่องคลอด มีกลิ่นเหม็นรุนแรง และถ้ามีอาการรุนแรงขึ้นอาจมีเลือดปนออกมาจากช่องคลอดด้วย (Sheldon and Dobson, 2004; Sheldon *et al.*, 2006)

5. อาการของโรค

การแบ่งประเภทของอาการตามการแสดงออกและช่วงระยะเวลาเกิดหลังคลอดสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

5.1 ชนิดแสดงอาการ (clinical sign) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

5.1.1 มดลูกอักเสบหลังคลอด (puerperal metritis) เกิดภายหลังคลอดประมาณ 10-14 วัน โดยลักษณะอาการที่พบ คือ มีหนองไหลออกมาตามช่องคลอด สีน้ำตาลอมแดง และกลิ่นเหม็น อุณหภูมิร่างกายสูงกว่าปกติ (มากกว่า 39.5 องศาเซลเซียส) จนมีอาการไข้ และผนังมดลูกหนาขึ้น (Lewis, 1997; Hajurka *et al.*, 2003; Zerbe *et al.*, 2003; Földi *et al.*, 2006; Sheldon *et al.*, 2006) บางครั้งอาจพบการอักเสบลุกลามไปถึงเยื่อหุ้มภายนอกลำไส้ (perimetritis) และอักเสบบริเวณเอ็นยึดระหว่างอวัยวะ (parametritis; Földi *et al.*, 2006)

5.1.2 เยื่อบุผนังมดลูกอักเสบชนิดเรื้อรัง (chronic/subacute endometritis) เกิดภายหลังคลอดประมาณ 21 วัน แต่ในช่วงต้นอาจสังเกตและพบอาการไม่ชัดเจน มักพบเป็นระยะเวลานาน อาการที่สังเกตเห็นได้ชัดคือ มีหนอง (มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์) หรือเมือกปนหนอง (อย่างละ 50 เปอร์เซ็นต์) ไหลออกมาตามช่องคลอด ปากมดลูกมีขนาดขยายใหญ่ขึ้นมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 7.5 เซนติเมตร (Drillich, 2006; Sheldon *et al.*, 2006) ทั้งนี้อาจพบเลือดคั่งบริเวณหลอดเลือดด้วย (Lewis, 1997) และมักไม่มีการแพร่เชื้อตามกระแสเลือดไปยังอวัยวะอื่น

5.2 ชนิดไม่แสดงอาการ (subclinical sign)

5.2.1 เยื่อบุผนังมดลูกอักเสบชนิดไม่แสดงอาการหรืออย่างอ่อน (subclinical endometritis) ภาวะนี้ไม่สามารถระบุระยะเวลาที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากการติดเชื้อในลักษณะนี้มักไม่แสดงอาการให้เห็นชัด มีอาการเป็นไข้ต่ำๆ และปรากฏหนองเพียงเล็กน้อยภายในมดลูก (Gilbert *et al.*, 2005; Kasimanickam *et al.*, 2005; Sheldon *et al.*, 2006) จึงยากต่อการสังเกตโดยต้องอาศัยการวินิจฉัยที่ละเอียดจากผู้เชี่ยวชาญ เป็นปัญหามากที่สุดในฟาร์มเกษตรกร โคยังสามารถเป็นสัตว์และตกไข่ แต่สภาพมดลูกไม่พร้อมรับการฝังตัวของคัพภะ จึงผสมไม่ติดและกลายเป็นโคผสมซ้ำหลายครั้ง และถูกคัดทิ้งในที่สุด (ปราจีน, 2541; Hajurka *et al.*, 2005)

6. การตรวจวินิจฉัย

การตรวจวินิจฉัยภาวะนี้จำเป็นสำหรับโคนมหลังคลอดเพราะมีผลกระทบต่อโคนมด้านระบบสืบพันธุ์ในระยะยาว การตรวจวินิจฉัยได้เร็วเพียงใดทำให้แก้ไขปัญหาก็ได้ทันที่ (Williams *et al.*, 2005; Sheldon *et al.*, 2006; Manspeaker, 2008) การตรวจวินิจฉัยมีหลายวิธีการซึ่งเหมาะแก่แต่ละประเภท โดยเหมือนหรือต่างกันก็ได้ ขึ้นอยู่กับเครื่องมือ อุปกรณ์ และค่าใช้จ่าย เช่น การสังเกตอาการภายนอกและการล้วงตรวจ (rectal palpation; Drillich, 2006) หรือการประเมินของเหลวที่อยู่ภายในช่องคลอดเพื่อเป็นการยืนยัน โดยใช้ uterine swab ซึ่งใช้ประเมินชนิดของแบคทีเรียได้ด้วย แต่มักไม่ใช่เป็นงานประจำเนื่องจากการเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต

Uterine swab เป็นการนำของเหลวที่ปรากฏภายในช่องคลอดออกมาประเมินลักษณะของเมือก (Sheldon and Dobson, 2004; Williams *et al.*, 2005; Sheldon *et al.*, 2006) ทำโดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า metrichk[®] หรือใช้มือสอดเข้าไปแล้วนำเอาของเหลวออกมาประเมินลักษณะตามตารางที่ 2 และ ภาพที่ 3 โดยจากตารางพบว่าระดับคะแนน 2 และ 3 จัดว่าโคอยู่ในภาวะนี้

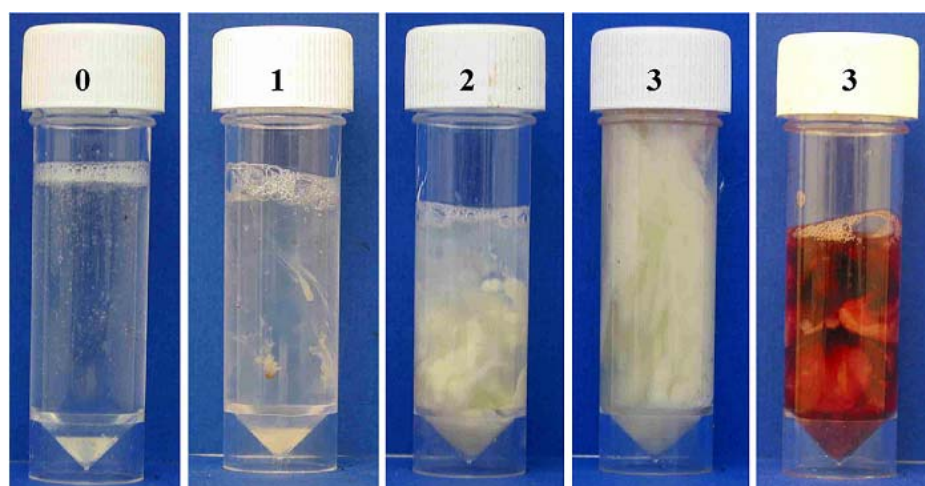
การส่องตรวจในช่องคลอด (vaginoscopy) เพื่อยืนยันความถูกต้องของภาวะเกิดโรค (LeBlanc *et al.*, 2002; Sheldon and Dobson, 2004; Drillich *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005; Sheldon *et al.*, 2006) การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสำหรับวิเคราะห์เชื้อสาเหตุ (Noakes *et al.*, 1991; Bonnett *et al.*, 1993; Lewis, 1997; Bondurant, 1999; LeBlanc *et al.*, 2002)

นอกจากนี้การตรวจวินิจฉัยเซลล์ (endometrial cytological examination) จากมดลูกโดยวิธี cytobrush method และเทคนิคการล้างเซลล์ (lavage technique) เพื่อตรวจสอบ neutrophils หรือ PMN (Rabb *et al.*, 2003; Gilbert *et al.*, 2005; Kasimanickam *et al.*, 2005) การตรวจสอบเนื้อเยื่อมดลูก (endometrial biopsy; Singh *et al.*, 1983) และการวินิจฉัยโดย ultrasonic เพื่อดูของเหลวภายในช่องคลอด (Kasimanickam *et al.*, 2005) หรืออาจใช้คลื่นเสียงเพื่อประเมินความผิดปกติ และความลึกของผนังเซลล์ (Fricke, 2002) ก็เป็นทางเลือกที่สามารถใช้ได้

ตารางที่ 2 ระดับคะแนนของภาวะมดลูกและเยื่อผนังมดลูกอักเสบ

คำอธิบาย	คะแนน
- ไสหรือมีเมือกใส	0
- ไสหรือมีเมือกใสและมีรอยค่างหรือหนองสีขาว	1
- ของเหลวน้อยกว่า 50 มิลลิลิตร และมีเมือกปนหนองสีขาวผิดปกติ้น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์	2
- ของเหลวน้อยกว่า 50 มิลลิลิตร และมีหนองสีขาวหรือเหลืองมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือบางครั้งอาจเป็นเลือดออกมา	3

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sheldon and Dobson (2004), Sheldon *et al.* (2006)



ภาพที่ 3 ลักษณะของหนองและเมือกที่ออกมาจากช่องคลอด ให้ระดับคะแนนเป็นไปตามแสดงในตารางที่ 2

ที่มา: Sheldon *et al.* (2006)

7. ผลกระทบของโรคต่อประสิทธิภาพการผลิต

นอกจากมีผลต่อการลดปริมาณน้ำนมและโปรตีนในน้ำนมแล้ว (Bell and Roberts, 2007) ยังมีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนมโดยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นความสมดุลของพลังงานจากอาหารชั้นและหยาดที่ ได้รับ สภาพแวดล้อมการเลี้ยงดู เทคนิคในการตรวจคัด การผสมเทียม คุณภาพของน้ำเชื้อที่ใช้ผสม ความสมดุลของฮอร์โมนที่จำเป็นต่อการตกไข่และอุ้มท้อง และประการสำคัญอย่างหนึ่งคือ การติดเชื้อหรือโรคต่างๆ (ปราจีน, 2541)

ทั้งมดลูกและเยื่อผนังมดลูกอักเสบส่งผลให้ความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนมลดต่ำลง การติดเชื้อไม่รุนแรงหรืออย่างอ่อน โคนมยังสามารถแสดงอาการเป็นสัด และสามารถปฏิสนธิกับอสุจิ กลายเป็นคัพพะ แต่ไม่สามารถฝังตัวที่ผนังมดลูกได้ เนื่องจากสภาพมดลูกยังไม่พร้อมรับการฝังตัว (ปราจีน, 2541; Hajurka *et al.*, 2005) การฝังตัวของคัพพะที่บริเวณเนื้อเยื่อผนังมดลูกเกิดจากอิทธิพลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนซึ่งมีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการฝังตัว ตลอดจนยับยั้งไม่ให้กล้ามเนื้อบริเวณมดลูกเกิดการบีบหดตัวในช่วงแรก โปรเจสเตอโรนยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาของ NK cells ทำหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเมื่อเข้าสู่ร่างกาย และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง cytokines ได้แก่ IL-4 และ IL-6 ซึ่งส่งเสริมการหลั่ง human chorionic gonadotropic hormone (hCG) เพื่อรักษาตัวอ่อน แต่หากเกิดการติดเชื้อจะส่งผลให้การสร้างโปรเจสเตอโรนลดลงหรือเกิดความแปรปรวนของระบบการหลั่ง ยังผลให้ NK cells, interferons และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นที่ทำหน้าที่ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมสามารถทำงานได้ โดยเฉพาะไปทำลายคัพพะในระยะแรกที่กำลังจะเกิดการฝังตัว ทำให้เกิดการไม่ยอมรับและถูกกลืนกินหรือขับออกไปนอกร่างกาย จึงเกิดการผสมไม่ติดและผสมช้าต่อมา (Gustáfsson *et al.*, 2004; Ishikawa *et al.*, 2004) Parma and Metha (1989) รายงานการศึกษาโคที่ผสมช้าในประเทศอินเดีย พบว่าปริมาณเม็ดเลือดขาวรวม และ eosinophils สูงกว่าโคปกติ ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อที่เนื้อเยื่อมดลูก

การอักเสบแบบเรื้อรัง พบว่าส่งผลกระทบต่อหรือกดการหลั่ง gonadotropin releasing hormone (GnRH) จากไฮโปทาลามัส ซึ่งส่งผลกระทบต่อหรือกระตุ้นการหลั่ง follicle stimulating hormone (FSH) และกระตุ้นการพัฒนาของกระเปาะไข่ในรังไข่ ทำให้กระบวนการสร้างและพัฒนาของไข่ช้าออกไป (Williams *et al.*, 2007) ทำให้วงจรการเป็นสัดช้าตามออกไปด้วย (Huszenicza *et al.*, 1999; Opsomer *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังมีผลต่อกระบวนการสร้างโปรสตาแกลนดินให้สร้างออกมา

น้อยกว่าระดับฐาน ส่งผลให้กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือสิ่งตกค้างภายในช่องคลอดซ้ำออกไป และไม่พร้อมสำหรับการเป็นสัดอีกครั้ง (Zain *et al.*, 1995; Hajurka *et al.*, 2005)

เยื่อบุผนังมดลูกอักเสบชนิดไม่แสดงอาการมีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนม (Kim and Kang, 2003; Rabb *et al.*, 2003; Bell and Roberts, 2007) Kim and Kang (2003) ศึกษาผลกระทบของภาวะนี้เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับผลกระทบ พบว่าระยะเวลาหลังคลอดถึงผสมครั้งแรก ระยะเวลาหลังคลอดถึงผสมติด และจำนวนครั้งผสมต่อการผสมติดตั้งท้อง ในกลุ่มที่ได้รับผลกระทบมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับผลกระทบ และอัตราการผสมติดเมื่อผสมครั้งแรกในกลุ่มที่ได้รับผลกระทบมีค่าต่ำกว่า ซึ่งจัดว่าลดความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนม Rabb *et al.* (2003) เปรียบเทียบผลกระทบของภาวะดังกล่าว โดยนับจำนวน PMN ผ่านวิธีการ cytobrush method และประเมินว่ากลุ่มที่มีปริมาณ PMN น้อยกว่า 5 เปอร์เซนต์ จัดเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับผลกระทบ ในทางกลับกันถ้ามีมากกว่า 5 เปอร์เซนต์ จัดเป็นกลุ่มที่ได้รับผลกระทบ ได้ผลว่ากลุ่มที่มีภาวะเกิดโรคทำให้อัตราการผสมติดเมื่อผสมครั้งแรกมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับผลกระทบ (46.1 และ 54.4 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ)

ผลต่ออัตราการตั้งท้อง Gilbert *et al.* (2005) พบว่ากลุ่มโคที่ไม่พบการติดเชื้อให้อัตราการตั้งท้องสูงกว่ากลุ่มที่พบการติดเชื้อในช่วงน้อยกว่า 100 วันหลังคลอด ซึ่งเวลาดังกล่าวเป็นช่วงวิกฤติสำหรับการอู้มท้อง แต่พบว่าในช่วงประมาณ 100-200 วันหลังคลอดให้ผลไม่แตกต่างกัน

8. การแก้ปัญหา ควบคุม และรักษาอาการของโรค

ปกติการรักษาอาการอักเสบหลังคลอดที่ตรวจพบการติดเชื้อ รวมทั้งในโคที่ผสมซ้ำหลายครั้งจะใช้การล้างมดลูก (uterine infusion) ด้วยยาต้านจุลชีพ ยาปฏิชีวนะ เช่น tetracycline (Sheldon and Noakes, 1998; Azawi, 2008) oxytetracycline (อุยฤทธิ์ และคณะ, 2544; Musal *et al.*, 2004; Földi *et al.*, 2006; Azawi, 2008) penicillin (Lewis, 1997) cephalixin (Dohmen *et al.*, 1995; McDougall, 2001; LeBlanc *et al.*, 2002; Kasimanickam *et al.*, 2005) cefquinime (Amiridis *et al.*, 2003) aminoglycosides (Cohen *et al.*, 1996; Baron, 2004; Sheldon *et al.*, 2004b) gentamycin, spectinomycin, sulfonamides และ nitrofurazone (Gilbert and Schwark, 1992) เป็นต้น

การเลือกใช้ยาเหล่านี้มีข้อจำกัดและต้องทำด้วยความระมัดระวัง เพราะอาจเกิดการดื้อยาของเชื้อสาเหตุ (Sheldon and Dobson, 2004; Kumar *et al.*, 2005) หรือมีผลข้างเคียง ความเข้มข้นของยามากเกินไปจะทำลายหรือสร้างความระคายเคืองต่อมดลูก หากเจือจางเกินไปจะไม่ได้ผลดี หรือฆ่าเชื้อได้เฉพาะบางชนิดเท่านั้น และอาจตกค้างในน้ำนม (ปราจีน, 2541; อยุทธ์ และคณะ, 2544; Dinsmore *et al.*, 1996; LeBlanc *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังลดความเสี่ยงโดยการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อภายนอกแบบเจือจาง เช่น น้ำยาไอโอดีน (Gilbert and Schwark, 1992) สารละลาย Lugol's iodine (Azawi, 2008) แต่การใช้อาจมีผลในการทำลาย phagocytic activity (Paisley *et al.*, 1986) และทำลายเซลล์ปกติ (Gilbert and Schwark, 1992) หรือใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับน้ำเกลือ (ปราจีน, 2541; Kumar *et al.*, 2005) โดยสามารถจัดสิ่งแปลกปลอมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของคัพภะได้ แต่ผู้ปฏิบัติต้องมีความชำนาญและเทคนิคต้องปลอดภัย สิ่งเหล่านี้เป็นหนทางหนึ่งที่จะลดความเสี่ยงได้

ปัจจุบันได้มีการวิจัยและพัฒนาวิธีการควบคุมรักษาอาการอักเสบหลังคลอด โดยคำนึงถึงข้อจำกัดดังกล่าวข้างต้น หนทางหนึ่งคือ การใช้ฮอร์โมน เช่น การใช้ prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (Bonnett *et al.*, 1990; Janowski *et al.*, 2001; Földi *et al.*, 2006; LeBlanc, 2008) เพื่อเร่งขับสิ่งแปลกปลอมให้ออกไปนอกร่างกาย นอกจากนี้ $PGF_{2\alpha}$ ให้ผลที่มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ penicillin หรือ tetracycline เนื่องจากเสี่ยงน้อยกว่าในการปนเปื้อนลงในน้ำนม (Gilbert, 1992; Olsen, 1996) แต่การใช้ให้ได้ประสิทธิภาพ LeBlanc (2008) แนะนำให้ใช้ในช่วง 4 ถึง 6 สัปดาห์หลังคลอด การใช้ฮอร์โมน estrogen เป็นอีกทางเลือกหนึ่งโดยช่วยให้มีการบีบตัวของกล้ามเนื้อ มดลูก กระตุ้นกระบวนการ phagocytosis สร้างเมือก และกระตุ้นการตกไข่และเป็นสัด (Bretzlaff, 1987; Hussain, 1989; Sheldon *et al.*, 2004a) หรือฮอร์โมน oxytocin เพื่อกระตุ้นการบีบตัวของมดลูก (Földi *et al.*, 2006)

การใช้สาร immunomodulation เช่น bacterial modulins, bacterial free filtrates, *E. coli* lipopolysaccharides, oyster glycogen และ leukotriene B_4 เป็นต้น (Subandrio and Noakes, 1992, 1997; Zerbe *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2000; Dhaliwal *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2005) สารเหล่านี้ช่วยเพิ่มจำนวน PMN และดึงดูดมายังบริเวณ uterus lumen เพื่อกำจัดแบคทีเรียสาเหตุและยังเพิ่ม IL-1 และ IL-8 ด้วย นอกจากนั้นแล้วยังพบว่าการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ เช่น มีการนำลำต้นใต้ดินของ *Gunnera perperisa* มาสกัดและทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุในห้องปฏิบัติการ (McGaw *et al.*, 2005) พบว่าสามารถยับยั้งเชื่อดังกล่าวได้

ในแง่ของการควบคุม และป้องกันสามารถกระทำได้ง่ายโดยในระหว่างการคลอควรมี การทำความสะอาดสถานที่ ตลอดจนอุปกรณ์ที่ใช้ และการจัดการสิ่งแวดล้อมก็มีความสำคัญ เนื่องจากจะทำให้โคมีสุขภาพดี ตลอดจนการให้โคได้รับโภชนาที่เพียงพอ เพื่อป้องกันสาเหตุโน้มนำ (Baldi *et al.*, 2000; Overton and Waldron, 2004) หากทำได้ตามนี้แล้วย่อมส่งผลให้โคไม่ ประสบปัญหาการเกิดโรค ให้ผลผลิตตามที่ต้องการ และที่สำคัญ คือ โคมีความสมบูรณ์พันธุ์ตาม เป้าหมายที่ต้องการ

ตะไคร้

ตะไคร้เป็นพืชในวงศ์กรามีนี (Gramineae Family) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cymbopogon citratus* Stapf. มีชื่อสามัญว่า lemon grass (วันดี, 2539; รุ่งรัตน์, 2540) ปลูกมากในประเทศ อินโดนีเซีย ศรีลังกา พม่า หมู่เกาะมาดากัสการ์ กัวเตมาลา และไทย เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณ ทางยารักษาโรคหลายประการ เช่น รักษาโรคทางระบบขับเบา ขับเหงื่อ ท้องอืด ลดความดันโลหิต เป็นต้น นอกจากนี้สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยยังมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและราอีกด้วย (Onawunmi, 1987)

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ตะไคร้แกงหรือตะไคร้บ้านเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี สูงประมาณ 1-2 เมตร เจริญรวมกัน เป็นกอใหญ่ ลำต้นมีลักษณะเป็นทรงกระบอก แข็งเกลี้ยง ตามปล้องมีไขปกคลุม ขยายพันธุ์โดยการ แแตกกอ (นิจศิริ, 2534) ใบเป็นใบเดี่ยว เป็นรูปขอบขนานแคบ กว้าง 2 เซนติเมตร ยาวได้ถึง 100 เซนติเมตร ปลายแหลม สากมือทั้งสองด้าน เส้นกลางใบแข็ง ตรงรอยต่อระหว่างกาบใบและตัวใบ จะมีเกล็ดบาง ยาว 2 มิลลิเมตร ปลายตัด ตามขอบมีขนเล็กน้อย เมื่อขยี้ใบจะมีกลิ่นหอมฉุน เนื่องจากมีน้ำมันหอมระเหย ดอกออกเป็นช่อกระจาย ช่อดอกย่อยมีก้านออกเป็นคู่ แต่มักไม่เห็น ดอก ผลขนาดเล็ก รากเป็นระบบรากฝอย ปลูกได้ในดินทุกชนิด ยกเว้นดินเหนียว และปลูกได้ทุก ฤดูกาล (รุ่งรัตน์, 2540) อายุให้ผลผลิตประมาณ 4 เดือน ไม่พบโรคและแมลงศัตรูพืชที่รุนแรงจน สร้างความเสียหาย (กองส่งเสริมพืชสวน, 2545)



ภาพที่ 4 ตะไคร้

ที่มา: สำนักงานข้อมูลสมุนไพร (2551)

2. พันธุ์ตะไคร้

ตะไคร้ที่ปลูกกันอยู่ทั่วไปในปัจจุบันมี 2 สายพันธุ์ (นิรนาม, 2547) คือ พันธุ์พื้นเมือง มีโคนต้นสีขาว ส่วนปลายของต้นมีสีแดงเล็กน้อย ขนาดของต้นไม่ใหญ่นัก จุดเด่นอยู่ที่มีกลิ่นหอมแรง จึงนิยมนำไปปรุงอาหาร เช่น ต้มยา หรือแกง เป็นต้น และพันธุ์เกษตร หรือพันธุ์โคราช มีลำต้นขนาดใหญ่ ตั้งแต่โคนต้นถึงปลาย เมื่อปลูกแล้วให้น้ำหนักดีกว่าพันธุ์พื้นเมือง แต่มีข้อด้อยอยู่ที่กลิ่นหอมน้อย เนื้อของตะไคร้แข็ง เมื่อปลูกไปแล้ว 6 เดือน หากไม่มีการเก็บเกี่ยวจะเกิดปล้องขึ้นที่ต้นในลักษณะคล้ายปล้องอ้อย จึงมีผู้นิยมปลูกน้อย เนื่องจากเหมาะสำหรับเพื่อเข้าโรงงานอุตสาหกรรม

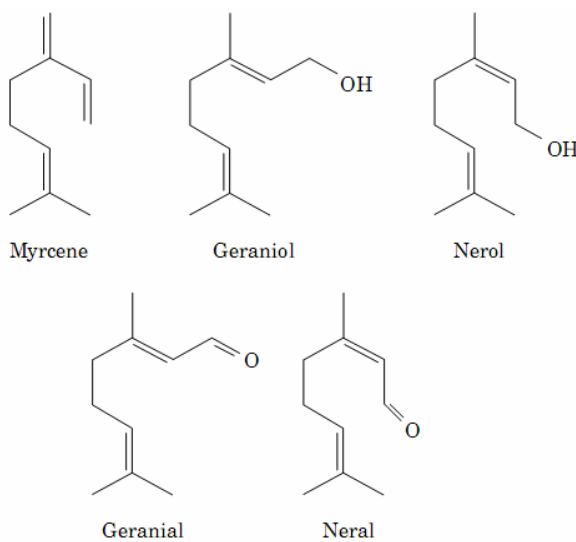
3. องค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางอาหาร

องค์ประกอบทางเคมีของตะไคร้อยู่ในรูปของน้ำมันหอมระเหย (essential oils) ร้อยละ 0.2-0.4 สารสำคัญ คือ Citral เป็นสารหลักที่พบถึงร้อยละ 65-85 สามารถแยกอนุพันธ์ได้เป็นสารประกอบ Geranial (α -citral) และ Neral (β -citral; สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2541; Onawunmi *et al.*, 1984) สารสำคัญอีกตัว คือ Myrcene โดยพบร้อยละ 12-20 (อานันท์, 2540) นอกจากนี้ยังพบสารอื่นอีก เช่น eugenol, iso-orientin, methyl heptanol, luteolin, 2-tridecanone, 1,4-cineole, 6-methyl 5-hepten-2-one, d-citronellic acid, dipentene, geraniol, nerol, linalool, linalool oxide, i-menthol, T-muurolol, seudenone, waxes, phenolic substance, citral diethyl acetate, bornyl acetate, geranyl acetate, geranic acid, caryophyllene, (+)-5-epi-neointermedeol,

cymbopol, cymbopogenol, cymboponol, β -sitosterol, amino acid, alcohol, saponin, hexacosanol และ tricotanol เป็นต้น (นันทวัน, 2530; อานันท์, 2540; มนตรี, 2545)

อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ส่วนที่มีน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด คือ ใบ โดยจะมีมากในใบอ่อน แต่ปริมาณ citral จะพบมากในใบแก่ โดยใบอ่อนพบ citral 77-79 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใบแก่พบ 83 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณ citral จะสูงสุดเมื่อต้นมีความชื้น 60-80 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิต่ำปริมาณน้ำมันหอมระเหยจะลดลง (นันทวัน, 2530) และปริมาณน้ำมันหอมระเหยจะมีมากที่สุดในฤดูแล้ง

คุณค่าทางอาหารของตะไคร้ในส่วนที่ใช้รับประทาน 100 กรัม มีปริมาณสารอาหาร ดังนี้ พลังงาน 126 แคลอรี น้ำ 65.6 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 1.2 กรัม คาร์โบไฮเดรต 25.5 กรัม เส้นใย 4.2 กรัม แคลเซียม 35 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 30 มิลลิกรัม เหล็ก 2.6 กรัม วิตามินเอ 427 หน่วย วิตามินบีหนึ่ง 0.05 มิลลิกรัม วิตามินบีสอง 0.02 มิลลิกรัม ไนอาซิน (niacin) 2.2 มิลลิกรัม และวิตามินซี 1 มิลลิกรัม (กระทรวงสาธารณสุข, 2530)



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ myrcene, geraniol, nerol, geranial และ neral

ที่มา: Lewinsohn *et al.* (1998)

4. การใช้ประโยชน์จากตะไคร้

ตะไคร้เป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์มากมาย ทั้งสรรพคุณทางยารักษาโรค และการใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรม ได้แก่ ใบ มีสรรพคุณเป็นยาขับลม แก้ผดผื่นคัน ช่วยไล่ลมเบ่งในขณะคลอดลูก แก้เบื่ออาหาร แก้โรคทางเดินปัสสาวะ และรักษาน้ำว (อานันท์, 2540; มนตรี, 2545; Pereira *et al.*, 2004) หัว มีสรรพคุณในการบำรุงธาตุไฟ แก้โรคทางเดินปัสสาวะ รักษาน้ำวเคลื่อนไหว แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ แน่นจุกเสียด แก้อาการขัดเบา (กระทรวงสาธารณสุข, 2530) ราก มีสรรพคุณแก้เสียดแน่นเสียดบริเวณหน้าอก ปวดกระเพาะอาหารและปัสสาวะ (Pereira *et al.*, 2004) ทั้งต้น มีสรรพคุณแก้ปัสสาวะเป็นเลือด ขับปัสสาวะ แก้ปวดท้อง ท้องอืดแน่น แก้โรคหืด เป็นยาทาเนื้องอกแก้ปวดเมื่อยเส้นตึง ฟกช้ำ ปวดข้อ แก้กลมวิงเวียน และประจำเดือนมาผิดปกติ (กระทรวงสาธารณสุข, 2530; อานันท์, 2540; มนตรี, 2545; Pereira *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้รักษาสัตว์ เช่น ใช้ตะไคร้มาทูปแล้วดองเกลือให้โค กระบือ กินจะช่วยรักษาโรคพยาธิใบไม้ในกระเพาะได้ (กรมปศุสัตว์, 2547) และน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ มีฤทธิ์ฆ่าเห็บโค (ณรงค์ และคณะ, 2542) และพยาธิ หมัด อีกหลายชนิด (Rim and Jee, 2006; Pedroso *et al.*, 2006)

ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรมของตะไคร้ มักใช้ส่วนของน้ำมันหอมระเหยไปใช้ประโยชน์ เช่น การใช้ในอุตสาหกรรมน้ำหอมและเครื่องสำอาง อาหารสำเร็จรูปและเครื่องชูรส เครื่องดื่มและน้ำอัดลม อุตสาหกรรมเกี่ยวกับสุขภัณฑ์และยาดับกลิ่น ยาฆ่าแมลง และอุตสาหกรรมเกี่ยวกับเครื่องหอม เป็นต้น (อานันท์, 2540; มนตรี, 2545)

5. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการทดสอบความเป็นพิษ

ใบและรากของตะไคร้มีสารออกฤทธิ์คล้ายอินซูลิน เป็นผงสีขาว มีรสขม ซึ่งไม่ใช่อัลคาลอยด์ กลัยโคไซด์หรือแทนนิน การรับประทานผงนี้ 1 กรัม มีความแรงเทียบเท่าอินซูลิน 440 หน่วย แต่ถ้าฉีดเข้าใต้ผิวหนังจะแรงเท่ากับอินซูลิน 880 หน่วย (โครงการศึกษาวิจัยสมุนไพร, 2532; กนกกาญจน์, 2536) ตะไคร้มีฤทธิ์ลดไข้ และลดการอักเสบ (Carlini *et al.*, 1986) การให้สารสกัดน้ำร้อนจากใบโดยการฉีดเข้าช่องท้องหนูขาวในขนาด 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดอุณหภูมิในร่างกายได้ และเมื่อให้สารสกัดน้ำร้อนจากใบแห้งเข้าภายในกระเพาะอาหารของหนูขาว ขนาด 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะแสดงฤทธิ์ลดการอักเสบของเท้าที่ถูกทำให้บวมด้วยการอักเสบ (Carlini *et al.*, 1986) ส่วนฤทธิ์แก้ปวด การกรอกน้ำมันหอมระเหยจากใบเข้ากระเพาะอาหาร หรือฉีดเข้า

ช่องท้องหนูถีบจักรเพศผู้ ขนาด 10, 15, 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถบรรเทาอาการปวดได้ (Viana *et al.*, 2000) citral มีฤทธิ์กระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ glutathione *S*-transferase (GST) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยลดสารพิษและต่อต้านสารก่อมะเร็งในเซลล์สัตว์ (Nakamura *et al.*, 2003) สาร citronellal เมื่อใช้ร่วมกับ citronellic acid หรือ rhodinic acid ฉีดเข้าใต้ผิวหนังหนูขาวทำให้หาเฉพาะที่ ลดการบีบตัวของกล้ามเนื้อลำไส้เล็กและมีผลย่อยเม็ดเลือดแดงของกระต่าย (โครงการศึกษาวิจัยสมุนไพร, 2532) myrcene มีคุณสมบัติลดความปวดที่ระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral analgesic effect) ในหนูแรท (Rao *et al.*, 1990)

การให้สารสกัดใบตะไคร้ด้วยน้ำในขนาด 20-40 ซีซีต่อกิโลกรัม ไม่พบพิษเมื่อกิน ไม่มีพิษต่อตัวอ่อนและไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว (Formigoni *et al.*, 1986) การให้หนูเพศผู้กินสารสกัดจากใบตะไคร้สดด้วยน้ำ ขนาด 125-500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทุกวันเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์และหาค่ากลูโคส คอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ พบว่าให้ค่าที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม จึงจัดว่าไม่เป็นพิษ (Adeneye and Agbaje, 2007) การให้คนรับประทานสารสกัดตะไคร้วันละ 2-10 กรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลา 2 อาทิตย์ ไม่พบอันตราย มีเพียง 2-3 รายที่บิลิรูบิน เอนไซม์ amylase เพิ่มขึ้นเล็กน้อย และไม่มีผลในการลดน้ำหนัก (Kobayashi, 1989) การให้คนสุขภาพดีรับประทานชาที่เตรียมจากตะไคร้ทุกวัน เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ แล้ววัดปริมาณของสารในเลือดและปัสสาวะ เช่น กลูโคส ยูเรีย คอเลสเตอรอล และบิลิรูบิน เป็นต้น พบว่าไม่มีความผิดปกติเกิดขึ้น (Leite *et al.*, 1986)

การศึกษาพิษต่อเซลล์ สารสกัดใบตะไคร้ด้วยเมทานอล ขนาด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ออกฤทธิ์ไม่แน่นอนต่อ human oral epidermoid carcinoma cell (CA-9KB; Arisawa, 1994) แต่ในขนาด 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อ human B lymphocyte cell (RAJI cell; Murakami *et al.*, 1993) น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เป็นพิษต่อเซลล์ P₃₈₈ mouse leukemia โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 5.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อผสมน้ำมันหอมระเหยของตะไคร้กับโหระพาช้าง (1:1 vol/vol) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 10.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Dubey *et al.*, 1997) ส่วนสกัดไม่เป็นพิษต่อเซลล์ murine lymphocytic leukemia P₃₈₈ (PS) และ murine ascites mammary carcinoma FM3A (FA) แต่สารสกัดยับยั้งแสดงฤทธิ์อย่างอ่อนต่อเซลล์ FA (Puatanachokchai *et al.*, 1993)

การศึกษาด้านพันธุศาสตร์ พบว่าสารสกัดตะไคร้ด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งการแตกหักของ DNA ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของสารไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐานโดย

วิธีอัลคาไลน์อีลูชัน (alkaline elution; อุษณีย์ และคณะ, 2534) สาร β -myrcene ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของความผิดปกติของโครโมโซม และการแลกเปลี่ยนส่วนของ sister chromatid exchange (SCE) ในโครโมโซมจาก lymphocytes ของคนที่เลี้ยงในหลอดทดลอง ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์ S 9-mix และไม่ทำให้มี mutation frequencies ที่ HPRT-locus ใน V79 cell เพิ่มขึ้น นอกจากนี้สารดังกล่าวสามารถลดจำนวน SCE ที่เกิดจากผลของ cyclophosphamide และยังลดความเป็นพิษต่อเซลล์และการก่อกลายพันธุ์ของ cyclophosphamide ใน V79 cell ได้ (Kauderer *et al.*, 1991) การศึกษาสารสกัดตะไคร้ด้วยเมทานอล โดยวิธี chromosome aberration assay โดยทดลองเลี้ยง lymphocytes ของคนในหลอดทดลอง แล้วทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมด้วย mitomycin C พบว่าความเข้มข้นของตะไคร้ที่ 3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดจำนวนความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดจาก mitomycin C ได้อย่างมีนัยสำคัญ (อำนาจ และคณะ, 2536)

6. ตะไคร้กับการศึกษาพิษวิทยาต่อจุลินทรีย์

นอกจากการใช้ประโยชน์ของตะไคร้ในด้านอื่นและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาแล้ว ยังได้มีการนำเอาตะไคร้มาศึกษาทดลองกับจุลินทรีย์ เช่น การทดสอบการกลายพันธุ์ โดยพบว่าสารสกัดตะไคร้ด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในการทดสอบกับเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA98 และ TA100 โดยวิธี Ames' test ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์ S 9-mix (Vinitketkumnuen *et al.*, 1994) หรือตะไคร้แห้งขนาด 400 ไมโครกรัมต่อจานเพาะเชื้อก็ไม่พบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อตัวเดียวกัน (Ostraff *et al.*, 2000) เมื่อนำน้ำต้มใบตะไคร้กับเนื้อ (โค ไก่ และสุกร) ขนาด 4, 8 และ 16 มิลลิกรัมต่อจานเพาะเชื้อ พบว่าไม่ก่อการกลายพันธุ์เช่นกัน (Onbunma *et al.*, 2002) สารสกัดตะไคร้ด้วยน้ำขนาด 0.5 ซีซีต่อจานเพาะเชื้อไม่มีผลก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อ *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) H-17 (Rec+) และ M-45 (Rec-; Ungsurungsie *et al.*, 1982) หรือการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งและต้านจุลินทรีย์ต่างๆ (อานันท์, 2540; Onawunmi *et al.*, 1984; Pereira *et al.*, 2004; Wright, n.d.)

การศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อเชื้อแบคทีเรีย Onawunmi *et al.* (1984) สกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี steam extraction พบว่า α -citral และ β -citral สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ การศึกษาจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วยวิธี agar disc diffusion สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* (Schuck *et al.*, 2001; Cimanga *et al.*,

2002; Wannissorn *et al.*, 2005; Akin-Osanaiye *et al.*, 2007) *Citrobacter diversus*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae* และ *Proteus vulgaris* (Cimanga *et al.*, 2002) *Salmonella* Typhimurium (Cimanga *et al.*, 2002; Wannissorn *et al.*, 2005) *S. Flexneri* (Cimanga *et al.*, 2002) *S. Typhi* (Akin-Osanaiye *et al.*, 2007) *S. Enteritidis* DMST 17368, *S. Agona* DMST 17365, *S. Braenderup* DMST 7443, *S. Derby* DMST 16881, *S. Gallinarum* DMST 15968, *S. Hadar* DMST 10634, *S. Mbandaka* DMST 7442, *S. Monterideo* DMST 7450, *S. Saintpaul* DMST 17242, *S. Schwarzergrund* DMST 17364, *S. Senftenberg* DMST 17013, *Clostridium perfringens* DMST 15191 และ *Campylobacter jejuni* DMST 15190 (Wannissorn *et al.*, 2005)

น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ด้วยวิธี hydrodistillation ต่อเชื้อก่อโรคทางระบบอาหารและทางเดินปัสสาวะ พบว่าที่ระดับ 100 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเชื้อสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ 71 จาก 79 สายพันธุ์ (89.9%) *K. pneumoniae* 6 จาก 7 สายพันธุ์ (85.7%) *P. mirabilis* 1 จาก 6 สายพันธุ์ (16.6%) *Morganella morganii* 2 จาก 4 สายพันธุ์ (50.0%) *Enterobacter aerogenes* 1 จาก 2 สายพันธุ์ (50.0%) *Klebsiella oxytoca* และ *P. aeruginosa* ไม่สามารถยับยั้งได้เลย เนื่องจากคือต่อสารสกัด (Pereira *et al.*, 2004)

การศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากตะไคร้ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าดังกล่าวต่อเชื้อ *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Choleraesuis*, *S. Derby*, *S. Enteritidis*, *S. Rissen*, *S. Senftenberg*, *S. Typhimurium* (non-DT 104 strain), *S. Typhimurium* DT104, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli* และ *Klebsiella pneumoniae* เท่ากับ 166.7, 166.7, 83.3, 166.7, 166.7, 83.3, 166.7, 166.7, >166.7, 166.7 และ >166.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Nanasombat and Lohasupthawee, 2005) หรือเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ต่อเชื้อ *S. aureus* 32 สายพันธุ์ ให้ค่าดังกล่าวที่ยับยั้งการเจริญ 90 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 17.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังช่วยเสริมฤทธิ์ยาปฏิชีวนะหลายชนิดในการยับยั้งกระบวนการสร้างโปรตีนผนังเซลล์ กรดโฟลิก และกรดนิวคลีอิก ต่อเชื้อดังกล่าวอีกด้วย (Betoni *et al.*, 2006) Chomnawang *et al.* (2005) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อก่อโรคได้แก่ *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 และ *S. epidermidis* ATCC 14990 ให้ค่าดังกล่าวเท่ากับ 5 และ >5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าแบคทีเรียเท่ากับ 5 และ >5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การศึกษาจำเพาะต่อเชื้อราและยีสต์ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida albicans* (*C. albicans*; Schuck *et al.*, 2001; Dutta *et al.*, 2007) และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญได้ และ citral ที่ระดับ 25 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง mycelial growth ได้ และยับยั้ง yeast-form ได้ที่ความเข้มข้นมากกว่า 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Abe *et al.*, 2003) ในขณะที่ Paranagama *et al.* (2003) ศึกษา น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ไปยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่แยกจากยุงนางข้าวสาร ให้ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งและฆ่าเชื้อราดังกล่าวเท่ากับ 0.6 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังลดการสร้าง AFB₁ ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ 2.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญได้ โดยยับยั้งการงอกของสปอร์ได้อย่างสมบูรณ์ และ Inouye *et al.* (2007) ศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Trichophyton mentagrophytes* พบว่าอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 20 นาที และระดับของน้ำมันหอมระเหย 0.1% Agar และ 10% NaCl-0.1% Agar ให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของราเท่ากับ 0.04% และ 0.02% ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส 20 นาที และระดับของน้ำมันหอมระเหย 0.1% Agar เท่ากับ 0.16%

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพร

หลังจากได้สารสกัดจากพืชสมุนไพรแล้ว ขั้นตอนต่อไปมีความสำคัญ คือ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ การทดสอบแบบเบื้องต้น และการทดสอบเฉพาะด้าน

1. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น

เป็นวิธีการทดสอบที่สะดวก รวดเร็ว ง่าย เชื่อถือได้ และลงทุนด้วย ใช้เครื่องมือในการทดสอบน้อยและสามารถใช้งบประมาณถึงการออกฤทธิ์ของสารสกัดได้อย่างกว้างขวาง

1.1 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยไรทะเล (brine shrimp lethality test) เป็นการทดสอบโดยใช้ไรทะเลซึ่งเป็นสัตว์น้ำเค็มขนาดเล็ก ไข่ (cysts) ทนทานต่อสภาพไม่เหมาะสมสูงและยาวนาน สามารถฟักตัวได้ในระยะเวลา 24 ถึง 36 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยง (Meyer *et al.*, 1982; Colegate and Molyneux, 1993) มีประโยชน์เป็นอาหารของสัตว์ทะเลวัยอ่อน และคุณสมบัติ

ที่สามารถเจริญได้ดีและรวดเร็ว แม้ในสภาวะห้องปฏิบัติการ สะดวกและง่ายต่อการเลี้ยง ราคาถูก หาซื้อง่ายตามท้องตลาด จึงนิยมนำมาใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้านพันธุกรรม รังสีวิทยา เภสัชวิทยา และพิษวิทยาจากสมุนไพร (Lincoln *et al.*, 1996; Pimenta *et al.*, 2003; Pisutthanan *et al.*, 2004; Wanyoike *et al.*, 2004; Yuenyongsawad and Tewtrakul, 2005; Krishnaraju *et al.*, 2005) โดยหาในค่าความเข้มข้นที่ทำให้ตายเป็นจำนวนครึ่งหนึ่ง (Lethal Concentration 50; LC₅₀)

1.2 การทดสอบฤทธิ์สารต้านจุลชีพ (susceptibility test) เป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด หรือยาต้านจุลชีพด้านหรือยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สามารถทำได้หลายวิธี แต่มีวิธีหลักๆ อยู่ 2 วิธี คือ การทดสอบแบบเจือจาง (dilution test) และการทดสอบโดยอาศัยการแพร่กระจายของสารต้านจุลชีพ เข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (diffusion test) โดยการทดสอบดังกล่าวจะต้องคำนึงถึงปัจจัย ดังนี้ คือ การเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณกล้าเชื้อ (inoculum) ระยะเวลาบ่มเพาะเชื้อ และชนิดของเชื้อที่ใช้ทดสอบ (เรืองทอง, 2543; อุไรวรรณ และคณะ, 2549; Koneman *et al.*, 1983)

1.2.1 การทดสอบแบบเจือจาง เป็นการทดสอบหาปริมาณ ความเข้มข้นของสารที่เข้าทำลายเชื้อได้ นิยมใช้ทดสอบเชื้อที่เจริญได้ช้า หรือเพื่อยืนยันผลกับวิธี agar disc diffusion ที่ให้ผลไวปานกลางหรือดื้อยา เพื่อว่าจะสามารถใช้สารต้านจุลชีพนั้นในจำนวนสูงได้ และใช้ทดสอบความไวของเชื้อที่เจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน การทดสอบแบ่งออกเป็น 2 การทดสอบ (เรืองทอง, 2543; อุไรวรรณ และคณะ, 2549)

ก. วิธีการทดสอบแบบเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (broth dilution method) เป็นการทดสอบโดยเจือจางสารที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลว นำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเติมลงในจำนวนที่เหมาะสม ในกรณีที่ใส่สารทดสอบปริมาณมากในหลอดทดลอง เรียกว่า macrodilution method และการทดสอบที่ใช้สารปริมาณน้อยๆ ควรทำใน microtiter plate เรียกว่า microdilution method

ข. วิธีการทดสอบแบบเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (agar dilution method) เป็นวิธีมาตรฐานการทดสอบความไวเชื้อแบบปริมาณวิเคราะห์ โดยเจือจางสารต้านจุลชีพในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและถ่ายเชื้อลงบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเป็นจุด เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ครั้งละหลายๆ แต่ไม่เหมาะกับการใช้งานประจำ ข้อดี คือ สามารถทดสอบเชื้อหลายชนิดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเดียวกันได้ และสามารถตรวจพบเชื้อปนเปื้อนหรือฆ่าเหล่าได้ แต่มี

ข้อเสีย คือ ไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimal bactericidal concentration; MBC) หรือความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อรา (minimal fungicidal concentration; MFC; อุไรวรรณ และคณะ, 2549)

1.2.2 การทดสอบด้วยการแพร่กระจายของสารต้านจุลชีพบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุด โดยเฉพาะ agar disc diffusion เป็นวิธีที่ทดสอบทางคุณภาพเท่านั้น ซึ่งต่างจากการทดสอบแบบชนิดเจือจางซึ่งเป็นการทดสอบด้านปริมาณ (เรืองทอง, 2543; อุไรวรรณ และคณะ, 2549) เนื่องจากวิธีการนี้ออกผลได้เพียงว่า เชื้อมีความไวต่อยา มีความไวปานกลาง หรือคือยา ไม่สามารถทราบค่า MIC หรือ MBC ได้ ไม่เหมาะกับการทดสอบเชื้อที่เจริญช้า และเชื้อที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ อย่างไรก็ตามก็เป็นวิธีการที่ใช้ทดสอบเป็นประจำในห้องปฏิบัติการที่ดีที่สุด และอาจใช้วิธีทดสอบแบบชนิดเจือจางร่วมด้วยเมื่อมีความจำเป็น (อุไรวรรณ และคณะ, 2549)

หลักการเป็นการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยการแพร่ของสารทดสอบไปยับยั้งจุลินทรีย์จากแหล่งเก็บกักสารผ่านตัวกลาง ซึ่งจะแสดงผลการยับยั้งจุลินทรีย์เป็นวงยับยั้ง หรือ inhibition zone โดยมีปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง คือ ขนาดของโมเลกุลของสารทดสอบ ปริมาณและอัตราการเจริญของเชื้อ ระยะเวลาในการเพาะเชื้อ ภาวะความเป็นกรดด่าง และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น (เรืองทอง, 2543; อุไรวรรณ และคณะ, 2549; Durmaz *et al.*, 2006)

2. การทดสอบเฉพาะด้าน

2.1 การทดสอบการต้านเชื้อไวรัส (antiviral activity) การทดสอบนี้โดยส่วนใหญ่ทำโดยการศึกษาลูก plaque reduction หรือ filter reduction ซึ่งทำโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นำมาทำให้ติดเชื้อโดย plaque forming unit ของไวรัส ต่อจากนั้นนำวุ้น หรือ methylcellulose มาเททับลงบนเซลล์ นำสารสกัดที่ต้องการทดสอบมาวางบนผิวหน้าหรือวางบนแผ่น disc ในปริมาณที่แตกต่างกัน เมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ถึง 48 ชั่วโมง จะแสดงถึงผลการยับยั้งเชื้อไวรัส

2.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) การทดสอบนี้มักใช้เซลล์ที่ต้องการทดสอบว่าสารสกัดจากสมุนไพรมีผลต่อเซลล์ดังกล่าว โดยทั่วไปมักจะใช้ทดสอบกับเซลล์มะเร็งหรือเซลล์ของเนื้อเยื่อส่วนที่สัมพันธ์กับการใช้สารทดสอบในหลอดทดลอง การทดสอบความเป็น

พิษต่อเซลล์ทำได้โดยใช้วิธี MTT assay และคำนวณหาค่า Inhibitory concentration (IC_{50}) (วีระ, 2546; กัลยาณี, 2547; Tanaka and Umesaki, 2000)

ด้วยสรรพคุณของตะไคร้ โดยเฉพาะในส่วนของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและรา น่าจะสามารถนำมาทดสอบใช้เป็นยาภายนอกเฉพาะที่ในรูปยาละลายชะล้างมดลูกแม่โคที่พบอาการติดเชื้ออักเสบของเยื่อผนังมดลูกอักเสบหลังคลอดเพื่อแก้ปัญหาการติดเชื้อแบบไม่รุนแรง แม้จะไม่มีข้อมูลชัดเจนเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ และสรรพคุณเมื่อใช้เป็นยาภายนอกก็ตาม แต่น่าจะนำมาทดลองเพื่อเป็นทางเลือกที่จะเป็นประโยชน์แก่ทั้งเกษตรกรผู้มีอาชีพปลูกตะไคร้ และเลี้ยงโคนม โดยมุ่งที่จะศึกษาหาวิธีการสกัดตะไคร้ด้วยวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ให้เหมาะสม เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ และป้องกันความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นกับเยื่อผนังมดลูก จึงจำเป็นต้องศึกษาพิษของสารสกัดต่อเซลล์ด้วยไรทะเล เพื่อทำนายระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ก่อนนำไปใช้ทดลองในระดับฟาร์มเพื่อแก้ปัญหาการเป็นสัดหลังคลอด และการผสมติดของโค อันเนื่องมาจากการตอบสนองต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชทดลอง

ต้นตะไคร้แกงหรือตะไคร้บ้าน (*C. citratus* Stapf.) สดทั้งต้น ยกเว้นราก อายุ 90 วัน จากเกษตรกรผู้ปลูกตะไคร้ อำเภอนาทม จังหวัดน่าน ในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2548

2. สารเคมีและตัวทำละลายสำหรับการสกัดพืชทดลอง

- 2.1 เอทานอลบริสุทธิ์ (analytical grade; Merck, Germany)
- 2.2 เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์
- 2.3 เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น; commercial grade)
- 2.4 น้ำกลั่น

3. สารสกัดจากพืชทดลอง

สารสกัดจากตะไคร้ที่ได้จากสารเคมีและตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดทั้ง 4 ชนิด (การทดลองที่ 1)

4. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการสกัดพืชทดลอง

- 4.1 ตู้อบความร้อน (hot air oven; Memmert Model UNE 800, Germany)
- 4.2 เครื่องปั่น (blender; Moulinex T71 Blender, France)
- 4.3 เครื่องเขย่า (shaker; New Brunswick Scientific, USA)
- 4.4 เครื่องระเหยตัวทำละลายชนิด rotary vacuum evaporator (Buchi Rotavapor R-200, Switzerland)
- 4.5 เครื่องอบแห้งแบบแช่แข็ง (freeze drier; Savant SuperModulyo, Thermo Scientific, USA and LABCONCO Stoppering Tray Dryer, USA)

4.6 ตู้เย็นสำหรับเก็บสารสกัด (Hitachi R60LS-1, Japan)

4.7 เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Acculab ALC-320.3, USA)

4.8 เครื่องแก้ว ได้แก่ Erlenmeyer Flask (Pyrex, USA) ขนาด 500 มิลลิลิตร, กรวยกรอง (funnel; Pyrex, USA), Beaker (Pyrex, USA) ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร และ Cylinder (Kimax, USA) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

4.9 ขวดสีชาสำหรับเก็บสารสกัด

4.10 กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatmann no.1, England)

4.11 ผ้าขาวบาง

5. แบคทีเรียทดสอบ

5.1 แบคทีเรียสาเหตุ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Arcanobacterium pyogenes* ATCC 8104

5.2 แบคทีเรียสาเหตุ *Salmonella typhimurium* ATCC 16809 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้รับการสนับสนุนจาก รศ.ดร. ฌรณี ตูย์เต็มวงศ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

6. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic soy broth (TSB; Difco, USA)

6.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tryptic soy agar (TSA; Difco, USA)

7. สารเคมีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ และประสิทธิภาพของสารสกัดต่อแบคทีเรีย

7.1 sulfuric acid (H_2SO_4 ; Merck, Germany)

7.2 barium chloride ($BaCl_2$; Prolabo, USA)

7.3 sodium chloride ($NaCl$; Oxoid, England)

7.4 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC; Merck, Germany)

7.5 dimethyl sulfoxide (DMSO; Merck, Germany)

7.6 defibrinated sheep blood (สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยมหิดล)

7.7 ยาปฏิชีวนะ tetracycline hydrochloride (Sigma-Aldrich, England)

8. วัสดุอุปกรณ์สำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์ และประสิทธิภาพของสารสกัดต่อแบคทีเรีย

8.1 ตู้บ่มเชื้อ (incubator; Memmert Model INE 800, Germany)

8.2 autoclave (Sanyo, Labo Autoclave MLS-3020, Japan)

8.3 ตู้เป่าเชื้อแบบ Laminar flow (ISSCO Laminar flow Model HT122, USA)

8.4 vortex mixer (Vortex-2 Genie Model G650E, USA)

8.5 anaerobic jar (Vacu-Quik Jar, Almore International, Inc., USA)

8.6 autopipette (Labmate High Tech Lab, Poland) ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

8.7 tip พร้อมกล่อง (CLP Neptune, USA) ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

8.8 microtube with cap (Sigma-Aldrich, England) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

8.9 96 microwell plates แบบ round bottom with lid (Costa, USA)

8.10 gas pack (Becton, Dickinson and Company, USA)

8.11 แผ่นกรอง (paper disc) เส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร (Macherey-Nagel, Germany)

8.12 ก้านพันสำลี (cotton swab)

8.13 เครื่องแก้ว ได้แก่ หลอดทดลองพร้อมฝาเกลียว (Duran, Germany) ขนาด 16x160

มิลลิเมตร, จานเพาะเชื้อ (petri dish; Pyrex, USA) ขนาด 90 x 15 มิลลิเมตร

8.14 stainless test tube rack ขนาด 5 x 10 ช่อง

8.15 กระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร (cellulose acetate filter; Sartorius, Germany)

8.16 กระบอกฉีดยา (Nipro disposable syringe; Nipro Medical Corporation, Japan)

8.17 คีมคีบ (forcep)

8.18 ไม้บรรทัดสำหรับวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้ง (inhibition zone)

8.19 ห่วงเป่าเชื้อ (loop)

8.20 ตะเกียงแอลกอฮอล์

9. ไข่ทดลองที่ใช้ทดสอบหาระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic)

ไข่ของไรทะเล (*Artemia salina* Linn. Cysts; SK Trading Co., Ltd., Thailand)

10. สารเคมีและตัวทำละลายที่ใช้ทดสอบหาระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic)

10.1 dimethyl sulfoxide (DMSO; Merck, Germany)

10.2 เกลือทะเลเทียม (artificial sea salt; Mariscience Int'l Co., Ltd., Thailand)

11. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ทดสอบหาระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic)

11.1 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereomicroscope; MP-613, Coin Optics, USA)

11.2 โคมไฟตั้งโต๊ะ

11.3 96 microwell plates แบบ flat bottom (Costa, USA)

11.4 หลอดทดลองสำหรับเชื้อจางสารสกัด (Pyrex, USA)

11.5 เครื่องฟั่นฟองอากาศ พร้อมสายพลาสติกใสขนาดเล็กและหินโปรง

11.6 ถังพลาสติกสำหรับฟักไข่ของไรทะเล

11.7 อลูมิเนียมฟลอยด์

11.8 ผ้าขาวบาง

11.9 กระดาษกราฟ

วิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดตะไคร้

1.1 การเตรียมตะไคร้

นำตะไคร้แก่หรือตะไคร้บ้านสดทั้งต้น ชกเว้นรากมาล้างทำความสะอาดและผึ่งให้แห้งในที่ร่ม หั่นให้มีขนาดความยาวประมาณ 0.5 ถึง 1.0 เซนติเมตร อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน ด้วยตู้อบความชื้น และนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องปั่น เก็บใส่ถุงพลาสติกปิดให้มิดชิดเพื่อป้องกันความชื้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนที่จะนำมาใช้สกัด

1.2 กระบวนการสกัดเย็นโดยวิธีการหมัก

นำตะไคร้ที่ผ่านการอบและบดแล้ว มาสกัดโดยวิธีการหมัก ในตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เอทานอลบริสุทธิ์ เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น) และน้ำกลั่น

ชั่งผงตะไคร้ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาณ 50 กรัมต่อขวด จำนวน 16 ขวด จากนั้นเติมตัวทำละลายแต่ละชนิดในปริมาตร 300 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของผงตะไคร้ต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 1 ต่อ 6) ตัวทำละลายละ 4 ขวด (ซ้ำ) นำไปเข้าเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วนำมารองเอาส่วนของเหลวออกจากกากด้วยผ้าขาวบาง และกรองซ้ำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนกากที่เหลือนำมาสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมในอัตราส่วนเท่าเดิมอีก 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดมารวมกัน เข้าเครื่องระเหยตัวทำละลายชนิด rotary vacuum evaporator (ชกเว้นสารสกัดจากตัวทำละลายน้ำกลั่น) เพื่อให้สารสกัดเข้มข้นขึ้น โดยใช้อุณหภูมิการระเหยไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส (พรทิพย์ และคณะ, 2542) จากนั้นนำสารสกัดจากทุกตัวทำละลายไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องอบแห้งแบบแช่แข็ง จะได้สารในรูปแบบของสารสกัดหยาบ

1.3 การบันทึกข้อมูล

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

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

1.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design; CRD) และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS Ver. 8.2 (SAS, 2001) 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 $\sim \text{NID}(0, \sigma_\varepsilon^2)$

2. การทดสอบฤทธิ์ และประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดจากตะไคร้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี agar disc diffusion โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Bauer *et al.* (1966)

2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538P, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. typhimurium* ATCC 16809, *P. aeruginosa* ATCC 27853 จาก stock เชื้อ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ทำให้เชื้อกระจายในอาหารโดยใช้ vortex mixer นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง (Bauer *et al.*, 1966) และเชื้อ *A. pyogenes* ATCC 8104 จาก stock เชื้อ นำมาเลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกัน แต่จะผสม 5% defibrinated sheep blood นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิเดียวกับข้างต้น ในสภาวะ anaerobic condition เป็นระยะเวลา 48 ถึง 72 ชั่วโมง (Sneath *et al.*, 1986; Jost and Billington, 2005) จากนั้นนำห้วงเชื้อจุ่มเชื้อแบคทีเรียมา 1 loop มา streak บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA กรณีเชื้อ *A. pyogenes* ผสม 5% defibrinated sheep blood เช่นกัน บ่มที่สภาวะและระยะเวลาเดิม จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB เช่นเดียวกับข้างต้นอีกครั้ง บ่มที่สภาวะและระยะเวลาเดิม นำเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบทั้งหมดมาปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลาย McFarland no. 0.5 โดยใช้สารละลายนอร์มัลซาลีน (sodium chloride 0.85% solution) ปลอดเชื้อ จะทำให้ได้เชื้อประมาณ 1.5×10^8 colony forming unit (CFU) ต่อมิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายของสารสกัดและสารสกัดแบบแผ่นแห้ง

นำสารสกัดตะไคร้ปริมาณ 0.5 กรัม ละลายในตัวทำละลายที่ใช้สกัด ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำให้ได้สารสกัดที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงใน microtube ปลอดเชื้อ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำแผ่นกรองปลอดเชื้อ (sterile paper disc) วางลงในจานเพาะเชื้อมาแล้ว ใช้ autopipette ดูดสารละลายของสารสกัด 30 ไมโครลิตร หยดตรงกลางแผ่น ทำให้ได้สารสกัด 15 มิลลิกรัมต่อแผ่น ในแผ่น disc อีก 2 แผ่น จะหยดตัวทำละลายแต่ละชนิดในปริมาตร 30 ไมโครลิตร ซึ่งจัดเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) และหยดยาปฏิชีวนะ tetracycline ปริมาตร 30 ไมโครกรัม ในอีกแผ่น จัดเป็นตัว

ควบคุมเชิงบวก (positive control) ตั้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ควบคุมการเจริญของเชื้อต่อไป

2.3 การทดสอบกับสารสกัด

ใช้ก้านพันสำลีปลอดเชื้อ (sterile cotton swab) จุ่มในสารละลายเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด และกระจายสารละลายเชื้อให้ทั่วผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA รอให้ผิวน้ำอาหารแห้งประมาณ 5 นาที ใช้คีบคีบปลอดเชื้อ (sterile forcep) คีบเอา disc วางลงบนอาหารเพาะเชื้อให้แนบกับผิวน้ำ โดยให้ห่างกันประมาณ 15 ถึง 20 มิลลิเมตร และห่างจากขอบจานอาหารประมาณ 15 มิลลิเมตร นำเชื้อ 5 ชนิดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง (Bauer *et al.*, 1966) ส่วนเชื้อ *A. pyogenes* บ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน ในสภาวะ anaerobic condition เป็นระยะเวลา 48 ถึง 72 ชั่วโมง (Sneath *et al.*, 1986; Jost and Billington, 2005) โดยคว่ำอาหารลงด้านล่าง ในการทดลองแต่ละเชื้อทดสอบ และตัวทำลาย จะทดสอบจำนวน 4 ซ้ำ

2.4 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้งที่เกิดขึ้นใน 2 แนว คือ แนวตั้งและแนวนอนของแต่ละเชื้อทดสอบและตัวทำลาย เพื่อหาค่าเฉลี่ย (Bauer *et al.*, 1966)

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดโดยวิธีของ DMRT โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS Ver. 8.2 (SAS, 2001) ซึ่งมีหุ่นจำลองทางสถิติ ดังนี้

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

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

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

μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมดของสิ่งตัวอย่าง

τ_i = อิทธิพลเนื่องจากชนิดของตัวทำลาย

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

3. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration; MIC and Minimal bactericidal concentration; MBC) โดยวิธี broth dilution โดยดัดแปลงตามวิธีการของ CLSI (2006)

3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อเช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ และประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดจากตะไคร้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี agar disc diffusion

3.2 การทดสอบหาค่า MIC

3.2.1 macrobroth dilution

เตรียมสารสกัดแต่ละตัวทำลายใน 10 เปอร์เซ็นต์ DMSO ให้มีความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในหลอดปลอดเชื้อเพื่อนำไปทดสอบหาค่า MIC ต่อไป

จัดหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ ลงใน rack จำนวน 4 แถวๆ ละ 10 หลอดต่อหนึ่งชุดการทดลอง ในแต่ละหลอดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ปริมาตร 1.98 มิลลิลิตร เติมสารสกัด 1.98 มิลลิลิตร ลงในหลอดแรก ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer คูณสารผสมจากหลอดแรก เติมลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน ทำการเจือจางเช่นเดียวกันนี้ในหลอดที่ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 จนครบ คูณสารละลายในหลอดที่ 8 ปริมาตร 1.98 มิลลิลิตร ทั่วไป หลอดที่ 9 เป็นชุดควบคุมเชิงบวก โดยเติมยา

ปฏิชีวนะ tetracycline (ความเข้มข้นสุดท้าย 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แทนสารสกัด และหลอดที่ 10 ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงลบ จะไม่เติมสารสกัด ใช้ autopipette เติมสารละลายแบคทีเรียลงในหลอดละ 20 ไมโครลิตร ทำให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดตั้งแต่หลอดที่ 1 ถึง 8 คือ 148.50, 74.25, 37.13, 18.56, 9.28, 4.64, 2.32 และ 1.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำหลอดทดสอบของเชื้อ 5 ชนิดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง (Bauer *et al.*, 1966) ส่วนเชื้อ *A. pyogenes* บ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน ในสภาวะ anaerobic condition เป็นระยะเวลา 48 ถึง 72 ชั่วโมง (Sneath *et al.*, 1986; Jost and Billington, 2005) อ่านผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ หรือ MIC หลังการบ่ม โดยสังเกตจากตะกอนขุ่นของเชื้อในหลอดทดลอง ซึ่งจะทดสอบจำนวน 4 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ย

3.2.2 microbroth dilution

เตรียมสารสกัดแต่ละตัวทำละลายใน 10 เปอร์เซ็นต์ DMSO ให้มีความเข้มข้น 594 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ลงใน microtube ปลอดเชื้อ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางแบบ two-fold dilution ให้ได้ความเข้มข้น 297.00, 148.50, 74.25, 37.13, 18.56, 9.28, 4.64, 2.32 และ 1.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทดสอบใน 96 microwell plates (round bottom) โดยในแต่ละหลุมประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ปริมาตร 90 ไมโครลิตร สารละลายของสารสกัดที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารละลาย TTC 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และสารละลายแบคทีเรีย 5 ไมโครลิตร ทั้งหมด 9 แถว ส่วนอีก 3 แถวที่เหลือเติมตัวทำละลาย 20 เปอร์เซ็นต์ DMSO และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แทนสารสกัด นำ 96 microwell plates ของเชื้อ 5 ชนิดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง (Bauer *et al.*, 1966) ส่วนเชื้อ *A. pyogenes* บ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน ในสภาวะ anaerobic condition เป็นระยะเวลา 48 ถึง 72 ชั่วโมง (Sneath *et al.*, 1986; Jost and Billington, 2005) อ่านผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ หรือ MIC หลังการบ่ม โดยสังเกตหลุมที่ไม่มีการเปลี่ยนสีของ TTC เป็นสีชมพูแดง หรือเปรียบเทียบกับแถวควบคุมซึ่งหยดสารละลาย McFarland no. 0.5 ปลอดเชื้อ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แทนสารละลายแบคทีเรีย การทดสอบหาค่า MIC ซึ่งจะทดสอบจำนวน 4 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ย

3.3 การทดสอบหาค่า MBC

หาค่า MBC โดยใช้ห้วงเชื้อ จุ่มลงในหลอดหรือหลุมที่เชื้อไม่เจริญในทุกความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้มาจากการทดสอบหาค่า MIC จำนวน 1 loop นำไป streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA สำหรับการทดสอบกับเชื้อ *A. pyogenes* เดิม 5% defibrinated sheep blood ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง นำเชื้อ 5 ชนิดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง (Bauer *et al.*, 1966) ส่วนเชื้อ *A. pyogenes* บ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน ในสภาวะ anaerobic condition เป็นระยะเวลา 48 ถึง 72 ชั่วโมง (Sneath *et al.*, 1986; Jost and Billington, 2005) โดยคว่ำอาหารลงด้านล่าง อ่านผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนจานอาหารหลังการบ่ม โดยความเข้มข้นที่ไม่พบเชื้อจะมีค่าเป็น MBC

3.4 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ซึ่งจัดว่าเป็นค่า MIC และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA โดยความเข้มข้นที่ไม่พบเชื้อจะมีค่าเป็น MBC

4. การทดสอบพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) ด้วยไรทะเล

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบหาระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยไรทะเล (*Artemia salina* Linn.) ของสารสกัดตะไคร้ โดยวิธี brine shrimp lethality assay ที่ประยุกต์ใช้กับสมุนไพรไทย (Yuenyongsawad and Tewtrakul, 2005) เพื่อใช้ทำนายความเป็นพิษวิทยาที่มีผลต่อเซลล์ และระดับการใช้สารสกัดจากตะไคร้ที่ได้ผลในการทดลองกับสัตว์ในฟาร์ม

4.1 การเพาะเลี้ยงไรทะเล

ไรไข่ (cyst) ของไรทะเลลงในน้ำทะเลเทียม (เกลือทะเลเทียม 38 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) ให้ทั่วผิวหน้า ปิดให้เหลือช่องครึ่งหนึ่งของกล่องด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ เนื่องจากไรทะเลจะฟักตัวในที่มืด ให้อากาศโดยใช้เครื่องพ่นฟองอากาศ (air pump) เปิดคอมไฟ

เพื่อให้ไรทะเลที่ฟักตัวแล้วเคลื่อนตัวออกมาสู่อีกด้านหนึ่ง เมื่อครบเวลา 24 ถึง 36 ชั่วโมง (Browne *et al.*, 1991) จึงนำมาใช้ในการทดสอบ

4.2 การเตรียมสารสกัดตะไคร้

เตรียมสารสกัดแต่ละตัวทำละลายโดยชั่งสารสกัด 2 กรัม ลงในหลอดทดลอง เติม 10 เปอร์เซ็นต์ DMSO ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และน้ำทะเลเทียม ปริมาตร 6 มิลลิลิตร จะให้ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำทะเลเทียมให้ให้ความเข้มข้น 60, 30, 20, 15, 10, 5, 2, 1, 0.2, 0.1, 0.02, 0.01, 0.002, 0.001, 0.0002 และ 0.0001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อใช้ในการทดสอบพิษต่อเซลล์ต่อไป

4.3 การทดสอบความเป็นพิษ

นับไรทะเลที่ฟักตัวแล้วใส่ลงใน 96 microwell plates (flat bottom) ซึ่งใส่น้ำทะเลเทียม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยใช้ autopipette ขนาด 200 ไมโครลิตร จำนวนระหว่าง 10 ถึง 15 ตัว จุดสารสกัดตะไคร้ที่เตรียมไว้แล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร ของแต่ละความเข้มข้นๆ ละ 6 wells จะให้ความเข้มข้นสุดท้ายลดลงครึ่งหนึ่งจากเริ่มต้น นำฝาปิดตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อรอการตรวจผลการทดสอบต่อไป จะทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ ในทุกการวิเคราะห์ เพื่อหาค่าเฉลี่ย

4.4 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลจำนวนไรทะเลขณะเริ่มต้นทดลอง จำนวนที่ตายและรอดชีวิตที่เวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปคำนวณและวาดกราฟ เพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death (Colegate and Molyneux, 1993) เพื่อทำนายความเป็นพิษของสารสกัด

สถานที่ทำการทดลอง

1. การศึกษาการเตรียมสารสกัดตะไคร้ ทำการทดลองที่ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน
2. การทดลองในห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับจุลชีววิทยา และการทดสอบพืชต่อเซลล์ด้วยไรทะเล ทำการทดลองที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ระยะเวลาในการทดลอง

เดือนมกราคม 2550 ถึง พฤษภาคม 2551 รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 16 เดือน

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การเตรียมสารสกัดตะไคร้

จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างตะไคร้สดที่นำมาศึกษามีเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง 22.48 ± 1.42 และจากการศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดจากตะไคร้ด้วยตัวทำละลายต่างๆ กัน พบ ลักษณะของสารสกัดที่ได้จากเอทานอลบริสุทธิ์ เป็นสารข้นเหนียวมาก สีน้ำตาลดำ กลิ่นหอม จากเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลึกกึ่งของแข็ง สีน้ำตาล กลิ่นหอม จากเอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น) เป็นผลึกกึ่งของแข็ง สีน้ำตาล กลิ่นหอม และจากน้ำกลั่นเป็นสารข้นเหนียว สีน้ำตาล กลิ่นหอม ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 6)

เปอร์เซ็นต์สารสกัดหยาบที่ได้จากทั้ง 4 ตัวทำละลาย แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยสารสกัดที่ได้จากเอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น) มีปริมาณมากที่สุด คือ 24.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ สารสกัดที่ได้จากเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ คือ 20.20 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดที่ได้จากน้ำกลั่น คือ 12.20 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดที่ได้จากเอทานอลบริสุทธิ์ คือ 9.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ลักษณะ สี กลิ่น และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้จากการสกัด (extract yield) ของสารสกัดจากตะไคร้ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ตัวทำละลาย	ลักษณะ สี และกลิ่นสารสกัด	เปอร์เซ็นต์ผลผลิต
เอทานอลบริสุทธิ์	สารขุ่นเหนียวมาก สีน้ำตาลดำ กลิ่นหอม	9.44 ^d ± 1.92
เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์	ผลึกกึ่งของแข็ง สีน้ำตาล กลิ่นหอม	20.20 ^b ± 1.68
เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)	ผลึกกึ่งของแข็ง สีน้ำตาล กลิ่นหอม	24.67 ^a ± 0.41
น้ำกลั่น	สารขุ่นเหนียว สีน้ำตาล กลิ่นหอม	12.20 ^c ± 0.70
SEM		0.67

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± standard deviation)

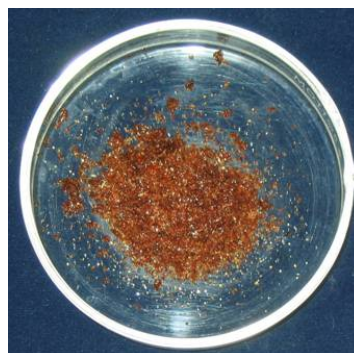
^{a,b,c,d} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

(P<0.05)

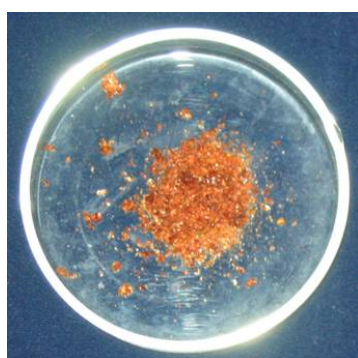
SEM = standard error of mean



ก.



ข.



ค.



ง.

ภาพที่ 6 ลักษณะ และสีของสารสกัดตะไคร้ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ก. สารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์

ข. สารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์

ค. สารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)

ง. สารสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น

2. การทดสอบฤทธิ์ และประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดจากตะไคร้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี agar disc diffusion

จากผลการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ และประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดจากตะไคร้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุบางชนิดของมดลูกอักเสบและเยื่อบุผนังมดลูกอักเสบในโคนม ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* และ *A. pyogenes* โดยวิธี agar disc diffusion พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดจากทุกตัวทำละลายสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *A. pyogenes* ได้ โดยสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น) และน้ำกลั่น ให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้งต่อ *B. subtilis* คือ 13.25, 12.50, 11.00 และ 13.38 มิลลิเมตร ตามลำดับ *A. pyogenes* คือ 17.13, 14.38, 12.50 และ 16.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ไวต่อสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ และน้ำกลั่น โดยให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้งต่อ *E. coli* คือ 10.38 และ 13.38 มิลลิเมตร ตามลำดับ *S. aureus* คือ 11.69 และ 13.38 มิลลิเมตร ตามลำดับ เชื้อ *S. typhimurium* ไวต่อสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น) และน้ำกลั่น โดยให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้ง คือ 16.88 และ 11.69 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเชื้อ *P. aeruginosa* ไวต่อสารสกัดจากตัวทำละลายน้ำกลั่นเท่านั้น โดยให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้ง คือ 14.75 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4)

ผลของตัวควบคุมเชิงบวก คือ ยาปฏิชีวนะ tetracycline ปริมาณ 30 ไมโครกรัม พบว่าให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้งต่อ *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* และ *A. pyogenes* เท่ากับ 23.00, 26.00, 17.69, 17.67, 0.00 และ 21.03 มิลลิเมตร ตามลำดับ ตัวควบคุมเชิงลบ คือ ตัวทำละลาย พบว่าไม่ปรากฏเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้งต่อทุกเชื้อ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ และประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดจากตะไคร้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย* สาเหตุบางชนิดของมดลูกอักเสบและเชื้อราในมดลูกอักเสบในโคนม โดยวิธี agar disc diffusion

ตัวทำละลาย	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	Ec	Sa	Bs	St	Pa	Ap
เอทานอลบริสุทธิ์	10.38 ^c ± 0.75	11.69 ^c ± 0.47	13.25 ^b ± 0.54	- ^d	- ^b	17.13 ^b ± 0.95
เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์	- ^d	- ^d	12.50 ^c ± 0.71	- ^d	- ^b	14.38 ^d ± 0.75
เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)	- ^d	- ^d	11.00 ^d ± 0.00	16.88 ^b ± 2.10	- ^b	12.50 ^c ± 0.58
น้ำกลั่น	13.38 ^b ± 0.75	13.38 ^b ± 0.75	13.38 ^b ± 0.48	11.69 ^c ± 0.24	14.75 ^a ± 1.50	16.25 ^c ± 0.96
Positive control (tetracycline 30 µg)	23.00 ^a ± 0.00	26.00 ^a ± 0.00	17.69 ^a ± 0.60	17.67 ^a ± 0.44	- ^b	21.03 ^a ± 0.62
Negative control (solvent)	- ^d	- ^d	- ^c	- ^d	- ^b	- ^f
SEM	0.15	0.13	0.23	0.33	0.22	0.30

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± standard deviation)

a, b, c, d, e, f ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01)

- = ไม่ปรากฏเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้ง

SEM = standard error of mean

* แบคทีเรีย: Ec = *Escherichia coli* ATCC 25922, Sa = *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, Bs = *Bacillus subtilis* ATCC 6633,

St = *Salmonella typhimurium* ATCC 16809, Pa = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Ap = *Arcanobacterium pyogenes* ATCC 8104

3. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration; MIC and Minimal bactericidal concentration; MBC) โดยวิธี broth dilution

ภายหลังจากนำสารสกัดจากตะไคร้ของแต่ละตัวมาทดสอบฤทธิ์และประสิทธิภาพเบื้องต้นในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุบางชนิดของมดลูกอักเสบและเชื้อผนังมดลูกอักเสบในโคนม ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* และ *A. pyogenes* โดยวิธี agar disc diffusion แล้วเลือกเฉพาะสารสกัดที่มีฤทธิ์และประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อมาศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียสาเหตุ โดยวิธี broth dilution ทั้ง macrobroth dilution และ microbroth dilution

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากทุกตัวทำละลายในการทดสอบครั้งนี้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน โดย *E. coli* สารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ ให้ค่า MIC ทั้ง macrobroth dilution และ microbroth dilution เท่ากับ 9.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดจากตัวทำละลายน้ำกลั่นให้ค่า MIC โดยวิธี macrobroth dilution เท่ากับ 9.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ microbroth dilution เท่ากับ 37.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร *S. aureus* สารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ให้ค่า MIC โดยวิธี macrobroth dilution เท่ากับ 4.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ microbroth dilution เท่ากับ 9.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดจากตัวทำละลายน้ำกลั่นให้ค่า MIC โดยวิธี macrobroth dilution เท่ากับ 18.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ microbroth dilution เท่ากับ 37.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร *S. typhimurium* สารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น) ให้ค่า MIC โดยวิธี macrobroth dilution เท่ากับ 18.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ microbroth dilution เท่ากับ 37.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดจากตัวทำละลายน้ำกลั่นให้ค่า MIC โดยวิธี macrobroth dilution เท่ากับ 9.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ microbroth dilution เท่ากับ 37.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร *P. aeruginosa* พบเพียงสารสกัดจากตัวทำละลายน้ำกลั่นเท่านั้นที่ยับยั้งการเจริญ โดยให้ค่า MIC ทั้ง macrobroth dilution และ microbroth dilution เท่ากับ 37.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 5)

สารสกัดจากทุกตัวทำละลายสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* และ *A. pyogenes* ได้ โดยพบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น) และน้ำกลั่น ให้ค่า MIC ต่อ *B. subtilis* โดยวิธี macrobroth dilution

เท่ากับ 18.56, 37.13, 37.13 และ 18.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน microbroth dilution เท่ากับ 18.56, 37.13, 74.25 และ 37.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า MIC ต่อ *A. pyogenes* โดยวิธี macrobroth dilution เท่ากับ 74.25, 37.13, 18.56 และ 74.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน microbroth dilution เท่ากับ 74.25, 37.13, 18.56 และ 37.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

เมื่อทดสอบหาค่า MBC พบเพียงสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์เท่านั้นที่ฆ่าแบคทีเรียได้ และสารสกัดจากตัวทำละลายทุกชนิดสามารถฆ่าเชื้อ *A. pyogenes* ได้ ส่วนสารสกัดจากตัวทำละลายอื่นไม่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นสูงสุด 148.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (macrobroth dilution) และ 297.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (microbroth dilution) โดย *E. coli* ให้ค่า MBC ทั้ง macrobroth dilution และ microbroth dilution เท่ากับ 37.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร *S. aureus* ให้ค่า MBC โดยวิธี macrobroth dilution เท่ากับ 9.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ microbroth dilution เท่ากับ 37.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร *B. subtilis* ให้ค่า MBC ทั้ง macrobroth dilution และ microbroth dilution เท่ากับ 148.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ *A. pyogenes* สารสกัดจากทุกตัวทำละลายให้ค่า MBC โดยวิธี macrobroth dilution เท่ากับ 148.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธี microbroth dilution เท่ากับ 74.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ขยี้และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย* สาเหตุบางชนิดของมดลูกอักเสบและเยื่อบุผนังมดลูกอักเสบในโคนม โดยวิธี broth dilution (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตัวทำละลาย		Ec		Sa		Bs		St		Pa		Ap	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
เอทานอลบริสุทธิ์	Macrodilution	9.28	37.13	4.64	9.28	18.56	148.50	NP	NP	NP	NP	74.25	148.50
	Microdilution	9.28	37.13	9.28	37.13	18.56	148.50	NP	NP	NP	NP	74.25	74.25
เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์	Macrodilution	NP	NP	NP	NP	37.13	>148.50	NP	NP	NP	NP	37.13	148.50
	Microdilution	NP	NP	NP	NP	37.13	>297.00	NP	NP	NP	NP	37.13	74.25
เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)	Macrodilution	NP	NP	NP	NP	37.13	>148.50	18.56	>148.50	NP	NP	18.56	148.50
	Microdilution	NP	NP	NP	NP	74.25	>297.00	37.13	>297.00	NP	NP	18.56	74.25
น้ำกลั่น	Macrodilution	9.28	>148.50	18.56	>148.50	18.56	>148.50	9.28	>148.50	37.13	>148.50	74.25	148.50
	Microdilution	37.13	>297.00	37.13	>297.00	37.13	>297.00	37.13	>297.00	37.13	>297.00	37.13	74.25

หมายเหตุ * แบคทีเรีย: Ec = *Escherichia coli* ATCC 25922, Sa = *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, Bs = *Bacillus subtilis* ATCC 6633,

St = *Salmonella typhimurium* ATCC 16809, Pa = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Ap = *Arcanobacterium pyogenes* ATCC 8104

MIC = minimal inhibitory concentration, MBC = minimal bactericidal concentration, NP = not performed

4. การทดสอบพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) ด้วยไรทะเล

ภายหลังการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดตะไคร้ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุทั้ง 6 ชนิด และนำไปทดสอบพิษต่อเซลล์โดยใช้ไรทะเล เพื่อทำนายระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการศึกษาวิจัยต่อไป จากการทดสอบพบว่าค่าความเข้มข้นที่ทำให้ไรทะเลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยงด้วยสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น) และน้ำกลั่น ที่ 6 ชั่วโมง เท่ากับ 7.24, 10.47, 9.77 และ 1.82 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ 12 ชั่วโมง เท่ากับ 6.03, 7.08, 3.63 และ 1.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 4.68, 0.96, 0.72 และ 1.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 1.74, 0.02, 0.45 และ 1.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากตะไคร้ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ที่ทำให้ไรทะเลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (Lethal Concentration 50; LC₅₀; มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตัวทำละลาย	ชั่วโมงที่ 6	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48
เอทานอลบริสุทธิ์	7.24	6.03	4.68	1.74
เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์	10.47	7.08	0.96	0.02
เอทานอลทางการค้า	9.77	3.63	0.72	0.45
40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)				
น้ำกลั่น	1.82	1.55	1.38	1.20

วิจารณ์

1. การเตรียมสารสกัดตะไคร้

จากการเตรียมสารสกัดตะไคร้ด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิด จะได้สารสกัดออกมาในรูปแบบของสารสกัดหยาบ ซึ่งจะประกอบด้วยสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหรือสารสำคัญ และสารไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหรือสารเฉื่อย เมื่อเปลี่ยนตัวทำละลายที่ใช้สกัดจะทำให้องค์ประกอบที่ได้เปลี่ยนแปลงไปด้วย ย่อมส่งผลถึงลักษณะ สี กลิ่น และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ต่างกัน ดังจะเห็นได้จากผลของตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด

สมบัติการมีขั้ว (polarity) ของตัวทำละลายต่างชนิดกันจะมีผลต่อสารสกัดที่ได้ (รัตนา, 2547; อุไรวรรณ และคณะ, 2549) จากตัวทำละลาย 4 ชนิดที่เลือกมาจัดเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วทั้งหมด ดังนั้นองค์ประกอบที่ได้ย่อมเป็นองค์ประกอบในกลุ่มสารละลายที่มีขั้ว น้ำเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงสุด จึงละลายองค์ประกอบที่มีขั้วสูงออกมาได้มาก ส่วนสารละลายผสมของน้ำและเอทานอล คือ เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น) และเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ มีขั้วรองลงมาตามลำดับ จึงละลายองค์ประกอบที่มีบางส่วนเหมือนและต่างจากสารสกัดจากน้ำ เช่นเดียวกับเอทานอลบริสุทธิ์ที่มีขั้วต่ำสุดก็จะละลายสารออกมาต่างกัน (Schuck *et al.*, 2001; Durmaz *et al.*, 2006; Mathabe *et al.*, 2006) ทั้งนี้ยังเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของตัวทำละลายด้วยความผิดพลาดในขั้นตอนการทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบแช่แข็งชนิดถาด (tray dryer) จากปริมาณที่มีมากจนเกินไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดจากน้ำ อาจส่งผลให้กระบวนการทำแห้งเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้จึงมีความคลาดเคลื่อน

ส่วนสีของสารสกัดที่ได้มีความแตกต่างกัน เนื่องจากองค์ประกอบของตะไคร้ เช่น น้ำมันหอมระเหย เป็นต้น ที่มีสีเหลือง น้ำตาลอ่อน หรือเหลืองปนน้ำตาลอ่อน (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2541) และเมื่อเกิดปฏิกิริยาของพืชสดจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือ polyphenol oxidase (PPO) ทำให้เมื่อถูกสกัดด้วยตัวทำละลายจึงละลายออกมาในสารสกัดด้วย (รุ่งรัตน์, 2540; เพ็ญธิรัตน์, 2546)

2. การทดสอบฤทธิ์ และประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดจากตะไคร้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี agar disc diffusion

ขนาดของวงยับยั้งที่มีค่ามากเป็นค่าบ่งบอกว่าสารสกัดหรือสารทดสอบมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าค่าที่น้อยกว่า (Bauer *et al.*, 1966; Koneman *et al.*, 1983) การไม่ปรากฏวงยับยั้ง หมายถึงสารสกัดไม่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมขึ้น ในที่นี้คือ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หากพิจารณาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของมดลูกอักเสบและเยื่อบุผนังมดลูกอักเสบในโคนมเชื้อหลัก คือ *E. coli*, *S. aureus* และ *A. pyogenes* (Lewis, 1997; Pascual Ramos *et al.*, 1997; Sheldon *et al.*, 2002, 2004a, 2004b, Jost and Billington, 2005) สารสกัดจากทั้งตัวทำละลายเอทานอล บริสุทธิ์ และน้ำ มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญได้ แต่เมื่อดูแนวโน้ม พบว่าสารสกัดจากน้ำมีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งพบการยับยั้งแบคทีเรียที่ดีกว่าโดยเฉพาะเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ดังนั้น หากเลือกชนิดตัวทำละลายที่สามารถสกัดแยกเอาสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุหลักทั้ง 3 ชนิด ควรเลือกสารสกัดจากทั้ง 2 ตัวทำละลาย หากพิจารณาพร้อมกับแบคทีเรียสาเหตุรอง คือ *B. subtilis*, *S. typhimurium* และ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มักก่อโรคในภายหลัง พบว่าสารสกัดจากน้ำมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้ง 6 ชนิด จึงมีความเหมาะสมที่จะพัฒนาตรวจสอบเพื่อนำไปใช้งานต่อไป

จากการพิจารณาขนาดวงยับยั้งเมื่อใช้สารสกัดด้วยตัวทำละลายทุกชนิดกับยาปฏิชีวนะ tetracycline ปริมาณ 30 ไมโครกรัม พบว่ายาปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพสูงที่สุด ยกเว้น *P. aeruginosa* ที่ไม่เกิดวงยับยั้ง เนื่องจากคือต่อยาปฏิชีวนะชนิดนี้ (กมลชัย, 2547) หากต้องการใช้สารสกัดตะไคร้ให้มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะ จึงจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณหรือความเข้มข้นให้มากขึ้น โดยต้องคำนึงถึงความสามารถในการละลายสารสกัดด้วย ตลอดจนความเสี่ยงของยาปฏิชีวนะ หากนำไปใช้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุในโคนม ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อร่างกายได้ (ปราจีน, 2541; LeBlanc *et al.*, 2002)

คุณสมบัติการละลายของตัวทำละลายที่ต่างกันจะสามารถละลายสารสำคัญและองค์ประกอบของตะไคร้ที่ต่างกันด้วย ซึ่งจะทำให้เกิดผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่างกันไปด้วย

เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ผลผลิต พบว่าปริมาณสารสกัดที่ได้กับปริมาณสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไม่มีผลต่อกัน

สารสำคัญในสารสกัดหยาบจากตะไคร้เมื่อใช้เอทานอลบริสุทธิ์ที่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย น่าจะสามารถสกัดได้สารสำคัญในรูปของน้ำมันหอมระเหย เช่น citral (geranial และ neral) ซึ่งเป็นสารหลักที่พบในส่วนดังกล่าว และสารในกลุ่ม phenolic substance ที่มีปริมาณสารออกมาได้มาก จะมีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญและขยายพันธุ์ได้ (Onawunmi *et al.*, 1984; Schuck *et al.*, 2001; Cimanga *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2004) โดยสารออกฤทธิ์ดังกล่าวจะไม่ละลายในน้ำหรือละลายได้น้อย ประกอบกับตะไคร้ยังมีสารออกฤทธิ์เป็นสารอินทรีย์พืชที่สร้างขึ้นในกลุ่มของ terpenes เช่น myrcene และกลุ่ม flavonoids เช่น luteolin และ linalool (Lorenzetti *et al.*, 1991; Cal, 2006; Figueirinha *et al.*, 2008) มีคุณสมบัติละลายได้ในตัวทำละลายน้ำ (Cai, 2006) จึงละลายออกมายับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ต่างกัน

เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลับ) มีสัดส่วนของน้ำและเอทานอลที่ต่างกันไป โดยเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ มีสัดส่วนของน้ำน้อยกว่าเอทานอล (25 ต่อ 75) และเอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลับ) มีสัดส่วนของน้ำมากกว่าเอทานอล (60 ต่อ 40) ดังนั้นสารสำคัญที่ได้จากการสกัดตะไคร้ด้วยตัวทำละลายหลักทั้งสองชนิด อาจจะสามารถละลายได้ทั้งสองกลุ่ม จึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ ส่วนกรณีที่ไม่สามารถยับยั้งได้เนื่องจากปริมาณสารสำคัญที่สกัดแยกออกมาได้นั้นน้อยกว่าระดับที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้

แบคทีเรียแต่ละชนิดมีลักษณะและโครงสร้างที่ต่างกันไป ทำให้เกิดการตอบสนองต่างกัน *S. aureus* และ *A. pyogenes* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่สร้างสปอร์ มีโครงสร้างผนังเซลล์เป็นเปปติโดไกลแคน 90 เปอร์เซ็นต์ และกรดไทโคอิก ซึ่งผนังเซลล์นี้ไม่มีประสิทธิภาพเลือกผ่านเข้าออกของสาร (Scherrer and Gerhardt, 1971) ในขณะที่ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีแคปซูล ซึ่งประกอบด้วยสารกลุ่มเด็กแทน เด็กทริน และเซลลูโลส เป็นต้น ด้วยคุณสมบัติของโครงสร้างนี้ส่งผลให้ไวต่อการยับยั้งด้วยสารสกัดตะไคร้ได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli*, *S. typhimurium* และ *P. aeruginosa* ซึ่งมีโครงสร้างผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่าเชื้อชนิดอื่น โดยมีเปปติโดไกลแคน 5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ แต่มีองค์ประกอบของไลโปโพลีแซคคาไรด์ซึ่งเพิ่มความ

แข็งแรงให้เซลล์ และยังพบว่า มีช่องพอริน (porin) ซึ่งไม่ยอมให้สาร โมเลกุลใหญ่ผ่านเข้าออก (Tortora *et al.*, 2001; Matu and van Staden, 2003)

3. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration; MIC and Minimal bactericidal concentration; MBC) โดยวิธี broth dilution

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งแบคทีเรีย หรือ MIC เป็นค่าบ่งบอกความสามารถของสารสกัด หรือสารทดสอบที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญ เช่นกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าแบคทีเรีย หรือ MBC เป็นค่าบ่งบอกความสามารถของสารสกัดหรือสารทดสอบที่มีประสิทธิภาพในการฆ่า ค่าดังกล่าวระบุเป็นค่าระดับความเข้มข้น โดยระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าเป็นระดับต้องการเลือกนำไปใช้มากกว่าค่าที่สูงกว่า (CLSI, 2006)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด ให้ค่าแตกต่างกันไปเนื่องจากสารสกัดจากตัวทำละลายต่างชนิดกัน อาจให้สารสำคัญที่ต่างกัน ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียต่างกัน (Betoni *et al.*, 2006) จากผลการทดสอบ เมื่อพิจารณาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของมดลูกอักเสบและเยื่อบุผนังมดลูกอักเสบในโคนมเชื้อหลัก คือ *E. coli*, *S. aureus* และ *A. pyogenes* สารสกัดจากทั้งตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ และน้ำ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้ และเฉพาะเอทานอลบริสุทธิ์ที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ อีกทั้งระดับความเข้มข้นส่วนใหญ่ให้ระดับที่ต่ำกว่าสารสกัดจากน้ำ ดังนั้นหากเลือกชนิดของตัวทำละลายที่สามารถทั้งยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียสาเหตุหลักทั้ง 3 ชนิด ควรเลือกสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ หากพิจารณาพร้อมกับแบคทีเรียสาเหตุรอง คือ *B. subtilis*, *S. typhimurium* และ *P. aeruginosa* พบว่าในแง่ของการใช้สารสกัดจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้ง 6 ชนิด สารสกัดจากน้ำให้ประสิทธิภาพครอบคลุมมากที่สุด จึงมีความเหมาะสมที่จะพัฒนาตรวจสอบเพื่อนำไปใช้งานได้

ค่า MIC และ MBC จากทั้งวิธี macrobroth dilution และ microbroth dilution ให้ค่าทั้งที่เหมือนและต่างกันไป สาเหตุหนึ่งที่ทำให้ค่าต่างกันเนื่องจากการเตรียมสารสกัดเพื่อทดสอบของแต่ละวิธีในแต่ละครั้งไม่พร้อมกัน จึงอาจส่งผลให้ค่าที่ได้มีความคลาดเคลื่อน

4. การทดสอบพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) ด้วยไรทะเล

การทดสอบพิษต่อเซลล์ด้วยไรทะเล เป็นแนวทางการเลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ทดสอบในระดับฟาร์ม พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายต่างชนิดกัน ให้ผลการทดสอบและพิษต่อไรทะเลต่างกัน เมื่อเพิ่มเวลาให้สัมผัสกับไรทะเลนานขึ้น ไรทะเลจะตายที่ความเข้มข้นต่ำลง เนื่องจากตัวทำละลายสกัดสารได้หลายชนิด ที่เป็นทั้งสารออกฤทธิ์และสารไม่มีฤทธิ์ หรืออาจเกี่ยวข้องกับความคงทนของสาร ซึ่งเมื่อระยะเวลาผ่านไปนานขึ้นอาจให้ประสิทธิภาพที่ต่างกัน จึงส่งผลเป็นพิษต่อไรทะเลต่างกันไปด้วย

การสัมผัสของไรทะเลกับสารสกัดจากตัวทำละลายต่างชนิดที่เวลาเดียวกัน ระดับความเข้มข้นสูงกว่าเป็นระดับที่ให้ความปลอดภัยกับเซลล์ได้มากกว่าระดับที่ต่ำกว่า ที่ 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ให้ระดับความเข้มข้นสูงกว่าตัวทำละลายอื่น แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปถึง 24 และ 48 ชั่วโมง สารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ ให้ระดับความเข้มข้นสูงสุดเช่นกัน ดังนั้นอาจเลือกชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดให้เหมาะสมกับระยะเวลาที่ต้องการนำไปใช้กับงานด้วย

จากผลในทุกการทดสอบ การพิจารณาเลือกตัวทำละลายสำหรับสกัดอะไรในรูปแบบสารสกัดหยาบ เพื่อนำมาใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของมดลูกอักเสบ และเยื่อหุ้มมดลูกอักเสบในโคนม จำเป็นต้องพิจารณาทั้งประสิทธิภาพในการควบคุมและคำนึงถึงพิษต่อเซลล์ ในแง่ของการนำสารสกัดเพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุหลัก คือ *E. coli*, *S. aureus* และ *A. pyogenes* ควรเลือกสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ซึ่งสามารถทั้งยับยั้งและฆ่า แต่หากพิจารณาในแง่ของการควบคุมเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 6 ชนิด ควรเลือกสารสกัดจากตัวทำละลายน้ำ แม้ว่าจะให้ผลเพียงการยับยั้งก็ตาม โดยทั่วไปการนำสารทดสอบไปใช้ เพื่อลดปัญหาการติดเชื้อในมดลูกโค โดยการชะล้าง (flushing) มักใช้ระยะเวลาการแช่สารในช่วงไม่เกิน 6 ถึง 12 ชั่วโมง (ปราจีน, 2541) ดังนั้นการพิจารณาปัญหาที่อาจก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์จึงจำเป็นต้องพิจารณาในช่วงระยะเวลาดังกล่าว จากการศึกษาพิษต่อเซลล์ด้วยไรทะเล แม้ว่าสารสกัดจากทั้งตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ และน้ำ จะไม่ใช่ว่าที่ดีที่สุดก็ตาม แต่จำเป็นต้องเลือกเนื่องจากให้ความสามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุได้ครอบคลุมกว่าตัวทำละลายอื่น และเมื่อพิจารณาวิธีการชะล้างมดลูก โดยส่วนใหญ่มักใช้น้ำเป็นสื่อในการนำสารเข้าไปในภายมดลูก (ปราจีน, 2541;

อยุธยา และคณะ, 2544) ดังนั้นตัวทำละลายน้ำจึงน่าจะเหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัดตะไคร้เพื่อใช้
ควบคุมปัญหาดังกล่าว

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การเตรียมสารสกัดตะไคร้ที่เหมาะสมสำหรับควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุบางชนิดของมดลูกอักเสบ และเยื่อผนังมดลูกอักเสบของโคนมโดยการทดสอบในห้องปฏิบัติการ คือ การสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ ซึ่งให้สัดส่วนความเข้มข้นของสารสกัดตะไคร้ต่อน้ำเท่ากับ 37.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุได้ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538P, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. typhimurium* ATCC 16809, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *A. pyogenes* ATCC 8104 สารสกัดตะไคร้จากทุกตัวทำละลายมีประสิทธิภาพมีผลให้ไรทะเลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดน้ำเป็นตัวทำละลายที่ให้ค่าความเข้มข้นซึ่งเป็นพิษต่อไรทะเลต่ำกว่าความเข้มข้นที่ใช้ยับยั้งเชื้อสาเหตุได้ ดังนั้นการใช้ประโยชน์สารสกัดที่ได้ อาจต้องพิจารณาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อลดความเสียหายต่อเซลล์เยื่อบุมดลูกโค โดยยังสามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุได้

ข้อเสนอแนะ

น้ำเป็นตัวทำละลายที่ดี หาง่าย ราคาถูก เกษตรกรใช้ต้นทุนการจัดเตรียมต่ำกว่า แต่มีข้อจำกัดในการใช้งานบางส่วน ได้แก่ ความเข้มข้นที่เลือกใช้มีความเป็นพิษต่อเซลล์จากการทดสอบพิษด้วยไรทะเล ซึ่งอาจแก้ไขได้จากการลดระยะเวลาในการสัมผัสกับเซลล์เนื้อเยื่อโคให้มีความสั้นลง หรือใช้ความเข้มข้นที่น้อยๆ เพิ่มระดับจนสามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุได้ อีกทั้งการใช้งานจากสารสกัดตะไคร้ด้วยน้ำจำเป็นต้องใช้แบบที่เตรียมขึ้นและใช้งานได้ทันที หรืออาจจะต้องเก็บรักษาในสภาพที่ไม่ให้เกิดการบูดเน่าเสียหายได้ และการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการทดสอบโดยใช้ตะไคร้ในรูปแบบของสารสกัดหยาบเพียงอย่างเดียวเท่านั้น จึงควรมีการศึกษาสารสกัดจากตะไคร้ในรูปแบบอื่น เช่น น้ำมันหอมระเหย หรือองค์ประกอบทางเคมีหรือสารสำคัญเฉพาะจากตะไคร้ เป็นต้น โดยนำมาทดสอบในลักษณะเช่นเดียวกันนี้ และอาจมีการศึกษาพิษวิทยาของสารสกัดต่อเซลล์เนื้อเยื่อโคที่เพาะแยกมาจากมดลูกโดยเฉพาะ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพและความเหมาะสมในการนำไปใช้วิจัยพัฒนาต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กนกกาญจน์ ปิ่นแสง. 2536. การต้านการเกิดไมโครนิวเคลียสในหนูของสารสกัดจากตะไคร้.
ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขากายวิภาคศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

กมลชัย ตรงวานิชนาม. 2547. การใช้ยาด้านจุลชีพในสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 5. สำนักพิมพ์แห่ง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. ภูมิปัญญาไทย สมุนไพรสำหรับโค-กระบือ.
โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

กระทรวงสาธารณสุข. 2530. สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์
ทหารผ่านศึก, กรุงเทพฯ.

กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2545. การปลูกพืช
สมุนไพรและเครื่องเทศ. กรมส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.

กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์. 2547. เทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัย
ศิลปากร, นครปฐม.

โครงการศึกษาวิจัยสมุนไพร. 2532. สมุนไพร อันดับที่ 02. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ชัยสิทธิ์ มาศเกษม. 2529. เอกสารประกอบการสอนวิชา กายวิภาคศาสตร์ของสัตว์เลี้ยง (anatomy
of domestic animals). ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น,
ขอนแก่น.

ณรงค์ จึงสมานญาติ, ธเนศวร ทิพย์รักษ์ และ ทวีรัตน์ ทศนวัฒน์. 2542. การผลิตสารสกัดจากพืช
ที่มีฤทธิ์ฆ่าเห็บโค. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ทัศนีย์ ชมพูนันท์, มนัสนันท์ ประสิทธิ์รัตน์ และ มนยา เอกทัศน์. 2539. **คู่มือการดูแลสุขภาพ โคมม. ฟันนี้พับบลิชิ่ง, กรุงเทพฯ.**

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. **จุดชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.**

นันทวัน บุญยะประภัทร. 2530. **ก้าวไปกับสมุนไพร. ธารกมลการพิมพ์, กรุงเทพฯ.**

นิจศิริ เรืองรังษี. 2534. **เครื่องเทศ. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.**

นิรนาม. 2547. รายงานพิเศษ ข่า ตะไคร้-พืชสมุนไพรสร้างเงิน. **เทคโนโลยีชาวบ้าน 17 (344): 62.**

ปราจีน วีรกุล. 2541. การทบทวนเอกสารด้านความสมบูรณ์พันธุ์ และปัญหาการผสมติดยากใน **โคมม. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, กรุงเทพฯ.**

พรทิพย์ สุคนธสิงห์, เฉลิมเกียรติ โกศาวัฒนา, ภาวนา อัสวประภา, ภัสรา ชวประดิษฐ์, มนตรี สิ้นสมศักดิ์ และ ศิริพร หาญนันท์. 2542. **คู่มือสมุนไพรและเครื่องเทศ ชุดที่ 1. กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.**

เพ็ญวิรัตน์ อัครผลสุวรรณ. 2546. **การจัดการหลังเก็บเกี่ยวผักผลไม้สดเพื่อการแปรรูป. กรมส่งเสริมการส่งออก สำนักบริการส่งออก, กรุงเทพฯ.**

มนตรี แสนสุข. 2545. **สมุนไพรผักพื้นบ้าน เพื่อชีวิต และสุขภาพ. สำนักพิมพ์อนิเมทกรุ๊ป, กรุงเทพฯ.**

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.**

รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ. 2540. **พืชเครื่องเทศและสมุนไพร. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.**

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

วงศ์อนันต์ ณรงค์วานิชการ, วันทนีย์ เนรมิตมานสุข, พัทรี เพือกเทศ และ ดวงทอง ปัจฉิมะศิริ.

2547. รายงานการติดเชื้อ *Fusobacterium necrophorum* ในควาง, น. 1-11. ใน การประชุมสัมมนาวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 19 มหกรรมเนื้อ นม ไข่ ปศุสัตว์ไทยปลอดภัยสู่ครัวโลก. พิพิธภัณฑการเกษตรเฉลิมพระเกียรติ, ปทุมธานี.

วันดี กฤษณพันธ์. 2539. **สมุนไพรน้ำรู้**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

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

สำนักงานข้อมูลสมุนไพร. 2551. **สมุนไพรที่ใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐาน**. แหล่งที่มา: <http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/index.asp>, 10 กรกฎาคม 2551.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2541. **มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำมันตะไคร้**. มอก. 1681-2541.

สุวิชัย โรจนเสถียร. 2538. การติดเชื้อภายในมดลูกของโค (uterine infection in cows), น. 163-183. ใน เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การดูแลสุขภาพและระบบสืบพันธุ์ในโค. ภาควิชาสัตวศาสตร์ ฐานเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

อรรถ หรินทรานนท์, พรชัย สุวรรณภิมย์, ไพโรจน์ อัมพวันวงศ์, ศาโรช งามขำ, วินัย กระแสสินธุ์โกมล, สันติ ประสิทธิ์ผล, ไกรวรรณ หงส์ยันตรชัย, กิตติ มหาวิรุฬห์ และ ปราจีน วีรกุล. 2544. การแก้ไขโคผสมซ้ำ โดยวิธีชะล้างมดลูกด้วยน้ำเกลือผสมยาปฏิชีวนะ, น. 25. ใน เอกสารการประชุมทางวิชาการโคนมและผลิตภัณฑ์ ครั้งที่ 4 ทำวิจัยได้-ใช้ประโยชน์จริง. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

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

อำนาจ มีเวที, สมภพ บุญทิม, โอภาส ศิริตะ, อุษณีย์ วินิจเขตคำนวน และ นภาพร โออริยะกุล.
2536.ฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของตะไคร้, น. 436-437. ใน การประชุมวิชาการทั่วประเทศ
ประจำปี 2536 เรื่องมนุษย์กับสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, อุดมลักษณ์ สุขอัดตะ, สุภนิตา บัวบาน, ประภัสสร รักถาวร, นิชากร
เจริญกุล, สิริพร ศิริวรรณ และ พจมาน พิจเพียจันทร์. 2549. การสกัดแยกสารและน้ำมัน
หอมระเหยจากพืชชั้นพื้นฐาน. พิมพ์ครั้งที่ 2. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทาง
การเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อุษณีย์ วินิจเขตคำนวน, ชีอาภา ขามาภูชิ, ชีอะ พุริษตะ และ ไทจิโร มัชชูชิม่า. 2534. สารยับยั้ง
สารก่อมะเร็งจากตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*), น. 620-621. ใน การประชุม
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 17. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

Abe, S., Y. Sato, S. Inoue, H. Ishibashi, N. Maruyama, T. Takizawa, H. Oshima and
H. Yamaguchi. 2003. Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including
lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. **Jap. J. Med. Mycol.**
44 (4): 287-291.

Adeneye, A.A. and E.O. Agbaje. 2007. Hypoglycemia and hypolipidemic effects of fresh leaf
aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. **J. Ethnopharmacol.** 112: 440-
444.

Akin-Osanaiye, B.C., A.S. Agbagi and M.A. Dakare. 2007. Antimicrobial activity of oils and
extracts of *Cymbopogon citratus* (lemongrass), *Eucalyptus citriodora* and *Eucalyptus*
camaldulensis. **J. Med. Sci.** 7 (4): 694-697.

- 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.
- Anonymous. 2008. **Chapter 2 the female reproductive system.** Available Source: <http://www.nongae.ac.kr/~espack/teaching/chap2.html>, July 10, 2008.
- Arisawa, M. 1994. Cell growth inhibition of kb cells by plant extracts. **Nat. Med.** 48 (4): 338-347.
- Azawi, O.I. 2008. Postpartum uterine infection in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 105: 187-208.
- Baldi, A., G. Savoini, L. Pinotti, E. Monfardini, F. Cheli and V. Dell' Orto. 2000. Effects of vitamin E and different energy sources on vitamin E status milk quality and reproduction in transition cows. **J. Vet. Med. Series A** 47: 599-608.
- 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.
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1992. **Applied animal reproduction.** 3rd ed. Prentice-Hall, Inc., Mississippi.
- Bell, M.J. and D.J. Roberts. 2007. The impact of uterine infection on a dairy cows performance. **Theriogenol.** 68: 1074-1079.

- Betoni, J.E.C., R.P. Mantovani, L.N. Barbosa, L.C.D. Stasi and A.F. Junior. 2006. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 101 (4): 387-390.
- Bondurant, R.H. 1999. Inflammation in the bovine female reproductive tract. **J. Dairy Sci.** 82 (Suppl. 2): 101-110.
- Bonnett, B.N., S.W. Martin and A.H. Meck. 1993. Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy. **Prev. Vet. Med.** 15 (2-3): 205-220.
- _____, _____, W.G. Etherington and W.H. Johnson. 1990. The effect of prostaglandin administration to Hostein-Friesian cows at day 26 postpartum on clinical findings, and histological and bacteriological results of endometrial biopsies at day 40. **Theriogenol.** 33: 877-890.
- Bretzlaff, K. 1987. Rationale for treatment of endometritis in the dairy cow. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 3: 593-607.
- Browne, R.A., P. Sorgeloos and C.N.A. Trotman. 1991. **Artemia biology**. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Cal, K. 2006. Aqueous solubility of liquid monoterpenes at 293 K and relationship with calculated Log P value. **Yakugaku Zasshi** 126 (4): 307-309.
- Carlini, E.A., J.D.D.P. Contar, A.R. Silva-Filho, N.G. Da Silverira-Filho, M.L. Frochtergarten and O.F.A. Bueno. 1986. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.** 17 (1): 37-64.

- Carter, G.R. and M.M Chegappa. 1991. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology.** Lea and Febiger, Philadelphia, PA.
- Chomnawang, M.T., S. Surassmo, V.S. Nukoolkan and W. Gritsanapan. 2005. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. **J. Ethnopharmacol.** 101: 330-333.
- Cimanga, K., K. Kambu, L. Tona, S. Apers, T. De Bruyne, N. Hermans, J. Totté, L. Pieters and A.J. Vlietinck. 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.
- CLSI. 2006. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** 7th ed. Villanova, PA: NCCLS, Approved standard. M7-A7.
- Cohen, R.O., R. Colodner, G. Ziv and J. Keness. 1996. Isolation and antimicrobial susceptibility of obligate anaerobic bacteria recovered from the uterus of dairy cows with retained fetal membranes and postparturient endometritis. **J. Vet. Med. Series B** 43: 193-199.
- Colegate, S.M. and R.J. Molyneux. 1993. **Bioactive natural products: detection, isolation and structural determination.** CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Del Vecchio, R.P., D.J. Matsas, S. Fortin, D.P. Sponenberg and G.S. Lewis. 1994. Spontaneous uterine infections are associations with elevated prostaglandin F_{2α} metabolite concentrations in postpartum dairy cows. **Theriogenol.** 41: 413-421.
- 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.

- Ding, H. and C. Lämmle. 1996. Purification and further characterization of a haemolysin of *Actinomyces pyogenes*. **J. Vet. Med. Series B** 43: 179-188.
- Dinsmore, R.P., R.D. Stevens, M.B. Cattell, M.D. Salman and S.F. Sundlof. 1996. Oxytetracycline residues in milk after treatment of cows with retained fetal membranes. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 209: 1753-1755.
- 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. 2006. An update on uterine infections in dairy cattle. **Slov. Vet. Res.** 43 (1): 11-15.
- _____, D. Rabb, M. Wittke and W. Heuwieser. 2005. Treatment of chronic endometritis in dairy cows with an intrauterine application of enzyme: a field trial. **Theriogenol.** 63: 1811-1823.
- Dubey, N.K., N. Kishore, J. Varma and S.Y. Lee. 1997. Cytotoxicity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum*. **Indian J. Pharm. Sci.** 59 (5): 263-264.
- Durmaz, H., E. Sagun, Z. Tarakei and F. Ozokce. 2006. Antibacterial activities of *Allium vineale*, *Chaerophyllum macropodium* and *Prangos ferulacea*. **Afr. J. Biotechnol.** 5 (19): 1795-1798.
- Dutta, B.K., S. Karmakar, A. Naglot, J.C. Aich and M. Begam. 2007. Anticandidal activity of some essential oils of a biodiversity hotspot in India. **Mycoses** 50: 121-124.
- Eley, R. 2008. **Module 3. Guidelines for reproductive management in cattle.** Available Source: <http://www.liri.org/InfoServ/Fulldocs/ImprovingCattle/Module3htm#TopOfPage>, July 10, 2008.

Figueirinha, A., A. Paranhos, J.J. Pérez-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 Chem.** 110: 718-728.

Földi, 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.

Formigoni, S.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.

Fricke, P.M. 2002. Scanning the future ultrasonography as reproductive management tool for dairy cows. **J. Dairy Sci.** 85: 1918-1926.

Gilbert, R.O. 1992. Bovine endometritis: the burden of proof. **Cornell Vet.** 82: 11-14.

_____ and D.S. Schwark. 1992. Management of peripartum condition in the cow. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 8: 40-55.

_____, S.T. Shin, C.L. Guard, H.N. Erb and M. Frajblat. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. **Theriogenol.** 64 (9): 1879-1888.

Gustáfsson, H., B. Kornmatitsuk, K. Königsson and H. Kindahl. 2004. Peripartum and early postpartum in the cow-physiology and pathology, pp. 64-65. In 23rd **World Buiatrics Congress.** Quebec City, Canada.

- Hafez, B. and E.S.E. Hafez. 2000. **Reproduction in farm animals**. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- Hajurka, J., J. Nagy, P. Popelka, H. Rozanska, J. Sokol, R. Cabadaj and V. Hura. 2003. Tetracycline concentrations in blood and milk of cows following intrauterine treatment of acute or subacute/chronic endometritis. **Bull. Vet. Inst. Pulawy** 47: 435-447.
- _____, 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.
- Haraldsson, G., J.H. Meurman, E. Kononen and W.P. Holbrook. 2005. Properties of hemagglutination by *Prevotella melaninogenica*. **Anaerobe** 11 (5): 285-289.
- Harrison, J.H., D.D. Handcock and H.R. Conrad. 1984. Vitamin E and selenium of reproduction of dairy cow. **J. Dairy Sci.** 67: 123-132.
- Holdeman, L.V., P.E. Cato and W.E.C. Moore. 1977. **Anaerobe laboratory manual**. 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blackburg, Virginia.
- Hussain, A.M. 1989. Bovine uterine defense mechanisms: a review. **J. Vet. Med. Series B** 36: 641-651.
- Huszenica, G., M. Fodor, M. Gacs, M. Kulcsár, M.J.W. Dohmen, M. Vamos, L. Porkolab, T. Kegl, J. Bartyik, J.A.C.M. Lohuis, S. Janosi and G. Szita. 1999. Uterine bacteriology, resumption of cyclic ovarian activity and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herds. **Reprod. Domest. Anim.** 34: 237-245.
- Inouye, S., K. Uchida, Y. Nishiyama, Y. Hasumi, H. Yamaguchi and S. Abe. 2007. Combined effect of heat, essential oils and salts on the fungicidal activity against *Trichophyton mentagrophytes* in foot bath. **Jpn. J. Med. Mycol.** 48 (1): 27-36.

- Ishikawa, Y., K. Nakada, K. Hagiwara, R. Kirisawa, H. Iwai, M. Moriyoshi and Y. Sawamukai. 2004. Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre-and post-partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive disease. **J. Vet. Med. Sci.** 66 (11): 1403-1408.
- Janowski, S., S. Zdunczyk and E.S. Mwaanya. 2001. Combined GnRH and PGF₂ α application in cows with endometritis puerperal is treated with antibiotics. **Reprod. Domest. Anim.** 36: 244-246.
- 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.
- Kauderer, B., H. Zamith, F.J.R. Paumgarten and G. Sprit. 1991. Evaluation of the mutagenicity of β -myrcene in mammalian cells *in vitro*. **Environ. Mol. Mutagen.** 18: 28-34.
- Kim, I.-H. and H.-G. Kang. 2003. Risk factors for postpartum endometritis and the effect of endometritis on reproductive performance in dairy cows in Korea. **J. Reprod. Dev.** 49 (6): 485-491.
- Kobayashi, N. 1989. Pharmaceutical compositions containing lemongrass extracts and antioxidants. **Patent: Japan Kokai Tokyo Koho** 01 221: 320.
- Koneman, E.W., S.D. Allen, V.R. Dowell and H.M. Sommers. 1983. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology.** J.B. Lippincott company, Philadelphia, PA.

- Krishnaraju, A.V., T.V.N. Rao, D. Sundaraju, M. Vanisree, H.-S. Tsay and G.V. Subbaraju. 2005. Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. **Int. J. Appl. Sci. Eng.** 3 (2): 125-134.
- Kuhlman, A.H. and W.D. Gallup. 1942. Carotene (provitamin A) requirements of dairy cattle for conception. **J. Dairy Sci.** 25: 688-689.
- Kumar, A., P.K. Pankaj and S. Das. 2005. Bovine endometritis and therapeutic immunomodulation of uterine defence. **Dairy Planner** 1: 9-11.
- LeBlanc, S.J., T.F. Duffield, K.E. Leslie, K.G. Bateman, G.P. Keefe, J.S. Walton and W.H. Johnson. 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 85: 2223-2236.
- _____. 2008. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. **Vet. J.** 176: 102-114.
- Lechtenberg, K.F., T.G. Nagaraja, H.W. Leipold and M.M. Chengappa. 1988. Bacteriology and histologic studies of hepatic abscesses in cattle. **Am. J. Vet. Res.** 49: 58-62.
- Leite, J., M.L.V. Seabra, E. Maluf, K. Assolant, D. Suchecki, S. Tufik, S. Klepacz, H.M. Calil and E.A. Carlini. 1986. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.). III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. **J. Ethnopharmacol.** 17 (1): 75-83.
- Lewinsohn, E., N. Dudai, Y. Tadmor, I. Katzir, U. Ravid, E. Putievsky and D.M. Joel. 1998. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae). **Ann. Bot.** 81: 35-39.
- Lewis, G.S. 1997. Uterine health and disorders. **J. Dairy Sci.** 80: 984-994.

- Lincoln, R.A., K. Strupinski and J.M. Walker. 1996. The use of *Artemia nauplii* (brine shrimp larvae) to detect toxic compounds from microalgal cultures. **Int. J. Pharmacog.** 34 (5): 384-389.
- Lorenzetti, B.B., G.E.P. Souza, S.J. Sarti, D.S. Filho and S.H. Ferreira. 1991. Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. **J. Ethnopharmacol.** 34: 43-48.
- Manspeaker, J.E. 2008. **Metritis and Endometritis**. Available Source: <http://www.wvu.edu/~agexten/forglust/Dairy/dirm>, June 14, 2006.
- Mathabe, M.C., R.V. Nikolova, N. Lall and N.Z. Nyazema. 2006. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. **J. Ethnopharmacol.** 105: 286-293.
- Matu, E.N. and J. van Staden. 2003. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. **J. Ethnopharmacol.** 87: 35-41.
- McDougall, S. 2001. Effect of intrauterine antibiotic treatment on reproductive performance of dairy cows following periparturient disease. **NZ Vet. J.** 49: 15-158.
- McGaw, L.J., R. Gehring, L. Katsoulis and J.N. Eloff. 2005. Is the use of *Gunnera perpensa* extracts in endometritis related to antibacterial activity?. **J.Vet. Res.** 72: 129-134.
- Meyer, B.N., N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobson, D.E. Nichols and J.L. McLaughlin. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.** 45: 31-34.

- Murakami, A., A. Kondo, Y. Nakamura, H. Ohigashi and K. Koshimizu. 1993. Possible anti-tumor promoting properties of edible plants from Thailand, and identification of an active constituent, cardamonin, of *Boesenbergia pandurata*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 57 (11): 1971-1973.
- Musal, B., K. Seyrek and P.A. Ulutas. 2004. Serum sialic acid, total protein and albumin levels in cows with metritis treated with intrauterine oxytetracycline. **Uludag University Faculty of Veterinary Medicine** 23 (1-2-3): 71-75.
- Nagaraja, T.G., S.B. Laudert and J.C. Parrott. 1996. Liver abscesses in feedlot cattle. Part I. Causes, pathogenesis, pathology, and diagnosis. **Compendium Continuing Education for the Practicing Veterinarian** 18: S230-S256.
- _____, S.K. Narayanan, G.C. Stewart and M.M. Chengappa. 2005. *Fusobacterium necrophorum* infectious in animals: pathogenesis and pathogenesis mechanisms. **Anaerobe** 11: 239-246.
- Nakamura, Y., M. Miyamoto, A. Murakami, H. Ohigashi, T. Osawa and K. Uchida. 2003. A phase II detoxification enzyme inducer from lemongrass: identification of citral and involvement of electrophilic reaction in the enzyme induction. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 302: 593-600.
- Nanasombat, S. and P. Lohasupthawee. 2005. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against *Salmonella* and other enterobacteria. **KMITL Sci. Technol. J.** 5 (3): 527-538.
- Noakes, D.E. 2001. The puerperium and the care of the newborn, pp. 189-202. In D.E. Noakes, T.J. Parkinson, G.C.W. England and G.H. Arthur, eds. **Author's veterinary reproduction and obstetrics**. W.B. Saunders, London.

- Noakes, D.E., L. Wallace and G.R. Smith. 1991. Bacterial flora of the uterus of cows after calving on two hygienically contrasting farms. **Vet. Rec.** 128: 440-442.
- O' Connor, M.L. 1996. Factors causing uterine infections in cattle. **DAS** 92-106: 1-3.
- Olsen, J.D. 1996. Metritis/endometritis: medically sound treatments, pp. 8-14. *In Proceedings of the 29th Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners.* San Diago, CA.
- Onawunmi, G.O. 1987. Effect of dimethyl sulfoxide on the anti-bacterial activity of lemongrass oil. **Microbios Lett.** 36 (134-144): 105-111.
- _____, W. Yisak and E.O. Ogunlana. 1984. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **J. Ethnopharmacol.** 12 (3): 279-286.
- Onbunma, S., K. Kangsadalampai, B. Butryee and T. Linna. 2002. Mutagenicity of different juices of meat boiled with herbs treated with nitrite. **Ann. Res. Abstr, Mahidol University** 29: 350.
- Opsomer, G., Y.T. Grohn, J. Hertl, M. Coryn, H. Deluyker and A. de Kruit. 2000. Risk factors for postpartum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. **Theriogenol.** 53: 841-857.
- Ostraff, M., K. Anitoni, A. Nicholson and G.M. Booth. 2000. Traditional Tongan cures for morning sickness and their mutagenic/toxicological evaluations. **J. Ethnopharmacol.** 71 (1/2): 201-219.
- Overton, T.R. and M.R. Waldron. 2004. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. **J. Dairy Sci.** 87: E105-E119.

- Paisley, L.G., W.D. Mickelsen and P.B. Anderson. 1986. Mechanisms 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.
- Parkinson, T.J. 2001. Infertility in the cow: structural and functional abnormalities management deficiencies and non-specific infections, pp. 383-472. In D.E. Noakes, T.J. Parkinson, G.C.W. England and G.H. Arthur, eds. **Author's veterinary reproduction and obstetrics.** W.B. Saunders, London.
- Parma, K.S. and V.M. Metha. 1989. Enzymatic and hematological parameters in repeat breeding. **Indian J. Anim. Sci.** 59 (5): 564-566.
- Pascual Ramos, C., G. Foster and M.D. Collins. 1997. Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 47: 46-53.
- Pedroso, R.B., T. Ueda-Nakamura, B.P. Dias Filho, D.A.G. Cortez, L.E.R. Cortez, J.A. Morgado-Díaz and C.V. Nakamura. 2006. Biological activities of essential oil obtained from *Cymbopogon citratus* on *Crithidia deanei*. **Acta Protozool.** 45: 231-240.
- 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.
- Pimenta, L.P.S., G.B. Pinto, J.A. Takahashi, L.G.F. Silva and M.A.D. Boaventura. 2003. Biological screening of Annonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). **Phytomedicine** 10: 209-212.
- Pisutthanan, S., P. Plianbangchang, N. Pisuthanan, S. Ruanruay and O. Muanrit. 2004. Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family Meliaceae. **Naresuan University J.** 12 (2): 13-18.
- Puatanachokchai, R., U. Vinitketkumnuen and P. Picha. 1993. Antimutagenic and cytotoxic effects of lemon grass, p. 174. *In* **The 11th Asia Pacific Cancer Conference**. Bangkok, Thailand.
- Quinn, P.J., M.E. Cater, B.K. Markey and G.R. Carter. 1994. **Clinical veterinary microbiology**. Mosby-Year book Europe Limited, London.
- Rabb, D., M. Drillich and W. Heuwieser. 2003. Diagnosis of subclinical endometritis and its effect on reproductive performance, pp. 166-167. *In* **36th Annual conference of the American Association of Bovine Practitioners**. Columbus, Ohio.
- Rao, V.S.N., A.M.S. Menezes and G.S.B. Viana. 1990. Effect of myrcene on nociception in mice. **J. Pharm. Pharmacol.** 42: 877-878.
- Rim, I.S. and C.H. Jee. 2006. Acaricidal effects of herb essential oils against *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) and qualitative analysis of a herb *Mentha pulegium* (pennyroyal). **Korean J. Parasitol.** 44 (2): 133-138.

- SAS. 2001. **SAS/STAT Software: Changes and Enhancements, Release 8.2.** SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
- Scherrer, R. and P. Gerhardt. 1971. Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. **J. Bacteriol.** 107: 718-735.
- Schuck, V.J.A., M. Fratini, C.S. Rauber, A. Henriques and E.E.S. Schapoval. 2001. Evaluation of the antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus*. **Braz. J. Pharm. Sci.** 37 (1): 45-49.
- Sheldon, I.M. and D.E. Noakes. 1998. Comparison of three treatments for bovine endometritis. **Vet. Rec.** 142: 575-579.
- _____ and H. Dobson. 2004. Postpartum uterine health in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 82-83: 295-306.
- _____, A.N. Rycroft and C. Zhou. 2004a. Association between postpartum pyrexia and uterine bacterial infection in dairy cattle. **Vet. Rec.** 154: 289-293.
- _____, D.E. Noakes, A.N. Rycroft and H. Dobson. 2004b. Effect of intrauterine of estradiol on postpartum uterine bacterial infection in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 81: 13-23.
- _____, _____, _____, _____, and D.U. Pfeiffer. 2002. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle growth and function in cattle. **Reprod.** 123: 837-845.
- _____, 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., S.S. Sidhu, G.S. Dhaliwal, G.R. Pangaonkar, A.S. Nanda and A.S. Grewal. 2000. Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. **Anim. Reprod. Sci.** 59: 159-166.
- 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.
- 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.
- Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt. 1986. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 8th ed. Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Sorensen, A.M. 1979. **Animal reproduction: principles and practices**. McGraw-Hill Publishing Co., New York.
- Subandrio, A.L. and D.E. Noakes. 1992. The influence of the bovine oestrous cycle on the chemotactic stimulus of oyster glycogen to intrauterine neutrophils. **Br. Vet. J.** 148: 163-165.
- _____ and _____. 1997. Neutrophil migration into the uterine lumen of the cow: the influence of endogenous and exogenous sex steroid hormones using two intrauterine chemoattractants. **Theriogenol.** 47: 825-835.

- Tan, Z.L., T.G. Nagaraja and M.M. Chengappa. 1994. Biochemical and biological characterization of ruminal *Fusobacterium necrophorum*. **FEMS Microbiol. Lett.** 120: 81-86.
- Tanaka, T. and N. Umesaki. 2000. Cytokine regulation of apoptotic susceptibility in a human endometrial cell line. **J. Reprod. Immunol.** 47: 105-119.
- Tortora, G.J., B.R. Funke and C.L. Case. 2001. **Microbiology: An introduction.** San Francisco: Benjamin Cummings.
- Ungsurungsie, M., O. Suthienkul and C. Paovalo. 1982. Mutagenicity screening of popular Thai spices. **Food Chem. Toxicol.** 20: 527-530.
- 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: 323-327.
- 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.
- Wanyoike, G.N., S.C. Chhabra, C.C. Lang at-Thoruwa and S.A. Omar. 2004. Brine shrimp toxicity and antiplasmodial activity of five Kenyan medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.** 90: 129-133.
- 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.

- Williams, E.J., D.P. Fischer, D.U. Pfeiffer, G.C.W. England, D.E. Noakes, H. Dobson and I.M. Sheldon. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine infection and the immune response in cattle. **Theriogenol.** 63: 102-117.
- Wright, T. n.d. **Simple essential oil remedies to the most common ailments.** Available Source: <http://www.theida.com/pdf/SimpleRemedies.pdf>, June 14, 2006.
- Yuenyongsawad, S. and S. Tewtrakul. 2005. Essential oil components and biological activities of *Coleus parvifolius* leaves. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 27 (Supply 2): 497-502.
- Zain, A.E., T. Nakao, M.A. Raouf, M. Moriyoshi, K. Kawata and Y. Moritsu. 1995. Factors in the resumption of ovarian activity and uterine involution in postpartum dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.** 38: 203-214.
- Zerbe, E., H.J. Schubert, M. Hodemaker, E. Gunert and W. Leibold. 1996. A new model system for endometritis basic concepts and characterization of phenotypic and functional properties of bovine uterine neutrophils. **Theriogenol.** 46: 1339-1356.
- Zerbe, H., H.-J. Schuberth, F. Engelke, J. Frank, E. Klug and W. Leibold. 2003. Development and comparison of *in vivo* and *in vitro* models for endometritis in cows and mare. **Theriogenol.** 60: 209-223.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสาร

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

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

3. ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อผสม 5% defibrinated sheep blood

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งไว้ให้อุณหภูมิของอาหารอยู่ที่ประมาณ 55 องศาเซลเซียส โดยนำใส่ตู้อุณหภูมิดังกล่าว ข้ามคืน จากนั้นผสม defibrinated sheep blood ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารที่เตรียม เขย่าให้เข้ากัน ควรนำไปใช้ทันที

4. 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	1.0
1% sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Approx. cell density (x 10 ⁸ /ml)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

ที่มา: CLSI (2006)

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

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

5.2 ทำให้ปลอดเชื้ออีกครั้งโดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ใส่ลงในขวดสีชาปลอดเชื้อ ก่อนนำไปใช้งาน

6. การเตรียมแผ่นกรอง (paper disc) หยดยาปฏิชีวนะ tetracycline ปริมาณ 30 ไมโครกรัม

6.1 ชั่ง tetracycline hydrochloride 0.3 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9.7 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ vortex mixer ทำให้มี tetracycline 0.03 กรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 30 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

6.2 ปิเปตสารละลาย tetracycline ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้ออีกหลอด ปริมาตร 9.7 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ vortex mixer ทำให้มี tetracycline 0.0003 กรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 3 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

6.3 ใช้ autopipette ดูด tetracycline ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกรองจะทำให้ได้ tetracycline ปริมาตร 30 ไมโครกรัม

ภาคผนวก ข
ข้อมูลการทดลอง

1. การหาค่าเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง (% dry matter)

ตารางผนวกที่ ข1 ค่าเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง (% dry matter)

ซ้ำที่	น้ำหนักตะไคร้ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ความชื้น	เปอร์เซ็นต์ ความชื้น	เปอร์เซ็นต์ วัตถุแห้ง
1	9,100	1,900	7,200	79.12	20.88
2	9,100	2,090	7,010	77.03	22.97
3	9,830	2,320	7,510	76.40	23.60

หมายเหตุ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักตะไคร้สด} - \text{น้ำหนักหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตะไคร้สด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง} = 100 - \text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น}$$

$$\text{ค่าเฉลี่ย \% dry matter} = 22.48 \pm 1.42$$

2. การหาค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (extract yield)

ตารางผนวกที่ ข2 การหาค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิต

ตัวทำละลาย	ซ้ำที่	ตะไคร้แห้งเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด หลังทำให้แห้ง (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ผลผลิต
เอทานอลบริสุทธิ์	1	50	5.74	11.48
	2	50	5.30	10.60
	3	50	3.69	7.38
	4	50	4.15	8.30
เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์	1	50	9.98	19.96
	2	50	11.28	22.56
	3	50	9.38	19.66
	4	50	9.31	18.62
เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)	1	50	12.25	24.50
	2	50	12.64	25.28
	3	50	12.25	24.50
	4	50	12.20	24.40
น้ำกลั่น	1	50	6.13	12.26
	2	50	6.40	12.80
	3	50	6.27	12.54
	4	50	5.60	11.20

3. ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้งของสารสกัดจากตะไคร้ด้วยตัวทำละลายต่างชนิด

ตารางผนวกที่ ข3 ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้งของสารสกัดจากตะไคร้ด้วยตัวทำละลายต่างชนิดที่ระดับความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

แบคทีเรีย	ตัวทำละลาย	สารสกัด	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
			ซ้ำที่			
			1	2	3	4
<i>E. coli</i>	เอทานอลบริสุทธิ์	สารสกัด	10.00	10.00	11.50	10.00
		Positive	23.00	23.00	23.00	23.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์	สารสกัด	0.00	0.00	0.00	0.00
		Positive	23.00	23.00	23.00	23.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)	สารสกัด	0.00	0.00	0.00	0.00
		Positive	23.00	23.00	23.00	23.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	น้ำกลั่น	สารสกัด	13.00	13.00	13.00	14.50
		Positive	23.00	23.00	23.00	23.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>S. aureus</i>	เอทานอลบริสุทธิ์	สารสกัด	12.00	12.00	11.75	11.00
		Positive	26.00	26.00	26.00	26.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์	สารสกัด	0.00	0.00	0.00	0.00
		Positive	26.00	26.00	26.00	26.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)	สารสกัด	0.00	0.00	0.00	0.00
		Positive	26.00	26.00	26.00	26.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	น้ำกลั่น	สารสกัด	14.00	12.50	13.00	14.00
		Positive	26.00	26.00	26.00	26.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ Positive คือ ยาปฏิชีวนะ tetracycline ปริมาณ 30 ไมโครกรัม

Negative คือ ตัวทำละลาย

ตารางผนวกที่ ข3 (ต่อ)

แบคทีเรีย	ตัวทำละลาย		เส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
			ซ้ำที่			
			1	2	3	4
<i>B. subtilis</i>	เอทานอลบริสุทธิ์	สารสกัด	13.50	13.25	13.75	12.50
		Positive	18.00	18.00	19.00	17.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	เอทานอล 75	สารสกัด	12.00	13.50	12.00	12.50
		Positive	18.00	18.00	18.00	17.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	เปอร์เซ็นต์	สารสกัด	11.00	11.00	11.00	11.00
		Positive	17.00	17.00	18.00	18.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	(สุรากลั่น)	สารสกัด	13.00	14.00	13.50	13.00
		Positive	17.00	18.00	17.00	18.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	น้ำกลั่น	สารสกัด	0.00	0.00	0.00	0.00
		Positive	18.00	18.00	17.50	17.50
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>S. typhimurium</i>	เอทานอลบริสุทธิ์	สารสกัด	0.00	0.00	0.00	0.00
		Positive	18.00	18.00	17.50	17.50
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	เอทานอล 75	สารสกัด	0.00	0.00	0.00	0.00
		Positive	17.00	17.00	18.00	18.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	เอทานอลทางการค้า 40	สารสกัด	17.50	19.00	17.00	14.00
		Positive	17.00	17.00	18.00	18.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	(สุรากลั่น)	สารสกัด	11.75	12.00	11.50	11.50
		Positive	18.00	18.00	18.00	17.75
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ Positive คือ ยาปฏิชีวนะ tetracycline ปริมาณ 30 ไมโครกรัม

Negative คือ ตัวทำละลาย

ตารางผนวกที่ ข3 (ต่อ)

แบคทีเรีย	ตัวทำละลาย		เส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
			ซ้ำที่			
			1	2	3	4
<i>P. aeruginosa</i>	เอทานอลบริสุทธิ์	สารสกัด	0.00	0.00	0.00	0.00
		Positive	0.00	0.00	0.00	0.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์	สารสกัด	0.00	0.00	0.00	0.00
		Positive	0.00	0.00	0.00	0.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)	สารสกัด	0.00	0.00	0.00	0.00
		Positive	0.00	0.00	0.00	0.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	น้ำกลั่น	สารสกัด	14.00	14.00	14.00	17.00
		Positive	0.00	0.00	0.00	0.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>A. pyogenes</i>	เอทานอลบริสุทธิ์	สารสกัด	17.00	16.50	18.50	16.50
		Positive	20.50	21.50	21.50	21.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์	สารสกัด	14.00	15.00	13.50	15.00
		Positive	21.00	21.50	21.50	21.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)	สารสกัด	12.00	13.00	13.00	12.00
		Positive	20.00	22.00	21.00	20.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00
	น้ำกลั่น	สารสกัด	17.00	15.00	16.00	17.00
		Positive	20.50	21.00	20.50	22.00
		Negative	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ Positive คือ ยาปฏิชีวนะ tetracycline ปริมาณ 30 ไมโครกรัม

Negative คือ ตัวทำละลาย

4. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) โดยวิธี macrobroth dilution

ตารางผนวกที่ ๔ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) โดยวิธี macrobroth dilution (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตัวทำละลาย	แบคทีเรีย	ซ้ำที่			
		1	2	3	4
เอทานอลบริสุทธิ์	<i>E. coli</i>	9.28	9.28	9.28	9.28
	<i>S. aureus</i>	4.64	4.64	4.64	4.64
	<i>B. subtilis</i>	18.56	18.56	18.56	18.56
	<i>S. typhimurium</i>	18.56	18.56	18.56	18.56
	<i>P. aeruginosa</i>	74.25	74.25	74.25	74.25
	<i>A. pyogenes</i>	74.25	74.25	74.25	74.25
เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์	<i>E. coli</i>	9.28	9.28	9.28	9.28
	<i>S. aureus</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>B. subtilis</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>S. typhimurium</i>	18.56	18.56	18.56	18.56
	<i>P. aeruginosa</i>	148.50	148.50	148.50	148.50
	<i>A. pyogenes</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)	<i>E. coli</i>	9.28	9.28	9.28	9.28
	<i>S. aureus</i>	18.56	18.56	18.56	18.56
	<i>B. subtilis</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>S. typhimurium</i>	18.56	18.56	18.56	18.56
	<i>P. aeruginosa</i>	148.50	148.50	148.50	148.50
	<i>A. pyogenes</i>	18.56	18.56	18.56	18.56
น้ำกลั่น	<i>E. coli</i>	9.28	9.28	9.28	9.28
	<i>S. aureus</i>	18.56	18.56	18.56	18.56
	<i>B. subtilis</i>	18.56	18.56	18.56	18.56
	<i>S. typhimurium</i>	9.28	9.28	9.28	9.28
	<i>P. aeruginosa</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>A. pyogenes</i>	74.25	74.25	74.25	74.25

ตารางผนวกที่ ข4 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	แบคทีเรีย	ซ้ำที่			
		1	2	3	4
Positive control (tetracycline 30 µg/ml)	<i>E. coli</i>	x	x	x	x
	<i>S. aureus</i>	x	x	x	x
	<i>B. subtilis</i>	x	x	x	x
	<i>S. typhimurium</i>	x	x	x	x
	<i>P. aeruginosa</i>	/	/	/	/
	<i>A. pyogenes</i>	x	x	x	x
Negative control (อาหารเลี้ยงเชื้อ เหลว TSB)	<i>E. coli</i>	/	/	/	/
	<i>S. aureus</i>	/	/	/	/
	<i>B. subtilis</i>	/	/	/	/
	<i>S. typhimurium</i>	/	/	/	/
	<i>P. aeruginosa</i>	/	/	/	/
	<i>A. pyogenes</i>	/	/	/	/

หมายเหตุ สัญลักษณ์ / แทน เชื้อเจริญ และอาหารเลี้ยงเชื้อขุน

x แทน เชื้อไม่เจริญ และอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุน

5. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ฆ่าแบคทีเรีย (MBC) โดยวิธี macrobroth dilution

ตารางผนวกที่ ข5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ฆ่าแบคทีเรีย (MBC) โดยวิธี macrobroth dilution (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตัวทำละลาย	แบคทีเรีย	ซ้ำที่			
		1	2	3	4
เอทานอลบริสุทธิ์	<i>E. coli</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>S. aureus</i>	9.28	9.28	9.28	9.28
	<i>B. subtilis</i>	148.50	148.50	148.50	148.50
	<i>S. typhimurium</i>	18.56	18.56	18.56	18.56
	<i>P. aeruginosa</i>	74.25	74.25	74.25	74.25
	<i>A. pyogenes</i>	74.25	74.25	74.25	74.25
เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์	<i>E. coli</i>	>148.50	>148.50	>148.50	>148.50
	<i>S. aureus</i>	>148.50	>148.50	>148.50	>148.50
	<i>B. subtilis</i>	>148.50	>148.50	>148.50	>148.50
	<i>S. typhimurium</i>	>148.50	>148.50	>148.50	>148.50
	<i>P. aeruginosa</i>	>148.50	>148.50	>148.50	>148.50
	<i>A. pyogenes</i>	148.50	148.50	148.50	148.50
เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)	<i>E. coli</i>	>148.50	>148.50	>148.50	>148.50
	<i>S. aureus</i>	>148.50	>148.50	>148.50	>148.50
	<i>B. subtilis</i>	>148.50	>148.50	>148.50	>148.50
	<i>S. typhimurium</i>	>148.50	>148.50	>148.50	>148.50
	<i>P. aeruginosa</i>	>148.50	>148.50	>148.50	>148.50
	<i>A. pyogenes</i>	148.50	148.50	148.50	148.50
น้ำกลั่น	<i>E. coli</i>	>148.50	>148.50	>148.50	>148.50
	<i>S. aureus</i>	>148.50	>148.50	>148.50	>148.50
	<i>B. subtilis</i>	>148.50	>148.50	>148.50	>148.50
	<i>S. typhimurium</i>	>148.50	>148.50	>148.50	>148.50
	<i>P. aeruginosa</i>	>148.50	>148.50	>148.50	>148.50
	<i>A. pyogenes</i>	74.25	74.25	74.25	74.25

ตารางผนวกที่ ข5 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	แบคทีเรีย	ซ้ำที่			
		1	2	3	4
Positive control (tetracycline 30 µg/ml)	<i>E. coli</i>	/	/	/	/
	<i>S. aureus</i>	/	/	/	/
	<i>B. subtilis</i>	/	x	x	/
	<i>S. typhimurium</i>	/	/	/	/
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-
	<i>A. pyogenes</i>	/	/	/	/
Negative control (อาหารเลี้ยงเชื้อ เหลว TSB)	<i>E. coli</i>	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-
	<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-
	<i>A. pyogenes</i>	-	-	-	-

หมายเหตุ สัญลักษณ์ / แทน เชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA

x แทน เชื้อไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA

- แทน ไม่นำมาทดสอบหาค่า MBC

6. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) โดยวิธี microbroth dilution

ตารางผนวกที่ ข6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) โดยวิธี microbroth dilution (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตัวทำละลาย	แบคทีเรีย	ซ้ำที่			
		1	2	3	4
เอทานอลบริสุทธิ์	<i>E. coli</i>	9.28	9.28	9.28	9.28
	<i>S. aureus</i>	9.28	9.28	9.28	9.28
	<i>B. subtilis</i>	18.56	18.56	18.56	18.56
	<i>S. typhimurium</i>	18.56	18.56	18.56	18.56
	<i>P. aeruginosa</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>A. pyogenes</i>	74.25	74.25	74.25	74.25
เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์	<i>E. coli</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>S. aureus</i>	18.56	18.56	18.56	18.56
	<i>B. subtilis</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>S. typhimurium</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>P. aeruginosa</i>	74.25	74.25	74.25	74.25
	<i>A. pyogenes</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)	<i>E. coli</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>S. aureus</i>	18.56	18.56	18.56	18.56
	<i>B. subtilis</i>	74.25	74.25	74.25	74.25
	<i>S. typhimurium</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>P. aeruginosa</i>	74.25	74.25	74.25	74.25
	<i>A. pyogenes</i>	18.56	18.56	18.56	18.56
น้ำกลั่น	<i>E. coli</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>S. aureus</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>B. subtilis</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>S. typhimurium</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>P. aeruginosa</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>A. pyogenes</i>	37.13	37.13	37.13	37.13

ตารางผนวกที่ ข6 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	แบคทีเรีย	ซ้ำที่			
		1	2	3	4
Control	<i>E. coli</i>	/	/	/	/
(10% DMSO)	<i>S. aureus</i>	/	/	/	/
	<i>B. subtilis</i>	/	/	/	/
	<i>S. typhimurium</i>	/	/	/	/
	<i>P. aeruginosa</i>	/	/	/	/
	<i>A. pyogenes</i>	/	/	/	/
Control	<i>E. coli</i>	/	/	/	/
(อาหารเลี้ยงเชื้อ เหลว TSB)	<i>S. aureus</i>	/	/	/	/
	<i>B. subtilis</i>	/	/	/	/
	<i>S. typhimurium</i>	/	/	/	/
	<i>P. aeruginosa</i>	/	/	/	/
	<i>A. pyogenes</i>	/	/	/	/

หมายเหตุ สัญลักษณ์ / แทน เชื้อเจริญ และอาหารเลี้ยงเชื้อขุน

7. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ฆ่าแบคทีเรีย (MBC) โดยวิธี microbroth dilution

ตารางผนวกที่ ข7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ฆ่าแบคทีเรีย (MBC) โดยวิธี microbroth dilution (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตัวทำละลาย	แบคทีเรีย	ซ้ำที่			
		1	2	3	4
เอทานอลบริสุทธิ์	<i>E. coli</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>S. aureus</i>	37.13	37.13	37.13	37.13
	<i>B. subtilis</i>	148.50	148.50	148.50	148.50
	<i>S. typhimurium</i>	74.25	74.25	74.25	74.25
	<i>P. aeruginosa</i>	74.25	74.25	74.25	74.25
	<i>A. pyogenes</i>	74.25	74.25	74.25	74.25
เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์	<i>E. coli</i>	>297.00	>297.00	>297.00	>297.00
	<i>S. aureus</i>	>297.00	>297.00	>297.00	>297.00
	<i>B. subtilis</i>	>297.00	>297.00	>297.00	>297.00
	<i>S. typhimurium</i>	>297.00	>297.00	>297.00	>297.00
	<i>P. aeruginosa</i>	>297.00	>297.00	>297.00	>297.00
	<i>A. pyogenes</i>	74.25	74.25	74.25	74.25
เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)	<i>E. coli</i>	>297.00	>297.00	>297.00	>297.00
	<i>S. aureus</i>	>297.00	>297.00	>297.00	>297.00
	<i>B. subtilis</i>	>297.00	>297.00	>297.00	>297.00
	<i>S. typhimurium</i>	>297.00	>297.00	>297.00	>297.00
	<i>P. aeruginosa</i>	>297.00	>297.00	>297.00	>297.00
	<i>A. pyogenes</i>	74.25	74.25	74.25	74.25
น้ำกลั่น	<i>E. coli</i>	>297.00	>297.00	>297.00	>297.00
	<i>S. aureus</i>	>297.00	>297.00	>297.00	>297.00
	<i>B. subtilis</i>	>297.00	>297.00	>297.00	>297.00
	<i>S. typhimurium</i>	>297.00	>297.00	>297.00	>297.00
	<i>P. aeruginosa</i>	>297.00	>297.00	>297.00	>297.00
	<i>A. pyogenes</i>	74.25	74.25	74.25	74.25

ตารางผนวกที่ ข7 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	แบคทีเรีย	ซ้ำที่			
		1	2	3	4
Control	<i>E. coli</i>	-	-	-	-
(10% DMSO)	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-
	<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-
	<i>A. pyogenes</i>	-	-	-	-
Control	<i>E. coli</i>	-	-	-	-
(อาหารเลี้ยงเชื้อ เหลว TSB)	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-
	<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-
	<i>A. pyogenes</i>	-	-	-	-

หมายเหตุ สัญลักษณ์ - แทน ไม่นำมาทดสอบหาค่า MBC

8. การคำนวณและวาดกราฟเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death เพื่อทำนายพิษของสารสกัดต่อเซลล์ (cytotoxic) ด้วยไรทะเล

ตารางผนวกที่ ข8 การคำนวณเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลังการเพาะเลี้ยงไรทะเลด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 6 ชั่วโมง

ก. ตัวทำลายเอทานอลบริสุทธิ์ (กราฟในภาพผนวกที่ ข1 ก.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น ($\mu\text{g/ml}$)	ความเข้มข้นสุดท้าย ($\mu\text{g/ml}$)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิตรอด	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	77.67	0.00	266.33	0.00	266.33 / 266.33	100.00
30,000	15,000	4.176	71.00	0.00	188.66	0.00	188.66 / 188.66	100.00
20,000	10,000	4.000	50.00	23.00	117.66	23.00	117.66 / 140.66	83.65
15,000	7,500	3.875	49.33	27.00	67.66	50.00	67.66 / 117.66	57.51
10,000	5,000	3.699	1.33	71.33	18.33	121.33	18.33 / 139.66	13.13
5,000	2,500	3.398	0.67	73.33	17.00	194.66	17.00 / 211.66	8.03
2,000	1,000	3.000	0.67	74.67	16.33	269.33	16.33 / 285.66	5.72
1,000	500	2.699	1.33	69.00	15.66	338.33	15.66 / 353.99	4.42
200	100	2.000	1.67	75.33	14.33	413.66	14.33 / 427.99	3.35
100	50	1.699	4.00	74.00	12.66	487.66	12.66 / 500.32	2.53
20	10	1.000	0.33	73.33	8.66	560.99	8.66 / 569.65	1.52
10	5	0.699	3.33	73.33	8.33	634.32	8.33 / 642.65	1.30
2	1	0.000	1.67	70.67	5.00	704.99	5.00 / 709.99	0.70
1	0.5	-0.301	2.33	71.33	3.33	776.32	3.33 / 850.32	0.43
0.2	0.1	-1.000	0.33	73.00	1.00	849.32	1.00 / 850.32	0.12
0.1	0.05	-1.301	0.67	73.33	0.67	922.65	0.67 / 923.32	0.07

ช่วงของ
ค่า LC_{50}

ตารางผนวกที่ ข8 (ต่อ)

ข. ตัวทำลายเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ (กราฟในภาพผนวกที่ ข1 ข.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น (µg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิตรอด	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	75.00	0.00	196.33	0.00	196.33 / 196.33	100.00
30,000	15,000	4.176	73.67	2.33	121.33	2.33	121.33 / 123.66	98.12
20,000	10,000	4.000	19.67	55.00	47.66	57.33	47.66 / 104.99	45.40
15,000	7,500	3.875	2.67	76.00	27.99	133.33	27.99 / 161.32	17.35
10,000	5,000	3.699	3.33	71.00	25.32	204.33	25.32 / 229.65	11.03
5,000	2,500	3.398	1.67	77.00	21.99	281.33	21.99 / 303.32	7.25
2,000	1,000	3.000	0.33	79.00	20.32	360.33	20.32 / 380.65	5.34
1,000	500	2.699	0.33	73.67	19.99	434.00	19.99 / 453.99	4.40
200	100	2.000	5.33	68.33	19.66	502.33	19.66 / 521.99	3.77
100	50	1.699	3.33	70.33	14.33	572.66	14.33 / 586.99	2.44
20	10	1.000	3.67	75.33	11.00	647.99	11.00 / 658.99	1.67
10	5	0.699	2.67	71.33	7.33	719.32	7.33 / 726.65	1.01
2	1	0.000	1.33	76.33	4.66	795.65	4.66 / 800.31	0.58
1	0.5	-0.301	2.33	75.67	3.33	871.32	3.33 / 874.65	0.38
0.2	0.1	-1.000	0.33	81.00	1.00	952.32	1.00 / 953.32	0.11
0.1	0.05	-1.301	0.67	81.67	0.67	1,033.99	0.67 / 1,034.66	0.07

ช่วงของ
ค่า LC₅₀

ตารางผนวกที่ ข8 (ต่อ)

ค. ตัวทำลายเอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น; กราฟในภาพผนวกที่ ข1 ค.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น (µg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิตรอด	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	69.33	2.33	204.68	2.33	204.68 / 207.01	98.88
30,000	15,000	4.176	26.67	46.00	135.35	48.33	135.35 / 183.68	73.69
20,000	10,000	4.000	24.67	47.33	108.68	95.66	108.68 / 204.34	53.19
15,000	7,500	3.875	22.00	52.67	84.01	148.33	84.01 / 232.34	36.16
10,000	5,000	3.699	17.00	58.00	62.01	206.33	62.01 / 268.34	23.11
5,000	2,500	3.398	17.67	57.67	45.01	264.00	45.01 / 309.01	14.57
2,000	1,000	3.000	11.67	62.67	27.34	326.67	27.34 / 354.01	7.72
1,000	500	2.699	1.33	73.33	15.67	400.00	15.67 / 415.67	3.77
200	100	2.000	0.33	71.33	14.34	471.33	14.34 / 485.67	2.95
100	50	1.699	2.00	73.00	14.01	544.33	14.01 / 558.34	2.51
20	10	1.000	2.00	71.00	12.01	615.33	12.01 / 627.34	1.91
10	5	0.699	1.67	69.67	10.01	685.00	10.01 / 695.01	1.44
2	1	0.000	1.67	72.00	8.34	757.00	8.34 / 765.34	1.09
1	0.5	-0.301	1.33	68.67	6.67	825.67	6.67 / 832.34	0.80
0.2	0.1	-1.000	2.67	68.00	5.34	893.67	5.34 / 899.01	0.59
0.1	0.05	-1.301	2.67	72.67	2.67	966.34	2.67 / 969.01	0.28

ช่วงของ
ค่า LC₅₀

ตารางผนวกที่ ข8 (ต่อ)

ง. ตัวทำลายน้ำกลั่น (กราฟในภาพผนวกที่ ข1 ง.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น (µg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิตรอด	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	75.00	0.00	435.65	0.00	435.65 / 435.65	100.00
30,000	15,000	4.176	79.33	0.00	360.65	0.00	360.65 / 360.65	100.00
20,000	10,000	4.000	80.00	0.00	281.32	0.00	281.32 / 281.32	100.00
15,000	7,500	3.875	74.00	0.00	201.32	0.00	201.32 / 201.32	100.00
10,000	5,000	3.699	71.33	0.00	127.32	0.00	127.32 / 127.32	100.00
5,000	2,500	3.398	51.33	17.67	55.99	17.67	55.99 / 73.66	76.01
2,000	1,000	3.000	0.67	76.00	4.66	93.67	4.66 / 98.33	4.74
1,000	500	2.699	0.33	75.00	3.99	168.67	3.99 / 172.66	2.31
200	100	2.000	0.00	71.00	3.66	239.67	3.66 / 243.33	1.50
100	50	1.699	0.00	76.33	3.66	316.00	3.66 / 319.66	1.15
20	10	1.000	1.00	73.33	3.66	389.33	3.66 / 392.99	0.93
10	5	0.699	0.00	73.00	2.66	462.33	2.66 / 464.99	0.57
2	1	0.000	1.00	76.33	2.66	538.66	2.66 / 541.32	0.49
1	0.5	-0.301	0.00	76.33	1.66	614.99	1.66 / 616.65	0.27
0.2	0.1	-1.000	0.33	75.00	1.66	689.99	1.66 / 691.65	0.24
0.1	0.05	-1.301	1.33	75.00	1.33	764.99	1.33 / 766.32	0.17

ช่วงของ
ค่า LC_{50}

ตารางผนวกที่ ข9 การคำนวณเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลังการเพาะเลี้ยงไรทะเลด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 12 ชั่วโมง
 ก. ตัวทำลายเอทานอลบริสุทธิ์ (กราฟในภาพผนวกที่ ข2 ก.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น ($\mu\text{g/ml}$)	ความเข้มข้นสุดท้าย ($\mu\text{g/ml}$)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิต	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	77.67	0.00	308.58	0.00	308.58 / 308.58	100.00
30,000	15,000	4.176	71.00	0.00	231.01	0.00	231.01 / 231.01	100.00
20,000	10,000	4.000	70.67	2.33	160.01	2.33	160.01 / 162.34	98.57
15,000	7,500	3.875	55.00	21.33	89.34	23.66	89.34 / 113.00	79.06
10,000	5,000	3.699	3.67	69.00	34.34	92.66	34.34 / 127.00	27.04
5,000	2,500	3.398	5.00	69.00	30.67	161.66	30.67 / 192.33	15.95
2,000	1,000	3.000	5.67	69.67	25.67	231.33	25.67 / 257.00	9.99
1,000	500	2.699	2.67	67.67	20.00	299.00	20.00 / 319.00	6.27
200	100	2.000	3.00	74.00	17.33	373.00	17.33 / 390.33	4.44
100	50	1.699	4.33	73.67	14.33	446.67	14.33 / 461.00	3.11
20	10	1.000	1.33	72.33	11.00	519.00	11.00 / 530.00	2.08
10	5	0.699	3.67	73.00	9.67	592.00	9.67 / 601.67	1.61
2	1	0.000	2.00	70.33	6.00	662.33	6.00 / 668.33	0.90
1	0.5	-0.301	2.67	71.00	4.00	733.33	4.00 / 737.33	0.54
0.2	0.1	-1.000	0.33	73.00	1.33	806.33	1.33 / 807.66	0.17
0.1	0.05	-1.301	1.00	73.00	1.00	879.33	1.00 / 880.33	0.11

ช่วงของ
ค่า LC_{50}

ตารางผนวกที่ ข9 (ต่อ)

ข. ตัวทำลายเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ (กราฟในภาพผนวกที่ ข2 ข.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น (µg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิตรอด	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	75.00	0.00	295.67	0.00	295.67 / 295.67	100.00
30,000	15,000	4.176	76.00	0.00	220.67	0.00	220.67 / 220.67	100.00
20,000	10,000	4.000	54.00	19.67	144.67	19.67	144.67 / 164.34	88.03
15,000	7,500	3.875	21.67	57.33	90.67	77.00	90.67 / 167.67	54.08
10,000	5,000	3.699	12.00	62.33	69.00	139.33	69.00 / 208.33	33.12
5,000	2,500	3.398	16.00	62.67	57.00	202.00	57.00 / 259.00	22.01
2,000	1,000	3.000	11.33	68.00	41.00	270.00	41.00 / 311.00	13.18
1,000	500	2.699	4.67	69.33	29.67	339.33	29.67 / 369.00	8.04
200	100	2.000	7.33	66.33	25.00	405.66	25.00 / 430.66	5.81
100	50	1.699	3.33	70.33	17.67	475.99	17.67 / 493.66	3.58
20	10	1.000	3.67	75.33	14.34	551.32	14.34 / 565.66	2.54
10	5	0.699	4.33	69.67	10.67	620.99	10.67 / 631.66	1.69
2	1	0.000	1.67	76.00	6.34	696.99	6.34 / 703.33	0.90
1	0.5	-0.301	3.00	75.00	4.67	771.99	4.67 / 776.66	0.60
0.2	0.1	-1.000	0.67	80.67	1.67	852.66	1.67 / 854.33	0.20
0.1	0.05	-1.301	1.00	81.33	1.00	933.99	1.00 / 934.99	0.11

ช่วงของ
ค่า LC₅₀

ตารางผนวกที่ ข9 (ต่อ)

ค. ตัวทำลายเอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น; กราฟในภาพผนวกที่ ข2 ค.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น (µg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิตรอด	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	71.67	0.00	361.67	0.00	361.67 / 361.67	100.00
30,000	15,000	4.176	69.67	3.00	290.00	3.00	290.00 / 293.00	98.98
20,000	10,000	4.000	64.00	8.00	220.33	11.00	220.33 / 231.33	95.25
15,000	7,500	3.875	41.33	33.33	156.33	44.33	156.33 / 200.66	77.91
10,000	5,000	3.699	40.00	35.00	115.00	79.33	115.00 / 194.33	59.18
5,000	2,500	3.398	30.33	45.00	75.00	124.33	75.00 / 199.33	37.63
2,000	1,000	3.000	16.00	58.33	44.67	182.66	44.67 / 227.33	19.65
1,000	500	2.699	11.00	63.67	28.67	246.33	28.67 / 275.00	10.43
200	100	2.000	1.33	70.33	17.67	316.66	17.67 / 334.33	5.29
100	50	1.699	2.33	72.67	16.34	389.33	16.34 / 405.67	4.03
20	10	1.000	2.33	70.67	14.01	460.00	14.01 / 474.01	2.96
10	5	0.699	2.00	69.33	11.68	529.33	11.68 / 541.01	2.16
2	1	0.000	2.67	71.00	9.68	600.33	9.68 / 610.01	1.59
1	0.5	-0.301	1.67	68.33	7.01	668.66	7.01 / 675.67	1.04
0.2	0.1	-1.000	2.67	68.00	5.34	737.00	5.34 / 742.00	0.72
0.1	0.05	-1.301	2.67	72.67	2.67	809.33	2.67 / 812.00	0.33

ช่วงของ
ค่า LC₅₀

ตารางผนวกที่ ข9 (ต่อ)

ง. ตัวทำลายน้ำกลั่น (กราฟในภาพผนวกที่ ข2 ง.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น (µg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิตรอด	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	75.00	0.00	453.67	0.00	435.67 / 453.67	100.00
30,000	15,000	4.176	79.33	0.00	378.67	0.00	378.67 / 378.67	100.00
20,000	10,000	4.000	80.00	0.00	299.34	0.00	299.34 / 299.34	100.00
15,000	7,500	3.875	74.00	0.00	219.34	0.00	219.34 / 219.34	100.00
10,000	5,000	3.699	71.33	0.00	145.34	0.00	145.34 / 145.34	100.00
5,000	2,500	3.398	63.67	5.33	74.01	5.33	74.01 / 79.34	93.28
2,000	1,000	3.000	1.00	75.67	10.34	81.00	10.34 / 91.34	11.32
1,000	500	2.699	0.67	74.67	9.34	155.67	9.34 / 165.01	5.66
200	100	2.000	0.00	71.00	8.67	226.67	8.67 / 235.34	3.68
100	50	1.699	0.33	76.00	8.67	302.67	8.67 / 311.34	2.79
20	10	1.000	1.00	73.33	8.34	376.00	8.34 / 384.34	2.17
10	5	0.699	0.00	73.00	7.34	449.00	7.34 / 456.34	1.61
2	1	0.000	1.67	75.67	7.34	524.67	7.34 / 532.01	1.38
1	0.5	-0.301	2.00	74.33	5.67	599.00	5.67 / 604.67	0.94
0.2	0.1	-1.000	2.00	73.33	3.67	627.33	3.67 / 676.00	0.54
0.1	0.05	-1.301	1.67	74.67	1.67	747.00	1.67 / 748.67	0.22

ช่วงของ
ค่า LC₅₀

ตารางผนวกที่ ข10 การคำนวณเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลังการเพาะเลี้ยงไรทะเลด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 24 ชั่วโมง
 ก. ตัวทำลายเอทานอลบริสุทธิ์ (กราฟในภาพผนวกที่ ข3 ก.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น ($\mu\text{g/ml}$)	ความเข้มข้นสุดท้าย ($\mu\text{g/ml}$)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิตรอด	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	77.67	0.00	344.33	0.00	344.33 / 344.33	100.00
30,000	15,000	4.176	71.00	0.00	266.66	0.00	266.66 / 266.66	100.00
20,000	10,000	4.000	73.00	0.00	195.66	0.00	195.66 / 195.66	100.00
15,000	7,500	3.875	62.33	14.00	122.66	14.00	122.66 / 136.66	89.76
10,000	5,000	3.699	19.67	53.00	60.33	57.00	60.33 / 117.33	51.42
5,000	2,500	3.398	6.33	67.67	40.66	124.67	40.66 / 165.33	24.59
2,000	1,000	3.000	7.33	68.00	34.33	192.67	34.33 / 227.00	15.12
1,000	500	2.699	3.67	66.67	27.00	259.34	27.00 / 286.34	9.43
200	100	2.000	3.00	74.00	23.33	333.34	23.33 / 356.67	6.54
100	50	1.699	4.67	73.33	20.33	406.67	20.33 / 427.00	4.76
20	10	1.000	2.00	71.67	15.66	478.34	15.66 / 494.00	3.17
10	5	0.699	4.33	72.33	13.66	550.67	13.66 / 564.33	2.42
2	1	0.000	2.33	70.00	9.33	620.67	9.33 / 630.00	1.48
1	0.5	-0.301	4.67	69.00	7.00	689.67	7.00 / 696.67	1.01
0.2	0.1	-1.000	1.33	72.00	2.33	761.67	2.33 / 764.00	0.31
0.1	0.05	-1.301	1.00	73.00	1.00	834.67	1.00 / 835.67	0.12

ช่วงของ
ค่า LC_{50}

ตารางผนวกที่ ข10 (ต่อ)

ข. ตัวทำลายเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ (กราฟในภาพผนวกที่ ข3 ข.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น (µg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิตรอด	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	75.00	0.00	492.01	0.00	492.01 / 492.01	100.00
30,000	15,000	4.176	76.00	0.00	417.01	0.00	417.01 / 417.01	100.00
20,000	10,000	4.000	73.67	0.00	341.01	0.00	341.01 / 341.01	100.00
15,000	7,500	3.875	61.00	17.67	267.34	17.67	267.34 / 285.01	93.80
10,000	5,000	3.699	49.33	25.00	206.34	42.67	206.34 / 249.01	82.86
5,000	2,500	3.398	46.67	32.00	157.01	74.67	157.01 / 231.68	67.77
2,000	1,000	3.000	45.67	33.67	110.34	108.34	110.34 / 218.68	50.46
1,000	500	2.699	33.67	40.33	64.67	148.67	64.67 / 213.34	30.31
200	100	2.000	8.00	65.67	31.00	214.34	31.00 / 245.34	12.64
100	50	1.699	4.00	69.67	23.00	284.01	23.00 / 307.01	7.49
20	10	1.000	4.33	74.67	19.00	358.68	19.00 / 377.68	5.03
10	5	0.699	5.33	68.67	14.67	427.35	14.67 / 442.02	3.32
2	1	0.000	2.67	75.33	9.34	502.68	9.34 / 512.02	1.82
1	0.5	-0.301	5.00	73.00	6.67	575.68	6.67 / 582.35	1.15
0.2	0.1	-1.000	0.67	80.67	1.67	656.35	1.67 / 658.02	0.25
0.1	0.05	-1.301	1.00	81.33	1.00	737.68	1.00 / 738.68	0.14

ช่วงของ
ค่า LC₅₀

ตารางผนวกที่ ข10 (ต่อ)

ก. ตัวทำลายเอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น; กราฟในภาพผนวกที่ ข3 ก.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น (µg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิตรอด	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	71.67	0.00	515.67	0.00	515.67 / 515.67	100.00
30,000	15,000	4.176	72.67	0.00	444.00	0.00	444.00 / 444.00	100.00
20,000	10,000	4.000	72.00	0.00	371.33	0.00	371.33 / 371.33	100.00
15,000	7,500	3.875	73.33	1.33	299.33	1.33	299.33 / 300.66	99.56
10,000	5,000	3.699	63.00	12.00	226.00	13.33	226.00 / 239.33	94.43
5,000	2,500	3.398	49.00	26.33	163.00	39.66	163.00 / 202.66	80.43
2,000	1,000	3.000	38.00	36.33	114.00	75.99	114.00 / 189.99	60.00
1,000	500	2.699	31.67	43.00	76.00	118.99	76.00 / 194.99	38.98
200	100	2.000	17.00	54.67	44.33	173.66	44.33 / 217.99	20.34
100	50	1.699	3.33	71.67	27.33	245.33	27.33 / 272.66	10.02
20	10	1.000	4.33	68.67	24.00	314.00	24.00 / 338.00	7.10
10	5	0.699	3.00	68.33	19.67	382.33	19.67 / 402.00	4.89
2	1	0.000	3.00	71.33	16.67	453.66	16.67 / 470.33	3.54
1	0.5	-0.301	3.33	66.67	13.67	520.33	13.67 / 534.00	2.56
0.2	0.1	-1.000	4.67	66.00	10.34	586.33	10.34 / 596.67	1.73
0.1	0.05	-1.301	5.67	69.67	5.67	656.00	5.67 / 661.67	0.86

ช่วงของ
ค่า LC₅₀

ตารางผนวกที่ ข10 (ต่อ)

ง. ตัวทำลายน้ำกลั่น (กราฟในภาพผนวกที่ ข3 ง.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น (µg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิตรอด	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	75.00	0.00	467.99	0.00	467.99 / 467.99	100.00
30,000	15,000	4.176	79.33	0.00	392.99	0.00	392.99 / 392.99	100.00
20,000	10,000	4.000	80.00	0.00	313.66	0.00	313.66 / 313.66	100.00
15,000	7,500	3.875	74.00	0.00	233.66	0.00	233.66 / 233.66	100.00
10,000	5,000	3.699	71.33	0.00	159.66	0.00	159.66 / 159.66	100.00
5,000	2,500	3.398	68.00	1.00	88.33	1.00	88.33 / 89.33	98.88
2,000	1,000	3.000	2.67	74.00	20.33	75.00	20.33 / 95.33	21.33
1,000	500	2.699	2.67	72.67	17.66	147.67	17.66 / 165.33	10.68
200	100	2.000	2.00	69.00	14.99	216.67	14.99 / 231.66	6.47
100	50	1.699	1.00	75.33	12.99	292.00	12.99 / 304.99	4.26
20	10	1.000	1.33	73.00	11.99	365.00	11.99 / 376.99	3.18
10	5	0.699	0.33	72.67	10.66	437.67	10.66 / 448.33	2.38
2	1	0.000	2.67	74.67	10.33	512.34	10.33 / 522.67	1.98
1	0.5	-0.301	2.33	74.00	7.66	586.34	7.66 / 594.00	1.30
0.2	0.1	-1.000	2.33	73.00	5.33	659.34	5.33 / 664.67	0.80
0.1	0.05	-1.301	3.00	73.33	3.00	732.67	3.00 / 735.67	0.41

ช่วงของ
ค่า LC₅₀

ตารางผนวกที่ ข11 การคำนวณเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลังการเพาะเลี้ยงไรทะเลด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 48 ชั่วโมง
 ก. ตัวทำลายเอทานอลบริสุทธิ์ (กราฟในภาพผนวกที่ ข4 ก.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น ($\mu\text{g/ml}$)	ความเข้มข้นสุดท้าย ($\mu\text{g/ml}$)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิตรอด	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	77.67	0.00	402.01	0.00	402.01 / 402.01	100.00
30,000	15,000	4.176	71.00	0.00	324.34	0.00	324.34 / 324.34	100.00
20,000	10,000	4.000	73.00	0.00	253.34	0.00	253.34 / 253.34	100.00
15,000	7,500	3.875	68.33	8.00	180.34	0.00	180.34 / 180.34	100.00
10,000	5,000	3.699	35.33	37.33	112.01	8.00	112.01 / 120.01	93.33
5,000	2,500	3.398	16.00	36.67	76.68	45.33	76.68 / 122.01	62.85
2,000	1,000	3.000	13.67	61.67	60.68	107.00	60.68 / 167.68	36.19
1,000	500	2.699	6.00	64.33	47.01	171.33	47.01 / 218.34	21.53
200	100	2.000	4.67	72.33	41.01	243.66	41.01 / 284.67	14.41
100	50	1.699	5.33	72.67	36.34	316.33	36.34 / 352.67	10.30
20	10	1.000	4.33	69.67	31.01	386.00	31.01 / 417.01	7.44
10	5	0.699	8.00	68.67	26.68	454.67	26.68 / 481.35	5.54
2	1	0.000	3.67	68.67	18.68	523.34	18.68 / 542.02	3.45
1	0.5	-0.301	8.67	65.00	15.01	588.34	15.01 / 603.35	2.49
0.2	0.1	-1.000	2.67	70.67	6.34	659.01	6.34 / 665.35	0.95
0.1	0.05	-1.301	3.67	70.33	3.67	729.34	3.67 / 733.01	0.50

ช่วงของ
ค่า LC_{50}

ตารางผนวกที่ ข11 (ต่อ)

ข. ตัวทำลายเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ (กราฟในภาพผนวกที่ ข4 ข.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น (µg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิตรอด	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	75.00	0.00	770.33	0.00	770.33 / 770.33	100.00
30,000	15,000	4.176	76.00	0.00	695.33	0.00	695.33 / 695.33	100.00
20,000	10,000	4.000	73.67	0.00	619.33	0.00	619.33 / 619.33	100.00
15,000	7,500	3.875	75.33	3.33	545.66	3.33	545.66 / 548.99	99.39
10,000	5,000	3.699	67.67	6.67	470.33	10.00	470.33 / 480.33	97.92
5,000	2,500	3.398	69.67	9.00	402.66	19.00	402.66 / 421.66	95.49
2,000	1,000	3.000	65.33	14.00	332.99	33.00	332.99 / 365.99	90.98
1,000	500	2.699	55.00	19.00	267.66	52.00	267.66 / 319.66	83.73
200	100	2.000	51.67	22.00	212.66	74.00	212.66 / 286.66	74.19
100	50	1.699	44.00	29.67	160.99	103.67	160.99 / 264.66	60.83
20	10	1.000	43.00	36.00	116.99	139.67	116.99 / 256.66	45.58
10	5	0.699	33.00	41.00	73.99	180.67	73.99 / 254.66	29.05
2	1	0.000	18.33	59.33	40.99	240.00	40.99 / 280.99	14.59
1	0.5	-0.301	9.33	69.00	22.66	309.00	22.66 / 331.66	6.38
0.2	0.1	-1.000	7.00	74.33	13.33	383.33	13.33 / 396.66	3.36
0.1	0.05	-1.301	6.33	76.00	6.33	459.33	6.33 / 465.66	1.36

ช่วงของ
ค่า LC₅₀

ตารางผนวกที่ ข11 (ต่อ)

ก. ตัวทำลายเอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น; กราฟในภาพผนวกที่ ข4 ก.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น (µg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิตรอด	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	71.67	0.00	560.03	0.00	560.03 / 560.03	100.00
30,000	15,000	4.176	72.67	0.00	488.36	0.00	488.36 / 488.36	100.00
20,000	10,000	4.000	72.00	0.00	415.69	0.00	415.69 / 415.69	100.00
15,000	7,500	3.875	74.67	0.00	343.69	0.00	343.69 / 343.69	100.00
10,000	5,000	3.699	66.67	8.33	269.02	8.33	269.02 / 277.35	97.00
5,000	2,500	3.398	55.00	20.33	202.35	28.66	202.35 / 231.01	87.59
2,000	1,000	3.000	43.67	30.67	147.35	59.33	147.35 / 206.68	71.29
1,000	500	2.699	36.67	38.00	103.68	97.33	103.68 / 201.01	51.58
200	100	2.000	22.33	49.33	67.01	146.66	67.01 / 213.67	31.36
100	50	1.699	7.67	67.33	44.68	213.99	44.68 / 258.67	17.27
20	10	1.000	6.67	66.33	37.01	280.32	37.01 / 317.33	11.66
10	5	0.699	4.67	66.67	30.34	346.99	30.34 / 377.33	8.04
2	1	0.000	6.00	67.67	25.67	414.66	25.67 / 440.33	5.83
1	0.5	-0.301	6.67	63.33	19.67	477.99	19.67 / 497.66	3.95
0.2	0.1	-1.000	6.00	64.67	13.00	542.66	13.00 / 555.66	2.34
0.1	0.05	-1.301	7.00	68.33	7.00	610.99	7.00 / 617.99	1.13

ช่วงของ
ค่า LC₅₀

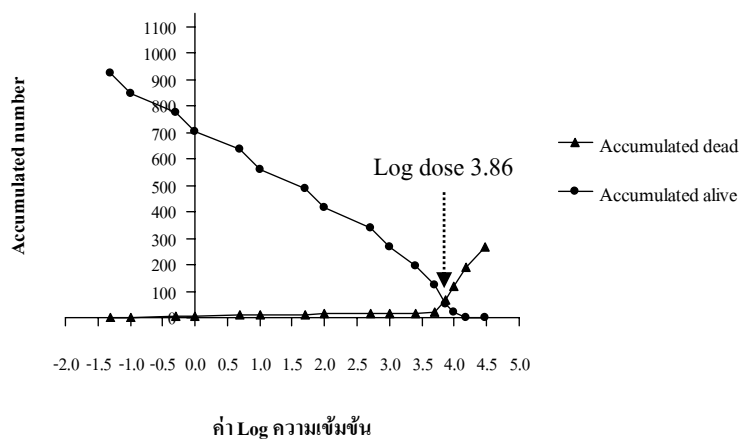
ตารางผนวกที่ ข11 (ต่อ)

ง. ตัวทำลายน้ำกลั่น (กราฟในภาพผนวกที่ ข4 ง.)

ความเข้มข้นเริ่มต้น (µg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/ml)	ค่า Log ความเข้มข้น	จำนวนที่ตาย	จำนวนมีชีวิตรอด	Accumulated dead	Accumulated alive	สัดส่วน จำนวนที่ตายต่อผลรวม	เปอร์เซ็นต์ที่ตาย
60,000	30,000	4.477	75.00	0.00	494.33	0.00	494.33 / 494.33	100.00
30,000	15,000	4.176	79.33	0.00	419.33	0.00	419.33 / 419.33	100.00
20,000	10,000	4.000	80.00	0.00	340.00	0.00	340.00 / 340.00	100.00
15,000	7,500	3.875	74.00	0.00	260.00	0.00	260.00 / 260.00	100.00
10,000	5,000	3.699	71.33	0.00	186.00	0.00	186.00 / 186.00	100.00
5,000	2,500	3.398	68.67	0.33	114.67	0.33	114.67 / 115.00	99.71
2,000	1,000	3.000	5.00	71.67	46.00	72.00	46.00 / 118.00	38.98
1,000	500	2.699	5.67	69.67	41.00	141.67	41.00 / 182.67	22.45
200	100	2.000	6.67	64.33	35.33	206.00	35.33 / 241.33	14.64
100	50	1.699	2.33	74.00	28.66	280.00	28.66 / 308.66	9.29
20	10	1.000	2.33	72.00	26.33	352.00	26.33 / 378.33	6.96
10	5	0.699	4.00	69.00	24.00	421.00	24.00 / 445.00	5.39
2	1	0.000	4.00	73.33	20.00	494.33	20.00 / 514.33	3.89
1	0.5	-0.301	5.00	71.33	16.00	565.66	16.00 / 581.66	2.75
0.2	0.1	-1.000	3.67	71.67	11.00	637.33	11.00 / 648.33	1.70
0.1	0.05	-1.301	7.33	69.00	7.33	706.33	7.33 / 713.66	1.03

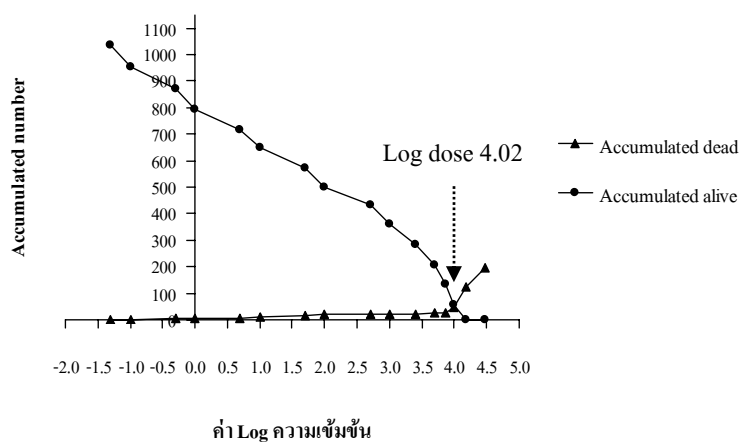
ช่วงของ
ค่า LC₅₀

เอทานอลบริสุทธ์ ที่ 6 ชั่วโมง



ก.

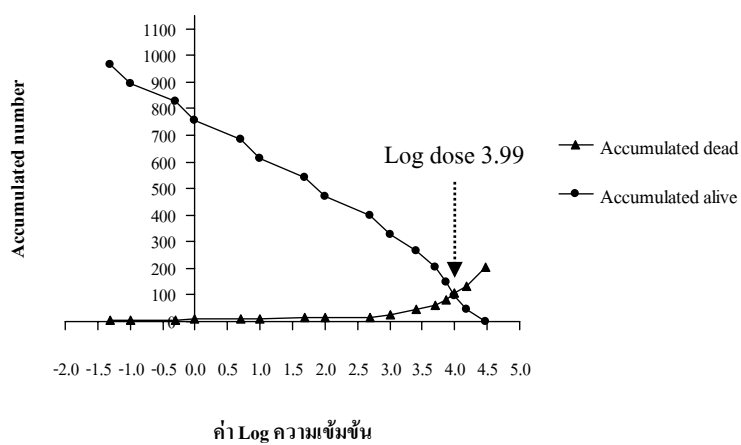
เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ที่ 6 ชั่วโมง



ข.

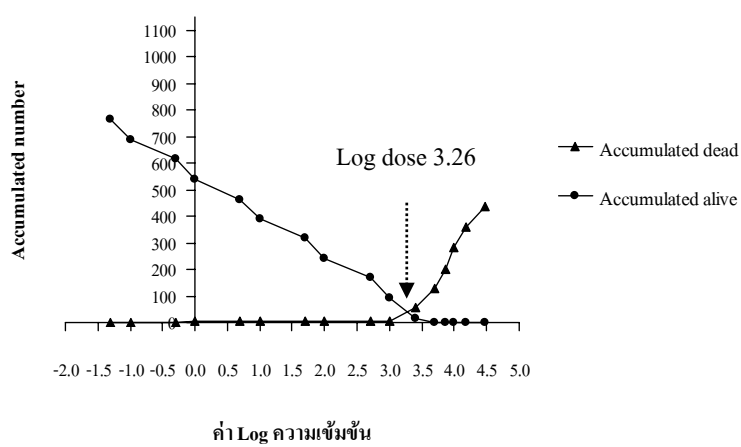
ภาพผนวกที่ ข1 การวาดกราฟเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลังการ
 เพาะเลี้ยงไรทะเลด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 6 ชั่วโมง
 ก. ตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์
 ข. ตัวทำละลายเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์
 ค. ตัวทำละลายเอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)
 ง. ตัวทำละลายน้ำกลั่น

เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น) ที่ 6 ชั่วโมง



ค.

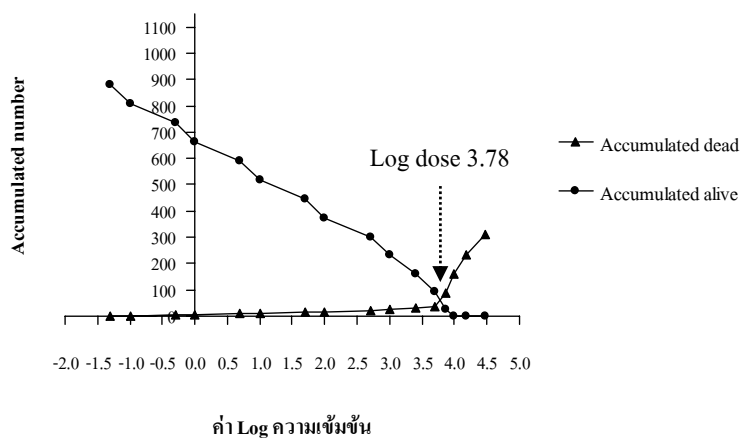
น้ำกลั่น ที่ 6 ชั่วโมง



ง.

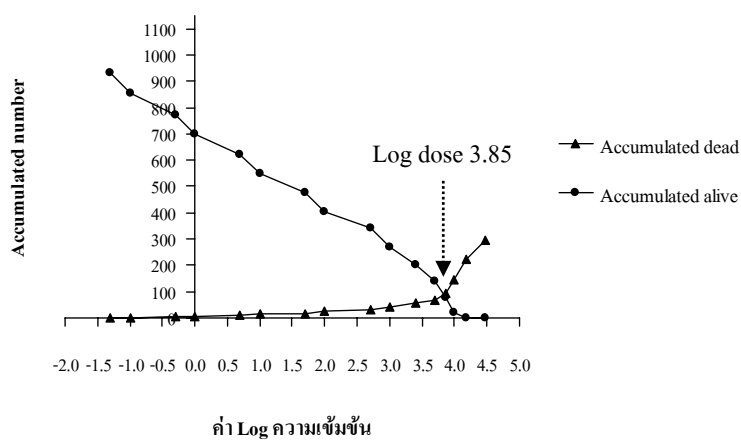
ภาพผนวกที่ ข1 (ต่อ)

เอทานอลบริสุทธิ์ ที่ 12 ชั่วโมง



ก.

เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ที่ 12 ชั่วโมง



ข.

ภาพผนวกที่ ข2 การวาดกราฟเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลังการ

เพาะเลี้ยงไรทะเลด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 12 ชั่วโมง

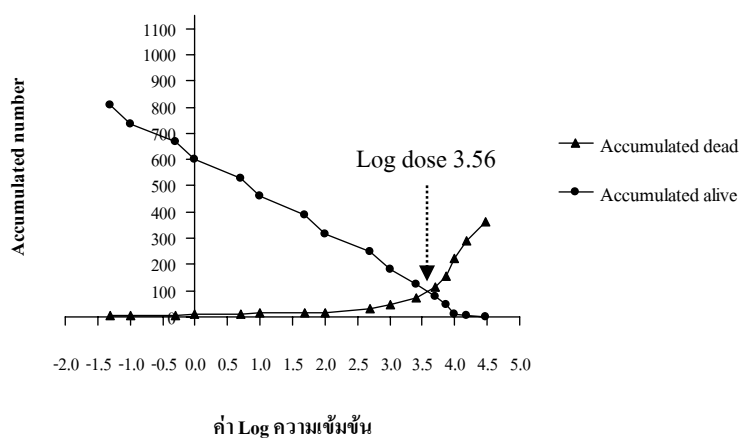
ก. ตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์

ข. ตัวทำละลายเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์

ค. ตัวทำละลายเอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)

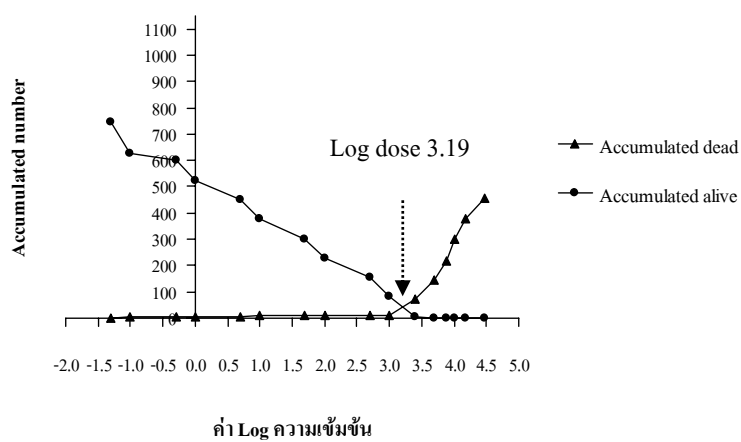
ง. ตัวทำละลายน้ำกลั่น

เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น) ที่ 12 ชั่วโมง



ก.

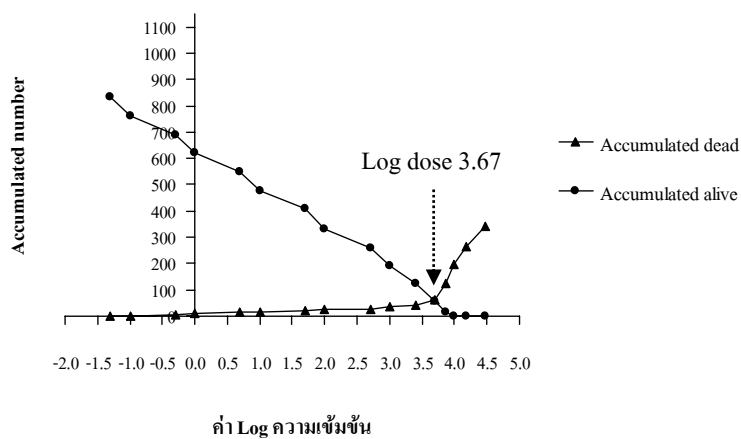
น้ำกลั่น ที่ 12 ชั่วโมง



ง.

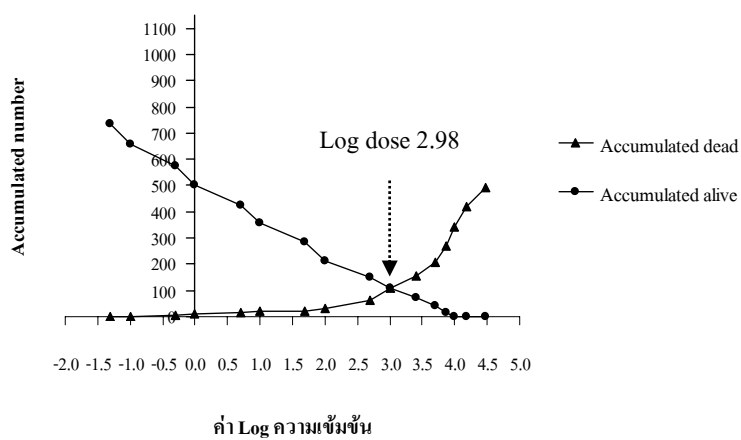
ภาพผนวกที่ ข2 (ต่อ)

เอทานอลบริสุทธิ์ ที่ 24 ชั่วโมง



ก.

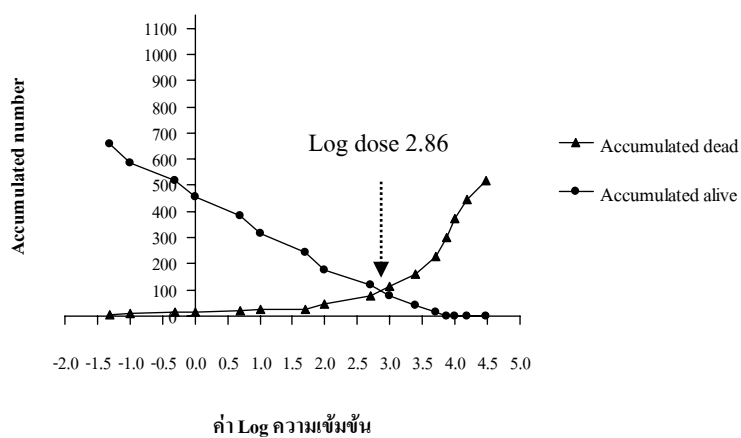
เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ที่ 24 ชั่วโมง



ข.

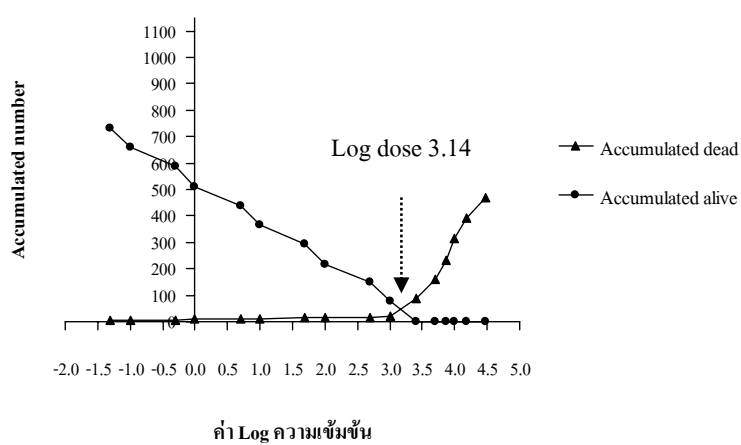
- ภาพผนวกที่ ข3 การวาดกราฟเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลังการเพาะเลี้ยงไรทะเลด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 24 ชั่วโมง
- ก. ตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์
- ข. ตัวทำละลายเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์
- ค. ตัวทำละลายเอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)
- ง. ตัวทำละลายน้ำกลั่น

เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น) ที่ 24 ชั่วโมง



ค.

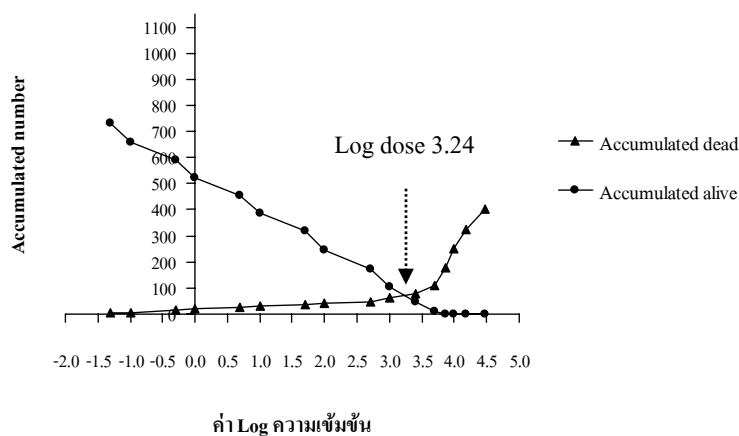
น้ำกลั่น ที่ 24 ชั่วโมง



ง.

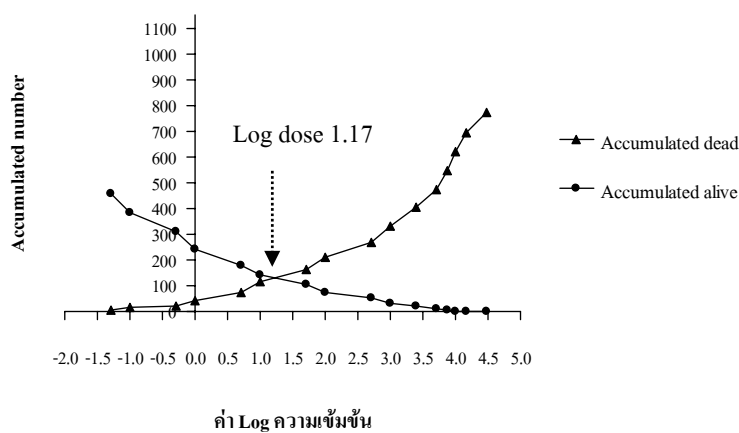
ภาพผนวกที่ ข3 (ต่อ)

เอทานอลบริสุทธิ์ ที่ 48 ชั่วโมง



ก.

เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ที่ 48 ชั่วโมง



ข.

ภาพผนวกที่ ข4 การวาดกราฟเพื่อหาค่า LC_{50} ด้วย Reed-Muench Accumulated Death ภายหลังการ

เพาะเลี้ยงไรทะเลด้วยสารสกัดจากตะไคร้ที่ 48 ชั่วโมง

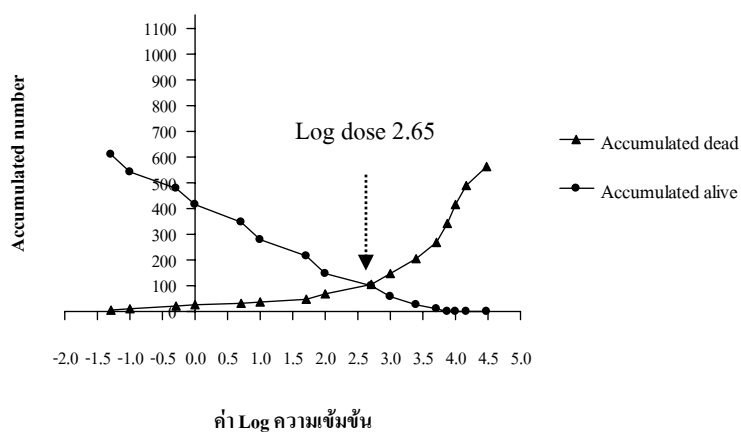
ก. ตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์

ข. ตัวทำละลายเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์

ค. ตัวทำละลายเอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)

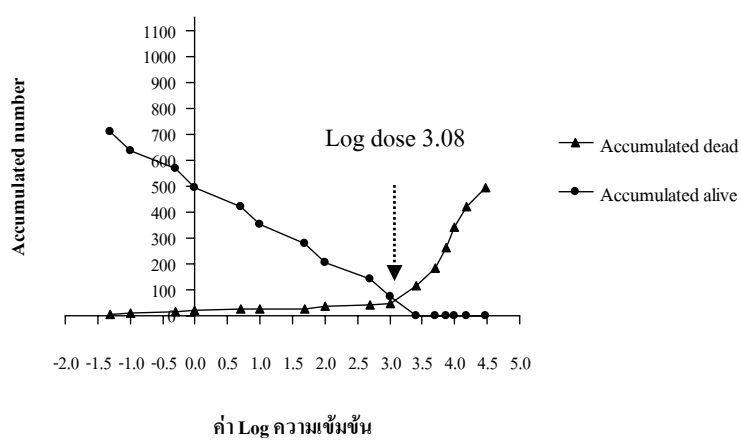
ง. ตัวทำละลายน้ำกลั่น

เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น) ที่ 48 ชั่วโมง



ก.

น้ำกลั่น ที่ 48 ชั่วโมง

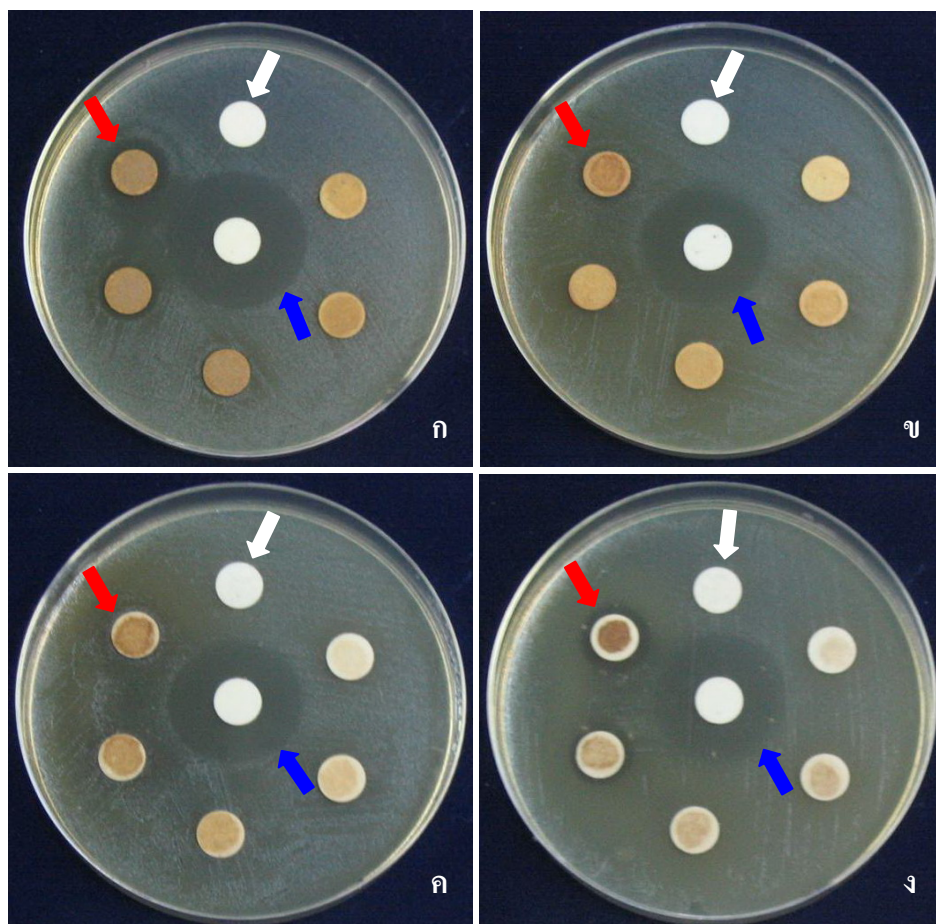


ง.

ภาพผนวกที่ ๔ (ต่อ)

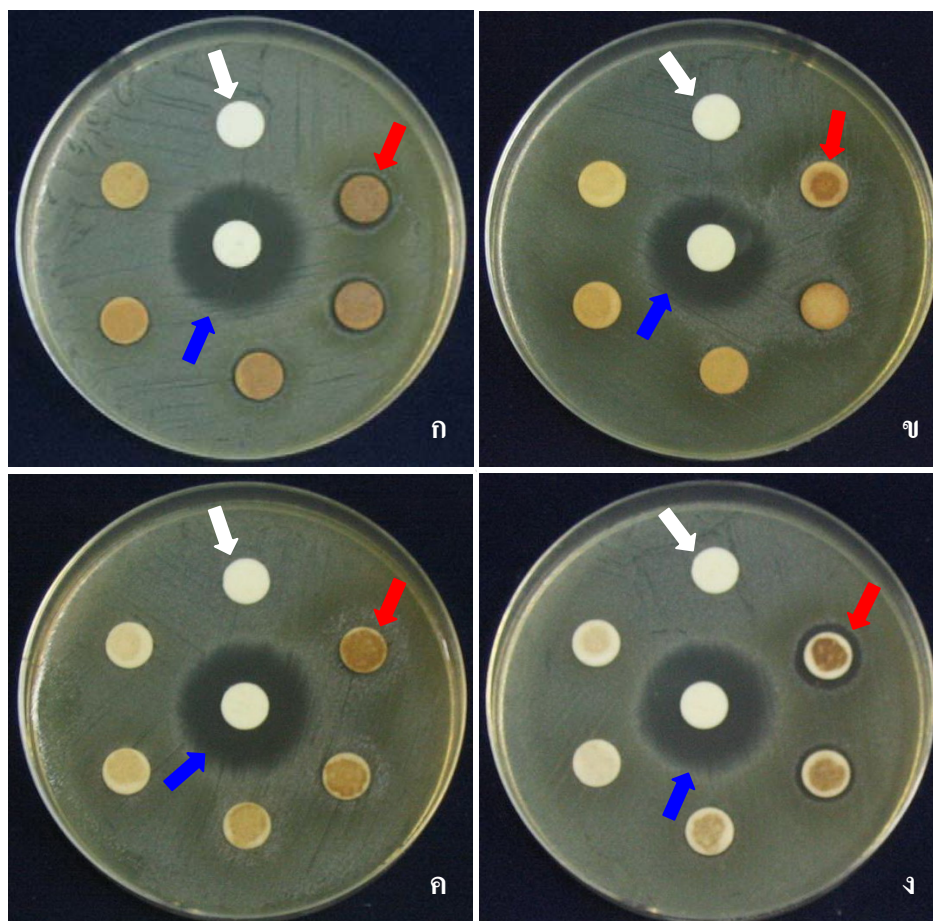
ภาคผนวก ค
ภาพจากการทดลอง

1. การทดสอบฤทธิ์ และประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัดตะไคร้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี agar disc diffusion



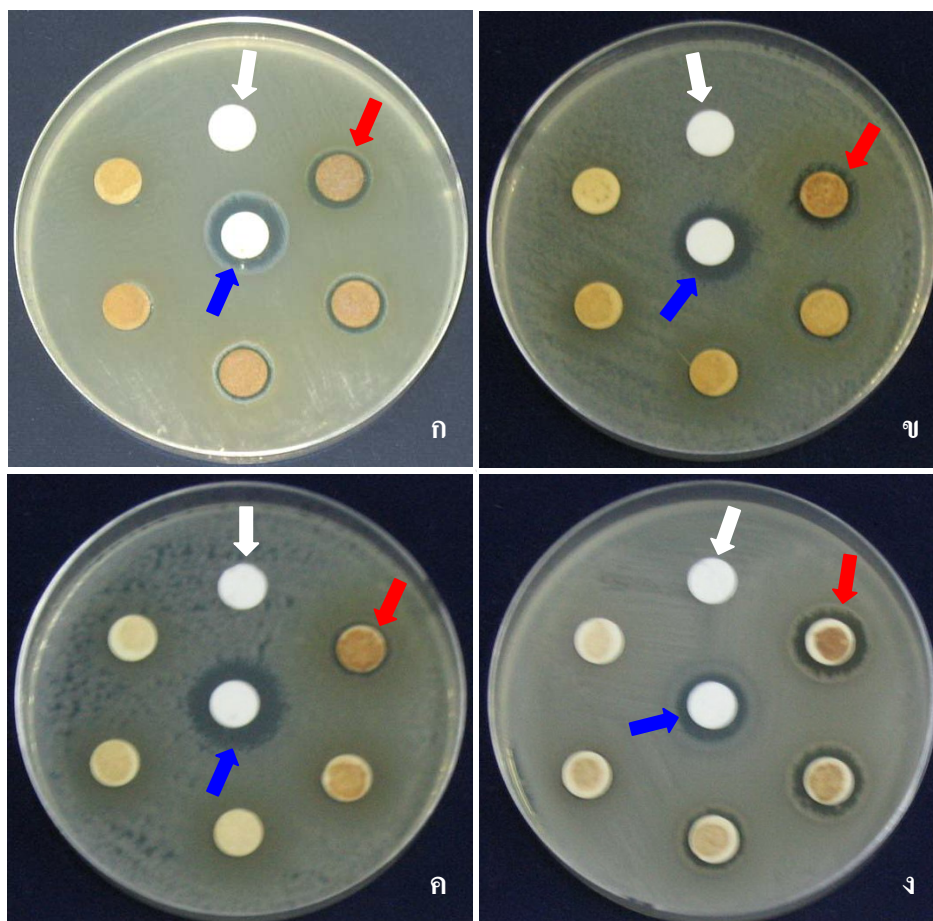
ภาพผนวกที่ ค1 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ของสารสกัดจากตะไคร้ด้วยตัวทำละลายต่างชนิด
 ก. เอทานอลบริสุทธิ์
 ข. เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์
 ค. เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)
 ง. น้ำกลั่น

หมายเหตุ ลูกศร แทน การชี้ให้เห็นถึงเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้ง (สีแดง: สารสกัดความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, สีน้ำเงิน: tetracycline ปริมาณ 30 ไมโครกรัม (positive control) และ สีขาว: ตัวทำละลาย (negative control))



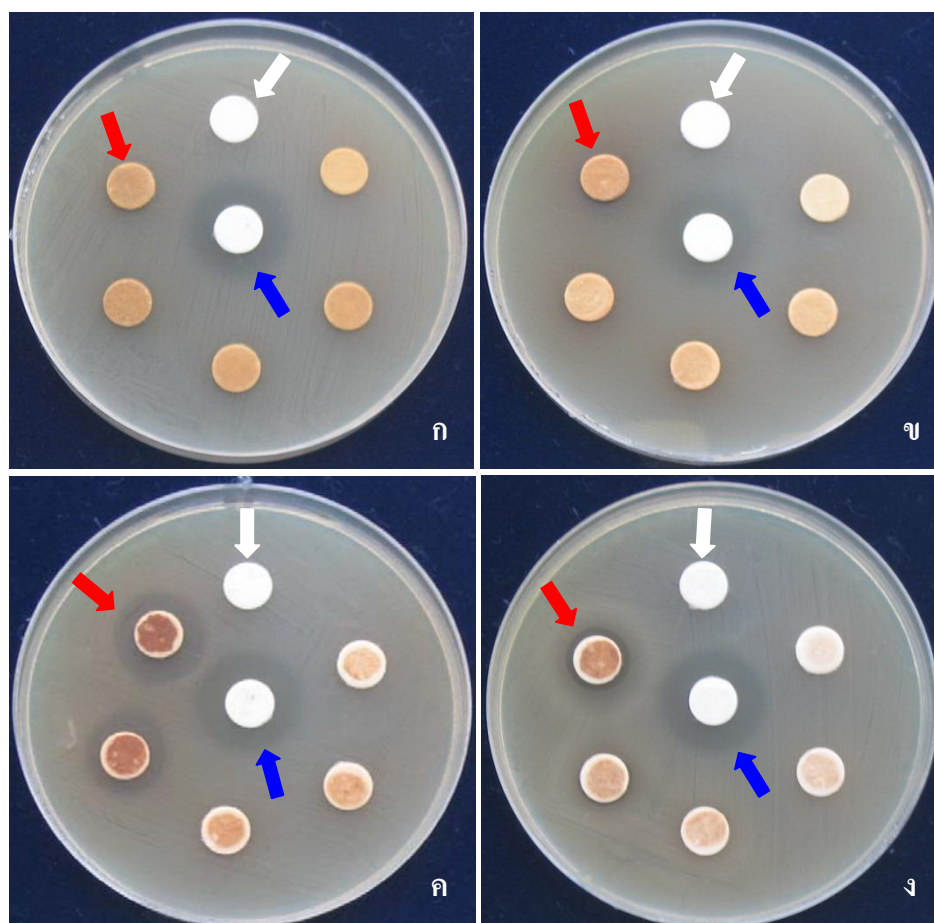
ภาพผนวกที่ ค2 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดจากตะไคร้ด้วย
 ตัวทำละลายต่างชนิด
 ก. เอทานอลบริสุทธิ์
 ข. เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์
 ค. เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)
 ง. น้ำกลั่น

หมายเหตุ ลูกศร แทน การชี้ให้เห็นถึงเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้ง (สีแดง: สารสกัดความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, สีน้ำเงิน: tetracycline ปริมาณ 30 ไมโครกรัม (positive control) และ สีขาว: ตัวทำละลาย (negative control))



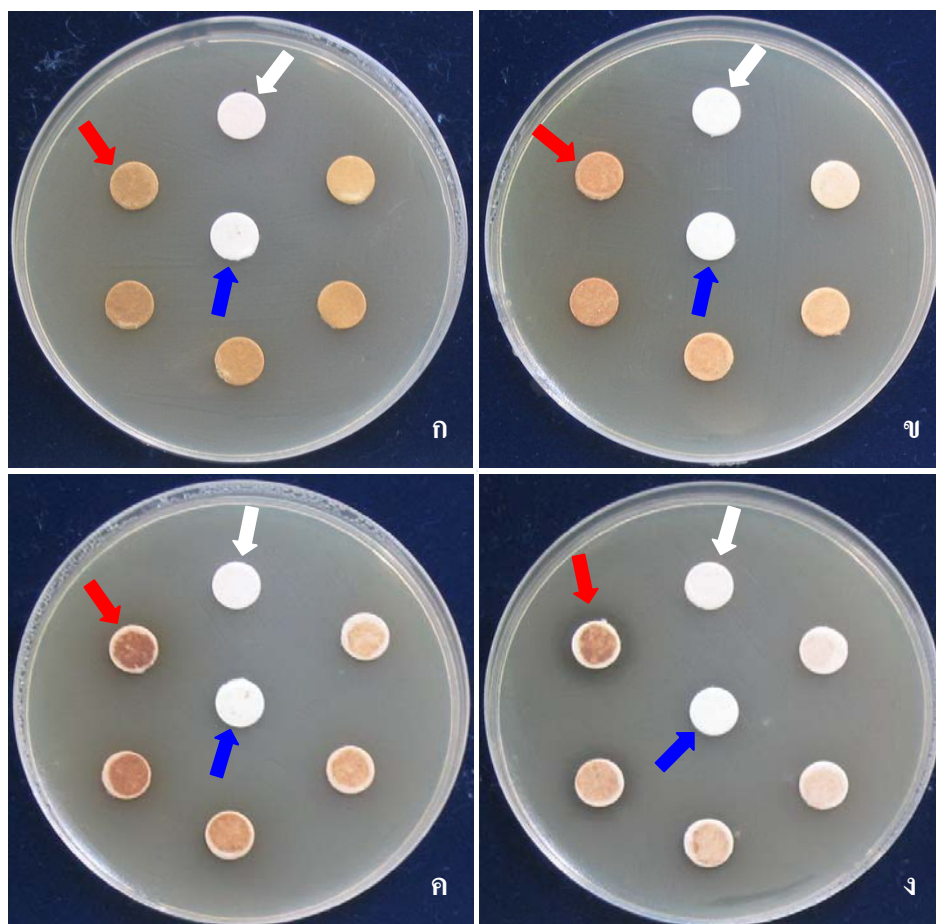
ภาพผนวกที่ ค3 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ของสารสกัดจากตะไคร้ด้วย
 ตัวทำละลายต่างชนิด
 ก. เอทานอลบริสุทธิ์
 ข. เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์
 ค. เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)
 ง. น้ำกลั่น

หมายเหตุ ลูกศร แทน การชี้ให้เห็นถึงเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้ง (สีแดง: สารสกัดความเข้มข้น
 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, สีน้ำเงิน: tetracycline ปริมาณ 30 ไมโครกรัม (positive
 control) และ สีขาว: ตัวทำละลาย (negative control))



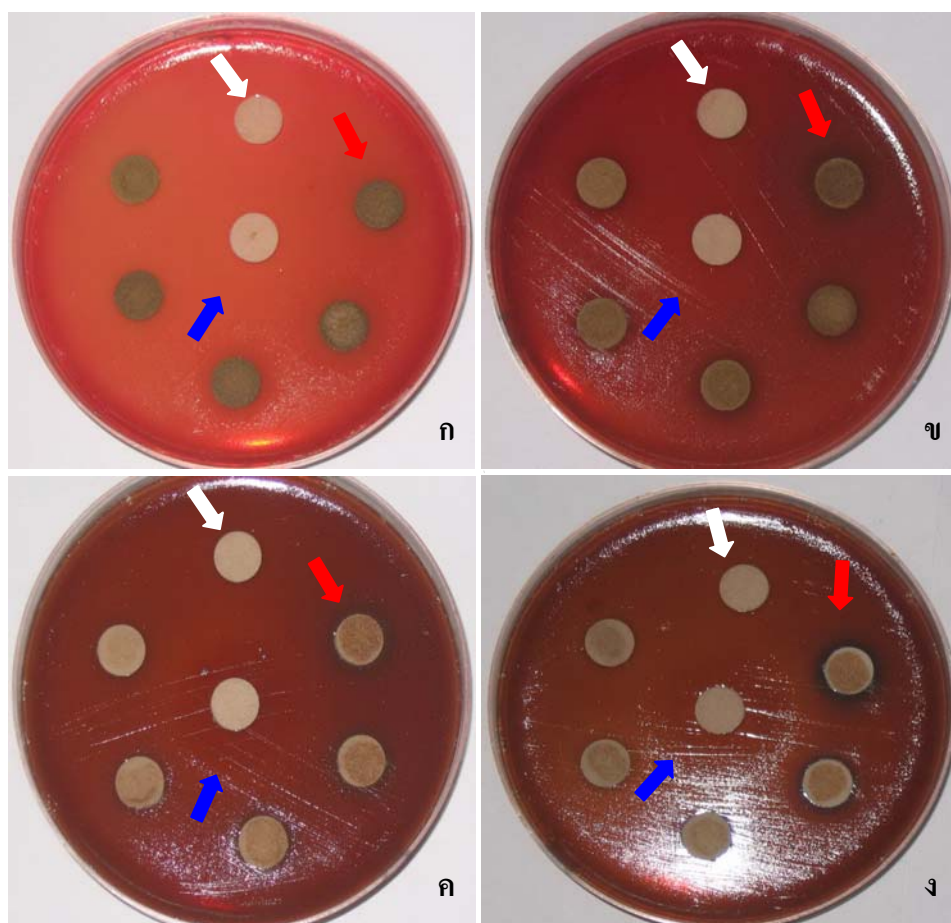
ภาพผนวกที่ ๓4 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. typhimurium* ของสารสกัดจากตะไคร้ด้วย
 ตัวทำละลายต่างชนิด
 ก. เอทานอลบริสุทธิ์
 ข. เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์
 ค. เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)
 ง. น้ำกลั่น

หมายเหตุ ลูกศร แทน การชี้ให้เห็นถึงเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้ง (สีแดง: สารสกัดความเข้มข้น
 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, สีน้ำเงิน: tetracycline ปริมาณ 30 ไมโครกรัม (positive
 control) และ สีขาว: ตัวทำละลาย (negative control))



ภาพผนวกที่ ค5 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ของสารสกัดจากตะไคร้ด้วย
 ตัวทำละลายต่างชนิด
 ก. เอทานอลบริสุทธิ์
 ข. เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์
 ค. เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)
 ง. น้ำกลั่น

หมายเหตุ ลูกศร แทน การชี้ให้เห็นถึงเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้ง (สีแดง: สารสกัดความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, สีน้ำเงิน: tetracycline ปริมาณ 30 ไมโครกรัม (positive control) และ สีขาว: ตัวทำละลาย (negative control))



ภาพผนวกที่ ๑๖ แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. pyogenes* ของสารสกัดจากตะไคร้ด้วย

ตัวทำละลายต่างชนิด

ก. เอทานอลบริสุทธิ์

ข. เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์

ค. เอทานอลทางการค้า 40 เปอร์เซ็นต์ (สุรากลั่น)

ง. น้ำกลั่น

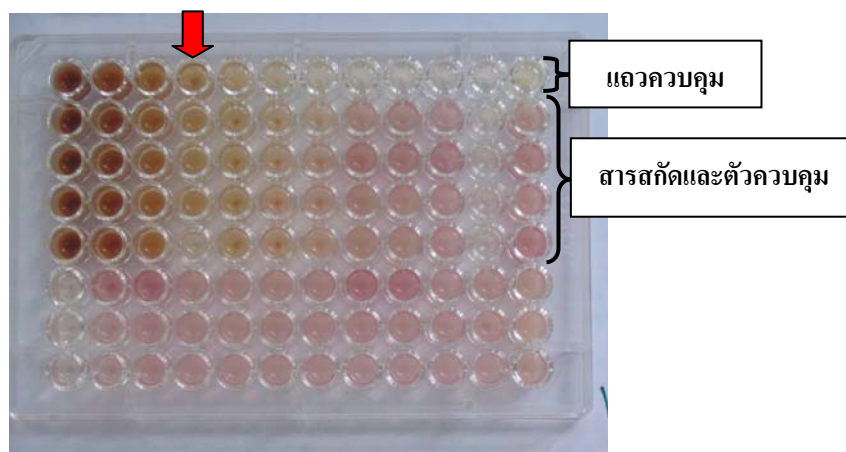
หมายเหตุ ลูกศร แทน การชี้ให้เห็นถึงเส้นผ่านศูนย์กลางของวงยับยั้ง (สีแดง: สารสกัดความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, สีน้ำเงิน: tetracycline ปริมาณ 30 ไมโครกรัม (positive control) และ สีขาว: ตัวทำละลาย (negative control))

2. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากตะไคร้ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) โดยวิธี broth dilution



ภาพผนวกที่ ค7 ตัวอย่างการหาค่า MIC ของสารสกัดจากตะไคร้ โดยวิธี macrobroth dilution

หมายเหตุ กรณีนี้เป็นสารสกัดจากตะไคร้ด้วยตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ต่อการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* โดยค่า MIC เท่ากับ 9.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ลูกศรสีแดง)



ภาพผนวกที่ ค8 ตัวอย่างการหาค่า MIC ของสารสกัดจากตะไคร้ โดยวิธี microbroth dilution

หมายเหตุ กรณีนี้เป็นสารสกัดจากตะไคร้ด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่นต่อการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* โดยค่า MIC เท่ากับ 37.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ลูกศรสีแดง)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นายจิตติกร ดวงอุปมา
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 18 กันยายน 2526
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง
ประวัติการศึกษา	- มัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลาย โรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย อ.เมือง จ.ลำปาง พ.ศ. 2543 - วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ พ.ศ. 2547
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	--
ผลงานทางวิชาการ	นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ภาคใต้ ครั้งที่ 5 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่