Science, Technology and Social Sciences Procedia 2022; 2022(4): rspg056
https://wjst.wu.ac.th/index.php/stssp

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเซลล์เท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร†

นิภาวรรณ์ จิตโสภากุล
Nipawan Jitsopakul

สาขาพืชศาสตร์ สิ่งทอและการออกแบบ คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ อำเภอเมืองสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์ 32000

อีเมล: njitsopakul@hotmail.com

บทคัดย่อ

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) โดยนำแคลลัสของเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่แปรผันความเข้มข้นของ 6-benzylaminopurine 0 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-dichlorophenoxyacetic acid ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม และไม่เติม α-naphthalene acetic acid ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Indole acetic acid ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 10 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า แคลลัสมีสีขาวปนเขียว ก้อนเล็กอัดแน่น มีขนาดใหญ่ที่สุดเฉลี่ย 2.56 x 3.17 เซนติเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 6- benzylaminopurine ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนยอด และความสูงยอดสูงสุดเฉลี่ย 3.10 ยอดต่อแคลลัส และ 2.65 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่เติม Indole acetic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และจำนวนรากสูงสุดเฉลี่ย 23 รากต่อแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม α-Naphthalene acetic acid ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยเปรียบเทียบตัวทำละลายในการสกัดสารจากแคลลัสเพาะเลี้ยง คือ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และเฮกเซน พบว่า การใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลายสามารถสกัดสารจากแคลลัสเพาะเลี้ยงที่มีผลยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Bacillus cereus* มากกว่าการใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย สารสกัดจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ α-naphthalene acetic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* มากที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 0.77 และ 0.80 เซนติเมตร ตามลำดับ การสกัดสารจากใบ ลำต้น และรากเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดจากรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ α-naphthalene acetic acid ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารที่เติม α-naphthalene acetic acid และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 0.70 เซนติเมตร เช่นเดียวกับสารสกัดจากรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ α-naphthalene acetic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* ได้เพียงสูตรเดียว สารสกัดจากใบเท้ายายม่อมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ได้เพียงสูตรเดียว โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 0.85 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าสารสกัดจากแคลลัส และราก แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* ได้ ส่วนสารสกัดจากลำต้นของเท้ายายม่อมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งทุกสูตรโดยไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อทั้ง 2 ชนิด สารสกัดจากเซลล์แคลลัส ใบ และรากเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงมีผลในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้มากกว่าเชื้อ *Bacillus cereus*

---

†การประชุมวิชาการและการนำเสนอผลงาน ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ครั้งที่ 10 (ระหว่างวันที่ 20 - 22 กันยายน 2565 ณ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์)

ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เท้ายายม่อม เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงพืชท้องถิ่นชนิดอื่นเพื่อผลิตสารจากพืชที่เป็นประโยชน์ต่อไป

คำสำคัญ: เท้ายายม่อม, แคลลัส, เอทานอล, เฮกเซน, สารสกัด

บทนำ

เท้ายายม่อม (*Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze.) เป็นพืชล้มลุกที่มีหัวใต้ดิน ในวงศ์ *Taccaceae* (Caddick et al., 2002) มีถิ่นกำเนิดในแอฟริกาตะวันตก เอเชียตะวันออกเฉียงเหนือ และตอนเหนือของออสเตรียเลีย (Ubwa et al., 2011) มีหัวอยู่ใต้ดินลักษณะกลม สำหรับสะสมอาหาร แป้งที่สกัดจากหัวเท้ายายม่อมเรียกว่า แป้งเท้ายายม่อม มีข้อดีกว่าแป้งชนิดอื่น คือ มีความมัน ลื่น ละเอียด สีขาว และเมื่อถูกความร้อนจะมีความคงตัวได้นานกว่าแป้งชนิดอื่น หัวเท้ายายม่อมที่สามารถนำมาผลิตแป้งได้ต้องมีอายุ 3 ปี (สุพินญา บุญมานพ และ ปาริฉัตร สังข์สะอาด, 2018) ประโยชน์ของแป้งเท้ายายม่อม คือ ใช้เป็นส่วนประกอบในการทำอาหาร และขนม (สุพินญา บุญมานพ และ ปาริฉัตร สังข์สะอาด, 2018) เป็นสมุนไพรที่ใช้สำหรับคนไข้ที่อ่อนเพลีย และเบื่ออาหาร (สุนทรี สิงหบุตรา, 2536) ใช้ในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ (Makhtar et al., 2013) สารที่พบในเท้ายายม่อมมีที่สำคัญ คือ ซาโปนิน (saponins) โดยสาร steroidal saponins ที่สกัดจากใบเท้ายายม่อมมีฤทธิ์ฆ่าหอยได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง (สุภาภรณ์ ภัทรสุทธิ และคณะ, 2543) ในการขยายพันธุ์เท้ายายม่อมโดยวิธีธรรมชาติทำได้โดยการใช้หัว หรือการเพาะเมล็ด แต่ปัญหาที่พบ คือ มีการนำหัวเท้ายายม่อมมาใช้ทำแป้ง และการขยายพันธุ์ด้วยหัวทำได้ในช่วงฤดูฝน ส่วนการเพาะเมล็ดปัญหาที่ พบคือ อัตราการงอกของเมล็ดต่ำ หรือบางครั้งเมล็ดไม่สามารถงอกได้ จึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการขยายพันธุ์ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถขยายพันธุ์พืชได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้นภายใต้สภาพปลอดเชื้อ สามารถผลิตพืชได้ทั้งตลอดทั้งปีโดยไม่ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ และภูมิประเทศ ในการเพาะเลี้ยงสามารถใช้เพียงส่วนหนึ่งส่วนใดของต้นพืชเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ ไม่ต้องทำลายต้นพืชทั้งต้น โดยสามารถปรับสภาวะของการเพาะเลี้ยง และองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยังมีข้อได้เปรียบ คือ สามารถให้ผลผลิตสารออกฤทธิ์ของพืชในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้ เช่น สารสกัดจากใบ และแคลลัสของพิทูเนียเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS, 1962) ที่แปรผันความเข้มข้นของ 2,4-dicholophenoxyacetic acid (2,4-D) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa, Baccilus subtilis, Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp และ *Salmonella* spp. โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย (Thenmozhi & Sivaraj, 2011) สารสกัดจากแคลลัสของต้นรำเพย (*Thevetia peruviana*) เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus B. cereus* และ *P. aeruginosa* ได้สูงกว่าเชื้อ *E. coli* เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบรำเพยเพาะเลี้ยง (Alhashimi et al., 2013) เชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่สร้างสารพิษซึ่งทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารของคน โดยมีอาการท้องร่วง และอุจจาระมีเลือดปน ในรายที่มีอาการรุนแรงจะทำให้เกิดความผิดปกติที่ไตซึ่งอาจถึงแก่ชีวิตได้โดยเฉพาะในเด็ก และคนชรา และ เชื้อ *B. cereus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ปนเปื้อนในอาหาร สร้างสารพิษที่ทำให้อุจจาระร่วง และสารพิษที่ทำให้คลื่นไส้ อาเจียน (วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์ และคณะ, 2559) แต่ยังไม่มีรายงานการสกัดสารจากเซลล์เท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร งานวิจัยนี้เป็นงานสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ

จุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่ออนุรักษ์พันธุกรรมเท้ายายม่อมด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และเพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัส ราก ใบ และลำต้นเท้ายายม่อมเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *B. cereus*

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญของแคลลัสเท้ายายม่อม

นำแคคลัสของเท้ายายม่อมที่ได้จากการเพาะเมล็ดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS, 1962) ที่แปรผันความเข้มข้นของ 6-benzylaminopurine (BA) คือ 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม และไม่เติม **α**-napthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Indole acetic acid (IAA) ความเข้มข้น 1 และ 2

มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร วุ้นเจลไรท์ 4 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.7 ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 10 ชั่วโมงต่อวัน ทำการบันทึกขนาดของแคลลัส จำนวนยอดเฉลี่ย ความสูงเฉลี่ย และจำนวนรากเฉลี่ย

2. การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากเซลล์ของเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยง

นำแคลลัสเท้ายายม่อมที่เพาะเลี้ยงจากอาหารเพาะเลี้ยง ข้อ 1 มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และเฮกเซน อัตราส่วนแคลลัส 1 กรัม ต่อ ตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (37±2 องศาเซลเซียส) ทำการกรองสารสกัดผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารสกัดที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคต่อไป ส่วนการสกัดสารจากใบ ลำต้น และรากเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และทำการสกัดเช่นเดียวกับการสกัดแคลลัสเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 1)

3. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

3.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อ *E. coli* และ *B. cereus* เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Nutrient broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (37±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 625 นาโนเมตร ให้มีค่า absorbance อยู่ระหว่าง 0.08-0.10

3.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเซลล์เท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเซลล์เท้ายายม่อมเพาะเลี้ยง ได้แก่ แคลลัส ราก ใบ และลำต้น ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion (Okeke et al., 2001) โดยทำการเตรียมอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) ในจานเพาะเลี้ยง ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นไว้ ทำการ swab ให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จากนั้นหยดสารสกัดที่จะทดสอบลงบนแผ่น paper disc (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร) โดยหยดสารสกัด ตำแหน่งละ 10 ไมโครลิตร รอจนแห้ง แล้วหยดอีก 2 ครั้ง วางแผ่น paper disc ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA รวมทั้งหยดตัวทำละลายนั้นๆ เป็นชุดควบคุม (control) โดยใช้ automatic pipette ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อนี้ไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (37±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใส (clear zone) หรือบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) และวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. สารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญของแคลลัสเท้ายายม่อม

เมื่อนำแคคลัสเท้ายายม่อมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่แปรผันความเข้มข้นของ BA คือ 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม และไม่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 10 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า แคลลัสมีสีขาวปนเขียว ก้อนเล็กอัดแน่น (ภาพที่ 1) โดยแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุดเฉลี่ย 2.56 x 3.17 เซนติเมตร (ตารางที่ 1) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แคลลัสขนาดเฉลี่ย 2.53 x 3.22 เซนติเมตร และ 2.41 x 3.19 เซนติเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 3 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ 2,4-D ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่า การใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นให้ขนาดของแคลลัสใหญ่กว่าการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารทุกสูตรสามารถเกิดเป็นยอดได้ โดยจำนวนยอดสูงสุดเฉลี่ย 3.10 ยอดต่อแคลลัส ความสูงยอดสูงสุดเฉลี่ย 2.65 เซนติเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหาร ที่เติม IAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 1) และจำนวนรากสูงสุดเฉลี่ย

23 รากต่อแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สอดคล้องกับรายงานของ Charoensub et al. (2008) พบว่า NAA กระตุ้นการเกิดรากของค้างคาวดำ

2. เปรียบเทียบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากแคลลัสเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร

เมื่อนำแคลลัสเท้ายายม่อมที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร ข้อ 1 มาสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และเฮกเซน เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *B. subtilis* ก่อโรคในอาหาร พบว่า การใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลายสามารถสกัดสารจากแคลลัสเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงที่มีผลยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *B. cereus* มากกว่าการใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย (ตารางที่ 2 ภาพที่ 2 ก และ ค) สอดคล้องกับการสกัดสารจากใบ และแคลลัสเพาะเลี้ยงของ *Baliospermum axillare* ด้วยเอทานอล สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Singh and Sudarshana, 2003) และการสกัดสารจาก *Scutellaria orientalis* L. subsp. *Bicolor* ด้วยเมทานอลให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กว่าการใช้อะซีโตน และเฮกเซน เป็นตัวทำละลาย (Ozdemir et al., 2016) และสารสกัดจากแคลลัสพิทูเนียเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS (1962) ที่เติม 2,4-D โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ดีกว่าการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย (Thenmozhi & Sivaraj, 2011) สารสกัดจากแคลลัสเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* แบคทีเรียแกรมลบ ได้มากกว่าเชื้อ *B. cereus* แบคทีเรียแกรมบวกซึ่งมีผนังเซลล์หนา และแข็งแรงกว่าแบคทีเรียแกรมลบ แต่เมมเบรนของแบคทีเรียแกรมลบมีไขมันมาก ซึ่งสารซาโปนินมีคุณสมบัติเหมือนผงซักฟอกอาจเพิ่มการซึมผ่านของสารเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ ซึ่งตรงข้ามกับสารสกัดจากแคลลัสของต้นรำเพยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้เลย (Alhashimi et al., 2013)

แคลลัสที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* มากที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 0.80 เซนติเมตร และสารสกัดจากแคลลัสเท้ายายม่อมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* มากที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 0.77 เซนติเมตร ส่วนแคลลัสที่สกัดด้วยเฮกเซนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* มากที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 0.70 เซนติเมตร ส่วนสารสกัดแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้ (ตารางที่ 2)

3. ผลของสกัดสารจากรากเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร

เมื่อนำรากเท้ายายม่อมที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร ข้อ 1 สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *B. subtilis* ก่อโรคในอาหาร พบว่า สารสกัดจากรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 2 ข) อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารที่เติม NAA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* (ตารางที่ 3) โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 0.70 เซนติเมตร ส่วนรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้เพียงสูตรเดียว โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 0.70 เซนติเมตร (ภาพที่ 2 ง)

4. ผลของสกัดสารจากใบเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร

เมื่อนำใบของเท้ายายม่อมที่เพาะเลี้ยง ข้อ 1 สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *B. subtilis* ก่อโรคในอาหาร พบว่า สารสกัดจากใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* เพียงสูตรเดียว โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 0.85 เซนติเมตร และใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ทุกสูตร ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus*

5. ผลของสกัดสารจากลำต้นเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร

เมื่อนำลำต้นของเท้ายายม่อมที่เพาะเลี้ยงข้อ 1 สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *B. subtilis* ก่อโรคในอาหาร พบว่า สารสกัดจากลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (1962) ทุกสูตร ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *B. cereus*

ตารางที่ 1 การเจริญของเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 10 ชั่วโมงต่อวัน

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)				ขนาดแคลลัสเฉลี่ย (เซนติเมตร) (กว้าง x ยาว)	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด/แคลลัส)	ความสูงยอดเฉลี่ย(เซนติเมตร)	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก/แคลลัส)
BA	NAA	2,4-D	IAA				
-	-	-	-	1.85±0.15^{e}x2.70±0.19^{b}	2.80±1.18^{b}	2.51±0.75^{a}	8.20±2.62^{c}
1	-	-	-	2.22±0.21^{d}x2.86±0.21^{b}	0.56±0.24^{d}	1.09±0.75^{c}	6.00±2.05^{cd}
2	-	-	-	2.35±0.18^{c}x3.11±0.20^{b}	0.20±0.13^{d}	1.20±0.81^{c}	4.00±1.26^{d}
3	-	-	-	2.56±0.09^{a}x3.17±0.21^{a}	0.90±0.43^{c}	2.06±0.86^{a}	0.60±0.40^{e}
-	0.5	-	-	2.07±0.14^{d}x3.00±0.15^{b}	2.30±0.45^{bc}	2.03±0.38^{a}	23.00±4.36^{a}
1	0.5	-	-	2.18±0.16^{d}x2.90±0.19^{b}	0.80±0.36^{c}	1.63±0.78^{b}	4.50±1.70^{cd}
2	0.5	-	-	2.41±0.21^{b}x3.19±0.12^{a}	0.11±0.11^{d}	0.22±0.22^{d}	3.33±1.56^{d}
3	0.5	-	-	2.53±0.16^{b}x3.22±0.15^{a}	0.60±0.34^{d}	0.86±0.49^{d}	2.40±1.14^{d}
-	-	0.5	-	2.18±0.20^{d}x2.72±0.24^{b}	1.50±0.79^{bc}	1.94±0.79^{b}	5.80±2.27^{cd}
-	-	1	-	2.09±0.23^{d}x2.70±0.26^{b}	0.70±0.30^{c}	1.55±0.75^{b}	2.80±1.01^{d}
-	0.5	0.5	-	2.06±0.31^{d}x2.70±0.44^{b}	2.00±1.14^{bc}	1.65±0.76^{b}	13.20±4.93^{b}
-	0.5	1	-	2.55±0.25^{a}x3.15±0.21^{a}	2.10±0.72^{bc}	2.39±0.76^{a}	8.30±1.88^{c}
-	1	0.5	-	1.91±0.29^{e}x2.48±0.27^{c}	0.70±0.37^{c}	1.17±0.69^{c}	8.30±3.43^{c}
-	1	1	-	2.28±0.17^{c}x2.82±0.17^{b}	0.60±0.27^{d}	1.06±0.56^{c}	0.30±0.30^{e}
-	-	-	1	1.66±0.12^{e}x2.48±0.16^{c}	3.10±1.31^{a}	2.65±0.80^{a}	12.00±2.78^{bc}
-	-	-	2	1.80±0.14^{e}x2.59±0.16^{b}	1.70±0.68^{bc}	2.44±0.89^{a}	5.90±2.35^{cd}

หมายเหตุ: ± Standard Derivation (SD)

ตัวอักษรที่เหมือนกันที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan’s Test

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากแคลลัสเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli และ B. cereus* ก่อโรคในอาหาร

สูตรอาหาร	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (เซนติเมตร)			
	เอทานอล 95 เปอร์เซนต์		เฮกเซน	
	E. coli	*B. cereus*	*E. coli*	*B. cereus*
MS	0[g]	0[d]	0[b]	0
MS + 1 mg/L BA	0.72±0.02[e]	0[d]	0[b]	0
MS + 2 mg/L BA	0.74±0.04[c]	0[d]	0[b]	0
MS + 3 mg/L BA	0.73±0.00[d]	0[d]	0.70±0.02[a]	0
MS + 1 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	0.79±0.02[b]	0.73±0.02[b]	0[b]	0
MS + 2 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	0.70±0.00[f]	0[d]	0[b]	0
MS + 3 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	0[g]	0[d]	0[b]	0
MS + 0.5 mg/L NAA	0.70±0.00[f]	0[d]	0[b]	0
MS + 0.5 mg/L 2,4-D	0.72±0.02[e]	0[d]	0[b]	0
MS + 1 mg/L 2,4-D	0.72±0.02[e]	0.70±0.02[c]	0[b]	0
MS + 0.5 mg/L 2,4D + 0.5 mg/L NAA	0.72±0.02[e]	0.70±0.00[c]	0[b]	0
MS + 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L NAA	0.70±0.02[f]	0.70±0.00[c]	0[b]	0
MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA	0.70±0.00[f]	0.77±0.02[a]	0[b]	0
MS + 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA	0.80±0.07[a]	0[d]	0[b]	0
MS + 1 mg/L IAA	0.73±0.00[d]	0[d]	0[b]	0
MS + 2 mg/L IAA	0.74±0.04[c]	0.70±0.02[b]	0[b]	0

หมายเหตุ: ± Standard Derivation (SD)

ตัวอักษรที่เหมือนกันที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan’s Test

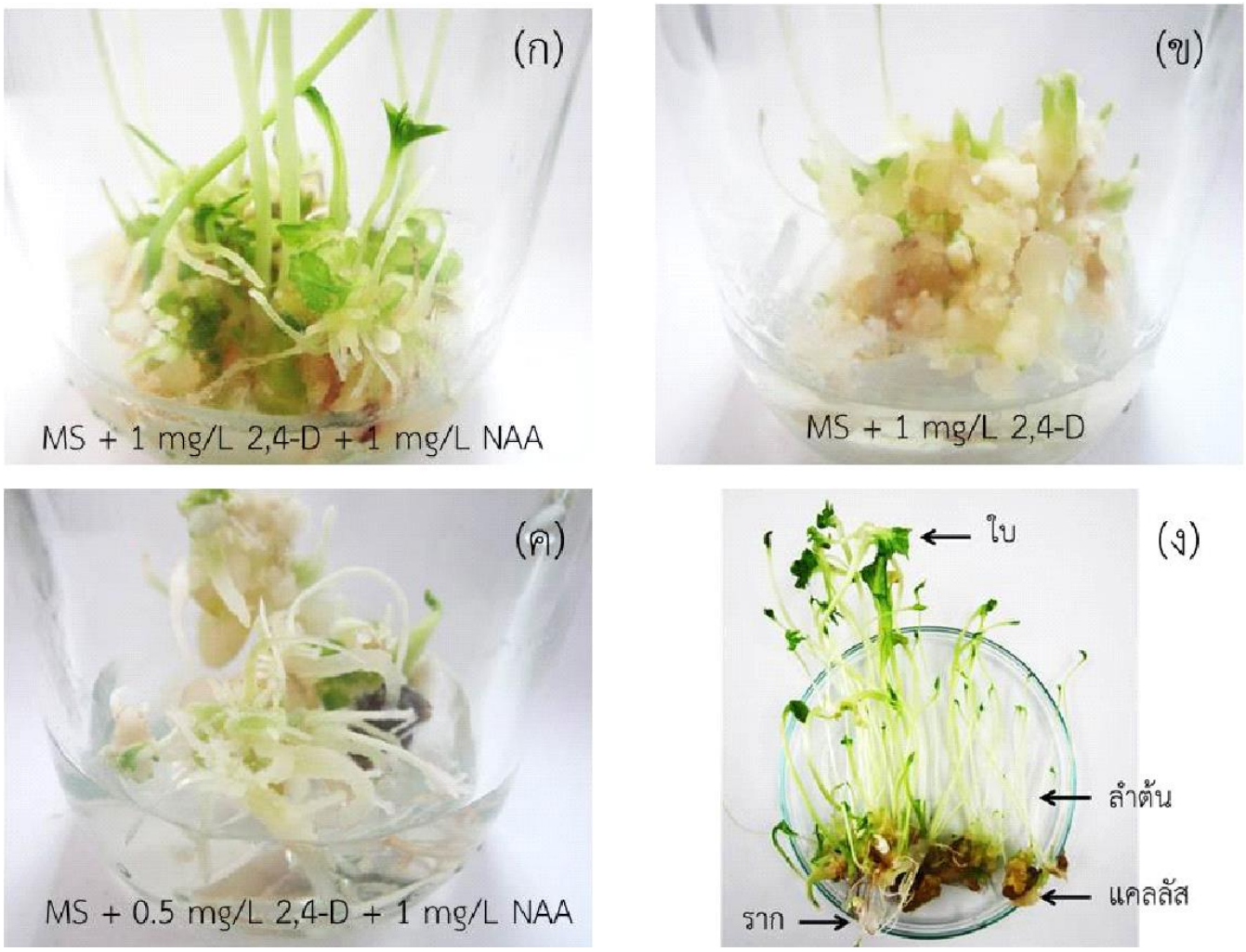
ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดจากส่วนของราก ใบ และลำต้นเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่แปรผันสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *B. cereus* เมื่อสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซนต์

สูตรอาหาร	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (เซนติเมตร)					
	ราก		ใบ		ลำต้น	
	E. coli	*B. cereus*	*E. coli*	*B. cereus*	*E. coli*	*B. cereus*
MS	0[b]	0[b]	0[b]	0	0	0
MS + 1 mg/L BA	0.70±0.02[a]	0[b]	0[b]	0	0	0
MS + 2 mg/L BA	0.70±0.02[a]	0[b]	0[b]	0	0	0
MS + 3 mg/L BA	0[b]	0[b]	0[b]	0	0	0
MS + 1 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	0.70±0.02[a]	0[b]	0[b]	0	0	0
MS + 2 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	0[b]	0[b]	0[b]	0	0	0
MS + 3 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	0[b]	0[b]	0[b]	0	0	0
MS + 0.5 mg/L NAA	0.70±0.00[a]	0[b]	0[b]	0	0	0
MS + 0.5 mg/L 2,4-D	0.70±0.02[a]	0[b]	0[b]	0	0	0
MS + 1 mg/L 2,4-D	0[b]	0[b]	0.85±0.02[a]	0	0	0
MS + 0.5 mg/L 2,4D + 0.5 mg/L NAA	0[b]	0[b]	0[b]	0	0	0
MS + 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L NAA	0[b]	0[b]	0[b]	0	0	0
MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA	0[b]	0.70±0.00[a]	0[b]	0	0	0
MS + 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA	0[b]	0[b]	0[b]	0	0	0
MS + 1 mg/L IAA	0[b]	0[b]	0[b]	0	0	0
MS + 2 mg/L IAA	0[b]	0[b]	0[b]	0	0	0

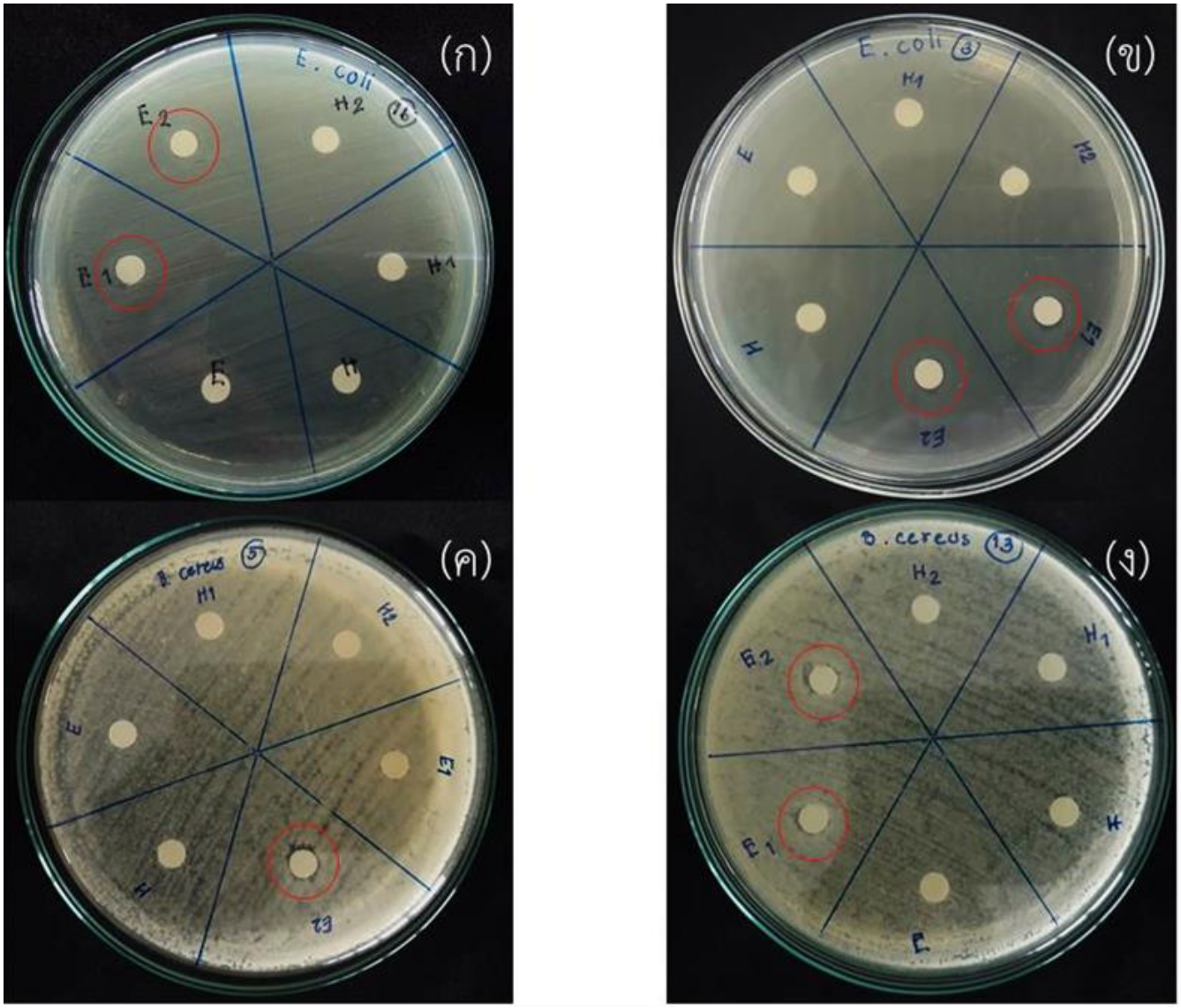
หมายเหตุ: ± Standard Derivation (SD)

ตัวอักษรที่เหมือนกันที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan’s Test



ภาพที่ 1 การเกิดแคลลัส ยอด ราก และใบของเท้ายายม่อมเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 10 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 60 วัน



ภาพที่ 2 การเกิดบริเวณใสของสารสกัดจากเซลล์เท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกอโรคในอาหารดวยวิธี Agar disc diffusion เมื่อ ใช้เอทานอล (E1 และ E2) และ เฮกเซน (H1 และ H2) เป็นตัวทำละลาย

(1) สารสกัดจากแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS + 2 mg/L IAA ยับยั้งเชื้อ *E. coli*

(2) สารสกัดจากรากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS + 2 mg/L BA ยับยั้งเชื้อ *E. coli*

(3) สารสกัดจากแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS + 1 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA ยับยั้งเชื้อ *B. cereus*

(4) สารสกัดจากรากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA ยับยั้งเชื้อ *B. cereus*

สรุปผล

การอนุรักษ์พันธุกรรมเท้ายายม่อมโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัส ราก ใบ และลำต้นในสภาพปลอดเชื้อเพื่อผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร โดยใช้สารสกัดจากเซลล์เท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่แปรผันสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2,4-D NAA และ IAA สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้มากกว่าเชื้อ *B. cereus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ชนิดของเซลล์เท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงมีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร โดยสารสกัดจากใบเท้ายายม่อมเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัส และรากเพาะเลี้ยง แต่สารสกัดจากส่วนของลำต้นเพาะเลี้ยงไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เท้ายายม่อม เพื่อผลิตสารออกฤทธิ์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงพืชท้องถิ่นชนิดอื่นเพื่อผลิตสารจากพืชเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

บรรณานุกรม

วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, พัชรี กัมมารเจษฎากุล, และ อิสยา จันทร์วิทยานุชิต. (2559). ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* ATCC 25922. *วารสาร มฉก. วิชาการ, 19*(38), 35-48.

สุนทรี สิงหบุตรา. (2536). *สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: โอเอสพริ้นติ้งเฮ้าส์.

สุพินญา บุญมานพ และ ปาริฉัตร สังข์สะอาด. (2018). *การขยายพันธุ์เท้ายายม่อมเพื่อการอนุรักษ์* (น. 82-90). การประชุมวิชาการการบริหารจัดการความหลากหลายทางชีวภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 5. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

สุภาภรณ์ ภัทรสุทธิ, นพรัตน์ หยีดจันทร์, ดวงจันทร์ ภูเขียวศักดิ์, และ ธีระ วงษ์เจริญ. (2543). *ศึกษาการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของเท้ายายม่อม* (น. 14–16). การประชุมวิชาการกองพฤกษศาสตร์และวัชพืช เรื่องความก้าวหน้างานวิจัย ด้านความหลากหลายทางชีวภาพ สมุนไพร และ วัชพืช. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช.

Alhashimi, S. K. M., Rashid, K. I., Saleh, G. S., Abdulhadi, A. M., & Taher, T. A. (2013). The antimicrobial activity of leaves and callus extracts of *Thevetia peruviana In vitro*. *Journal of Biotechnology Research Center*, *7*(3), 74-80.

Caddick, R. L., Wilkin, P., Rudall, P. J., Hedderson, A. J., & Chase, M. W. (2002). Yams reclassified: A recircumscription of *Dioscoreaceae* and *Dioscoreales*. *Taxon, 51*, 103–114.

Charoensub, R., Thiantong, D., & Phansiri, S. (2008). Micropropagation of bat flower plant, *Tacca chantrieri* Andre. *Kasetsart Journal (Natural Sciences), 42*(suppl. 5), 7-12.

Makhtar, N. S. M., Rais, M. F. M, Rodhi, M. N. M., Bujang, N., Musa M., & Hamid, K. H. K. (2013). *Tacca leontopetaloides* starch: New sources starch for biodegradable plastics (pp. 385-391). In Proceedings of the Malaysian International Tribology Conference 2013. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, *15*, 473-497.

Okeke, M. I., Iroegbu, C. U., Eze, E. N., Okoli, A. S., & Esimone, C. O. (2001). Evaluation of extracts of the roots of *andolphia owerriense* for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, *78*, 119-127.

Ozdemir, F. A., Kilic, O., & Atalan, E. (2016). In vitro callus propagation and antibacterial activities of callus an edible endemic and medicinal plant *Scutellaria orientalis* L. subsp. *bicolor*. *Progress in Nutrition*, *18*(1), 81-86.

Singh, K., & Sudarshana, M. S. (2003). Antimicrobial activity of *Baliospermum axillare* plant and callus extract. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences journal*, *5*, 571-574.

Thenmozhi, M., & Sivaraj, R. (2011) *In Vitro* evaluation of the antibacterial activity of *Petunia* leaf and callus extracts. *Journal of Agricultural Technology*, *7*(2), 321-330.

Ubwa, S. T., Anhwange, B. A., & Chia, J. T. (2011). Chemical analysis of *Tacca leontopetaloides* peels. *American Journal of Food Technology, 6*, 932-938.