



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อทางผิวหนังของ

แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากสมุนไพรสาบเสือ

Bacterial skin infection diseases study of endophytic bacteria

from a medical plant *Chromolaena odorata* (L.) King &

Robinson

ดร.ศรีสุดา หาญภาคภูมิ

ผศ.ดร.ปิยาภรณ์ วรานุสันติกุล

มหาวิทยาลัยสวन्दุสิต

2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวन्दุสิต



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อทางผิวหนังของ
แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากสมุนไพรสาบเสือ

Bacterial skin infection diseases study of endophytic bacteria
from a medical plant *Chromolaena odorata* (L.) King &
Robinson

ดร.ศรีสุตา หาญภาคภูมิ

ผศ.ดร.ปิยาภรณ์ วรานุสันติกุล

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยสวนดุสิต ปีงบประมาณ 2558)

หัวข้อวิจัย	การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อทางผิวหนังของ แบคทีเรียเอนโดไฟต์จากสาบเสือ
ผู้ดำเนินการวิจัย	ดร.ศรีสุดา หาญภาคภูมิ ผศ.ดร.ปิยาภรณ์ วรรณสุนันติกุล
หน่วยงาน	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
ปี พ.ศ.	2560

คัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวนทั้งหมด 32 ไอโซเลต จากส่วนใบ ลำต้น และราก
สาบเสือจากจังหวัดชุมพร มีเพียง 9 ไอโซเลตแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากจำนวนทั้งหมด 32 ไอโซเลต
มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค 9 ชนิด ด้วยเทคนิค point inoculum พบว่า จำนวนไอโซเลตเอนโดไฟต์
ที่มีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคจากส่วนต้น (42.86%) มากกว่าส่วนราก (26.67%) และใบ (20.0%) สาร
สกัดหยาบจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต LBCH3 และ RBCH5 แสดงฤทธิ์สูงต่อการยับยั้ง *Stap.*
aureus TISTR 1466 (34.7 ± 7.2 mm) และ *B. cereus* TISTR 687 (31.0 ± 1.0 mm) ตามลำดับ
นอกจากนี้สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RBCH5 แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค
ทั้ง 9 ชนิด ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบจาก แบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RBCH5
เท่ากับ 0.39 and 0.78 mg/mL ต่อเชื้อ *Propionibacterium acnes* DMST 14916 และ *S.*
epidermis TISTR 1466, ตามลำดับ ซึ่งไอโซเลต RBCH5 แสดงความใกล้เคียงกับ *Streptomyces*
parvulus NBRC 13193^T ให้ค่าลำดับเบสใน 16S rRNA gene sequence เหมือนกับเท่ากับ 99.86
%

คำสำคัญ: แบคทีเรียเอนโดไฟต์, สาบเสือ, ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย, *Streptomyces parvulus*

Research Title	Bacterial skin infection diseases study of endophytic bacteria from a medical plant <i>Chromolaena odorata</i> (L.) King & Robinson
Researcher	Srisuda Hanphakphoom Piyaporn Waranusantigul
Organization	Science and Technology, Suan Dusit Rajabhat University Science and Technology, Suan Dusit Rajabhat University
Year	2017

Thirty twelve of endophytic bacteria were isolated from leaf, stem and root of *Chromolaena odorata* from Chumporn province. Nine of thirty twelve endophytic bacteria isolates showed antibacterial activity with nine pathogenic bacteria by point inoculum technique. It was found that the percentage of endophytic isolates against all test pathogens from stem part (42.86%) more than root (26.67%) and leaf (20.0%) parts. The crude extracts from endophytic isolate LBCH3 and RYCH5 showed high inhibitory activity against *Stap. aureus* TISTR 1466 (34.7 ± 7.2 mm) and *B. cereus* TISTR 687 (31.0 ± 1.0 mm), respective. In addition, the crude extracts from endophytic isolate RBCH5 showed more potent inhibition against 9 pathogen strains. The lowest minimum inhibition concentration (MIC) of crude extracts from endophytic isolate RBCH5 was 0.39 and 0.78 mg/mL against *Propionibacterium acnes* DMST 14916 and *S. epidermis* TISTR 1466, respectively. The isolate RBCH5 showed closely related to *Streptomyces parvulus* NBRC 13193^T with 99.86 % similarity based on the 16S rRNA gene sequence.

Keywords: Endophytic bacteria, *Chromolaena odorata*, Antibacterial activity, *Streptomyces parvulus*

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ กลุ่มวิชาชีววิทยา ศูนย์เครื่องมือและปฏิบัติการ และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่, อุปกรณ์, และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ซึ่งทำให้งานวิจัยดำเนินไปอย่างราบรื่นจนประสบความสำเร็จ และสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสวนดุสิต และบุคคลทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องซึ่งทำให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอแสดงความกตัญญูตเวทิตาคคุณ แต่บิดา มารดา ที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนทุกสิ่งอย่างสำหรับข้อบกพร่องต่างๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นนั้น ผู้วิจัยขอน้อมรับและยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

ศรีสุตา หาญภาคภูมิ

2560

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตการวิจัย	4
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสาบเสือ	6
เอนโดไฟต์	11
ความสัมพันธ์ระหว่างเอนโดไฟต์กับพืชในทางนิเวศวิทยา	11
ฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์	14
โรคติดเชื้อทางผิวหนัง	19
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
กรอบแนวคิดในการวิจัย	25

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	27
การเก็บตัวอย่างสาบเสื่อ	27
การแยกจุลินทรีย์เอนโดไฟท์	27
ยืนยันการเป็นจุลินทรีย์เอนโดไฟท์	29
การคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้าน แบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อผิวหนัง	29
การระบุชนิดของจุลินทรีย์เอนโดไฟท์	32
การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารอินทรีย์	34
การประเมินผลทางสถิติ	34
บทที่ 4 ผลการวิจัย	35
การแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากวัชพืชสาบเสื่อ	35
การคัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์	35
การระบุชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์	46
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	55
สรุปผลการวิจัย	55
อภิปรายผล	56
ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้	57
ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป	57
บรรณานุกรม	58
บรรณานุกรมภาษาไทย	58
บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ	59
ประวัติผู้วิจัย	67

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ชื่ออื่นของสาบเสือ	6
2.2	เอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์	14
2.3	เอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง	16
2.4	สารออกฤทธิ์ชีวภาพและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในจุลินทรีย์เอนโดไฟต์	23
3.1	อาหารแยกแบคทีเรีย	29
3.2	อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ และทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสำคัญ	31
4.1	จำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งหมดและไอโซเลตของแบคทีเรียที่แยกได้จากสาบเสือ	31
4.2	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสยับยั้งเชื้อก่อโรคและอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสยับยั้งเชื้อก่อโรคต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเอนโดไฟต์จากส่วนใบสาบเสือ	37
4.3	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสยับยั้งเชื้อก่อโรคและอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสยับยั้งเชื้อก่อโรคต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเอนโดไฟต์จากส่วนต้นสาบเสือ	38
4.4	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสยับยั้งเชื้อก่อโรคและอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสยับยั้งเชื้อก่อโรคต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเอนโดไฟต์จากส่วนต้นสาบเสือ	39
4.5	บริเวณยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจากสารสกัดหยาบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่เข้มข้น 100 mg/ml	44
4.6	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค	45
4.7	ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบสาบเสือ	47
4.8	ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นสาบเสือ	48

ตารางที่		หน้า
4.9	ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากรากสาบเสือ	49
4.10	ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารอินทรีย์	51
4.11	เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RCHB5	53
4.12	ลำดับเบส 16s rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางชีวภาพเพื่อจัดจำแนกชนิด	53

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะของใบต้นสาบเสือ	8
2.2	ลักษณะของดอกต้นสาบเสือ	9
2.3	ลักษณะของดอกสาบเสือที่แก่แล้ว	10
2.4	ลักษณะของลำต้นสาบเสือที่แก่แล้ว	10
2.5	ลักษณะของรากสาบเสือที่แก่แล้ว	11
2.6	ความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์เอนโดไฟต์กับพืช (A) การแทรกตัวของเส้นใยเอนโดไฟต์ในช่องว่างระหว่างเซลล์(intercellular space) (B) เส้นใยของราเอนโดไฟต์ที่เจริญอยู่ระหว่างเซลล์ใบของพืช (C) เส้นใยของราเอนโดไฟต์ที่เจริญอยู่ในเนื้อเยื่อในเมล็ดพืช	13
3.1	ตัวอย่างต้นสาบเสือ	27
3.2	การเก็บแยกและตากแดดส่วนใบ (A) ลำต้น (B) และราก (C) สาบเสือ	28
3.3	การล้างส่วนใบ ลำต้น และรากสาบเสือ	28
3.4	ส่วนของสาบเสือที่บดแล้ว ใบ ลำต้น และรากสาบเสือ	29
4.1	เปรียบเทียบระหว่างจำนวนไอโซเลตแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้กับแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ที่ให้ผลบวกต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคจากสาบเสือ	36
4.2	บริเวณยับยั้งเชื้อก่อโรคต่างๆของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากสาบเสือ	41
4.3	สร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง CMC (A) อาหารแข็ง Skim milk (B) อาหารแข็ง Starch (C) และอาหารแข็ง Tween (D)	51
4.4	วิวัฒนาการแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลต RCHB5	54