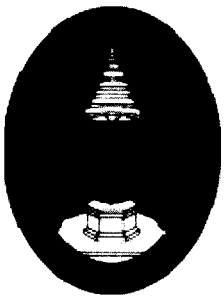
- 5 ส.ค. 2559



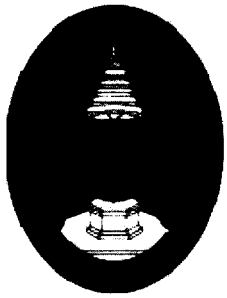
ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวและเปลือกทับทิมในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus epidermidis*

Efficiency of Crude Peel Extracts from *Citrus aurantifolia* (*Christm*) Swing. and *Punica granatum* L. to Inhibit *Staphylococcus epidermidis*

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ต่วนซาวีย๊ะ ยือแร
นูรีดา โตะหิ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ แขนงวิชาจุลชีววิทยา (Microbiology)
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิยาลัยราชภัฏสงขลา
2558



ใบรับรองงานวิจัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
โปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์

ชื่อเรื่องงานวิจัย ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวและเปลือกทับทิมในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus epidermidis*

ชื่อผู้ทำงานวิจัย นางสาวต่วนซาวีย๊ะ ยือแร
นางสาวนูรีดา โตะหิ

คณะกรรมการสอบโครงการวิจัย

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ดร. นิศากร วิทจิตสมบูรณ์)

.....กรรมการสอบ
(อาจารย์สัลวา ตอปี)

.....กรรมการสอบ
(ดร. สายใจ วัฒนเสน)

คณะกรรมการประจำสาขาวิชารับรองแล้ว

.....
(ดร. สายใจ วัฒนเสน)
ประธานโปรแกรมวิชา

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทัศนา ศิริโชติ)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

เมื่อวันที่.....เดือน.....พ.ศ.....
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ชื่อเรื่อง ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวและเปลือกทับทิมในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus epidermidis*

ชื่อผู้วิจัย นางสาวต่วนซาวีย๊ะ ยือแร
นางสาวนูรีดา โตะหิ
อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ดร. นิศากร วิทจิตสมบูรณ์

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ แขนงวิชาจุลชีววิทยา
สถาบัน มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
ปีที่พิมพ์ 2558

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกพืชสมุนไพร 2 ชนิด ได้แก่ มะนาว และทับทิมต่อการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อดังกล่าว เชื้อที่ใช้ในการทดสอบได้คัดแยกจากกลุ่มนักศึกษามหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา พบว่าเป็นเชื้อ *S. epidermidis* จำนวน 12 ไอโซเลต สุ่มเลือกมาทำการทดลองต่อ จำนวน 3 ไอโซเลต คือ I_1, I_4 และ I_5 จากนั้นสกัดสารด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ได้สารสกัดหยาบคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ได้จากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิม คือ 37.10 และ 91.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดด้วยวิธี disk diffution ใช้สารสกัด ที่ระดับความเข้มข้น 300, 200, 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิมมีประสิทธิภาพในการการยับยั้งการเจริญของเชื้อสามารถยับยั้งได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งต่อเชื้อ I_1, I_4 และ I_5 เท่ากับ 20.87±1.57, 19.53±1.15 และ 22.80±0.52 มิลลิเมตร ตามลำดับสารสกัดจากเปลือกมะนาวมีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 12.77±0.57, 11.87±0.58 และ 14.77±0.58 ตามลำดับ จากนั้นทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ด้วยวิธี Broth dilution technique และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) ด้วยวิธี Agar dilution technique จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิมมีค่า MIC ต่อเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต เท่ากับ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MBC ต่อเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากเปลือกมะนาวมีค่า MIC ต่อเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต เท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MBC ต่อเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดจากเปลือกทับทิมมีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกมะนาว

คำสำคัญ : *Staphylococcus epidermidis* เปลือกทับทิม เปลือกมะนาว MIC และ MBC

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีต้องขอขอบพระคุณดร. นิศากร วิทจิตสมบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่กรุณาเสียสละเวลาในการให้คำปรึกษา แนะนำแนวทาง วิธีการ และขั้นตอนการศึกษา ตลอดจนการตรวจทานแก้ไขงานวิจัยนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณดร. อัจฉรา เพิ่ม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ เสาวนิตย์ ชอบบุญ อาจารย์ประจำวิชาวิจัยเฉพาะทาง และคณาจารย์ในโปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะในการแก้ไขจุดบกพร่องต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและศูนย์วิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์และเจ้าหน้าที่ปฏิบัติการเคมีทุกท่าน และขอขอบพระคุณพี่ ๆ และเพื่อน ๆ นักศึกษาจุลชีววิทยาทุกคนที่คอยให้ปรึกษาความช่วยเหลือและมีส่วนร่วมในการทำวิจัยฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่ให้คำปรึกษาและกำลังใจ ตลอดจนการสนับสนุนทำให้งานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี

ต่วนซาวีย๊ะ ยือแร
นูรีดา โตะหิ
ธันวาคม 2558

เลข Bib# 1136990
วันที่ 3 ก.พ. 2559

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	**(ก)**
กิตติกรรมประกาศ	**(ข)**
สารบัญ	**(ค-ง)**
สารบัญตาราง	**(จ)**
สารบัญภาพ	**(ฉ)**
บทที่ 1 บทนำ	**1**
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**4**
สมุนไพรและความสำคัญของสมุนไพร	4
ประโยชน์ของมะนาวและทับทิม	5
เชื้อประจำถิ่น	8
คุณสมบัติของเชื้อ *S. epidermidis*	10
การก่อโรค	11
การเกิดกลิ่นตัว	11
การรักษา	11
วิธีการสกัดสาร	12
เทคนิคและวิธีการทดสอบ	13
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	**21**
วัสดุและอุปกรณ์	21
วิธีการทดลอง	22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	**26**
การคัดแยกเชื้อ	26
การสกัดสารจากเปลือกมะนาวและเปลือกทับทิม	28
การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* โดยวิธี Agar Dise Diffusion	28

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* โดยวิธี Agar Dise Diffusion	29
การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม ด้วยวิธี Micro dilution technique	32
ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว ด้วยวิธี Agar dilution technique	32
ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม ด้วยวิธี Agar dilution technique	34
ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว ด้วยวิธี Agar dilution technique	34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	**37**
ข้อเสนอแนะ	38
อกสารอ้างอิง	**39**
ภาคผนวก	**42**
ภาคผนวก (ก) สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	43
ภาคผนวก (ข) สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ	47
ภาคผนวก (ค) วิธีที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย	48
ภาคผนวก (ง) การทดสอบทางชีวเคมี	49
ภาคผนวก (จ) ภาพประกอบในการทำการศึกษาวิจัย	52
ประวัติย่อของผู้วิจัย	**59**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงการคัดแยกเชื้อ *S. epidermidis* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรม (Graim's stain) และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี	27
2	แสดงเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ได้ (% Yield) จากการสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด	28
3	แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* ไอโซเลทที่ 1, 4 และ 5 ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิม	30
4	แสดงค่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญ (Minimal Inhibition Concentration; MIC) ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิมต่อเชื้อ *S. epidermidis*	33
5	แสดงค่าความสามารถในการฆ่าเชื้อ (Minimal bactericidal concentration: MBC) ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิมต่อเชื้อ *S. epidermidis*	35

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงลักษณะของมะนาว	5
2	แสดงลักษณะของทับทิม	7
3	แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรีย *S. epidermidis*	11
4	แสดงผลการยับยั้ง *S. epidermidis* ไอโซเลตที่ 1, 4 ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิม ที่ความเข้มข้น 300, 200, 100 และ 50 มิลลิลิตร	31
5	แสดงผลการยับยั้ง *S. epidermidis* ไอโซเลตที่ 5 ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิม ที่ความเข้มข้น 300, 200, 100 และ 50 มิลลิลิตร	32
6	แสดงผล MBC ของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิมต่อเชื้อ *S. epidermidis* ไอโซเลตที่ 1, 4 และ 5 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	35

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ผู้ใหญ่มีผิวหนังประมาณ 2 ตารางเมตร ผิวหนังประกอบด้วยผิวหนังชั้นนอกกับผิวหนังชั้นใน ผิวหนังชั้นนอกจะสัมผัสกับจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมภายนอกตลอดเวลา ปกติจุลินทรีย์ไม่สามารถทะลุเข้าไปได้ ยกเว้น เมื่อมีบาดแผล รอยถลอก ฉีดขาด หรือถูกไฟไหม้ ผิวหนังแต่ละบริเวณของร่างกายจะมีลักษณะแตกต่างกัน มีความชื้น ความสะอาดหรือสกปรกแตกต่างกันออกไป ตามสุขนิสัยของบุคคลซึ่งเป็นตัวกำหนดชนิด และปริมาณของจุลินทรีย์ประจำถิ่นผิวหนังเป็นด่านแรกที่สามารถต่อต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิด มนุษย์มีสารต้านจุลินทรีย์อยู่บนบริเวณผิวหนังแต่พวกจุลินทรีย์ประจำถิ่นก็จะสามารถเจริญเติบโตได้โดยอาศัยน้ำกรดอะมิโน เกลือแร่ และกรดไขมันจากต่อมเหงื่อและต่อมไขมันจากผิวหนังแบคทีเรียที่พบตามผิวหนังส่วนใหญ่เป็นพวก *Staphylococcus* และ *Corynebacteria* ในต่อมไขมันลึกลงไปมีจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนและใช้ไขมันเป็นอาหารซึ่งปกติจะไม่เป็นอันตรายแต่ก็พบว่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดสิว (ธีระ ปานทิพย์อำพร, 2551)

ผิวหนังของเราในชั้นหนังแท้จะมีต่อมเหงื่อและต่อมไขมันอยู่ต่อมเหงื่อในร่างกายเรามีอยู่ 2 ชนิดด้วยกัน คือ ต่อมเหงื่อน้ำใส เป็นเหงื่อน้ำใสๆ ที่ผุดตามผิวหนัง ฝ่ามือฝ่าเท้า แผ่นหลัง ต่อมเหงื่อชนิดนี้ไม่มีกลิ่น จุดสำคัญที่สุดของกลิ่นตัวคือต่อมเหงื่อน้ำข้น ซึ่งมีชื่อเรียกว่า aprocrine ซึ่งจะมีเฉพาะจุด เช่น ศีรษะ รักแร้ หัวนม อวัยวะเพศ ต่อมเหงื่อชนิดนี้จะเริ่มทำงานเมื่อเข้าสู่วัยรุ่น มีหน้าที่สร้างสารที่มีกลิ่นคล้ายฟีโรโมน สารชนิดนี้มีสีขาวขุ่น ในระยะแรกที่หลั่งออกมา จะไม่มีกลิ่น หลังจากถูกย่อยโดยเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งอาศัยอยู่บนผิวหนังจึงทำให้เกิดกลิ่นขึ้น (เอมอร คชเสนี, 2554)

พืชสมุนไพรผลิตเมแทบอไลท์ทุติยภูมิที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์เป็นจำนวนมาก ทุกส่วนของพืชไม่ว่าจะใช้เดี่ยวหรือใช้ร่วมกันมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ สารเคมีหลากชนิดที่พืชผลิตขึ้นน่าจะมีส่วนสำคัญในการป้องกันพืชจากโรคติดเชื้อ องค์ประกอบของสารยับยั้งจุลินทรีย์เหล่านี้พบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เปลือก ต้น ใบ ผล ราก ดอก เมล็ด และเปลือกผลไม้ เปลือกผลไม้จัดเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งของยาต้านจุลินทรีย์การนำเปลือกผลไม้มาใช้เป็นการประหยัด เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ลดมลภาวะและเป็นการเพิ่มมูลค่าของเปลือกผลไม้ มีงานวิจัยหลายฉบับที่รายงานว่า เปลือกและเมล็ดของผลไม้ เช่น เปลือกและเมล็ดองุ่น เปลือกและเมล็ดทับทิม เปลือกมะละกอ เปลือกมะม่วง เปลือกมังคุด และเปลือกสับประรดมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ (สุคนธ์ ตันติไพบูลย์วุฒิ และคณะ, 2012)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดสมุนไพรจากเปลือกผลของพืชที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ที่อาศัยอยู่บนผิวหนัง ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นตัวขึ้นและที่สำคัญทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลมากขึ้นยากต่อการรักษา เนื่องจาก *S. epidermisdis* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ และมีแบบแผนการดื้อยาไม่แน่นอน โดยใช้สารสกัดจากสมุนไพร คือ มะนาว และทับทิมเนื่องจากสมุนไพรทั้งสองชนิดมีสรรพคุณเป็นยา และมีคุณสมบัติสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ และคณะ, 2549)

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวและเปลือกทับทิมต่อการยับยั้ง *Staphylococcus epidermidis*

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

3.1 ได้ทราบถึงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากปลือกมะนาว และเปลือกทับทิม ในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermisdis*

3.2 สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์กำจัดกลิ่นที่เกิดจากเชื้อที่ทดสอบได้

3.3 สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการวางแผนงานให้มีประสิทธิภาพ เพื่อลดอุบัติการณ์การติดเชื้อฉวยโอกาสในอนาคตต่อไป

4. ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษา และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวและเปลือกทับทิมในการยับยั้ง *Staphylococcus epidermidis* โดยเปลือกมะนาวเก็บจาก ต.ดุซงญอ อ.จะแนะ จ.นราธิวาส และทับทิม เก็บจาก ต.เขาตูม อ.ยะรัง จ.ปัตตานี

4.1 ลักษณะงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง

4.2 ระยะเวลา

เดือนพฤศจิกายน 2556 ถึง ธันวาคม 2558

4.3 ตัวแปร

ตัวแปรต้น :สารสกัดหยาบจากสมุนไพร

ตัวแปรตาม :การเจริญของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis*

ตัวแปรควบคุม :สภาวะในการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิและเวลา

สถานที่ :ห้องปฏิบัติการชีววิทยาและห้องปฏิบัติการเคมี ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

5. นิยามคำศัพท์ที่ใช้ในการวิจัย

5.1 Broth dilution test เป็นการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสมุนไพรที่ละเอียดวิธีหนึ่ง การทดสอบนี้จะทำให้ทราบทั้งค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum inhibitory concentration: MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimum bactericidal concentration: MBC) ของสมุนไพร นั้น ๆ กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ

5.2 Disc diffusion method เป็นวิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุดเนื่องจากสะดวกประหยัดและใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่นๆวิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพสามารถบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ ไม่อาจทราบค่า MIC หรือ MBC ได้ไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญช้าและเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ

5.3 Minimum inhibitory concentration (MIC) หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ หน่วยที่ใช้โดยทั่วไป คือ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อมิลลิลิตร ค่า MIC สามารถนำไปใช้เป็นค่าเปรียบเทียบ เพื่อดูความไวของเชื้อทดสอบต่อการต้านแบคทีเรีย ความเข้มข้นที่มีระดับของสารทดสอบต่ำสุดซึ่งไม่พบการเจริญของเชื้อ คือ MIC

5.4 Minimum bactericidal concentration (MBC) หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถฆ่าเชื้อได้ 99.99 เปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไปรายงานผลในหน่วย ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อมิลลิลิตร

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. สมุนไพร

กำเนิดมาจากธรรมชาติ และมีความหมายต่อชีวิตมนุษย์ มีสรรพคุณในการรักษาโรค หรืออาการเจ็บป่วยต่าง ๆ

2. ความสำคัญของสมุนไพร

2.1 ความสำคัญในด้านสาธารณสุข

พืชสมุนไพร เป็นผลผลิตจากธรรมชาติ ที่มนุษย์รู้จักนำมาใช้เป็นประโยชน์ เพื่อการรักษาโรคภัยไข้เจ็บตั้งแต่โบราณ เช่น ในเอเชียมีหลักฐานแสดงว่ามนุษย์รู้จักใช้พืชสมุนไพรมากว่า 6,000 ปี แต่หลังจากที่ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์ มีการพัฒนาเจริญก้าวหน้ามากขึ้นมีการสังเคราะห์ และผลิตยาจากสารเคมี ในรูปที่ใช้ประโยชน์ได้ง่าย สะดวกสบายในการใช้มากกว่าสมุนไพร ทำให้ความนิยมใช้ยาสมุนไพรลดลงมาเป็นอันมาก เป็นเหตุให้ความรู้วิทยาการด้านสมุนไพรขาดการพัฒนาไม่เจริญก้าวหน้าเท่าที่ควร ในปัจจุบันทั่วโลกได้ยอมรับแล้วว่าผลที่ได้จากการสกัดสมุนไพรให้คุณประโยชน์ดีกว่ายาที่ได้จากการสังเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์ประกอบกับในประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติอันอุดมสมบูรณ์มีพืชต่าง ๆ ที่ใช้เป็นสมุนไพรได้อย่างมากมายนับหมื่นชนิด ยังขาดก็แต่เพียงการค้นคว้าวิจัยในทางที่เป็นวิทยาศาสตร์มากขึ้นเท่านั้น ความตื่นตัวที่จะพัฒนาความรู้ด้านพืชสมุนไพร จึงเริ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่ง มีการเริ่มต้นนโยบายสาธารณสุขขั้นมูลฐานอย่างเป็นทางการของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2522 โดยเพิ่มโครงการสาธารณสุขขั้นมูลฐานเข้าในแผนพัฒนาการสาธารณสุขตามแผนพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 4 (พ.ศ. 2520-2524) ต่อเนื่องจนถึงแผนพัฒนาการเศรษฐกิจ และสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 7 (พ.ศ. 2535-2539) โดยมี กลวิธีการพัฒนาสมุนไพรและการแพทย์แผนไทยในงานสาธารณสุขมูลฐาน คือ สนับสนุนและพัฒนาวิชาการและเทคโนโลยีพื้นบ้านอันได้แก่ การแพทย์แผนไทย เภสัชกรรมแผนไทย การนวดไทย สมุนไพรและเทคโนโลยีพื้นบ้าน เพื่อใช้ประโยชน์ในการแก้ไขปัญหาสุขภาพของชุมชน สนับสนุนและส่งเสริมการดูแลรักษาสุขภาพของตนเอง โดยใช้สมุนไพร การแพทย์พื้นบ้าน การนวดไทย ในระดับบุคคล ครอบครัว และชุมชน ให้เป็นไปอย่างถูกต้องเป็นระบบสามารถปรับประสานการดูแลสุขภาพแผนปัจจุบันได้ อาจกล่าวได้ว่าสมุนไพรสำหรับสาธารณสุขมูลฐานคือ สมุนไพรที่ใช้ในการส่งเสริมสุขภาพและการรักษาโรคหรืออาการเจ็บป่วยเบื้องต้น เพื่อให้ประชาชนสามารถพึ่งตนเองได้มากขึ้น

2.2 ความสำคัญในด้านเศรษฐกิจ

ในปัจจุบันพืชสมุนไพรจัดเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ต่างประเทศกำลังหาทางลงทุน และคัดเลือกสมุนไพรไทยไปสกัดหาตัวยาเพื่อรักษาโรคบางโรค และมีหลายประเทศที่นำสมุนไพรไทยไปปลูก และทำการค้าขายแข่งกับประเทศไทย สมุนไพรหลายชนิดที่เราส่งออกเป็นรูปของวัตถุดิบคือ กระวาน ขมิ้นชัน เร่ว เปล้าน้อย และมะขามเปียกเป็นต้น ซึ่งสมุนไพรเหล่านี้ตลาดต่างประเทศยังคงมีความต้องการอีกมาก และในปัจจุบันกรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ให้ความสนใจในการศึกษาเพิ่มขึ้น และมีโครงการวิจัยบรรจุไว้ในแผนพัฒนาระบบการผลิต การตลาด และการสร้างงานในแผนพัฒนาเศรษฐกิจ และสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2530-2534) เพื่อหาความเป็นไปได้ในการพัฒนาคุณภาพ และแหล่งปลูกสมุนไพรเพื่อส่งออก โดยกำหนดชนิดของสมุนไพรที่มีศักยภาพ 13 ชนิด คือ มะขามแขก กานพลู เทียนเกล็ดหอย ดองดึง เร่ว กระวาน ชะเอมเทศ ขมิ้น จันทร์เทศ ใบพลู พริกไทย ดีปลี และน้ำผึ้ง (รังสรรค์ ชุณหวรากรณ์, ม.ป.ป)

3. ประโยชน์ของมะนาวและทับทิม

3.1 มะนาว

ภาพที่ 1 มะนาว
ที่มา : สมศักดิ์ วรรณศิริ, 2541

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Citrus aurantifolia* (*Christm*) Swing.
วงศ์ : Rutaceae
ชื่อท้องถิ่น : ส้มมะนาว มะลิว (เชียงใหม่)

มะนาว (อังกฤษ: lime) เป็นไม้ผลชนิดหนึ่ง ผลมีรสเปรี้ยวจัด จัดอยู่ในสกุล ส้ม (Citrus) ผลสีเขียว เมื่อสุกจัดจะเป็นสีเหลือง เปลือกบาง ภายในมีเนื้อแบ่งกลีบ ๆ ชุ่มน้ำมาก นับเป็นผลไม้ที่มีคุณค่า นิยมใช้เป็นเครื่องปรุงรส นอกจากนี้ยังถือว่ามีคุณค่าทางโภชนาการและทางการแพทย์

ประโยชน์ของน้ำมะนาวที่รู้จักกันดี คือ วิตามินซีสูงมาก ขับเสมหะ แก้ไอ รักษาโรคเลือดออกตามไรฟัน เหงือกบวม นอกจากนี้ยังช่วยแก้อาการปวดศีรษะ แก้อาเจียน เมาเหล้า ขจัดคราบบุหรี่

บำรุงตา บำรุงผิว และยังสามารถมีฤทธิ์ในการกัดด้วยแต่วิตามินซีสลายตัวได้ง่าย เมื่อถูกความร้อนจึงต้องระมัดระวังในการปรุงอาหาร (ยุวดี จอมพิทักษ์, ม.ป.ป)

ลักษณะทั่วไป

มะนาวเป็นไม้พุ่มเตี้ย สูงเต็มที่ประมาณ5 เมตร ก้านมีหนามเล็กน้อย มักมีขนดก ใบยาวเรียวเล็กน้อย คล้ายใบส้ม ส่วนดอกสีขาวอมเหลือง ปกติจะมีดอกผลตลอดทั้งปี แต่ในช่วงหน้าหนาว จะออกผลน้อย และมีน้ำน้อยมะนาวเป็นพืชพื้นเมืองในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้น้ำมะนาวนอกจากใช้ปรุงรสเปรี้ยวในอาหารหลายประเภทแล้ว ยังนำมาใช้เป็นเครื่องดื่ม ผสมเกลือ และน้ำตาลเป็นน้ำมะนาว ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีทั้งในประเทศไทย และต่างประเทศทั่วโลก นอกจากนี้เครื่องดื่มแอลกอฮอล์บางชนิดยังนิยมฝานมะนาวเป็นชิ้นบางๆ เสียบไว้กับขอบแก้ว เพื่อใช้แต่งรสในผลมะนาวมีน้ำมันหอมระเหยถึง 7เปอร์เซ็นต์ แต่กลิ่นไม่ฉุนอย่างมะกรูด น้ำมะนาวจึงมีประโยชน์สำหรับใช้เป็นส่วนผสมน้ำยาทำความสะอาด เครื่องหอม และการบำบัดด้วยกลิ่น (aromatherapy) หรือน้ำยาล้างจาน ส่วนคุณสมบัติที่สำคัญ ทว่าเพิ่งได้ทราบเมื่อไม่ช้านานมานี้ (ราวคริสต์ศตวรรษที่ 2) ก็คือ การป้องกันโรคลักปิดลักเปิด ภายหลังได้มีการค้นพบว่าสาเหตุที่มะนาวสามารถช่วยป้องกันโรคลักปิดลักเปิด เพราะในมะนาวมีวิตามินซีเป็นปริมาณมากมะนาวมีน้ำมันหอมระเหยที่ให้กลิ่นสดชื่นเพราะมีส่วนประกอบของสารซิโตรเนลลัล (Citronellal) ซิโครเนลลิลอะซีเตต (Citronellyl Acetate) ไลโมนีน (Limonene) ไลนาลูล (Linalool) เทอร์พีนีออล (Terpeneol) ฯลฯ รวมทั้งมีกรดซิตริค (Citric Acid) กรดมาลิค (Malic Acid) และกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic Acid) ซึ่งถือเป็นกรดผลไม้ (AHA : Alpha Hydroxy Acids) กลุ่มหนึ่ง เป็นที่ยอมรับว่าช่วยให้ผิวหน้าที่เสื่อมสภาพหลุดลอกออกไป พร้อมๆ กับช่วยกระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่ๆ ช่วยให้รอยด่างดำหรือรอยแผลเป็นจางลง

ส่วนที่ใช้เป็นยา : เปลือกและน้ำในผล

ช่วงเวลาที่เก็บเป็นยา : ช่วงผลแก่จัด

สรรพคุณทางยา : เปลือกผลรสขม ช่วยขับลมได้ดี น้ำของผลมะนาวเปรี้ยวจัด เป็นยาขับเสมหะ เมื่อเด็กหกล้มหัวโน ใช้น้ำมะนาวผสมกับดินสอพองพอกบริเวณที่โนจะทำให้เย็นและยุบลงเร็ว

ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ : ผิวเปลือกของมะนาวมีน้ำมันหอมระเหย " โวลาทิล " มีฤทธิ์ขับลม แก้ท้องอืดเฟ้อได้ ส่วนน้ำมะนาวมีสารเคมีหลายชนิด เช่น Staronoid, Organic acid, citral และวิตามิน ซี ฯลฯ น้ำมะนาวมีฤทธิ์รักษาโรคลักปิดลักเปิด เนื่องจากมีวิตามิน ซี สูง ส่วนฤทธิ์ในการแก้ ขับเสมหะ เนื่องจากกรดที่มีอยู่ในน้ำมะนาว กระตุ้นให้มีการขับน้ำลายออกมาทำให้เกิดอาการชุ่มคอจึงลดอาการไอลงได้

วิธีใช้ : เปลือกมะนาวและน้ำมะนาวใช้เป็นยาได้ โดยมีรายการใช้ดังต่อไปนี้คือเปลือกมะนาวรักษาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ แน่นจุกเสียด นำเอาเปลือกมะนาวของผลสดมาประมาณครึ่งผล คลึงหรือทุบเล็กน้อยพอให้น้ำมันออก ชงน้ำร้อนดื่มเวลามีอาการ

คุณค่าทางด้านอาหาร : มะนาวเป็นเครื่องปรุงรสอาหารไทยที่ขาดเสียมิได้ น้ำพริกกะปิ ส้มตำ ต้มยำต่าง ๆ ยำทุกชนิด ลาบ และอีกมากมาย หลายอย่างจะต้องใช้น้ำมะนาว ด้วยเสมอจึงจะเกิดรสดี อร่อยสุด ๆ นอกจากนี้น้ำมะนาวก็ยังเอาไปทำเป็นน้ำผลไม้ได้ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น อร่อย ชุ่มคอ ชื่นใจ ร่างกายจะมีความรู้สึกว่า เกิดอาการสดชื่นยิ่งขึ้นนิยมดื่มกันโดยทั่วไป

3.2 ทับทิม

ภาพที่ 2 ทับทิม
ที่มา : พรพนา นาคสิงห์, 2550

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Punicagranatum* L.
ชื่อสามัญ : Pomegranate , Punica apple
วงศ์ : Punicaceae
ชื่ออื่น : พิลา (หนองคาย) พิลาขาว มะก่องแก้ว (น่าน) มะเกาะ (เหนือ) หมากจัง (แม่ฮ่องสอน)

ทับทิมมีถิ่นกำเนิดจากตะวันออกของประเทศอิหร่าน ทางตอนใต้ของอัฟกานิสถานและทางตอนเหนือของเทือกเขาหิมาลัย ทับทิมจึงชอบอากาศหนาวเย็นและอยู่บนพื้นที่สูงกว่าระดับน้ำทะเลอย่างน้อย 300 เมตร ยิ่งอากาศหนาวเนื้อทับทิมจะมีสีแดงเข้มมากขึ้น

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ยืนต้น หรือพรรณไม้พุ่มขนาดเล็ก ลักษณะผิวเปลือกลำต้นเป็นสีเทา ส่วนที่เป็นกิ่งหรือยอดอ่อนจะเป็นเหลี่ยมหรือมีหนามแหลมยาวขึ้น ใบมีลักษณะเป็นรูปยาวรี โคนใบมน แคบ ส่วนปลายใบเรียวแหลมสั้น ผิวหลังใบ เกลี้ยงเป็นมัน ใต้ท้องใบจะเห็นเส้นใบได้ชัด ขนาดของใบกว้างประมาณ 1-1.8 เซนติเมตร ยาว ประมาณ 2.5 – 6 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อ หรืออาจจะเป็น ดอกเดียว ในบริเวณปลายยอด หรือง่ามกิ่ง ลักษณะของดอกมีเป็น สีส้ม สีขาว หรือสีแดง ดอกหนึ่งมีกลีบดอกประมาณ 6 กลีบ ปลายกลีบ ดอกจะแยกออกจากกัน ตรงกลางดอกมีเกสรตัวเมีย และตัวผู้ซึ่งมีอับเรณูเป็นสีเหลือง ขนาดของดอกบานเต็มที่มีเส้นผ้าศูนย์กลางประมาณ 2 – 3 เซนติเมตร ผลมีลักษณะเป็นรูปค่อนข้างกลมผิวเปลือกนอกหนาเกลี้ยง ผลเมื่อแก่หรือสุกเต็มที่มีสีเหลืองปนแดง และลักษณะของผลจะแตกหรือออกข้างในผลก็จะมีเมล็ดเป็นเม็ดจำนวนมากเป็นรูปเหลี่ยมมีสีชมพูสด

ส่วนที่ใช้ : ใบ ดอก เปลือกผลแห้ง เปลือกต้นและเปลือกราก เมล็ด

สรรพคุณทางยา

- **ใบ**-อมกลั้วคอทำยาล้างตา
- **ดอก**-ใช้ห้ามเลือด

- **เปลือกและผลแห้ง** - เป็นยาแก้ท้องร่วง ท้องเดิน แก้บิดแก้โรคลักกะปิดลักกะเปิด
- **เปลือกต้นและเปลือกราก** - ใช้เป็นยาขับพยาธิตัวตืด ,พยาธิตัวกลม
- **เมล็ด** – แก้โรคลักปิดลักเปิด

สารเคมี

เปลือกผลมีรสฝาด เนื่องจากมี tannin 22-25 เปอร์เซ็นต์ และสาร gallotannic acid สารสีเขียวอมเหลือง รากมีสารอัลคาลอยด์ ชื่อ pelletierine และอนุพันธ์ของ pelletierine

คุณค่าด้านอาหาร

ทับทิมใช้รับประทานเป็นผลไม้รสหวาน หรือเปรี้ยวหวาน มีวิตามินซี และแร่ธาตุหลายตัว ช่วยป้องกันโรคเลือดออกตามไรฟัน และบำรุงฟันให้แข็งแรงทับทิมเป็นผลไม้ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ น้ำทับทิมมีวิตามินซีสูงและยังมีสารเกลือแร่ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายในปริมาณที่สูงเหมาะสำหรับการดื่มเพื่อเพิ่มความสดชื่นให้กับร่างกาย

น้ำทับทิมมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดและมีประสิทธิภาพสูงมาก สามารถลดการแข็งตัวของเลือดจากไขมันในเลือดสูง บรรเทาโรคหัวใจและความดันโลหิตสูง ช่วยเพิ่มพลังและความงามดื่มน้ำทับทิมคั่นวันละแก้วจะช่วยส่งเสริมการทำงานของหลอดเลือด ลดการแข็งตัวของหลอดเลือดแดง และช่วยเสริมสุขภาพของหัวใจให้ดีขึ้น

เปลือกทับทิม

จากการศึกษาวิจัยพบว่าในเปลือกทับทิมมีสารในกลุ่มแทนนินสูง 22-25 เปอร์เซ็นต์ โดยมี Gallotannin เปลือกทับทิมตากแห้งใช้เป็นยาแก้ท้องเดินและโรคบิดได้ นอกจากนี้ยังพบสารแทนนินในกลุ่ม Ellagic tannin ปริมาณสูงสารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยมีสรรพคุณลดอาการอักเสบ ทั้งยังมีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งกว่า 13 ชนิด ไม่ให้เพิ่มจำนวนขึ้น เช่น มะเร็งผิวหนัง มะเร็งลำไส้ มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งตับ เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบว่ามีคุณสมบัติในการทำลายมะเร็งหลอดอาหาร และลำไส้ใหญ่ ซึ่งพบว่าการให้กรดเอลลาจิกกับสัตว์ทดลอง สารดังกล่าวจะไปเร่งการเจริญของเซลล์มะเร็งแบบอะมอพโดซีส (Amoptosis) ทำให้เซลล์มะเร็งถูกทำลายโดยกลไกการแตกตัวของตัวมันเองได้ (อุดมลักษณ์ สุขอัตตะและคณะ,2549)

4. เชื้อประจำถิ่น

เชื้อประจำถิ่นเป็นจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปตามผิวหนังและภายในร่างกายของคนปกติที่มีสุขภาพดี เช่น เยื่อเมือกของช่องปาก ทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร เป็นต้นเชื้อประจำถิ่นในคนสุขภาพดีปกติ เป็นพวกไม่มีโทษส่วนใหญ่ไม่ทำให้เกิดโรคดำรงชีวิตแบบภาวะเกื้อกูล คือได้ประโยชน์จากโฮสต์บางชนิดดำรงชีวิตแบบพึ่งพากันทั้งคู่ได้ประโยชน์ซึ่งกันและกันเชื้อประจำถิ่นบางชนิด อาจเป็นพวกฉวยโอกาสทำให้เกิดโรค คือทำให้เกิดโรคถ้าความต้านทานของร่างกายลดลง

เชื้อประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในร่างกาย จะมีการเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลา ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น อายุ อาหาร ระดับฮอร์โมน สุขภาพ และสุขอนามัยส่วนบุคคล ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงสภาพ

ความเป็นอยู่ของคนเราก็อาจไปกระทบกับชนิดและจำนวนของเชื้อประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ด้วย เช่น เมื่อเข้ารักษาตัวในโรงพยาบาล เชื้อปกติที่ไม่ก่อโรคในปากและคอหอย จะถูกแทนที่ด้วยเชื้อแบคทีเรียที่รุนแรงกว่าบุกรุกเข้ามา

หน้าที่ที่สำคัญอันหนึ่งของเชื้อประจำถิ่น คือ การควบคุมการเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อโรคโดยวิธีต่าง ๆ เช่น การแก่งแย่งอาหารกับเชื้อโรค และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้ อย่างไรก็ตามการยับยั้งเชื้อประจำถิ่นด้วยยาปฏิชีวนะจะทำให้เชื้อโรคอื่นเพิ่มจำนวนลุกลามได้ เช่น การใช้สารเฮกซาคลอโรฟีนทำความสะอาดผิวหนัง จะไปยับยั้งเชื้อประจำถิ่นพวกแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้แบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนซึ่งปกติไม่เจริญบนผิวหนังกลับเจริญได้ ดังนั้นการมีเชื้อประจำถิ่น จึงช่วยป้องกันเชื้อโรคไม่ให้เจริญ โดยการที่เชื้อประจำถิ่นจะแย่งอาหารหรือสร้างสารไปยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคนั้น

การกระจายของเชื้อประจำถิ่นในบริเวณต่าง ๆ สามารถพบดังนี้

1) ผิวหนัง ประกอบด้วยชั้นหนังกำพร้า และหนังแท้ หนังกำพร้าเป็นชั้นของเซลล์ที่ตายแล้วและไม่ยอมให้แบคทีเรียเข้าสู่ชั้นหนังแท้ได้ แต่ชั้นหนังกำพร้านี้อาจเกิดบาดแผลรอยถลอก รอยช่วน แผลพุพอง ทำให้แบคทีเรียแทรกซึมเข้าไปได้ ผิวหนังมีลักษณะที่ไม่เหมาะกับการเจริญของแบคทีเรีย เนื่องจากความแห้ง ซึ่งจะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ยกเว้นบางบริเวณ เช่น ข้อพับ และผิวหนังระหว่างนิ้วเท้าที่มีความชื้น และพบเชื้อประจำถิ่นมากกว่า คือ ประมาณ 106 โคโลนี ต่อตารางเซนติเมตรความเป็นกรดด่าง (pH) ระหว่าง 3-5 เนื่องจากมีกรดแลกติกและกรดอินทรีย์ที่สร้างจากจุลินทรีย์บนผิวหนัง การมีความเป็นกรดด่างต่ำช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดสารยับยั้งการเจริญ เช่น ต่อมเหงื่อขับเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย ต่อมน้ำมันขับไขมัน แต่ถึงกระนั้นก็มีแบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญเติบโตเพราะสารคัดหลั่ง (secretion) จากต่อมเหงื่อ และต่อมน้ำมัน มีกรดอะมิโน ยูเรีย เกลือ และกรดไขมัน ซึ่งเป็นสารอาหารของจุลินทรีย์พวก *Staphylococcus epidermidis, Corynebacteria* หรือ *Diphtheroids* ในต่อมไขมันที่อยู่ลึก ๆ จะพบแบคทีเรียพวกไม่ใช้อากาศ และชอบใช้ไขมัน เช่น *Propionibacterium acnes* ปกติแบคทีเรียชนิดนี้ไม่มีโทษ แต่ก็อาจทำให้เกิดสิวในคนหนุ่มสาวได้

2) ตา มีเยื่อบุลูกตา และมีน้ำตาออกมาชะล้าง ภายในน้ำตามีเอนไซม์ไลโซไซม์ จึงมีจุลินทรีย์อยู่น้อย ที่พบได้แก่ *S. epidermidis, S. aureus, S. pneumonia, Nesseria* sp., *Moraxella* sp. และ *H. parainfluenzae*

3) ทางเดินหายใจส่วนบนก่อนถึงกล่องเสียง จะมีจุลินทรีย์อยู่น้อย แม้ในลมหายใจเข้า จะมีจุลินทรีย์เข้าไปมากก็ตามแต่จะถูกยึดด้วยเยื่อเมือกที่เหนียวในนาโซฟาริงซ์ (Nasopharynx) และถูกขับเคลื่อนลงสู่กระเพาะอาหาร ในที่สุดจะถูกทำลายด้วยกรดในกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ จุลินทรีย์ยังถูกทำลายด้วยไลโซไซม์ในเยื่อเมือกของจมูกด้วย อย่างไรก็ตามแบคทีเรียก็สามารถเกาะยึดกับเยื่อบุผิวได้ แบคทีเรียที่พบในจมูกได้แก่ *S. epidermidis* และ *S. aureus* ในส่วนนาโซฟาริงซ์พบ *S. pneumonia* ที่ไม่รุนแรง นอกจากนี้ยังพบ *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Nesseria*sp., *Branhamella*sp., *Haemophillus* sp. และ *Micrococcus* sp. ทางเดินลมหายใจ

ส่วนล่างตั้งแต่หลอดลมลงไปจะไม่พบเชื้อประจำถิ่น เพราะถูกขับออกโดยเมือก และยังถูกทำลายโดยเซลล์ฟาโกไซด์ (phagocyte) พวกอัลวีโอลาร์แมโครเฟจ (alveolar macrophage)

4) ปาก ถึงแม้ในปากจะมีความชื้นและอาหารซึ่งเหมาะกับการเจริญของแบคทีเรีย แต่น้ำลายจะชะล้างจุลินทรีย์เหล่านี้โดยการกลืนลงสู่กระเพาะอาหารและถูกทำลายด้วยกรด การหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผิวก็เป็นวิธีขับจุลินทรีย์ออกช่องปาก แต่ก็ยังมีเชื้อประจำถิ่นจำนวนมากที่ยังทนต่อการชะล้างและเกาะติดอยู่กับพื้นผิวในช่องปาก

5) ทางเดินอาหาร ในกระเพาะอาหารมีแบคทีเรียอยู่น้อยกว่า 10 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพราะในกระเพาะอาหารมีกรดเกลือมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ จุลินทรีย์ที่พบจะเป็นพวกทนกรด เช่น *Lactobacillus, Streptococcus* ส่วน *H. pylori* ก็อาจพบได้ จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในกระเพาะอาหารอาจเปลี่ยนแปลงได้ในคนไข้ที่ได้รับยาลดกรด จุลินทรีย์จะถูกขับออกจากลำไส้ใหญ่โดยการบีบตัวของลำไส้และการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผิว นอกจากนี้ยังมีเมือกซึ่งจะจับกับจุลินทรีย์ในลำไส้และขับออกทางอุจจาระ

6) ทางเดินระบบปัสสาวะและสืบพันธุ์ ในคนสุขภาพดี ในไตและกระเพาะปัสสาวะจะปราศจากจุลินทรีย์ แต่จะพบแบคทีเรียที่ส่วนปลายของหลอดปัสสาวะทั้งสองเพศได้ มักจะเป็นเชื้อ *S. epidermidis, S. faecalis* และโคโลนีแบคทีเรีย บางครั้งจะพบพวกไนซีเรีย และสมาชิกในตระกูลเอนเทอโรแบคทีริเอซี หลอดปัสสาวะส่วนบนที่ใกล้กับกระเพาะปัสสาวะมีจุลินทรีย์น้อยลง เพราะสารที่ขับออกจากมิวโคซ่าของหลอดปัสสาวะมีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียได้ และเนื่องจากการหลั่งน้ำปัสสาวะออกมาจึงชะล้างจุลินทรีย์ออกมาด้วย (พินิจ กลำคลองตัน, 2553)

5. คุณสมบัติของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ขนาด 0.5-1.5 ไมโครเมตร อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ลักษณะโคโลนีขนาดเล็ก สีขาว สามารถเจริญได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียสเป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่ม Staphylococcus ที่ไม่สร้าง coagulase นอกจากนั้นยังไม่สามารถสร้างแอลฟาทอกซิน(α toxin), เอกซ์โฟลิเอติน(exfoliatin) และซุปเปอร์แอนติเจนท็อกซิน (superantigen toxins) ได้

S. epidermisdis พบเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่ผิวหนัง โพรงจมูก รูหูและทางเดินปัสสาวะส่วนปลาย ในอดีตไม่ค่อยเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ แต่เนื่องจากมีการใช้ catheters และ prosthesis กันอย่างแพร่หลายมากขึ้น จึงพบว่ามีความสำคัญในการก่อการติดเชื้อในโรงพยาบาลมากขึ้น นอกจากนี้ยากต่อการรักษา เนื่องจาก *S. epidermisdis* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ และมีแบบแผนการดื้อยาไม่แน่นอนและแตกต่างกับ *S. aureus* พบการดื้อยาต่อกลุ่ม penicilinase-resistant penicillin และ cephalosporin มากกว่า *S. aureus* ซึ่งยาทั้งสองกลุ่มนี้ ได้ผลดีกับ *S. aureus* การรักษาจึงจำเป็นต้องใช้ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะเป็นแนวทาง (นิธิ ตั้งศิริทรัพย์, 2555)

ภาพที่ 3 แสดงรูปร่าง การเรียงตัวของ *S. epidermidis* จากการย้อมสีแกรม
ที่มา : กฤติภูมิ ภู่กิตติวรางกูร และปุษยา มูสิกะปาละ, 2556

6. การก่อโรค

ปกติเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* พบทั่วไปในอากาศและสิ่งแวดล้อม และมีความรุนแรงต่ำ แต่ถ้าระบบป้องกันตัวของร่างกายโฮสต์บกพร่อง ก็อาจทำให้เกิดการติดเชื้อรุนแรง มักเกิดการติดเชื้อกับสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย เช่นลิ้นหัวใจเทียม ข้อต่อเทียม หลอดเลือดที่นำมาต่อ หลอดสวนหัวใจ เป็นต้น เมื่อเชื้อไปเกาะติดกับผิวอวัยวะเทียมเหล่านั้นจะเป็นจุดเริ่มต้นของการทำให้เกิดโรค *Staphylococcus epidermidis* บางสายพันธุ์สร้างสารไกลโคแคลิกซ์ที่เหนียวออกมานอกเซลล์ ซึ่งนอกจากช่วยให้มันเกาะติดกับผิวที่เรียบของพลาสติกหรือโลหะได้แล้ว ยังทำให้เชื้อมีความรุนแรงในการเกิดโรค โดยป้องกันเชื้อจากยาปฏิชีวนะและระบบป้องกันตัวตามธรรมชาติของโฮสต์ *Staphylococcus epidermidis* ยังทำให้เกิดการติดเชื้อในท่อปัสสาวะในคนไข้ในโรงพยาบาล (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณ, 2553)

7. การเกิดกลิ่นตัว

ผิวหนังของเราในชั้นหนังแท้จะมีต่อมเหงื่อและต่อมไขมันอยู่ต่อมเหงื่อในร่างกายเรามีอยู่ 2 ชนิดด้วยกัน คือ ต่อมเหงื่อน้ำใส เป็นเหงื่อน้ำใสๆ ที่ผุดตามผิวหนัง ฝ่ามือฝ่าเท้า แผ่นหลัง ต่อมเหงื่อชนิดนี้ไม่มีกลิ่น จุดสำคัญที่สุดของกลิ่นตัวคือต่อมเหงื่อน้ำข้น ซึ่งมีชื่อเรียกว่า aprocrine ซึ่งจะมีเฉพาะจุด เช่น ศีรษะ รักแร้ หัวนม อวัยวะเพศ ต่อมเหงื่อชนิดนี้ซึ่งจะเริ่มทำงานเมื่อเข้าสู่วัยรุ่น มีหน้าที่สร้างสารที่มีกลิ่นคล้ายฟีโรโมน สารชนิดนี้มีสีขาวขุ่น ในระยะแรกที่หลั่งออกมา จะไม่มีกลิ่น หลังจากถูกย่อยโดยเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งอาศัยอยู่บนผิวหนังจึงทำให้เกิดกลิ่นเกิดขึ้น (เอมอร คชเสนี, 2554)

8. การรักษา

Staphylococcus epidermidis เป็นสายพันธุ์ที่มีโอกาสก่อโรคมักดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดรวมทั้งเมธิซิลลินการรักษาทำได้ยาก เพราะเชื้อชอบอยู่ตามเครื่องมืออวัยวะเทียม ทำให้สามารถแยกตัวออกจากระบบหมุนเวียนเลือดและหลบจากยาปฏิชีวนะได้ *Staphylococcus epidermidis*

ดื้อยามากกว่า *Staphylococcus aureus* ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ดื้อต่อยาแพนิซิลลิน การดื้อยาปฏิชีวนะไม่เพียงแต่ทำให้ยุ่งยากในการรักษา แต่ยังทำให้เกิดการสะสมยีนที่ดื้อยาสำหรับเชื้อที่รุนแรงด้วย การเลือกใช้ยาปฏิชีวนะรักษา จึงต้องขึ้นอยู่กับบันทึกการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อเหล่านี้ด้วย แต่ถ้าไม่มีก็ควรใช้ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ เช่น เจนตาไมซินกับเซฟาโลธินหรือไรแฟมพินหรือแวนโคไมซินอย่างเดียว (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณ, 2553)

9. วิธีการสกัดสาร

เป็นเทคนิคการแยกสารออกจากสารผสมโดยอาศัยความสามารถในการละลายที่ต่างกัน เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมากในเคมีอินทรีย์ สารผสมอาจเป็นได้ทั้งของแข็งและของเหลว แต่ตัวทำละลายที่ใช้มักเป็นของเหลว(ทิพย์มนต์ ภัทราครและคณะ, 2537)

9.1 Solid-liquid extractionเป็นการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายสกัดสารออกจากของผสมที่เป็นของแข็ง ซึ่งสามารถสกัดได้ 2 วิธี

1. ทำโดยแช่ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสกัดในตัวทำละลายที่เหมาะสม หลังจากนั้นกรองแล้วระเหยเอาตัวทำละลายออก จะได้สารอินทรีย์ในสภาพที่ยังไม่บริสุทธิ์ ต้องนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

2. สกัดโดยใช้เครื่อง Soxhlet extraction เครื่องมือนี้ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ ส่วนล่างสุดเป็นภาชนะบรรจุตัวทำละลาย ส่วนกลางเป็นอุปกรณ์ลักษณะพิเศษที่ของเหลวสามารถไหลกลับลงสู่ภาชนะส่วนล่างได้ ซึ่งส่วนนี้ใช้บรรจุสารที่ต้องการสกัด ส่วนบนสุดคือเครื่องควบแน่น เมื่อให้ความร้อนแก่ภาชนะส่วนล่าง ตัวทำละลายจะระเหยเป็นไอผ่านท่อแก้วของอุปกรณ์ส่วนกลางผ่านไปยังเครื่องควบแน่น และควบแน่นกลับเป็นของเหลวลงสู่อุปกรณ์ส่วนกลาง สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสกัด ละลายเอาสารที่ต้องการสกัดออกมาด้วย ตัวทำละลายนี้ระเหยเป็นไอเข้าสู่วงตามที่กล่าวมาข้างต้น ด้วยวิธีนี้ตัวทำละลายบริสุทธิ์เท่านั้นที่จะสัมผัสกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสกัด ทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพดีกว่า และสิ้นเปลืองตัวทำละลายน้อยกว่าการสกัดวิธีแรก หลังจากระเหยเอาตัวทำละลายออกจะได้สารอินทรีย์ในสภาพที่ไม่บริสุทธิ์เช่นเดียวกัน (ทิพย์มนต์ ภัทราครและคณะ, 2537)

9.2 การสกัดแบบ liquid-liquid extraction

ส่วนใหญ่เป็นการใช้ตัวทำละลายใหม่สกัดสารออกจากสารละลายซึ่งประกอบด้วยตัวถูกละลายและตัวทำละลายเดิม (ส่วนใหญ่มักจะใช้น้ำ) อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดแบบนี้ได้แก่ กรวยแยก การสกัดโดยใช้กรวยแยกต้องทำอย่างระมัดระวัง กรวยแยกที่จุกล่างทำด้วยแก้วต้องทาจาระบี ที่จุกล่างให้เป็นชั้นบาง ๆ ก่อนนำมาใช้ ถ้าจุกล่างทำด้วยเทฟลอน ไม่จำเป็นต้องทาจาระบี การถือกรวยแยก ถ้าถนัดมือซ้ายใช้มือซ้ายจับกรวยข้างบนโดยใช้นิ้วชี้กดจุดบนไว้ หรือจะใช้ฝ่ามือกดจับไว้ก็ได้ ส่วนมือซ้ายจับกรวยแยกด้านล่างในลักษณะที่นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้พร้อมที่จะหมุนจุกล่างได้คล่องตัว จับกรวยแยกเอียงให้ด้านบนอยู่ต่ำกว่าด้านล่าง เมื่อจะทำการสกัด ให้เทสารละลายที่ต้องการสกัดและตัวทำละลายใหม่ลงในกรวยแยก เขย่าแยกกรวยเพื่อให้ตัวทำละลายใหม่สัมผัสกับสารที่ต้องการสกัดให้มากที่สุด ระหว่างเขย่าจะมีแรงดันเกิดขึ้นในกรวยแยก ทำการลดความดันโดยหมุนจุกล่างให้อากาศ

ออกทางจุกล่าง เมื่อเลิกสกัด จับกรวยแยกให้ตั้งตรง วางกรวยแยกลงบนวงแหวนเหล็ก หรือใช้ที่ยึดยึดไว้กับขาตั้ง สารละลายในกรวยแยกจะแยกเป็นสองชั้น เปิดจุกบนก่อนที่จะไขสารละลายชั้นล่างออกจากจุกล่าง ส่วนสารละลายชั้นบนให้เทออกจากด้านบนของกรวยแยก เมื่อเลิกใช้กรวยแยก ต้องล้างกรวยแยกให้สะอาด ถ้าเป็นจุกแก้วให้เก็บกรวยแยกโดยเช็ดจุกแก้วให้แห้ง ตัดกระดาษเป็นแถบเล็กๆรองจุกบนและจุกล่างไว้เพื่อกันไม่ให้จุกติดกับตัวกรวยแยกจนใช้การไม่ได้ (ทิพย์มนต์ ภัทราคร และคณะ, 2537)

10. เทคนิค และวิธีการทดสอบ

10.1 Agar Disc Diffusion method

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถปฏิบัติง่าย สะดวก และรวดเร็ว รวมทั้งสามารถให้ผลที่แน่นอนและถูกต้อง การทดสอบวิธีนี้ใช้หลักการแพร่กระจายของสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เติมลงบนกระดาษตาปลา (paper disc) ซึ่งวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบไว้ สารออกฤทธิ์จะแพร่กระจายจากจุดเริ่มต้นไปในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น เมื่อระยะทางที่สารแพร่กระจายออกไปเพิ่มขึ้นความเข้มข้นของสารนั้นจะลดลงทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสาร ณ จุดต่างๆ กันรอบแผ่นกระดาษตาปลา ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารออกฤทธิ์ ณ ความเข้มข้นของสารที่จุดใด ๆ (ไกลกระดาษตาปลา) ก็จะเจริญ และเพิ่มจำนวนขึ้นจนเห็นได้ชัด แต่บริเวณใกล้กระดาษตาปลาซึ่งมีความเข้มข้นของสารมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้จะไม่มีการเจริญของเชื้อให้เห็นจึงเกิดเป็นโซนใส (inhibition zone) ขึ้น อัตราการแพร่กระจายของสารออกฤทธิ์ผ่านไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส ซึ่งจะบอกถึงความสามารถของสารที่นำมาทดสอบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้มากน้อยเพียงใด ผลการยับยั้งจุลินทรีย์วัดได้จากขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส ซึ่งขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสจะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Minimum inhibitory concentration: MIC) (อมรรัตน์ สีสุกอง และคณะ, 2550)

10.2 วิธีการทำ Agar disc diffusion

เตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบ โดยเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว วัดความขุ่นของเชื้อเพื่อให้ได้จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับการทดสอบแล้ว swab เชื้อบน Mueller-Hinton agar (MHA) ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร จุ่มกระดาษกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ในสารละลายของสารสกัดสมุนไพร และวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรทำชุดควบคุมบ่มเพาะเชื้อนาน 24 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (inhibition zone) โดยเทียบกับชุดควบคุมบวก (positive control) ที่ใช้ disc ยาปฏิชีวนะที่ทราบปริมาณยาที่แน่นอนทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำผลที่ได้ทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การแปรผลของวิธีนี้จะสามารถบอกได้เพียงว่าสมุนไพรที่ความเข้มข้นนั้น ๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากหรือน้อยตามขนาดของบริเวณใสเท่านั้น และอาจใช้การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เกิดจากยาปฏิชีวนะมาตรฐาน (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชรและคณะ, 2551)

ข้อดี คือ ค่าใช้จ่ายน้อย ทำได้ง่าย ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือพิเศษ สะดวกรวดเร็วเนื่องจากความแรงของยาที่ใช้ในการทดสอบนั้นสามารถใช้ความเข้มข้นเดียว สามารถปรับใช้ได้กับยาหลายๆตัว

ข้อเสีย คือ ผลการทดสอบที่ได้เป็นเพียงผลการทดสอบเบื้องต้นเท่านั้น ไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ ดังนั้นจึงนิยมใช้ในงานที่ต้องการความรวดเร็ว และไม่ต้องการผลที่ละเอียดมากนัก เช่น การทดสอบกับสิ่งตรวจจากคนไข้โดยตรง การทดสอบเบื้องต้นในการหาความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพตัวใหม่ เป็นต้น (นิธิ ตั้งศิริทรัพย์, 2555)

10.3 Agar well diffusion method

การทดสอบโดยใช้การเจาะหลุมอาหารด้วย cork borer แล้วจึงหยอดสารที่ต้องการทดสอบลงไปในหลุม (Agar –well) (ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล และคณะ, 2546)

10.4 วิธีการทำAgar well diffusion method

นำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ มา streak บนจานอาหารแข็ง Mueller Hinton agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบใส่ลงในอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) ในปริมาตรที่ต้องการ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมาเตรียมเชื้อเริ่มต้น โดยวิธีเทียบความขุ่นกับสารละลาย McFarland No.0.5 จะได้เชื้อประมาณ 0.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในหลอดเพาะเชื้อเริ่มต้น กดไม้พันสำลีที่ข้างหลอดพอหมาดแล้วนำมาเกลี่ยให้ทั่วบนผิวหน้าอาหารแข็ง MHA เจาะหลุมบนอาหารแข็ง MHAที่ทำการเกลี่ยเชื้อที่เตรียมไว้แล้ว ด้วย sterile cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ให้แต่ละหลุมห่างกันพอประมาณ ใส่สารสกัดที่ละลายด้วยตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้นที่กำหนด ลงในหลุมแต่ละหลุม ใส่ตัวทำละลาย ลงในหลุมที่หนึ่งเพื่อเป็น negative control และใส่ยาปฏิชีวนะ ที่ความเข้มข้นที่กำหนด เพื่อเป็น positive control นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง (inhibition zone) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำมาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน นำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Minimum inhibitory concentration: MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimum bactericidal concentration: MBC) (นิธิ ตั้งศิริทรัพย์, 2555)

10.5 วิธีการทำBroth dilution method

เป็นการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ละเอียดวิธีหนึ่ง การทดสอบนี้จะทำให้ทราบทั้งค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Minimum inhibitory

concentration: MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimum bactericidal concentration: MBC) ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นๆ กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้ คือ เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ซึ่งมีสารสกัดสมุนไพรในปริมาณต่าง ๆ กันผสมอยู่ และสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

10.6 วิธีการทำ Broth dilution method

วิธีนี้สามารถแบ่งได้เป็น 3 แบบ คือ

10.6.1 Agar dilution วิธีนี้จะทำการเจือจางยาในอาหารวุ้นให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จากนั้นจึงนำเชื้อที่ต้องการทดสอบจำนวน 10^4 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร มาจุดลงบนผิวหน้าของอาหาร และสังเกตการเจริญของเชื้อเมื่อผ่านการเพาะเชื้อตามกำหนดเวลาแล้ว ความเข้มข้นของยาต่ำสุดที่เชื้อไม่เจริญ คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration: MIC)

ข้อดี คือสามารถทดสอบเชื้อได้หลายชนิดในคราวเดียวกัน และสามารถสังเกตการปนเปื้อนได้

ข้อเสีย คือ ไม่สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum bactericidal concentration: MBC) และมีขั้นตอนที่ค่อนข้างยุ่งยากใช้เวลานาน

10.6.2 macro broth dilution วิธีนี้จะทำการเจือจางสารที่จะทดสอบในอาหารเหลวให้มีความเข้มข้นต่างๆกันโดยทำในหลอดทดลองในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (two-fold dilution) ไปเรื่อยๆปริมาตรสุดท้ายที่อยู่ในหลอด เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร และต้องมีหลอดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพรด้วยเตรียมเชื้อที่ทดสอบ โดยอาจใช้วิธีเทียบความขุ่นกับ McFarland standard No.0.5 หรืออาจใช้การวัดความขุ่นด้วย spectrophotometer แล้วเจือจางลงเพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อที่ต้องการ

10.6.3 micro broth dilution ทำใน microtiter plate 96-well โดยเจือจาง stock solution ด้วย broth แบบ two-fold dilution มีหลุมควบคุมเป็น broth ที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพรในแต่ละหลุมจะมีปริมาตรเท่ากับ 0.05 มิลลิลิตร จากนั้นใส่เชื้อที่ปรับปริมาตรแล้ว 0.05 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วปิดฝาก่อนนำไปบ่มเพาะ อ่านค่า MIC โดยดูความขุ่นด้วยตาเปล่า หรืออาจใช้สารบางอย่างที่สามารถบ่งชี้การเจริญของเชื้อได้เพื่อให้อ่านค่าได้ง่ายขึ้น ดังเช่น งานการวิจัยของ Eloff ที่ได้ทดลองโดยใช้สาร tetrazolium dye หลายชนิด ได้แก่ tetrazolium red, thiazolyl blue และ p-Iodonitrotetrazolium violet (INT) เป็นสารบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรีย (biologically active organisms) โดยหากเชื้อมีการเจริญจะสามารถเปลี่ยนสารที่ไม่มีสีเป็นสารสีได้ซึ่งพบว่า p-Iodonitrotetrazolium violet ให้ผลการวัดการเจริญได้ของเชื้อที่ดีที่สุด ซึ่งวิธีการนี้สามารถทำได้รวดเร็วแม่นยำ และเหมาะสมแก่การนำมาใช้ศึกษาสมุนไพร เนื่องจากสามารถลดการรบกวนการอ่านผลเนื่องจากสี และความขุ่นของสมุนไพรบางชนิดได้หากดูความขุ่นด้วยตาเปล่า (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

Broth dilutions ทั้งสองวิธีมีข้อดี คือ เป็นวิธีที่ให้ผลเชื่อถือได้ จึงเหมาะกับงานวิจัย สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ สามารถใช้ทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อของสารได้

ข้อเสีย คือ ไม่สามารถสังเกตการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ และการทดสอบในแต่ละชุดสามารถทดสอบกับเชื้อได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น (นิธิ ตั้งศิริทรัพย์, 2555)

11. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษามีจุดประสงค์เพื่อทดสอบหาฤทธิ์ร่วมกันของสารแอลฟาแมงโกสติน (alpha-mangostin) ที่แยกได้จากเปลือกผลมังคุดกับยาเจนตามัยซิน (gentamicin) ในการยับยั้งการเจริญของ MRSA จำนวน 16 ไอโซเลท และ *Staphylococcus aureus* ที่ไวต่อยาเมธิซิลลิน (methicillin-susceptible *S. aureus* : MSSA) จำนวน 1 ไอโซเลท ผลการทดสอบพบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibitory concentration : MIC) ของสารแอลฟาแมงโกสตินและยาเจนตามัยซินต่อเชื้อทดสอบ มีค่าตั้งแต่ 6.25-12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.25-256 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม (fractional inhibitory concentration index : FICI) ของสารแอลฟาแมงโกสตินร่วมกับยาเจนตามัยซินต่อ MRSA ทุกไอโซเลท และ MSSA เท่ากับ 0.625-1.0 และ 0.5 ตามลำดับ การวิเคราะห์ฤทธิ์ร่วมกันของสารทั้งสองชนิดเมื่อเทียบกับสารเพียงชนิดเดียว พบว่าผลการยับยั้ง MRSA เป็นแบบไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว และเมื่อทดสอบกับ MSSA พบว่ามีฤทธิ์แบบเสริมกัน ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปสู่การพัฒนาในการนำสารชนิดใหม่มาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะเพื่อนำไปใช้รักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ MRSA ในอนาคต (อุมาพร ทาไธสง และสิทธิเดช แสงนวล, 2011)

จากการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเปลือกผลไม้ 5 ชนิด ได้แก่ ทุเรียนพันธุ์หมอนทอง มังคุดสุก ส้มเขียวหวาน กล้วยน้ำว้าดิบ และหมากสงดิบ เมื่อสกัดด้วยน้ำร้อน เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และอะซิโตน จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วยอะซิโตนให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิดที่ทดสอบ (*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium*) สูงที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) น้อยกว่า 195.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ สารสกัดจากเปลือกทุเรียนด้วยอะซิโตน มีค่า MIC ต่อ *B. subtilis* และ *S. typhimurium* เท่ากับ 373 และ 273 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า MIC ต่อ *S. aureus* และ *E. coli* เท่ากัน คือ 2,984 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากเปลือกผลไม้ทุกชนิดที่ทดสอบด้วยอะซิโตนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนและสารสกัดด้วยเอทานอล และพบว่า ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ตรวจพบในเปลือกผลไม้ นอกจากนี้ เปลือกผลไม้ทุกชนิดที่ทำการศึกษาสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (สุคนธ์ ตันติไพบูลย์วุฒิ, และคณะ, 2012)

จากการศึกษาสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวหนัง โดยทำการทดลองหาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดสมุนไพร 11 ชนิดได้แก่ ทองพันชั่ง (ทั้งต้น) มังคุด (เปลือก) ตะไคร้ (ทั้งต้น) พลู (ใบ) มะกรูด (ทั้งต้น) เทียนกิ่ง (ใบ) เทียนบ้าน (ใบ) บอระเพ็ด (เถา) มะคำดีควาย (ผล) ผักบุ้ง (ทั้งต้น) หมีเหม็น (ใบ) พบว่าสารสกัดจากต้นทองพันชั่ง เปลือกมังคุด ใบพลูและต้นตะไคร้ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดี เมื่อนำสารสกัดทั้ง 4 มาหาฤทธิ์เสริมหรือต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* พบว่า ทองพันชั่งและมังคุด มังคุดและพลู ให้ผลเสริมกันในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อนี้ เมื่อนำสารสกัดผสมที่ได้มาเตรียมเป็นสบู่เหลวสมุนไพร แล้วทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งต่อเชื้อ *S. aureus* และเชื้อจุลินทรีย์ตามผิวหนังอื่นได้แก่ *Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Proteus vulgaris* และ *Pseudomonas aeruginosa* เปรียบเทียบกับสบู่ระงับเชื้อจุลินทรีย์ในท้องตลาดคือ Protex ® พบว่าสบู่เหลวสมุนไพรที่ประกอบด้วยสารสกัดจากเปลือกมังคุด 2.0 เปอร์เซ็นต์มังคุดและตะไคร้รวมกัน 2.0 เปอร์เซ็นต์มังคุด พลูและตะไคร้รวมกัน 2.0 เปอร์เซ็นต์มังคุดและทองพันชั่งรวมกัน 1.0 เปอร์เซ็นต์มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาต่อเนื่องโดยการปรับความเข้มข้นหรืออัตราส่วนของสมุนไพรให้มีฤทธิ์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ได้กว้างมากขึ้นและพัฒนาคุณสมบัติของสบู่เหลวให้น่าใช้มากขึ้น เพื่อการผลิตในขั้นอุตสาหกรรมต่อไป (จันจิรา อินตราและอนุสรา รอดรักษา, 2542)

จากการศึกษาระดับความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) และฆ่า (MBC) ของสารสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดใบฝรั่ง (*Psidiumguajava* Linn.) เปลือกมังคุด (*Garciniamangostana* Linn.) หัวขมิ้นชัน (*Curcuma Longa* Linn.) บัวบก (*Cetellaasiatica* Linn. Urban) และใบฟ้าทะลายโจร (*Andrographispaniculata* (Bur. f. Nees)) ต่อเชื้อ *S. aureus* ชนิดที่ดื้อ (8 สายพันธุ์) และไวต่อยาเพนนิซิลลิน (7 สายพันธุ์)ที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ และแสดงอาการ สารสกัดใบฟ้าทะลายโจรไม่สมารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. aureus* ทั้งหมดในการศึกษานี้ได้ สารสกัดบัวบกและสารสกัดขมิ้นชันสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ทั้งชนิดที่ดื้อและไวต่อยาเพนนิซิลลิน ได้ที่ระดับความเข้มข้นสูงแต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ส่วนใหญ่ได้ ขณะที่สารสกัดจากใบฝรั่งขี้นกและสารสกัดเปลือกมังคุดสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ทั้งที่ดื้อและไวต่อยาเพนนิซิลลินได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ แต่ใช้ระดับความเข้มข้นที่สูงเพื่อฆ่าเชื้อ นอกจากนี้พบว่าระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ฆ่าหรือยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ไวต่อยาเพนนิซิลลินมีระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาเพนนิซิลลิน (ชัยเดช อินทร์ชัยศรี และคณะ, 2548)

จากการศึกษาการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acnes* และเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากเปลือกมังคุด ขมิ้นชันและใบบัวบก พืชทั้ง 3 ชนิดจะถูกนำไปสกัด และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้ด้วยเทคนิค HPLC

พบว่าบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ของสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีค่ามากกว่าสารสกัดจากขมิ้นชันและใบบัวบกที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากัน และการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด ขมิ้นชันและใบบัวบก สำหรับเชื้อ *P. acnes*มีค่าเท่ากับ 12.5, 25 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับและเชื้อ *S. aureus* มีค่าเท่ากับ 6.25, 12.5 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด ขมิ้นชันและใบบัวบก สำหรับเชื้อ *P. acnes* มีค่าเท่ากับ 25, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับและเชื้อ *S. aureus* มีค่าเท่ากับ 12.5, 25 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อของสารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิดพบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดใช้ความเข้มข้นน้อยที่สุด 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการยับยั้งเชื้อทั้ง 2 ชนิด (นุศวดี พจนานุกิจ และสมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม,2553)

จากการศึกษาสารสกัดจากพืชในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของเนื้อสัตว์ โดยนำสารสกัดจากพืชที่มีสารแทนนินเพื่อมาใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสารแทนนินเป็นสารที่พบมากในพืชที่มีรสฝาดมีฤทธิ์ในการบรรเทาท้องเสียทั้งยังป้องกันการทำลายของเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียบางชนิด โดยพืชที่นำมาสกัด มี 3 ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง เปลือกเงาะ และ เปลือกมังคุด จากการศึกษาปริมาณสารแทนนินในพืชที่มีรสฝาดโดยวิธีการตกตะกอนโปรตีนพบว่าใบฝรั่งมีปริมาณสารแทนนินอยู่ 18.65 กรัม เปลือกเงาะ 17.87 กรัม และเปลือกมังคุด 15.77 กรัม ตามลำดับ การศึกษาผลของสารสกัดจากใบฝรั่ง เปลือกเงาะ และเปลือกมังคุดมาใช้เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เนื้อสัตว์เน่าเสียในห้องปฏิบัติการ โดยการวัดบริเวณยับยั้ง พบว่าสารสกัดจากพืชที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli, Salmonella typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* โดยเกิดบริเวณยับยั้งเห็นได้ชัดเจนมี 1 ชนิด คือ สารสกัดจากเปลือกเงาะ ส่วนสารสกัดจากพืชอีก 2 ชนิด ไม่ก่อให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกเงาะ ในการยับยั้งแบคทีเรียบนเนื้อหมู เนื้อไก่ และเนื้อปลา ที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดจากเปลือกเงาะที่ระดับความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์มีประสิทธิภาพดีที่สุด เมื่อนำมาเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีที่ลดลง (%) จะพบว่าสารสกัดจากเปลือกเงาะสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุดทั้งบนเนื้อหมู เนื้อไก่และเนื้อปลา (ศิริวรรณ แก้วเพ็ชร์และคณะ, 2553)

สมุนไพรพื้นบ้านไทยจำนวน 7 ชนิดนำมาสกัดสารโดยใช้น้ำเมทานอลและเอทานอลเป็นตัวทำละลายได้นำมาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจำนวน 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Escherichi coli* ATCC25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC27736, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยทดลองใช้สารสกัด (30 ไมโครกรัม/plate) 21 ตัวอย่างต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ผลการทดลองพบว่าสารสกัดฟักแม้วด้วยเมทานอลแสดงการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ

Staphylococcus epidermidis ได้ดีที่สุดโดยมีค่า MIC เท่ากับ 7.81 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 62.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับสารสกัดสะระแหน่ด้วยน้ำและสารสกัดชะพลูด้วยเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Klebsiella pneumonia และ Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุดมีค่า MIC เท่ากับ 15.62 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (จิราภรณ์ บุราครและเรือนแก้ว ประพฤติ, 2555)

ในการศึกษาเตรียมสารสกัดเปลือกมังคุดโดยวิธีแช่เปลือกมังคุดในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมคุณภาพของสารสกัดด้วยวิธี TLC-fingerprint และ densitometric method จากนั้นทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *P. acnes, S. aureus*และ *S. epidermidis* พบว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้คือ 0.156, 0.156 และ 0.313 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้คือ 0.313 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การตั้งตำรับแผ่นแปะใช้ polyvinyl pyrrolidone (PVP), polyvinyl alcohol (PVA), EudragitRS - 100 และ EudragitRL - 100, กลีเซอรีน และโพรพีลีนไกลคอลในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อศึกษาสูตรตำรับที่ดีที่สุดในการเตรียมแผ่นแปะสารสกัดมังคุด และใช้สารสกัดมังคุดในปริมาณเท่ากับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิด ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ ความหนา ความแข็งแรง ความยืดหยุ่น การยึดติดและฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิดเปรียบเทียบกับ 1เปอร์เซ็นต์ clindamycin ทั้งนี้พบว่าแผ่นแปะสารสกัดมังคุดที่ประกอบด้วย PVP 1.7 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และ PVA 3.3 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้กลีเซอรีน 2 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร เป็นพลาสติไซเซอร์ มีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดีที่สุด และจากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ พบว่าแผ่นแปะสารสกัดมังคุดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยเกิดวงใสเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.67 เซนติเมตร ขณะที่ clindamycin เกิดวงใสต่อเชื้อ *S. aureus* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.73 เซนติเมตร อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบความคงตัวของแผ่นแปะสารสกัดมังคุด และศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดสิวในมนุษย์ต่อไป (นิศารัตน์ บุญภักดี และอังศนา เนตรปฏิภาณ,2555)

จากการนำเปลือกมังคุดสดและแห้งมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและการสกัดเปลือกมังคุดสดและแห้งแบบต่อเนื่องด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือเฮกเซนอะซิโตนและเมทานอลโดยใช้วิธีการสกัดเย็น(Maceration) และวิธีการสกัดร้อนด้วยเครื่อง Soxhlet extraction apparatus จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 5 ชนิดคือเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Propionibacterium acnes* เชื้อยีสต์ *Candida albicans* และเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ด้วยวิธี disc diffusion method พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดสดโดยวิธีการสกัดเย็นด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Propionibacterium acnes* และ *Trichophyton mentagrophytes* ได้ดีที่สุดเมื่อนำสารสกัดจากเปลือกมังคุดสดโดยวิธีการสกัดเย็นด้วยเอทานอลมาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดโดยวิธี agar dilution method พบว่า

สารสกัดจากเปลือกมังคุดสดโดยวิธีการสกัดเย็นด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุดโดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุด 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (อุดมลักษณ์สุขอัตตะ, และคณะ, 2549)

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 เครื่องมือ

1.1.1 เครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง
1.1.2 หม้อนึ่งความดันไอ
1.1.3 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
1.1.4 เตาไมโคเวฟ
1.1.5 ตู้ถ่ายเชื้อ
1.1.6 กล้องถ่ายรูปดิจิตอล
1.1.7 เครื่องปั่น (Blender)
1.1.8 เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary Evaporator)
1.1.9 Micropipette
1.1.10 Verniercaliper
1.1.11 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
1.1.12 ตู้แช่4 องศาเซลเซียส
1.1.13 อ่างควบคุมอุณหภูมิน้ำ (Water bath)
1.1.14 ตู้พ่นอากาศบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ (Laminar flow)
1.1.15 Vortex

1.2 อุปกรณ์

1.2.1 จานเพาะเชื้อ
1.2.2 หลอดทดลอง
1.2.3 บีกเกอร์
1.2.4 ปิเปตขนาด1ml 5ml 10 ml
1.2.5 ปากคีบ (Forcep)
1.2.6 สำลีก้าน (Swab)
1.2.7 ขวดรูปชมพู่ (Flaks) ขนาด 500 ml 1000 ml
1.2.8 กระดาษกรอง Whathman เบอร์ 4
1.2.9 กระดาษตาปลาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง6 มิลลิเมตร (Paper Disc)
1.2.10 Microtiter plates (96-well sterile culture plates)
1.2.11 Tip
1.2.12 กระดาษฟรอยส์
1.2.13 ช้อนตักสาร

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

1.2.14 แท่งแก้วคนสาร

1.2.15 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ถาด เข็มเขี่ยเชื้อ ตะเกียง ไฟเซ็ค ห่วงถ่ายเชื้อ ปากกาเขียนแก้ว สำหรับใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3.1 Mannitol Salt Agar (MSA)

1.3.2 Mueller Hinton Agar (MHA)

1.3.3 Mueller-Hinton Broth (MHB)

1.3.4 Nutrient Agar (NA)

1.3.5 Tryptic Soy Agar (TSA)

1.3.6 Tryptic Soy Broth (TSB)

1.4 สารเคมี

1.4.1 น้ำกลั่น

1.4.2 เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

1.4.3 ยาปฏิชีวนะTetracycline ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม

1.4.4 ยาปฏิชีวนะ Novobiocin ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม

1.4.5 ยาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม

1.4.6 Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

1.4.7 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)0.85เปอร์เซ็นต์

1.4.8 คริสตัล ไวโอเลต (crystal violet)

1.4.9 ไอโอดีน (iodine)

1.4.10 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

1.4.11 ซาฟรานินโอ (safranin O)

1.4.12 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 10 เปอร์เซ็นต์

1.4.13 McFarland standard solution No.0.5

1.5 สมุนไพรที่ใช้ทดสอบ

1.5.1 เปลือกมะนาว

1.5.2 เปลือกทับทิม

2. วิธีการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis*

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมตัวอย่างสมุนไพรและการสกัดสารที่ใช้ในการทดสอบ

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาผลของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis*

2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis*

2.1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อMannitol Salt Agar (MSA) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

2.1.2 รอให้อาหารหลอมเหลว เขียนป้ายชื่อติดที่ก้นจานเพาะเชื้อ

2.1.3 ทำการเทเพลทแล้วรอให้อาหารแข็งตัว

2.1.4 ใช้ไม้พันสำลี (Sterile cotton swab) จุ่มลงใน NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์กดพอหมาด ๆ ที่ด้านในหลอดเช็ดบริเวณผิวหนังเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MSA

2.1.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกผลลักษณะโคโลนีที่เจริญในแต่ละจานเพาะเชื้อ

2.1.6 แยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์โดยนำเชื้อจุลินทรีย์จากข้อ2.1.5 ลากขีดเชื้อลงในอาหารแข็ง MSAด้วยลวดเขี่ยเชื้อ

2.1.7 นำไปบ่มเชื้อลักษณะคว่ำจานที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงจนได้เชื้อบริสุทธิ์ที่มีโคโลนีเดี่ยว (colony) บันทึกผลลักษณะโคโลนีในแต่ละจานเพาะเชื้อ

2.1.8 นำมาตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทำการย้อมสีแกรม (Gram's stain)

2.1.9 ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียได้แก่ Oxidase test , Catalase test, Citrate test , Urea test , MIL test , Methyl red/Voges-prokauer test , Coagulase test , ความไวต่อยาปฏิชีวนะ Novobiocin ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม และการเจริญในอาหารผสม NaCl 10 เปอร์เซ็นต์

2.2 การเตรียมตัวอย่างสมุนไพรและการสกัดสารที่ใช้ในการทดสอบ

2.2.1 นำมะนาว และทับทิมมาล้างให้สะอาดหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ หรือซอยจนละเอียด

2.2.2 นำเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิมไปตากให้แห้งเป็นเวลา 2-3 วัน

2.2.3 นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นและร่อนด้วยตะแกรงจะได้ผงสมุนไพรเก็บที่แห้ง

2.2.4 ชั่งน้ำหนักผงสมุนไพร 500 กรัม แล้วแช่ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร อัตราส่วนของผงจากเปลือกทั้ง 2 ชนิด ต่อตัวทำละลาย 1:3 นำไปเขย่าด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

2.2.5 กรองสารละลายด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 นำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 - 55 องศาเซลเซียส จนได้สารหนืด

2.2.6 นำสารสกัดที่ได้ไปชั่งน้ำหนักแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำน้ำหนักของสารที่สกัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ได้ (% Yield) ตามสารสกัดที่ได้ โดยใช้สูตร

$$\% \text{ YIELD} = \frac{\text{น้ำหนักของสมุนไพรที่ได้จากการสกัด}}{\text{น้ำหนักของสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด}} \times 100$$

2.3 ศึกษาผลของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis*

2.3.1 การเพาะเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

2.3.1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงNutrient Agar (NA) และ Tryptic Soy Broth (TSB) ในหลอดทดลองทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

2.3.1.2 เชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ คือ *S. epidermidis* นำเชื้อมาเพาะบนอาหาร Nutrient Agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.3.1.3 เขี่ยโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานอาหาร NA เขี่ยประมาณ 2-3 โคโลนี นำมาใส่ในอาหาร TSB ในหลอดบ่มที่อุณหภูมิ35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง

2.3.1.4 นำเชื้อจากข้อ 2.3.1.31 มิลลิลิตร ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อในหลอดสุดท้ายเป็น 10^{-3} ด้วย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ปริมาณ 9 มิลลิลิตรจำนวน 4 หลอดแล้วนำไปปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarlantstandard No.0.5 เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการทดสอบต่อไป

2.3.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar Disc Diffusion

2.3.2.1 เมื่อเชื้อที่บ่มไว้เจริญได้ดีแล้ว นำจานเพาะเชื้อไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อ

2.3.2.2 เตรียมอาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA) แล้วนำไปบ่มที่หม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว15 นาที แล้วนำมาตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิเย็นลง จึงนำมาเทใส่ในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

2.3.2.3 ทำเครื่องหมายไว้ที่จานเพาะเชื้อที่ทำการทดลอง โดยการแบ่งออกเป็น 5 ส่วนเท่าๆกัน ซึ่งแต่ละส่วนจะวางแผ่นกระดาษตาปลา (paper disc)

2.3.2.4 นำเชื้อที่ใช้ในการทดสอบที่ได้ทำการปรับความขุ่นกับ McFarland standard No.0.5 มาเตรียมไว้

2.3.2.5 จากนั้นนำไม้พันสำลีจุ่มลงในหลอดเชื้อแล้วกดข้าง ๆ หลอดให้พอหมาด ๆ แล้วป้ายบนผิวหน้าอาหาร MHA เป็น 3 ระนาบ ให้ทั่วทั้งผิวหน้าอาหารแล้วป้ายรอบขอบด้านในของอาหารเพาะเชื้ออีกครั้ง ปล่อยให้ผิวหน้าอาหารแห้งทิ้งไว้ 3-5 นาที

2.3.2.6 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายสมุนไพร 20 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 300, 200, 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หยดลงบนแผ่นกระดาษตาปลาก่อน เพื่อให้สารละลายซึมซับได้มากที่สุด จึงใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อแล้ว (โดยการลนไฟแล้วปล่อยให้เย็นลง) คีบแผ่นกระดาษตาปลาเบา ๆ วางไว้ให้ติดกับผิวหน้าอาหาร(ทำการทดลอง 3ซ้ำ) ใช้ยาปฏิชีวนะ Tetracycline ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมเป็น Positive control และใช้สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็น Negative control

2.3.2.7 บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของขนาดวงใส ที่เกิดขึ้นรอบๆแผ่นกระดาษตาปลาบันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง และนำผลการทดลองที่ได้เปรียบเทียบค่าแตกต่างทางสถิติ

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.3.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration, MIC) ของสารสกัดจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิม ด้วยวิธี Broth dilution technique (ดัดแปลงจากนิธิ ตั้งศิริทรัพย์, 2555)

2.3.3.1 นำ Microtiter plates (96-well sterile culture plates) ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขียนเครื่องหมายกำกับไว้ที่Microtiter plates

2.3.3.2 ใช้ไมโครปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) ใส่ในหลุมที่ 1-12 หลุมละ 50 ไมโครลิตร

2.3.3.3 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดที่เตรียมไว้ใส่ในหลุมที่ 2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมสารในหลุมที่ 2 ให้เข้ากัน ดูดยาปฏิชีวนะ Ampicillin ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใส่ลงในหลุมที่ 1 ดูดมา 50 ไมโครลิตรเป็น Positive control

2.3.3.4 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารที่เตรียมไว้ใส่ในหลุมที่ 2 จำนวน 50 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันจากนั้นดูดสารละลายในหลุมที่ 2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรไปใส่ในหลุมที่ 3 ทำซ้ำไปจนถึงหลุมที่ 11 (เปลี่ยนTip ทุกครั้งที่เปลี่ยนหลุม) เมื่อผสมสารละลายในหลุมที่ 11 ให้เข้ากันได้ดีแล้วใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายทิ้งไป 50 ไมโครลิตร

2.3.3.5 เติมเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ลงไปในทุก ๆ หลุมปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตรหลุมที่ 12 จะมีอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อ เป็น Negative control นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง อ่านผลการเจริญของแบคทีเรียจากการสังเกตความขุ่นของแบคทีเรียที่ทดสอบในแต่ละหลุมด้วยตาเปล่า เทียบกับหลุมควบคุมซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อและยาปฏิชีวนะ และหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อกับเชื้อ โดยค่า MIC คือค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดของสารสกัดหรือยาปฏิชีวนะในหลุมทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ซึ่งหลุมทดสอบนั้นจะใสบันทึกผล (ทำการทดลอง3 ซ้ำ)

2.3.4 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดสามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิม ด้วยวิธี Agar dilution technique (ดัดแปลงจากนิธิ ตั้งศิริทรัพย์, 2555)

2.3.4.1 ดูดสารละลายในหลุมทดสอบที่ใสจากการทดสอบหาค่า MIC ทุกหลุมปริมาตร50 ไมโครลิตร ไป Spread plateลงบนอาหาร TSA

2.3.4.2 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.3.4.3 อ่านผลโดยดูการเจริญของเชื้อ ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้จะไม่มีเชื้อเจริญขึ้นและบันทึกผล (ทำการทดลอง3 ซ้ำ)

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิมซึ่งสกัดโดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ได้ทำการคัดแยกเชื้อ *S. epidermidis* และหาเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ได้ (% Yield) ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิมในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* โดยวิธี Disc Diffusion Methodหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ด้วยวิธี Broth dilution techniqueและการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) ด้วยวิธี Agar dilution technique ให้ผลการศึกษาดังนี้

1. การคัดแยกเชื้อ

ทำการคัดแยกเชื้อ *S. epidermidis* จากนักศึกษาโปรแกรมวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา จำนวน 10 คน โดยใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (Swab) จุ่มลงในหลอดที่มี NaCl ความเข้มข้น0.85 เปอร์เซ็นต์บิดพอหมาด ป้ายบริเวณผิวหนังที่อับชื้นเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Mannitol Salt Agar (MSA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง พบโคโลนีเดี่ยวขนาดเล็กสีชมพูหรือสีแดง และไม่เปลี่ยนสีของอาหารทั้งหมด 32 ไอโซเลตนำมาตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยทำการย้อมสีแกรม (Graim's stain)และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ได้แก่ Oxidase test, Catalase test, Citrate test, Urea test, MIL test, Methyl red/Voges-prokauer test, Coagulase test, ความไวต่อยาปฏิชีวนะ Novobiocin ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมและ การเจริญในอาหารผสมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 10 เปอร์เซ็นต์ซึ่ง พบว่ามีเชื้อทั้งหมด 12 ไอโซเลต ที่ใช้ผลสอดคล้องกับคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของ *S. epidermidis* ดังแสดงในตารางที่ 1 (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบเชื้อ *S. epidermidis*ที่คัดแยกได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งตรวจสอบด้วยการย้อมสีแกรม (Graim's stain) และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ดังนี้

การทดสอบ	*S. epidermidis* ที่แยกได้												*S. epidermidis*
	I_1	I_4	I_5	I_9	I_{12}	I_{15}	I_{18}	I_{20}	I_{21}	I_{25}	I_{27}	I_{28}	
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methy Red (MR)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vogas-Proskauer(VP)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulase test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Novobiocin resistant (20 µg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Graim's Stain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
รูปร่าง/การจัดเรียงตัว	กลม/พวงองุ่น	กลม/พวงองุ่น	กลม/พวงองุ่น	กลม/พวงองุ่น	กลม/พวงองุ่น	กลม/พวงองุ่น	กลม/พวงองุ่น	กลม/พวงองุ่น	กลม/พวงองุ่น	กลม/พวงองุ่น	กลม/พวงองุ่น	กลม/พวงองุ่น	กลม/พวงองุ่น

ที่มา : หนังสือการจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์ (นันทนา อรุณฤกษ์ม, 2537)

2. การสกัดสารจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิม

จากการสกัดสารจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิมด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน1:3โดยชั่งผงเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิม 500 กรัม ต่อเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 1,500 มิลลิลิตรโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ได้ (% Yield) จากเปลือกมะนาว เท่ากับ 37.10 เปอร์เซ็นต์ และเปลือกทับทิม เท่ากับ 91.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและสารสกัดจากเปลือกมะนาวมีลักษณะทางกายภาพเป็นสารหนืด สีเขียว และมีกลิ่นหอม ส่วนสารสกัดจากเปลือกทับทิมมีลักษณะทางกายภาพเป็นสารหนืด สีน้ำตาล ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของเกศรินทร์ รามณี (2552) ซึ่งศึกษาการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* โดยสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม พบว่า มะนาวให้เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารสกัดที่ 1.53 เปอร์เซ็นต์ และจากงานวิจัยของวรยุทธ ยอดบุญ (ม.ป.ป) และคณะ ซึ่งศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร พบว่า ทับทิมให้เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารสกัดที่ 12.23 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ได้ (% Yield) ที่สูงกว่า การสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เนื่องจากใช้ตัวทำลายที่ต่างกัน

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ได้ (% Yield) จากการสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด

พืชสมุนไพร	ลักษณะทางกายภาพ	น้ำหนักของสมุนไพรที่ได้จากการสกัด (g)	น้ำหนักของสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด (g)	เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ได้ (% Yield)
มะนาว	สีเขียวหนืด มีกลิ่นหอม	37.10	500	7.42
ทับทิม	สีน้ำตาลหนืด	91.87	500	18.37

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ*Staphylococcus epidermidis*โดยวิธี Agar Disc Diffusion

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* จำนวน 3 ไอโซเลต ที่แยกได้จาก 12 ไอโซเลต ได้แก่ I_1, I_4 และ I_5 โดยนำมาทดสอบด้วยวิธี Agar Disc Diffusion ใช้สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 300, 200, 100 และ 50

เชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตดังแสดงในตารางที่ 3 รูปที่ 1, 2 และ3 สามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อ I_1 เท่ากับ 20.87±1.57, 19.43±0.57, 18.57±0.58 และ 17.57±1.53 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วน I_4 สามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 19.53±1.15, 18.57±0.58, 18.17±0.70 และ 16.53±0.67 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ I_5 สามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 22.80±0.52, 22.60±0.52, 22.17±1.10 และ 16.23±2.23 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวรยุทธ ยอดบุญ และคณะ (ม.ป.ป) ซึ่งศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารที่สกัดจากตัวทำละลายได้แก่ เฮกเซนอะ ซีโตน เมทานอล เอทานอล และน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ด้วยวิธี Agar Disc Diffusion ทดสอบกับแบคทีเรีย 13 สายพันธุ์โดยจากการทดสอบพบว่าสารสกัดเปลือกทับทิมด้วย เมทานอล และเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* สามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 12.50 และ 15.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ

4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* โดยวิธี Agar Disc Diffusion

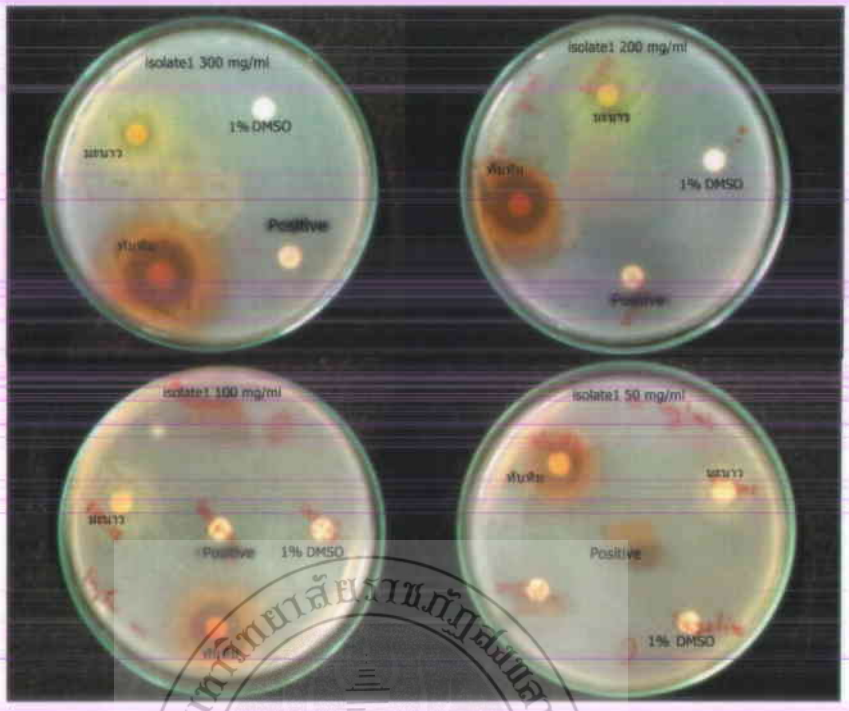
จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ I_1, I_4 และ I_5 โดยนำมาทดสอบด้วยวิธี Agar Disc Diffusion ใช้สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 300, 200, 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตดังแสดงในตารางที่ 3 รูปที่ 1, 2 และ3 สามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งต่อเชื้อ I_1 ที่ความเข้มข้น 300 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 12.77±0.57 และ 12.03±0.12 มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้น 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไม่พบบริเวณยับยั้ง ส่วน I_4 ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 300 และ200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวยับยั้ง เท่ากับ 11.87±0.58 และ 3.73±6.47 มิลลิเมตร ตามลำดับ ทดสอบความเข้มข้น 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่พบบริเวณยับยั้ง และ I_5 ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 300, 200 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส เท่ากับ 14.77±0.58, 12.57±1.37 และ 8.40±7.29 มิลลิเมตร ตามลำดับและทดสอบที่ความเข้มข้น 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่พบบริเวณยับยั้งซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของเกศรินทร์ รามณี (2552) ซึ่งศึกษาการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา 6 สายพันธุ์ โดยสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม พบว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารสกัดเอธิลอะซิเตตและน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม 5 ชนิดคือ มะกรูด มะนาว ส้มโอ ส้มเช้ง และส้มโชกุนที่มีผลต่อเชื้อรา โดยวิธี disc diffusion assay พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวมีกิจกรรมยับยั้งในช่วงกว้างที่สุดโดยน้ำมันหอมระเหยจากมะนาวมีความกว้างของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 24.13, 18.13, 28.63, 22.82 และ 22.85 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* I_1, I_4 และ I_5 ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิมที่ความเข้มข้น 300, 200, 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ไอโซเลต	ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (ค่าเฉลี่ย ± SD; มิลลิเมตร)			
		สารสกัดเปลือกมะนาว	สารสกัดเปลือกทับทิม	Tetracycline (Positive control)	1% DMSO (Negative control)
I_1	300	12.77±0.57	20.87±1.57	37.77±1.15	-
	200	12.03±0.12	19.43±0.57	38.48±1.15	-
	100	-	18.57±0.58	39.70±0.58	-
	50	-	17.57±1.53	39.77±0.58	-
I_4	300	11.87±0.58	19.53±1.15	36.30±0.69	
	200	3.73±6.47	18.57±0.58	35.57±2.40	-
	100	-	18.17±0.70	35.57±2.40	-
	50	-	16.53±0.67	34.50±1.05	-
I_5	300	14.77±0.58	22.80±0.52	41.83±0.23	-
	200	12.57±1.37	22.60±2.43	41.63±2.93	-
	100	8.40±7.29	22.17±1.10	44.13±3.41	-
	50	-	16.23±2.23	40.30±2.42	-

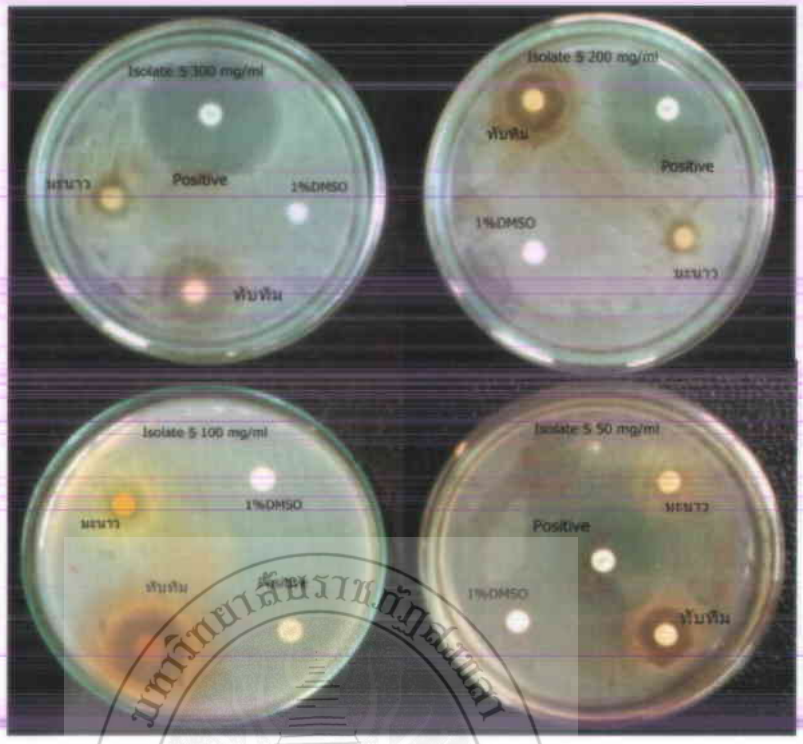
หมายเหตุ: - ไม่พบบริเวณยับยั้ง

Negative control=1% DMSO, Positive control =Tetracycline 20 ไมโครกรัม



รูปที่ 1 แสดงผลการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* I_1 ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิมและเปลือกทับทิม ที่ความเข้มข้น 300, 200, 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

รูปที่ 2 แสดงผลการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* I_4 ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิม ที่ความเข้มข้น 300, 200, 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 3 แสดงผลการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* I_5 ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิม ที่ความเข้มข้น 300, 200, 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) ของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม ด้วยวิธี Micro dilution technique

จากการศึกษาการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าค่า MIC ของI_1, I_4 และ I_5 อยู่ในช่วง 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกันดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวรยุทธ ยอดบุญ และคณะ (ม.ป.ป) ซึ่งศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยเตรียมสารสกัดในแต่ละตัวทำละลายในให้มีความเข้มข้น 594.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* อยู่ในช่วง 2.32 และ 4.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

6. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว ด้วยวิธี Microbroth dilution technique

จากการศึกษาการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่า MIC ของ I_1, I_4 และ I_5 อยู่ในช่วง 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบจากงานวิจัยของนุศวดี พจนานุกิจ และสมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม, 2553 ศึกษาการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acnes* และเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัด

จากเปลือกมังคุด ขมิ้นชันและใบบัวบก พืชทั้ง 3 ชนิดจะถูกนำไปสกัด และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด ขมิ้นชันและใบบัวบก สำหรับเชื้อ *P. acnes* มีค่าเท่ากับ 12.5, 25 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับและเชื้อ *S. aureus* มีค่าเท่ากับ 6.25, 12.5 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อของสารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิดพบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดใช้ความเข้มข้นน้อยที่สุด 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งเชื้อทั้ง 2 ชนิด

ตารางที่ 4 แสดงค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม และเปลือกมะนาวต่อเชื้อ *S. epidermidis* I_1, I_4 และ I_5 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกทับทิม (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	**ความสามารถในการยับยั้งการเจริญ (+/-) *S. epidermidis***			**ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกมะนาว (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**	**ความสามารถในการยับยั้งการเจริญ (+/-) *S. epidermidis***		
	I_1	I_4	I_5		I_1	I_4	I_5
50	+	+	+	100	+	+	+
25	+	+	+	50	–	–	–
12.5	+	+	+	25	–	–	–
6.25	+	+	+	12.5	–	–	–
3.13	–	–	–	6.25	–	–	–
1.56	–	–	–	3.13	–	–	–
0.78	–	–	–	1.56	–	–	–
0.39	–	–	–	0.78	–	–	–
0.20	–	–	–	0.39	–	–	–
0.10	–	–	–	0.20	–	–	–
Negative control	–	–	–	Negative control	–	–	–
Positive control	+	+	+	Positive control	+	+	+

หมายเหตุ: + มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง (ใส) , - ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง (ขุ่น)
Negative control = เชื้อ + อาหารเลี้ยงเชื้อ,Positive control = Ampicilin 25 mg/ml +อาหารเลี้ยงเชื้อ+เชื้อ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

7. ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimal bactericidal concentration: MBC) ของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม ด้วยวิธี Agar dilution technique

จากการศึกษาการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิมที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *S. epidermidis* พบค่า MBC ของ I_1, I_4 และ I_5 มีค่าเท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 5 รูปที่ 4 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของกัลยา เจือจันทร์ และคณ, (2513) ศึกษาผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่ สกัดสาระสำคัญด้วยวิธีการหมักในเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดที่ผ่านการกรองนำไปทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศ สารสกัดหยาบที่ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่ในหลอดทดลอง ด้วยวิธี Macrobroth (tube) dilution method ผลพบว่า สารสกัดที่เตรียมได้นี้สามารถฆ่าทำลายเชื้อที่นำมาทดสอบได้ทั้ง 100 ตัวอย่าง และให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าทำลายเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration: MBC) อยู่ระหว่าง 1.25-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

8. ผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimal bactericidal concentration: MBC) ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว ด้วยวิธี Agar dilution technique

จากการศึกษาการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเชื้อ *S. epidermidis* พบค่า MBC ของ I_1, I_4 และ I_5 มีค่าเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 5 รูปที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบจากงานวิจัยของนุศวดี พจนานุกิจ และสมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม, 2553 ศึกษาการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acnes* และเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากเปลือกมังคุด ขมิ้นชันและใบบัวบก พืชทั้ง 3 ชนิดจะถูกนำไปสกัด และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด ขมิ้นชันและใบบัวบก สำหรับเชื้อ *P. acnes* มีค่าเท่ากับ 25, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับและเชื้อ *S. aureus* มีค่าเท่ากับ 12.5, 25 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อของสารสกัดจากพืชทั้ง 3ชนิดพบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดใช้ความเข้มข้นน้อยที่สุด 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการยับยั้งเชื้อทั้ง 2 ชนิด

ตารางที่ 5 แสดงค่า MBC ของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม และเปลือกมะนาวต่อเชื้อ *S.epidermidis* I_1, I_4 และ I_5 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกทับทิม (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความสามารถในการยับยั้งการเจริญ (+/-) *S. epidermidis*			ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกมะนาว (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความสามารถในการยับยั้งการเจริญ (+/-) *S. epidermidis*		
	I_1	I_4	I_5		I_1	I_4	I_5
50	+	+	+	100	+	+	+
25	+	+	+				
12.5	+	+	+				
6.25	–	–	–				
Negative control	–	–	–	Negative control	–	–	–
Positive control	+	+	+	Positive control	+	+	+

หมายเหตุ: + มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง (ใส) , - ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง (ขุ่น)
Negative control = เชื้อ + อาหารเลี้ยงเชื้อ, Positive control = Ampicilin 2.5 mg/ml +อาหารเลี้ยงเชื้อ+เชื้อ

รูปที่ 4 ผล MBC ของสารสกัดหยาบจากเปลือกทับทิม ต่อเชื้อ *S. epidermidis*ของ I_1, I_4 และ I_5 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร A=Positive control , B=50 mg/ml, C=25 mg/ml , D=12.5 mg/ml , E=6.25 mg/ml , F=Negative control ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

รูปที่ 5 ผล MBC ของสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว ต่อเชื้อ *S. epidermidis* ของ I_1, I_4 และ I_5 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร A=Positive control , B=100 mg/ml , C= Negative control ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรทั้งสองชนิดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสมุนไพรสามารถแยกตัวทำละลายออกจากสารสกัดได้ง่าย

การเตรียมสารสกัดพืชเพื่อใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบันทึกน้ำหนักพืชตัวอย่างชนิดแห้งเปรียบเทียบกับน้ำหนักสารสกัดที่สกัดได้หน่วยเป็นกรัมแล้วนำมาคำนวณร้อยละของปริมาณสารสกัด (% yield) ของพืชตัวอย่างแต่ละชนิดให้ค่าร้อยละปริมาณสารสกัดได้สูงกว่าซึ่งอยู่ในช่วง 7.42-18.37 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรทั้งสองชนิดต่อการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* พบว่าสารสกัดทับทิมมีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต ซึ่งสามารถยับยั้งได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดย I_1มีค่าเท่ากับ 20.87±1.57 I_4 มีค่าเท่ากับ 19.53±1.15 และ I_5 มีค่าเท่ากับ 22.80±0.52 ตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดมะนาวมีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร I_1 มีค่าเท่ากับ 12.77±0.57 I_4 มีค่าเท่ากับ 11.87±0.58 และ I_5 มีค่าเท่ากับ 14.77±0.58 ตามลำดับ

สำหรับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดทับทิมที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าค่า MIC ของ I_1, I_4 และ I_5 มีค่า MIC อยู่ในช่วง 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรรองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดมะนาวที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าค่า MIC ของ I_1, I_4 และ I_5 มีค่า MIC อยู่ในช่วง 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้ของสารสกัดทับทิมที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 mg/ml ต่อเชื้อ *S. epidermidis* พบค่า MBC ของ I_1, I_4 และ I_5 มีค่าเท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 mg/ml ต่อเชื้อ *S. epidermidis* พบค่า MBC ของ I_1, I_4 และ I_5 มีค่าเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาต่อยอดในเรื่องของสารสกัดสมุนไพรว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้หรือไม่
2. ควรทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อก่อโรคตัวอื่น ๆ

เอกสารอ้างอิง

กฤติภูมิ ภู่กิตติวรางกูร และปุษยา มูสิกะปาละ (2556). **ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากต้นบัวบก และไพร ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อเกิดสิว *Staphylococcus epidermidis***, สาขาชีววิทยา. กรุงเทพมหานคร.

กัลยา เจือจันทร์และคณะ (2545). **ผลของสารสกัดเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ที่แยกได้จากไก่**. วิทยาศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เกศรินทร์ รามณี (2552). **การยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซิลของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* โดยใช้สารสกัดจากพืชตระกูลส้ม**, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จันจิรา อินตราและอนุสรา รอดรักษา (2542). **การพัฒนาแชมพูสมุนไพรขจัดรังแค.** กลุ่มที่ 7 ภาควิชาเภสัชกรรม.

จิราภร บุราคร และเรือนแก้ว ประพฤติ (2555). **วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก.** ปีที่ 10 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน 2555.

ชัยเดช อินทร์ชัยศรและคณะ(2548). **ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดของสมุนไพรบางชนิด *Staphylococcus aureus* ที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบในโคนม.** การประชุมวิชาการคณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ครั้งที่ 4 ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทย์ศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล และคณะ (2548). **องค์ประกอบทางเคมีบางประการของน้ำมันกระชายและฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช**. ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 สาขาพืช 1-4 กุมภาพันธ์ 2548. กรุงเทพฯ. น. 697-704.

ทิพย์มนต์ ภัทราคร และภควดี สุทธิไวยกิว (2539). **การวิเคราะห์สารที่ให้ความหอมในเมล็ดข้าวหอม**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนา.

ธีระ ปานทิพย์อำพร (2551). **จุลินทรีย์ในร่างกาย**. บทความวิทยุกระจายเสียงรายการวันนี้กับวิทยาศาสตร์. ครั้งที่ 7 โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพกรมวิทยาศาสตร์บริการ.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณ (2553). **จุลชีววิทยาทั่วไป สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์.** กรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 4.

นันทนา อรุณฤกษ์ (2537). **การจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์**. วท.ม. (จุลชีววิทยา) ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ พิมพ์ครั้งที่ 1.

นิธิ ตั้งสิริทรัพย์. **การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกกล้วยดิบต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อสิวและการติดเชื้อผิวหนังที่พบได้บ่อย**. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จิตวิทยา). มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ , 2555.

นิศารัตน์ บุญภักดี และอังศนา เนตรปฏิภาณ (2555). **การพัฒนาแผ่นแปะรักษาสิวจากสารสกัดมังคุด**. กลุ่มที่44 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

นุศวดี พจนานุกิจ และสมใจขจรชีพพันธุ์งาม (2553). **เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุดขมิ้นชันและใบบัวบก**, ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ (2551). **การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ.** คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พรพนา นาคสิงค์ (2550). **ผลการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดเอทานอลจากเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก.** สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พินิจ กล่ำคลองตัน (2553). **การแพร่กระจายของเชื้อ *Pseudomonus aeruginosa* ในสถานพยาบาล** : กรณีศึกษาโรงพยาบาลนภาลัย จังหวัดสมุทรสงคราม. ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยศิปกร.

ยุวดี จอมพิทักษ์ (2544). **ปลูกสมุนไพรใช้เอง.** สำนักพิมพ์ประพันธ์สาสินจำกัด. กรุงเทพฯ.

วรยุทธ ยอดบุญ และคณะ (ม.ป.ป). **ผลของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร.**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

ศิริวรรณ แก้วเพ็ชร์ และคณะ (2553). **การศึกษาสารสกัดจากพืชในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของเนื้อสัตว์.** มหาวทยาลัยราชมงคลธัญบุรี.

สุคนธ์ ตันติไพบูลย์วุฒิ และคณะ (2012). **ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลไม้บางชนิด.**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

สมศักดิ์ วรรณศิริ (2541). **สวนมะนาว.**พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพฯ : งานเกษตรกรรม.

อุดมลักษณ์สุขอัตตะ และคณะ (2549). **การสกัดและการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด**. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 สาขาวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรรัตน์ สีสุกอง และคณะ (2550). **การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากวัชพืชท้องถิ่นในจังหวัดนนทบุรี**.โปรแกรมวิชาชีววิทยา และชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต.

อุมาพร ทาไธสง และสิทธิเดช แสงนวล (2011). **ฤทธิ์ร่วมกันของสารแอลฟาแมงโกสตินกับยาเจนตามัยซินในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลลินที่แยกได้จากโรงพยาบาลพระนารายมหาราช.** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เอมอร คารเสนี (2554). **การเกิดกลิ่นตัว.** บทความวิทยุกระจายเสียงรายการ

รังสรรค์ ชุณหวรากรรม (http :// www.bs.ac.th/rangsan/ a bout – auther.html)

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

1.สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Nutrient Agar (NA)

Nutrient broth	8	กรัม
Agar	14	กรัม
น้ำกลั่น	1000	กรัม

วิธีการเตรียม

ละลาย Nutrient brothลงในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้วให้สารอาหารละลายปรับ pH ด้วย 0.1 NaOHหรือ 0.1 N HClจนได้ประมาณ 6.8 -7 ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรนำไปผสมวุ้นต้มจนละลาย เทอาหารใส่ขวดปริมาณขวดละ 200 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี ปิดทับด้วยกระดาษอีกครั้ง นำไปนึ่งในหม้อความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 20 นาที

1.2 Mineral Salts Agar (MSA)

Ammonium sulphate	1.0	กรัม
Sodium hydrogen phosphate heptahydrate	8.2	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	2.7	กรัม
Megnesiumsulphateheptahydrate	0.1	กรัม
Calcium nitrate	0.5	กรัม
Ferrous sulphateheptahydrate	0.25	กรัม
Yeast extract	0.05	กรัม
Agar	20.0	กรัม

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ต้มจนเดือด นำใส่ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งไว้ข้างนอกให้พออุ่น กระทั่งอุณหภูมิลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเทลงในจานอาหารปลอดเชื้อจานละ 20 มิลลิลิตร

1.3 Tryptic Soy Agar (TSA)

Tryptoneหรือ trypticase	17.0	กรัม
Soya peptone หรือ phytone	3.0	กรัม
K_2HPO_4	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
	pH	7.3

วิธีการเตรียม

ต้มส่วนผสมข้างบนเพื่อละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอจากนั้นนำออกมาตั้งไว้ข้างนอกให้พออุ่นกระทั่งอุณหภูมิลดลงประมาณ 50องศาเซลเซียสจึงเทลงในจานอาหารปลอดเชื้อจานละ 20 มิลลิลิตร

1.4 Tryptic SoyBroth (TSB)

Pancreatic Digest of Casein	15	กรัม
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
	pH	7.3±0.2

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ต้มจนเดือด นำใส่ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งไว้ข้างนอกให้พออุ่น กระทั่งอุณหภูมิลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเทลงในจานอาหารปลอดเชื้อจานละ 20 มิลลิลิตร

1.5 Mueller Hinton Agar (MHA)

Beef extract power	2	กรัม
Acid Digest of Casein	17.5	กรัม
Soluble starch	1.5	กรัม
Agar	15	กรัม

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

Distilled water	1000	มิลลิลิตร
	pH	7.3±0.1

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ต้มจนเดือด นำใส่ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ เข้าหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งไว้ข้างนอกให้พออุ่น กระทั่งอุณหภูมิลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเทลงในจานอาหารปลอดเชื้อจานละ 20 มิลลิลิตร

2. อาหารทดสอบชีวเคมี

2.1 Simmon citrate agar

Sodium chloride	5.0	กรัม
Magnesium sulphate	0.2	กรัม
Ammonium dihydrogen phosphate	1.0	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2 HPO_4)	1.0	กรัม
Sodium citrate	2.0	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
Agar	15.0	กรัม

วิธีการเตรียม

ต้มส่วนผสมข้างบนเพื่อละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121องศาเซลเซียสเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอดันไอ

2.2 Christensen's Urea agar

Basal medium ประกอบด้วย		
Bacto peptone	1.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
D-glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Phenol red, 0.2% solution	6.0	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ปรับ pH ให้มีค่าประมาณ 6.8 - 7.0 แล้วจึงนำbasal medium แบ่งใส่หลอดๆ ละ 4.5มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเวลา 15 นาทีจากนั้นเมื่ออาหารเย็นลงเติม 20% urea solution ที่ผ่านการกรองให้ปราศจากเชื้อลงไป 0.5มิลลิลิตรโดยปรับให้มีค่าความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2% glucose เขย่าให้เข้ากันแล้วเอียงให้เป็น slan

ภาคผนวก ข
สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

1. ชุดย้อมสีแกรม (Gram stain solution)

1.1 Crystal violet stain

สารละลาย A

Crystal violet (85 เปอร์เซ็นต์ dye)	2.0	กรัม
Ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์	20.0	กรัม

ละลายสีในแอลกอฮอล์จนสีละลายหมด

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และสารละลาย B ถ้ามีตะกอนกรองก่อนใช้และถ้ามีสีเข้มเกินไป อาจเจือจางสารละลาย A เป็น 1:10 ก่อนผสมกับสารละลาย B

1.2 Safranin O counterstain (stock solution)

Safranin O	2.5	กรัม
Ethyl alcohol	100.0	มิลลิลิตร

ถ้าจะใช้สีย้อมให้เจือจางเป็น 1:10 (stock safranin O 10 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร) ถ้ามีตะกอนกรองก่อนใช้ทุกครั้ง

1.3 Gram iodine solution

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Iodine และ Potassium iodideในน้ำกลั่นปริมาณน้อย ๆ ก่อนแล้วเติมน้ำให้ครบแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา (กัญจนา ธีระกุล และคณะ, 2547)

1.4 Alcohol-acetone (decolorizer)

Ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์	250.0	มิลลิลิตร
Acetone	250.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
วิธีที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยการสังเกตรูปร่างของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการย้อมสีเพื่อดูรูปร่างขนาด การจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียการติดสีแกรม

1. การย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain)

1.1 ทำความสะอาดสไลด์ เช็ดให้แห้ง

1.2 เกลี่ยเชื้อบนสไลด์ที่เตรียมไว้ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง (air dry) และตรึงด้วยเซลล์ด้วยความร้อน (heat fixed)

1.3 หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที

1.4 ล้างสีออกด้วยน้ำสะอาดแล้วหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยเกลี่ยทิ้งไว้1 นาที

1.5 เทสารละลายไอโอดีนออก ชะด้วย decolorize (สารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ 95% หรือเอธิลแอลกอฮอล์อะซีโตน) เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำสะอาดทันที และซับด้วยกระดาษซับ

1.6 ย้อมทับด้วยการหยดสี safranin O ให้ท่วมรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที

1.7 ล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วซับด้วยกระดาษทิชชู วางทิ้งไว้ให้แห้ง

1.8 ตรวจดูดด้วยกล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก ง
การทดสอบทางชีวเคมี

1. Catalase test

1.1 เขี่ยเชื้อลงอาหาร Nutrient agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 18-24 ชั่วโมง

1.3 หยด H_2O_2 6 เปอร์เซ็นต์บนแผ่นสไลด์ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแล้วนำมาจุ่มใน H_2O_2 6% ที่หยดทิ้งไว้ ถ้าเกิดฟองอากาศแสดงว่าแบคทีเรียสร้างเอนไซม์แคทาเลส อ่านผล positive ถ้าไม่เกิด negative

2. Oxidase test

2.1 วางกระดาษกรองที่อิ่มด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์ tetramethy-phenylenediamine HClลงในจานเชื้อ

2.2 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีออกมาทดสอบ โดยลากโคโลนีไปมาบนกระดาษ ถ้าเกิดสีม่วงภายใน 10 วินาที อ่านผล positive หรืออาจจะทดสอบโดยหยดน้ำยาทดสอบลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนี ถ้ามีออกซิเดส จะมีสีชมพูแล้วก็เป็นสีม่วง

3. Citrate Utillzation

Simmon citrate agar	2.00	กรัม
Sodium citrate	5.00	กรัม
NaCl	0.20	กรัม
$MgSO_4$	1.00	กรัม
$NH_4H_2PO_4$	1.00	กรัม
Bromothylmol blue	0.08	กรัม
Agar	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1.00	กรัม

3.1 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแล้ว streak เชื้อบนอาหาร Simmon citrate agar

3.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง บ่มได้นานถึง 7 วัน

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

3.3 ตรวจสอบสีของอาหาร ถ้าเชื้อมีการใช้ซิเตรท อาหารจะมีสีน้ำเงิน อ่านผล positive แต่ถ้าเชื้อไม่มีการใช้ซิเตรท อาหารจะมีสีเขียวเหมือนเดิม และจะไม่เห็นการเจริญของเชื้อบนอาหารอ่านผล negative

4. Motile Indole lysine semi-solid medium Reaction (MIL)

4.1 เตรียมอาหาร MIL ใส่หลอดแก้ว

4.2 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลมเขี่ยเชื้อแทงลงในอาหารตรง ๆ

4.3 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 18-24 ชั่วโมง

อ่านผล

4.3.1 M : Motility test ดูการเคลื่อนที่ของเชื้อ โดยการดูการเคลื่อนที่จากรอย stab ถ้ามีการเคลื่อนที่จะพบว่าอาหารขุ่นทั้งหมด อ่านผล positive ถ้าเชื้อเฉพาะรอย stab อ่านผลnegative

4.3.2 I : Indole ดูปฏิกิริยาการเกิด Indoleโดยการหยด Kovac's reagent ลงไปถ้าเกิดวงแหวนสีชมพูแดง อ่านผล positive ถ้าไม่เกิด อ่านผล negative

4.3.3 L : Lysine decarboxylation ดูปฏิกิริยาการเกิด Lysine decarboxylation ถ้าอาหารเลี่ยนสีเหลือง อ่านผล negative : ถ้าไม่เกิดปฏิกิริยา Lysine decarboxylation อาหารไม่เปลี่ยนแปลงอ่านผล positive

5. Methyl Red Test

5.1 เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหาร MR – VP broth

5.2 บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 24 ชั่วโมง

5.3 แบ่งอาหารที่บ่ม แล้วลงในหลอดทดลอง

5.4 เติม Methyl Red reagent ลงในอาหารเหลว ในหลอดเล็กที่แบ่งมา

5.5 หากพบว่าได้ผลลบให้บ่มอาหาร ที่ยังไม่ได้เติม Methyl Red reagent ต่อไปอีก 4 ชั่วโมง แล้วทดสอบในข้อ 5.3 และ 5.4 ใหม่

การอ่านผล

Positive : methyl red เปลี่ยนเป็นสีแดง

Negative : methyl red ไม่เปลี่ยนสีโดยยังคงมีสีเช่นเดิม

6. Voges-Prokauer test

6.1 Inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน MR – VP medium

6.2 Inoculate ที่ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 18-24 ชั่วโมง

6.3 แบ่งอาหารเหลว ที่ incubate แล้วลงในหลอดขนาดเล็ก

6.4 หยอด alpha-naphthol solution 5 เปอร์เซ็นต์ (0.6 มิลลิลิตร ต่อ broth Culture 2.5 มิลลิลิตร) และ 40 เปอร์เซ็นต์ sodium hydroxide solution (0.2 มิลลิลิตร ต่อ broth culture 2.5 มิลลิลิตร) ลงไป

6.5 เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันและเพื่อให้ออกซิเจนเข้าร่วมในปฏิกิริยา ตั้งทิ้งไว้ 10-15 นาทีก่อนอ่านผล

6.6 หากพบว่าได้ผลลบให้บ่มอาหารที่ยังไม่ได้หยด VP-reagents ต่อไปอีก 48 ชั่วโมง แล้วทดสอบซ้ำจากข้อ 6.3-6.5

การอ่านผล

Positive :อาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดงภายใน10-15 นาที หลังจากเติม VP-reagents ส่วนมากจะเกิดสีชมพูแดงภายใน 3-5 นาที

Negative :ไม่มีสีชมพูหรือแดงเกิดขึ้น

7. การทดสอบการเจริญใน NaCl 10 เปอร์เซ็นต์

7.1 ใช้ห่วงถ่ายเชื้อลนไฟแตะโคโลนีของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบใส่ในอาหาร NaCl10 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

8. Urease test

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอ็นไซม์ยูรีเอส ซึ่งจะทำให้ยูเรียแตกตัวเป็นแอมโมเนีย น้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยแอมโมเนียที่เกิดขึ้นในอาหาร เป็นตัวการที่ทำให้อาหารมีความเป็นเบสเพิ่มมากขึ้น จนกระทั่งทำให้ phenol red ที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์เปลี่ยนสี และถ้าหาก pH มีค่าอยู่ระหว่าง 6.90 - 8.50 จะปรากฏสีบานเย็นขึ้นบนผิวหน้าของอาหาร แสดงว่าเป็นผลบวกสำหรับการตรวจสอบผลควรทำทุกวัน เนื่องจากแบคทีเรียบางชนิดอาทิProteus จะให้ผลบวกอย่างรวดเร็วภายในเวลา 2 - 4 ชั่วโมงและถ้าหากผลบวกเกิดขึ้นภายหลัง 24 ชั่วโมงอาจเป็น *Klebsiella* หรือ *Enterobacter* ดังนั้น ระยะเวลาในการเกิดผลจึงเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่มีส่วนช่วยในการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียด้วย

ภาคผนวก จ

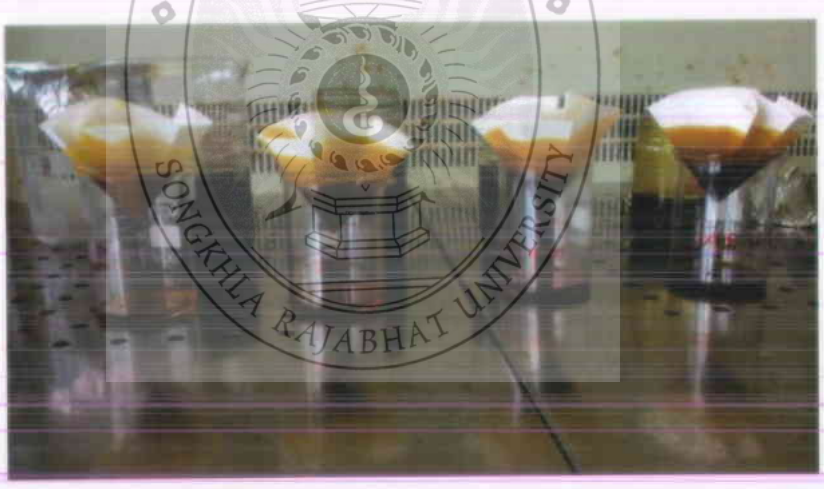
ภาพประกอบในการทำการศึกษาวิจัย

ภาพที่ จ-1 หั่นเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิมเป็นชิ้นบางๆแล้วไปตากแดดให้แห้งให้สนิท

ภาพที่ จ-2 เปลือกมะนาวและเปลือกทับทิมที่ผ่านการตากแดดจนแห้งแล้ว นำมาบด และปั่นให้เป็นผงละเอียด

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาพที่ จ-3 สกัดสารจากเปลือกมะนาว และเปลือกทับทิมด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน



ภาพที่ จ-3 กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whathman เบอร์ 4 โดยกรองเอาส่วนใส

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

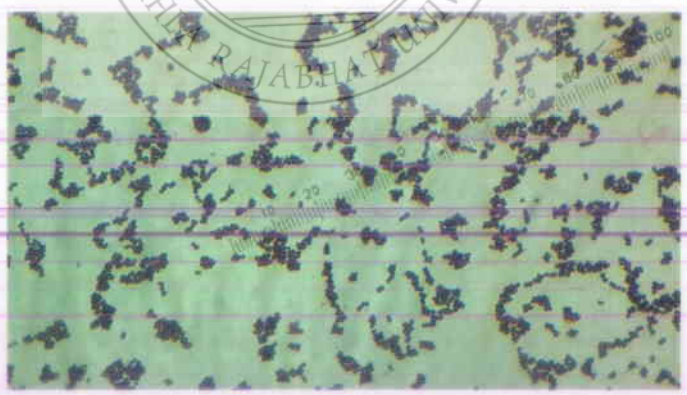
ภาพที่ จ-4 นำส่วนใสที่กรองได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส จนได้สารหนืด

ภาพที่ จ-5 ผลการทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดจากมะนาวทับทิมและยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *S. epidermidis*

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาพที่ จ-6 ผลการ Swab บริเวณผิวหนัง

ภาพที่ จ-7 ผลการStreak ลงบนอาหารอีกครั้ง



ภาพที่ จ-8 ผลการย้อมแกรม และแสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis*

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาพที่ จ-9 ผลการทดสอบBiochem testโดยทดสอบcitratetest

ภาพที่ จ-10 ผลการทดสอบBiochem testโดยทดสอบMil medium

ภาพที่ จ-11 ผลการทดสอบBiochem testโดยทดสอบUreatest

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาพที่ จ-12 ผลการทดสอบBiochem testโดยทดสอบMethyl red

ภาพที่ จ-13 ผลการทดสอบBiochem testโดยทดสอบVoges-Prokauer

ภาพที่ จ-14 ผลการทดสอบBiochem testโดยทดสอบCoagulase test

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ประวัติผู้ทำวิจัย

ชื่อผู้ทำวิจัย	นางสาวต่วนซาวีย๊ะ ยือแร
วันเดือนปีเกิด	4 มกราคม 2534
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	19/9 ม.7 ตำบลเขาตูม อำเภอยะรัง จังหวัดปัตตานี 94160
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2545 ชั้นประถมศึกษาโรงเรียนบ้านเขาตูม พ.ศ. 2548 ชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นโรงเรียนสตรีอิสลามวิทยามูลนิธิ พ.ศ. 2551 ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนธรรมวิทยามูลนิธิ พ.ศ. 2554 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ แขนงจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ประวัติผู้ทำวิจัย

ชื่อผู้ทำวิจัย	นางสาวนูรีดา โตะหิ
วันเดือนปีเกิด	23 พฤศจิกายน 2533
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	21/4 ม.1 ตำบลดุซงญอ อำเภอจะแนะ จังหวัดนราธิวาส 96220
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2545 ชั้นประถมศึกษาโรงเรียนบ้านดุซงญอ พ.ศ. 2548 ชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นโรงเรียนดารุสสาลาม พ.ศ. 2551 ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนดารุสสาลาม พ.ศ. 2554 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ แขนงจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY