การตรวจหาฤทธิ์ยับยั้ง *Escherichia coli* ของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชที่พบบริเวณหมู่เกาะแสมสาร

(Screening for Anti-*Escherichia coli* Activity of the Ethanol Extracts of Plants from Samaesarn Island)

วิญญู ภักดี

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มีนาคม 2543

ลิขสิทธิ์เป็นของภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิต และคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาได้พิจารณาปัญหาพิเศษฉบับนี้แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต วิชาเอกจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธาน
(อาจารย์กาญจนา หริ่มเพ็ง)

คณะกรรมการผู้สอบ

..... ประธาน
(อาจารย์กาญจนา หริ่มเพ็ง)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สุดารัตน์ สวนจิตร)

..... กรรมการ
(อาจารย์ศิริพร เอื้ออังกูร)

ภาควิชาจุลชีววิทยาอนุมัติให้รับปัญหาพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อภิรดี ปิลันธนภาคย์)

วันที่ เดือน มีนาคม พ.ศ. 2543

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประกาศคุณูปการ

การทำปัญหาพิเศษทางจุลชีววิทยาฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ต้องขอขอบพระคุณ อาจารย์กาญจนา หริ่มเพ็ง อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้กรุณาแนะแนวทางในการศึกษาค้นคว้า ตรวจแก้ไข ข้อบกพร่องและสนับสนุนในด้านต่างๆ ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. สุดารัตน์ สวนจิตร และ อาจารย์ศิริพร เอื้ออังกูร ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบ และให้ความรู้เพิ่มเติม

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช สวนจิตรลดา ในพระราชดำริสมเด็จพระเทพ รัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี ที่อนุญาตให้เก็บตัวอย่างพืชบนเกาะแสมสาร

ขอขอบคุณหน่วยสงครามพิเศษทางเรือ (นสร) กองทัพเรือ ที่อำนวยความสะดวกและ ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างพืชบนเกาะแสมสาร

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์สมสุข มัจฉาชีพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้ช่วยเหลือในการเก็บพืชชนิดต่างๆ จากเกาะแสมสาร

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. ประภาพรรณ เตชะเสาวภาคย์ และอาจารย์เอกรัฐ ศรีสุข ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้ทำการสกัดส่วนสกัดต่างๆ ให้

ขอขอบคุณอาจารย์อัมพา มานพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่เอื้อเฟื้อข้อมูลพืชในการทำรูปเล่ม

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทางด้าน อุปกรณ์และสารเคมีในการทำปฏิบัติการ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ของโรงพยาบาลสมเด็จฯ ณ ศรีราชา จังหวัดชลบุรี ที่ได้เอื้อเฟื้อเชื้อแบคทีเรียในการทำปฏิบัติการ ขอขอบคุณภาควิชาเคมีที่ได้ทำการสกัดสารจากพืชทั้งหมดในการทำปฏิบัติการในครั้งนี้ และขอขอบคุณเพื่อนๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือเป็นกำลังใจในการทำปฏิบัติการและทำรูปเล่ม

ความดีของปัญหาพิเศษทางจุลชีววิทยาฉบับนี้ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ ซึ่งได้ให้กำลังใจ และสนับสนุนการศึกษาตลอดมา รวมถึงคุณครู อาจารย์ ที่ได้ให้คำสั่งสอนทุกท่าน

วิญญู ภักดี

มีนาคม 2543

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Title	**Screening for Anti-*Escherichia coli* Activity of the Ethanol Extracts of Plants from Samaesarn Island**
Name	**Mr. Winyou Pakdee**
Department	**Microbiology**
Academic Year	**1999**

Abstract

The anti-*E. coli* activity of 28 plant ethanol extracts, from sticks and leaves of 14 plants in Samaesarn island, were investigated by disc diffusion method. The antibacterial activity of all extracts, at the concentration of $\leq$ 2000 μg/disc, were not demonstrated. Only two extracts, from sticks and leaves of *Diospyros filipendula* Pierre ex Lec, showed the bacteriostatic and bactericidal activity against *E. coli* ATCC 25922. The minimum inhibition concentrations of the extracts from *Diospyros filipendula* Pierre ex Lec's sticks and leaves against *E. coli* ATCC 25922 were 5600 and 4800 μg/ml, respectively. The minimum bactericidal concentrations of them were 6400 and 5600 μg/ml, respectively. Subsequently, the antibacterial activity of both extracts were tested against 20 clinical isolated *E. coli*. It was found that the anti-*E. coli* activity of the sticks extract was inferior to the leaf extract. The former could inhibit 13 isolated of the *E. coli* while the latter could inhibit 18 isolated of the microorganisms.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง.....ข

สารบัญภาพ.....ค

สารบัญกราฟ.....ง

บทที่ 1. บทนำ

บทนำ.....1

วัตถุประสงค์.....2

ขอบเขตการศึกษา.....2

สมมติฐานของการศึกษา.....3

ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....3

สถานที่ทดลอง.....3

บทที่ 2. เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับพืชที่นำมาศึกษา.....4

2. รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ.....10

3. รายละเอียดเกี่ยวกับการทดสอบความไว.....16

4. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....18

บทที่ 3. วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์.....21

วิธีดำเนินการทดลอง.....22

บทที่ 4. ผลการทดลอง.....27

บทที่ 5. สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดสอบ.....47

อภิปรายผลการทดสอบ.....47

ข้อผิดพลาดในการทดลอง.....50

ข้อเสนอแนะ.....50

เอกสารอ้างอิง.....51

ภาคผนวก.....53

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. ลักษณะทางชีวเคมีของ *E. coli*.....11
2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ของส่วนสกัดเอทานอลจากพืช 14 ชนิดจากส่วนใบและกิ่ง โดยวิธี disc diffusion.....27
3. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชชนิดต่างๆ โดยวิธี broth dilution.....33
4. ผลการทดสอบหาค่า MBC ต่อ *E. coli* ของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชชนิดต่างๆ โดยวิธี drop plate.....37
5. ผลการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดง โดยวิธี broth dilution.....41
6. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ของส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดง โดยวิธี agar dilution.....42

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1. ลำบิดดง (*Diospyros filipendula* Pierre ex Lec).....54
2. การทดสอบความไวของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อส่วนสกัดเอทานอลจากใบ
ของลำบิดดง (PTL 1002) โดยวิธี disc diffusion.....55
3. การทดสอบความไวของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อส่วนสกัดเอทานอลจากกิ่ง
ของลำบิดดง (PTS 1002) โดยวิธี broth dilution.....55
4. การ drop plate เพื่อหาค่า MIC ของส่วนสกัดเอทานอลจากกิ่งของลำบิดดง (PTS 1002).....56
5. การทดสอบความไวเพิ่มเติมของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อส่วนสกัดเอทานอล
จากกิ่งของลำบิดดง (PTS 1002) โดยวิธี broth dilution.....56
6. การทดสอบความไวของ *E. coli* ATCC 25922 และ *E. coli* จากสิ่งส่งตรวจ
ของผู้ป่วยต่อส่วนสกัดเอทานอลจากใบของลำบิดดง (PTL 1002) โดยวิธี agar dilution.....57

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญกราฟ

กราฟที่ **หน้า**

1. ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone ของ ceftazidime disc เมื่อทดสอบกับ *E.coli* ATCC 25922 ในแต่ละชุดการทดลอง..... 46

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 1
บทนำ

Escherichia coli เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งที่มีการศึกษากันมาก ทั้งทางด้านพันธุศาสตร์ แพทย์ศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ *E. coli* เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่เมื่อใดที่ *E. coli* มีการปนเปื้อนไปสู่อวัยวะส่วนอื่นก็อาจทำให้เกิดโรคติดเชื้อได้ เช่น ในผู้ป่วยที่รักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาลและต้องใส่สายสวนปัสสาวะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ *E. coli* เข้าไปยังระบบทางเดินปัสสาวะได้และก่อให้เกิดอาการกระเพาะปัสสาวะอักเสบ (cystitis) กรวยไตอักเสบ (pyelitis) หรือไตอักเสบ (pyelonephritis) มีรายงานว่า *E. coli* เป็นสาเหตุสำคัญอันดับหนึ่งของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ นอกจากนี้ *E. coli* สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในบาดแผลไฟไหม้-น้ำร้อนลวกและแผลผ่าตัด ทำให้เกิดท่อน้ำดีอักเสบเฉียบพลัน (acute cholangitis) ถุงน้ำดีอักเสบเฉียบพลัน (acute cholecystitis) ฝีในตับ เยื่อบุช่องท้องอักเสบ การอักเสบในโพรงมดลูก การติดเชื้อหลังการผ่าตัดหรือการติดเชื้อในกระแสเลือดอาจทำให้เกิดปอดบวม และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ การสูดสำลักซึ่งจะพบบ่อยในเด็กเล็ก (โสภณ และคณะ, 2524) หรือแม้แต่ในระบบทางเดินอาหารเองก็ยังมี *E. coli* บางสายพันธุ์ เช่น Enteropathogenic *E.coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC), Enteroinvasive *E.coli* (EIEC) และ Enterohaemorrhagic *E.coli* (EHEC) ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารได้ (นันทนา, 2537) และในกรณีที่คนไข้มีการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่ถูกต้อง จะมีผลทำให้มีประชากรของ *E. coli* สายพันธุ์ที่ดื้อยาเพิ่มจำนวนมากขึ้น ซึ่งคุณสมบัติการดื้อยานี้อาจถ่ายทอดไปสู่เชื้อชนิดอื่นๆ ที่ผ่านเข้ามาในลำไส้ได้ โดยเชื้อเหล่านี้จะได้รับยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะจาก *E. coli* โดยวิธี conjugation เช่น *E. coli* ที่มียีนดื้อต่อ streptomycin และ chloramphenicol เมื่อมีการ conjugation กับ *Shigella dysenteriae* ที่ไม่มียีนดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั้งสอง โดยมีการถ่ายทอด R-factor จาก *E.coli* ไปสู่ *S. dysenteriae* เป็นผลให้แบคทีเรียนี้ดื้อต่อยาดังกล่าว ได้เช่นเดียวกับ *E. coli* เป็นต้น (บัญญัติ, 2525) ทำให้เกิดปัญหาเรื่องการใช้ยาปฏิชีวนะในการบำบัดรักษาที่ไม่มีประสิทธิภาพซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางการแพทย์และสาธารณสุข ดังนั้นจึงมีผู้สนใจศึกษาค้นคว้าหาสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อโรคและสายพันธุ์ที่ดื้อยาจากพืช โดยมีรายงานว่าสารสกัดจากพืชบางชนิด เช่น *Garcinia kola* สกัดด้วยเอทานอล *Cephalaria transsylvanica* สกัดด้วยเมทานอล *Psidium guajava* และ *Garcinia mangostana* สกัดด้วยน้ำ มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ได้ เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวไปทำการวิเคราะห์ทางเคมี พบว่าเป็นสารในกลุ่ม hydroxybiflavanonal, triterpenoid glycosides และ tannin ตามลำดับ (Madubunyi, 1995., Kimizigul, Anil, Ucar and Akdemir, 1996., จริยา และคณะ, 2532) สำหรับสารสกัดด้วยเมทานอลจากพืช *Celastrus monospermpides* Loes., *Maytenus obscura*

(A. Rich). Cufod. และ *Terminalia archbodiana* Exell. และสารสกัดด้วย Petroleum ether จากพืช *Capparis spinosa, Suaeda vermiculata, Prosopis farcta* และ *Salsola villosa* ก็มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ได้เช่นกันแต่ยังไม่ทราบคุณสมบัติทางเคมีของสารออกฤทธิ์ (Rao, 1996., Mahasneh, Abbas, and El-Oglas, 1996.) นับแต่อดีตจะเห็นได้ว่าสารต้านจุลชีพจากพืชมีบทบาทในการรักษาโรคติดเชื้อต่างๆ ในรูปแบบของสมุนไพรพื้นบ้านซึ่งมีมานานและมากมายหลายชนิดคาดว่าอนาคตสารต้านจุลชีพชนิดใหม่จากพืชจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้ป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อจากจุลินทรีย์ เพื่อทดแทนสารปฏิชีวนะซึ่งปัจจุบันจุลินทรีย์มีอัตราการดื้อเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการตรวจหาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยสารสกัดจากพืชจึงเป็นขั้นตอนพื้นฐานที่สำคัญ เพื่อนำความรู้และข้อมูลที่ได้ไปศึกษาและประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดทางการแพทย์ในอนาคตต่อไป

ในการศึกษานี้ได้นำส่วนสกัดเอทานอลจากพืชที่พบบริเวณหมู่เกาะแสมสารจำนวน 14 ชนิด จาก 5 วงศ์ได้แก่ Ebenaceae, Melastomataceae, Capparaceae, Guttiferae และ Rutaceae โดยสกัดสารจากทั้งใบและกิ่งรวม 28 ตัวอย่าง มาทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 โดยวิธี disc diffusion และ broth dilution เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibition Concentration ; MIC) ของ *E. coli* ATCC 25922 และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ฆ่า (Minimum Bactericidal Concentration ; MBC) *E. coli* ATCC 25922 จากนั้นนำส่วนสกัดเอทานอลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีที่สุดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรงพยาบาลสมเด็จฯ ณ ศรีราชา โดยวิธี agar dilution เพื่อหาค่า MIC ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจหาฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชบนเกาะแสมสาร
2. เพื่อคัดเลือกชนิดของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ดีที่สุด
3. เพื่อศึกษาความไวของ *E. coli* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยต่อส่วนสกัดเอทานอลจากพืชที่คัดเลือกได้

ขอบเขตการศึกษา

นำส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของพืช 14 ชนิด รวม 28 ตัวอย่าง จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา มาทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 โดยวิธี disc diffusion คัดเลือกชนิดของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ดีที่สุด โดยวิธี broth dilution และศึกษาความไวได้ของ *E. coli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 20 ไอโซเลท ต่อส่วนสกัดเอทานอลจากพืชที่คัดเลือก โดยวิธี agar dilution

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาแบ่งได้เป็น 4 ตอน คือ

1. รายละเอียดเกี่ยวกับพืชที่นำมาศึกษา
2. รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ
3. รายละเอียดเกี่ยวกับการทดสอบความไว
4. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับพืชที่นำมาศึกษา

1.1 นางดำ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Diospyros castanea* (Craib) Fletcher

ชื่อวงศ์ Ebenaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ต้นเล็กถึงขนาดกลาง ต้นเล็กมักคดงอแต่ต้นโตค่อนข้างตรง เปลือกแตกเป็นสะเก็ดสีเทาปนดำหรือค่อนข้างดำ เปลือกในสีน้ำตาล กระพี้สีน้ำตาลอ่อน แก่นสีน้ำตาลเข้ม ตามกิ่งอ่อนมีขนนุ่มทั่วไป ใบเป็นชนิดใบเดี่ยวเรียงสลับกัน รูปไข่ มน หรือป้อม ฐานใบ ป้าน ตรง หรืออาจเว้าเข้าเล็กน้อย ปลายใบมน ขอบแคบหรือบางทีก็หยักเป็นสองลอนกว้างๆ เนื้อใบค่อนข้างหนาและเกลี้ยงทั้งสองด้าน เส้นแขนงใบมี 6 - 10 คู่ ช่อดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่ต่างต้นกัน กลีบดอกและกลีบรองดอกมีอย่างละ 3 กลีบ ผล มนหรือกลม ผิวหนา แข็ง เกลี้ยงหรือมีขนนุ่มตอนใกล้ๆ โคนผล ปลายผลเป็นติ่งหนามแหลมสั้นๆ กลีบจุกมี 3 กลีบ

นิเวศน์วิทยา พบขึ้นตามป่าแดงหรือป่าเหล่า ที่สูงจากระดับน้ำทะเลระหว่าง 20 – 400 เมตร ตามภาคต่างๆ ของประเทศไทย เว้นภาคตะวันออกเฉียงใต้และภาคใต้ และมีแพร่พันธุ์เข้าไปในลาวและกัมพูชา

ประโยชน์ เนื้อไม้ ทำเสาเข็ม ทำด้ามเครื่องมือกสิกรรม ไม้ถือ ผล ใช้ย้อมเครื่องมือประมงและย้อมผ้า

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.2 <u>ลำบิดดง</u> (ก้านร่ม)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Diospyros filipendula* Pierre ex Lec

ชื่อวงศ์ Ebenaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ต้นขนาดเล็ก เปลือกนอกสีดำแตกเป็นสะเก็ดเล็กๆ ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ รูปขอบขนาน ไข่ มน เนื้อใบบาง มีขนนุ่มตามเส้นกลางใบทั้งสองด้าน ดอกเป็นดอกช่อ ตัวผู้ ตัวเมีย อยู่ต่างต้นกัน กลีบเลี้ยงโคนเชื่อมติดเป็นรูปถ้วยปากกว้าง กลีบดอกรูปแจกันทรงสูง ผลรูปร่างมน หรือกลม มีกลีบจุกผลที่มักแยกเป็นกลีบจากโคนจุก

1.3 <u>มะพลับใหญ่</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Diospyros malabarica* (Desv.) Kostel.var.*siamensis* (Hochr.) Phengkl

ชื่อวงศ์ Ebenaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง สูงได้ถึง 15 เมตร เปลือกต้นสีเทาเข้ม ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปวงรี แกมขอบขนาน กว้าง 2 - 10 เซนติเมตร ยาว 7 - 32 เซนติเมตร โคนใบและปลายใบมนถึงแหลม ผิวใบเกลี้ยง ก้านใบสั้น ดอกแยกเพศอยู่คนละต้น ดอกตัวผู้อยู่คนละต้น ดอกตัวผู้ออกเป็นช่อสั้นๆ ที่ซอกใบ ดอกย่อย 3 - 9 ดอก ดอกตัวเมียออกที่ซอกใบ ดอกย่อย 1 - 5 ดอก กลีบดอกสีเหลือง ผลสดรูปไข่ เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 - 7.5 เซนติเมตร เมื่อสุกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือส้ม มีกลีบเลี้ยงติดอยู่ เมล็ด 4 - 8 เมล็ด

สรรพคุณ

ราก	แก้ลงท้อง แก้ฝีเปื่อยพัง แก้บวม แก้ตัวพยาธิ แก้ตกโลหิต
เปลือกต้น	บำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้ท้องร่วง แก้โรคกามตายด้าน ขับผายลม
เนื้อไม้	บำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้ท้องร่วง ขับผายลม
ยาง	แก้บิด แก้ท้องร่วง แก้แผลน้ำกัดเท้า
ดอก	แก้ลงท้อง แก้ฝีเปื่อย แก้บวม แก้ตัวพยาธิ แก้ตกโลหิต
ผล	แก้ลงท้อง แก้ฝีเปื่อย แก้บวม แก้ตัวพยาธิ แก้ตกเลือด สมานแผล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.4 <u>มะเกือกา</u> (ไฟ, สล่างตัวผู้)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Diospyros rubra* Lec

ชื่อวงศ์ Ebenaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ต้นขนาดเล็ก ลำต้นมักคดงอ เปลือกดำปนเขียวและแตกเป็นร่องเล็กๆ ใบเดี่ยวออกเรียงสลับ รูปขอบขนานแกมรูปไข่และรูปหอก โคนใบขอบแคบหรือโค้งมน เนื้อใบค่อนข้างหนา หลังใบเกลี้ยง เส้นใบย่อยแบบขั้นบันได ดอกเป็นดอกช่อสั้นๆ ผลป้อม โต ผลแก่จัดมีสีแดง ปลายผลมักเป็นติ่ง หนามแหลมสั้น

1.5 <u>เม่าเหล็ก</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Diospyros toposia* Ham. var. *topoia* Ham

ชื่อวงศ์ Ebenaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ต้นขนาดกลาง สูงไม่เกิน 20 เมตร เปลือกสีดำอมเขียว ค่อนข้างเรียบ เปลือกในเหลืองอ่อน ส่วนกระพี้สีขาว ตามกิ่งอ่อนแรกๆ มีขนสากๆ ยอดอ่อนมีขนแน่น ใบรูปขอบขนานหรือขอบขนานแกมรูปหอก โคนใบทู่ มนหรือป้อม ปลายใบสอบเรียวแล้วหยักคอดเป็นติ่งทู่ๆ เนื้อใบหนาเป็นแผ่นหนังและเกลี้ยงเป็นมันทั้งสองด้าน ใบแห้งออกสีเหลืองอ่อน เส้นแขนงใบมี 12 – 16 คู่ เส้นใบย่อยแบบร่างละเอียด ช่อดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่ต่างต้นกัน ผลรูปไข่โตวัดผ่ากลางได้ 2 – 5 เซนติเมตร มีกลีบ 4 กลีบ ไม่ติดกัน

นิเวศวิทยา พบขึ้นตามป่าดิบชื้นทางภาคตะวันตกเฉียงใต้และภาคใต้ของไทย ที่สูงจากระดับน้ำทะเล 100 – 700 เมตร นอกจากนี้ยังแพร่พันธุ์อยู่ในอินเดีย ศรีลังกา เวียดนาม เขมรและมาเลเซีย

ประโยชน์ ผลใช้เบื่อปลา (Phengklai, 1978)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.6 **พลองใบรี** (เหมือดจี้ดง)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Memecylon plebejem* Kurz. var *ellipsoideum* Craib

ชื่อวงศ์ Melastomataceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ยืนต้น เกือบทุกส่วนค่อนข้างกลม ใบแตก 4 กิ่ง ใบย่อยแยกออกมา 4 ใบ รูปไข่หรือรูปหอก มีก้านใบสั้น ใบเด่นชัดเป็นรูปหัวใจถึงรูปปลายแหลม ก้านใบย่อยยาว มีช่อดอกแบบ umbel ก้านดอกสั้น ส่วนมากออกดอกเป็นรูประฆัง โค้งเล็กน้อยเป็น 4 หยัก เส้นกลางบาง

1.7 **พลองเล็กใบหนา** (พลองดำ, พลองเหมือด, เหมียด, เหมือดแอ)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Memecylon edule* Roxb.var. *orientale* Craib

ชื่อวงศ์ Melastomataceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ยืนต้น สูง 5 - 10 เมตร ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปวงรีแกมรูปไล่แกมขอบขนาน กว้าง 2 - 3 เซนติเมตร ยาว 3 - 5 เซนติเมตร ดอกช่อ ออกเป็นกระจุกที่ซอกใบ กลีบดอกสีม่วง ฐานรองดอกรูประฆัง ผลสด รูปทรงกลม

ยาพื้นบ้านใช้ ราก ผสมกับสมุนไพรอื่น ต้มน้ำดื่ม แก้ประดง (อาการโรคผิวหนัง เป็นเม็ดผื่นคล้ายผด คันมากมักมีไข้ร่วมด้วย) ต้น ผสมกับแก่นพลับพลา ต้นกำแพง 7 ชั้น ต้นสบู่ขาว แก่นขำปา แก่นโมกหลวง ต้มน้ำดื่ม แก้หืด ต้นและใบ ต้มน้ำดื่ม ครั้งละ 1 แก้ว วันละ 2 ครั้ง หลังอาหารเช้าเย็น ขับปัสสาวะขัด

1.8 **พลองใบใหญ่**

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Memecylon ovatum* J.E.Smith

ชื่อวงศ์ Melastomataceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ขนาดเล็กแตกกิ่งต่ำ เปลือกนอกตกสะเก็ด เป็นแผ่นบางๆ แตกเป็นร่องตามทางยาว ใบป้อมรูปไข่ ฐานค่อนข้างกว้างหรือเป็นรูปมนกว้าง ปลายใบแหลมเป็นติ่ง ขอบใบเรียบ แผ่นใบหนาคล้ายหนัง ดอกช่อแตกกิ่งสั้นๆ อยู่บนก้านช่อยาวเรียว อยู่รวมเป็นกระจุกบนกิ่ง ดอกสีม่วงสีน้ำเงิน หรือสีแดงเรื่อๆ แล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม กลีบดอก 4 กลีบ ผลกลม สีชมพูอมแดง เมื่อสุกสีน้ำเงินเข้มเกือบดำ

ความสำคัญ เนื้อไม้ใช้ทำด้ามเครื่องมือเครื่องใช้ ผลเมื่อสุกรับประทานได้ (เต็ม, 2518)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.9 **<u>พลองใบเล็กบาง</u>**

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Memecylon pauciflorum* Blume

ชื่อวงศ์ Melastomataceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ยืนต้น เกือบทุกส่วนมีลักษณะกลม ใบเป็นรูปไข่หรือรูปไข่กว้าง ปลายใบมน ใบเรียบ มีขนอ่อนปกคลุมด้านบน ดอกมีขนาดเล็ก ออกเป็นช่อแบบ umbel ออกตามซอกใบ

1.10 **<u>ชิงชี่</u>** (ชินชี่, พญาจอมปลวก, แสมซอ, จิงโจ้, กระดาษขาว)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Capparis micracantha* A. DC

ชื่อวงศ์ Capparaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้พุ่มหรือไม้ต้นบางทีกึ่งเลื้อย ลำต้นสีเทา กิ่งคดไปมาที่โคนกิ่งและก้านล้อมรอบด้วยใบคล้ายเกร็ด ใบรูปไข่ ขอบขนานหรือรูปหอก ปลายใบมนกว้างหรือกลม โคนใบป้านกึ่งรูปหัวใจหรือสอบแหลม เนื้อใบค่อนข้างมัน ดอกเรียงเป็นแถวอยู่เหนือง่ามใบ มีแหล่งน้ำหวานสีเหลือง เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม

สรรพคุณ

ใบ แก้โรคผิวหนัง แก้ไข้ฝีกาฬ แก้ตะคิว

ดอก แก้มะเร็ง

ลูก แก้โรคในลำคอ

ต้น แก้ฟกบวม

ราก แก้โรคที่เกิดในท้อง ขับลมให้ซ่านออกมา แก้ไข้ร้อนภายในทุกชนิด แก้โรคตา (วุฒิ, 2540)

1.11 **<u>ติ้วเกลี้ยง</u>** (ติ้วขาว)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cratoxylum formosum* (Jack) Dyer.var.*formosum* (Jack)Dyer

ชื่อวงศ์ Guttiferae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ยืนต้นมีหนามแข็งตามลำต้นเมื่ออายุยังน้อย เปลือกสีน้ำตาลปนแดง ล่อนเป็นสะเก็ด เปลือกใบสีน้ำตาลแดง มีน้ำยางสีเหลือง ใบรูปมน โคนใบและปลายใบสอบ หลังใบเป็นมันสีเข้มกว่าท้องใบ ใบแก่สีแสดหรือสีแดง ดอกสีชมพูหรือสีขาว ออกเป็นดอกเดี่ยวๆ หรือเป็นกระจุกตามง่ามใบ ผลรูปกระสวย ผิวแข็งสีน้ำตาล – สีดำ แก่จัดจะแตกตามรอยประสานเป็น 3 แฉก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.12 **<u>พะวา</u>** (สารภีป่า, ชะมวง, มะคะขี้นก, ขวาด, กวักไหม, หมักกวัก)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Gacinia speciosa* Wall.

ชื่อวงศ์ Guttiferae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง เนื้อไม้สีน้ำตาลแดง ใบดกหนาทึบ ใบรูปมน เส้นแขนงใบถี่ ใบแห้งสีน้ำตาลแดง หลังใบขาว ดอกช่อออกตามปลายกิ่ง กลีบเลี้ยง 4 กลีบดอก 4 รูปไข่ ผลกลมหรือรีผลแก่ออกสีแดงแก่หรือแดงปนม่วง

ความสำคัญ ใช้ทำเสา เสาเข็ม กระดานพื้น

1.13 **<u>มะนาวผี</u>** (กรูดผี, กะนาวผี, ขี้ติ้ว, จ๊าลิว, นางกาน, มะลิว)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Atalantia monophylla* Corr.

ชื่อวงศ์ Rutaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่หรือไม้ยืนต้นขนาดเล็ก มีหนามแข็งออกตามซอกกิ่ง ใบเป็นใบประกอบ เรียงตัวแบบสลับ ใบย่อยรูป elliptic หรือ ovate-oblong ขอบใบเรียบ ปลายใบเว้าเป็น 2 หยัก แผ่นใบหนาและเหนียว สีเขียว ก้านใบสั้น ดอกอยู่เป็นกลุ่มแบบ receme สั้นๆ ขึ้นตามซอกใบ มีขนปกคลุมในระยะแรก กลีบเลี้ยง 3 - 5 แฉก กลีบดอก 3 - 5 รูปรีขาว ขอบเรียบ เรียงซ้อนกัน ผลสดแบบ berry ค่อนข้างกลม

1.14 **<u>มะกรูดผี</u>**

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Atalantia trimera* (O.Liv.)Bu.

ชื่อวงศ์ Rutaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้รอเลื้อยหรือไม้เลื้อย มีหนามแข็งออกตามซอกกิ่ง เป็นหนามเดี่ยวๆ ใบรูป oblong ขอบใบเรียบ แผ่นใบหนาและเหนียว ตามใบพบต่อมน้ำมันกระจายอยู่ทั่วไป ยังไม่พบดอก ผลแบบ berry ผิวค่อนข้างเกลี้ยง เปลือกหนา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

Escherichia coli

E. coli เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Facultative anaerobe อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae จัดเป็น Coliform หรือมีชื่อสามัญว่า Colon bacillus พบในลำไส้เล็กตอนปลายและลำไส้ใหญ่ของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมีจำนวนมากที่สุด *E. coli* มีหลาย serotypes และหลาย biotypes เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่แสดงความแตกต่างของเชื้อ เช่น MacConkey Agar โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 – 3 มิลลิเมตร และมีสีชมพูแดงเนื่องจากหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส (lactose fermenter) ได้กรดที่เกิดจากการหมักย่อยน้ำตาล ซึ่งทำให้สีของอินดิเคเตอร์ในอาหารเปลี่ยนไปจากเดิม โคโลนีที่เจริญบน Eosine Methylene Blue (EMB) Agar ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 – 3 มิลลิเมตร สีเข้มตรงกลางและเป็นมันวาวแบบโลหะ (dark center with greenish metallic sheen) เนื่องจากความสามารถในการหมักน้ำตาล แล้วให้กรดในปริมาณสูง

ลักษณะที่สำคัญสำหรับการวินิจฉัย *E. coli* ได้แก่ IMViC ให้ผลคือ + + - - คือ Indole และ Methyl Red ให้ผลบวก Voges Proskauer และ Citrate ให้ผลลบ ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้

สัณฐานวิทยาและสรีระวิทยา

E. coli เป็นแบคทีเรียกรัมลบเซลล์ติดสีแดง รูปร่างท่อนสั้น มีขนาดกว้าง 0.4 – 0.7 μm และยาว 1.0 – 3.0 μm มีแฟลกเจลลาแบบ peritrichous ยื่นออกมารอบเซลล์สำหรับใช้ในการเคลื่อนที่ *E. coli* มี DNA ยาว 1100 – 1400 ไมครอน และมีน้ำหนักโมเลกุล 3 x 10^9 ดาลตัน มีคู่ของเบส 5 ล้านคู่ (บัญญัติ, 2525) มีฟิมเบรียหรือพิไล (pili) เป็นระยางค์ลักษณะคล้ายขนเล็กๆ ไม่มีสปอร์ บางสายพันธุ์มีแคปซูล ในสิ่งส่งตรวจของคนไข้ เช่น หนอง จะมีลักษณะเป็นท่อนอ้วน-สั้น (โสภณ และคณะ, 2524)

การเจริญ

E. coli เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดธรรมดา *E. coli* ที่เจริญในอาหารเหลว (broth) แล้วเอาไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาในการแบ่งเซลล์แต่ละครั้งประมาณ 17 นาที ส่วนที่เลี้ยงในน้ำนมแล้วบ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน จะใช้เวลาในการแบ่งเซลล์ประมาณ 12.5 นาที่ โดยทั่วไป *E. coli* ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจะมีระยะ lag phage นาน 30 นาที ถึง 3 ชั่วโมง *E. coli* จัดอยู่ในกลุ่ม mesophilic bacteria อุณหภูมิที่เจริญได้ที่ minimum คือ 8 องศาเซลเซียส และที่ maximun คือ 47 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส ช่วง pH สำหรับการเจริญของ *E. coli* ต่ำสุดคือ 4.4 และสูงสุดคือ 9.0 และช่วง pH ที่เหมาะสมคือ 6.0 – 7.0 (บัญญัติ, 2525)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 1 ลักษณะทางชีวเคมีของ *E. coli*

Chracteristics	*E. coli*	*E. coli* inactive
Indole production	+	[+]
Methyl red	+	+
Voges-proskauer	-	-
Simmon 's Citrate	-	-
Hydrogen sulfide on TSI	-	-
Urease, Christensen's	-	-
Phenylalanine deaminase	-	-
Lysine decarboxylase	[+]	d
Arginine dihidrolase	[-]	-
Ornithine decarboxylase	d	[-]
Motility	[+]	-
Gelatin liquefaction at 22 .C	-	-
KCN, growth in	-	-
Malonate utilization	-	-
D-Glucose, acid production	+	+
D-Glucose, gas production	+	-
Lactose	+	[-]
Sucrose	d	[-]
D-Manitol	+	+
Dulcitol	d	d
Salicin	d	-
D-Adonitol	-	-
myo-Inocitol	-	-
D-Sorbitol	+	[+]
L-Arabinose	+	[+]

หมายเหตุ : + , 90 – 100% of stains are positive; [+], 76 – 89% positive; d, 26 – 75% positive; [-], 11 – 25% positive; -, 0 – 10% positive. บ่มที่อุณหภูมิ 36 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Chracteristics	*E. coli*	*E. coli* inactive
Raffinose	d	[-]
L-Rhamnose	[+]	d
Maltose	+	[+]
D-Xylose	+	d
Trehalose	+	+
Cellobiose	-	-
Alpha-methyl-D-glucoside	-	-
Esculin hydrolysis	d	-
Melibiose	[+]	d
D-Arabitol	-	-
Mucate	+	d
Lipase, corn oil	-	-
Deoxyribonuclease at 25 .C	-	-
Nitrate to nitrite	+	+
Oxidase, Kovacs'	-	-
ONPG (Beta-galactosidase)	+	d
Yellow pigment	-	-
D-Mannose	+	+

หมายเหตุ : + , 90 – 100% of stains are positive; [+], 76 – 89% positive; d, 26 – 75% positive; [-], 11 – 25% positive; -, 0 – 10% positive. บ่มที่อุณหภูมิ 36 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (Buchanan and Gibbons, 1974)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ความทนทาน

สายพันธุ์ของ *E. coli* ส่วนใหญ่จะตายที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 1 ชั่วโมง หรือที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 – 20 นาที บางสายพันธุ์อยู่รอดได้ในนมที่ผ่านการพาสเจอร์-ไรเซชัน ที่อุณหภูมิห้องหรือในธรรมชาติ *E. coli* สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานเป็นเดือน เช่น ในน้ำ ฝุ่นในห้องผู้ป่วย ส่วนในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ 12 – 21 องศาเซลเซียส หรือในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 3 – 7 องศาเซลเซียส *E. coli* ที่ปนเปื้อนในอาหารสามารถเจริญเติบโตได้อย่างช้าๆ ส่วนที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่านี้เชื้อสามารถอยู่ได้นานหลายเดือนถึงเป็นปี

ส่วนช่วงของค่า pH ก็มีส่วนสำคัญต่อความอยู่รอดหรือความทนทานของเชื้อ เช่น ในน้ำแอปเปิลคั้นที่มีสภาพเป็นกรดต่ำ pH 3.7 และเก็บที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เชื้อจะอยู่ได้นาน 10 – 31 วัน แต่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะอยู่ได้นาน 2 – 3 วัน ส่วนมากสายพันธุ์ที่ก่อโรคจะไม่เจริญในช่วง pH < 5.4 (บัญญัติ, 2525)

สารพิษที่สร้างโดย *E. coli*

1. Enterotoxin

Enterotoxin เป็นทอกซินที่มีด้วยกัน 2 ชนิด คือ heat – labile enterotoxin (LT) และ heat – stable enterotoxin (ST)

LT ประกอบด้วยซับยูนิต A (active subunit) ทำหน้าที่เป็นทอกซิน และซับยูนิต B 5 หน่วย (binding subunit) มีหน้าที่จับกับ GM1 ganglioside ซึ่งเป็น receptor จำเพาะ LT มีคุณสมบัติร้อยละ 80 เหมือน cholera toxin (CT) LT ประกอบด้วยแฟรกเมนต์ A1 ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์และแฟรกเมนต์ A2 มีหน้าที่จับ A1 และ ซับยูนิต B

LT มี 2 ชนิด LT I และ LT II ซึ่ง LT I นั้นแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามแหล่งกำเนิดคือ human origin (LTh) และ porcine origin (LTp) LT ทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กับ CT มาก โดยที่จับบน GM1 ganglioside เหมือนกัน มีกลไกที่ก่อพยาธิสภาพเหมือนกัน และคุณสมบัติของทอกซินถูกลบล้างด้วยแอนติบอดีต่อ CT นอกเหนือจากคุณสมบัติเหล่านี้ LTh และ LTp มีคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนต่างกัน ส่วน LT II มีคุณสมบัติที่ต่างจาก LT I คือมีลำดับ DNA ที่แตกต่างกัน แอนติบอดีต่อ CT, LTh และ LTp ไม่ลบล้างฤทธิ์ของ LT II ได้ และไม่มีที่จับจำเพาะกับ GM1 ยีนที่ควบคุมการสร้างอยู่ที่พลาสมิด

ST เป็นเปปไตด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 – 19 ชนิด มีคุณสมบัติทนต่อความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ประกอบด้วย STa และ STb โดย STa มีความสำคัญในการติดเชื้อในคน ส่วน STb ติดเชื้อในสุกร (กนกรัตน์, 2541)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

2.1 Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

EPEC เป็น *E. coli* ชนิดแรกที่พบว่าก่อโรคอุจจาระร่วงในเด็ก ขณะนี้พบกลุ่ม O ของ EPEC มี 15 ชนิดคือ O18ab, O18ac, O26, O44, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128ab, O142 และ O158 *E. coli* ในกลุ่มนี้ไม่มีการสร้าง enterotoxin ชนิด heat labile (LT) หรือ heat stable (ST) และไม่มีคุณสมบัติในการบุกรุก

2.2 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

ETEC เป็นสายพันธุ์ *E. coli* ที่ผลิต enterotoxin ชนิด heat labile (LT) และ heat stable (ST) หรือ ทั้ง 2 ชนิด แต่สายพันธุ์ที่ก่อโรคอุจจาระร่วงได้นั้นต้องมี colonization factor antigen (CFA) ด้วยซึ่งทำให้เชื้อสามารถเกาะกับ receptor ที่จำเพาะพบผิวเซลล์เยื่อบุได้ ดังนั้นสายพันธุ์ที่ก่อโรคได้ในคนก็ไม่สามารถก่อโรคในสัตว์ ส่วนสายพันธุ์ที่ก่อโรคได้ทั้งในคนและในสัตว์พบได้น้อยมาก สายพันธุ์ของ ETEC ที่เป็นสาเหตุของการระบาดพบในกลุ่มที่จำกัดคือ O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O115, O128ac, O139, O148, O153, O159 และ O167

2.3 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

EIEC เป็น *E. coli* ที่แตกต่างจาก *E. coli* อื่นๆ คือไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแล็กโตส หรือย่อยได้อย่างช้าๆ เจริญได้ในที่ไม่มีออกซิเจน และไม่เคลื่อนที่ ซึ่งคล้ายกับ *Shigella* EIEC มีพยาธิกำเนิดคล้ายกับ *Shigella* ในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ ซีโรไทป์ของ EIEC มักไม่ซ้ำซ้อนกับของ ETEC และ EPEC ได้แก่ O28ac, O29, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, O164 และ O167

2.4 Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)

EHEC เป็น *E. coli* ที่พบเมื่อปี พ.ศ. 2525 ซีโรไทป์ที่สำคัญคือ O157:H7 *E. coli* O157:H7 นี้สามารถหมักย่อยน้ำตาลแล็กโตสและให้ผลปฏิกิริยาชีวเคมีเหมือน *E. coli* ทั่วไป ยกเว้นไม่หมักย่อยน้ำตาล sorbitol ซึ่งใช้เป็นคุณสมบัติที่แยกเชื้อออกจาก *E. coli* อื่นๆ ได้ (93 % ของ *E. coli* ที่แยกได้จากคนสามารถหมักย่อย sorbitol ได้) นอกจากนี้ *E. coli* O157:H7 ไม่มีเอนไซม์ β-glucuronidase จึงไม่สามารถไฮโดรไลซ์ 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) ได้ *E. coli* O157:H7 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30 – 42 องศาเซลเซียส สามารถอยู่รอดได้ในเนื้อบดแช่แข็ง แต่เจริญได้ไม่ดีที่ 44 – 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้ในการตรวจหา fecal *E. coli* ในตัวอย่างอาหาร (กนกรัตน์, 2541)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. รายละเอียดเกี่ยวกับการทดสอบความไว

วิธีทดสอบความไว

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยามีหลายวิธี โดยมีวิธีหลักอยู่ 3 รูปแบบคือ

1. Broth dilution susceptibility test

2. Agar dilution susceptibility test

3. Agar diffusion test

การจะเลือกใช้วิธีทดสอบรูปแบบใดขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ในทำนองเดียวกัน วิธีการแต่ละรูปแบบก็มีปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการทดสอบด้วย กลุ่มเชื้อที่นิยมทดสอบความไวต่อยา คือ แบคทีเรีย เพราะเป็นกลุ่มที่มีปัญหาของเชื้อดื้อยาค่อนข้างมาก ขณะที่การทดสอบความไวของเชื้อราไม่นิยมทำเป็นงานประจำ นอกจากในงานวิจัยหรือรายที่มีปัญหาในการรักษายาอย่างมาก

ศัพท์ที่เกี่ยวข้อง

Minimum Inhibition Concentration (MIC) คือ ความเข้มข้นของยาน้อยสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) คือ ความเข้มข้นของยาน้อยสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้

การเลือกรูปแบบวิธีทดสอบ

การจะเลือกรูปแบบใดเพื่อการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างที่สำคัญคือ

1. ลักษณะของงาน เช่น เป็นงานวิจัย งานตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่ทำเป็นประจำหรือนานๆ ทำครั้ง งานที่ต้องรู้ค่า MBC ฯลฯ ตัวอย่างเช่น งานตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่นานๆ ทำครั้ง และแต่ละครั้งมีจำนวนเชื้อที่ทดสอบน้อยจะนิยมใช้ agar diffution test (เพื่อตัดปัญหาต้องเตรียมและเก็บสารละลายของตัวยาที่ต้องใช้ใน dilution test) ขณะที่งานที่ต้องรู้ค่า MBC ของตัวยาจะนิยมใช้ broth dilution test

2. ชนิดของเชื้อทดสอบ เช่น เชื้อที่เจริญช้า หรือต้องการเลือกเฟ้นใช้อาหารมาก (fastidious organism) จะนิยมใช้ broth dilution test ขณะที่เชื้อซึ่งต้องเจริญบนเลือด หรือไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobe) มักใช้ agar dilution test หรือเชื้อที่มีอัตราการเจริญไม่คงที่ ควรเลือกวิธี dilution test

3. จำนวนเชื้อทดสอบ เช่น มีจำนวนเชื้อทดสอบมากและต้องการหาค่า MIC จะนิยมทำ agar dilution test

4. ชนิดของยาทดสอบ เช่น ตัวยาที่แพร่กระจาย (diffuse) ในวุ้นไม่ดี จะนิยมใช้ dilution test

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. จำนวนยาทดสอบ เช่น มีตัวยาจำนวนมาก แต่เชื้อมีจำนวนน้อย จะนิยมใช้ agar diffusion test (มาลิน, 2532)

Dilution Susceptibility Test

ทั้ง broth และ agar dilution susceptibility test มีหลักการทดสอบคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ยาจะถูกเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นจึงใส่เชื้อลงใน / บน อาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาความเข้มข้นต่างๆ ภายหลังการบ่มให้ดูค่า MIC โดยสังเกตความขุ่นหรือใสของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และมีหรือไม่มีเชื้อเจริญขึ้นบนวุ้น

วิธี broth dilution test สามารถแบ่งเป็น macrodilution หรือ tube dilution test โดยทำในหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร และ microdilution test ซึ่งทำใน microtiter tray (plate)

ข้อดีของ broth และ agar dilution test

ข้อดีของ broth dilution test คือ ใช้ทดสอบวิถีการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อของยาได้ อีกทั้งยังสามารถใช้เมื่อต้องการรู้ผลเร็ว ซึ่งมีกระบวนการที่ทำได้หลายรูปแบบ เช่น ภายหลังการบ่มระยะหนึ่งแล้วอาจตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างเชื้อที่เกิดจากยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หรืออาจตรวจสอบโดยการดูการเปลี่ยนแปลงของ pH ใน medium

สำหรับข้อดีของ agar dilution test คือ ใช้ทดสอบเชื้อหลายชนิดได้ในเวลาเดียวกัน อีกทั้งยังใช้ดูได้ว่าเชื้อทดสอบมีเชื้ออื่นปนเปื้อนหรือไม่ รวมทั้ง medium เมื่อเติมสารเสริมอื่นที่ทำให้ขุ่น เช่น เติมเลือด ฯลฯ ก็สามารถนำมาใช้ในการทดสอบได้ และวิธีการอาจนำมาปรับปรุงเพื่อใช้ทดสอบเชื้อที่มีคุณสมบัติพิเศษต่าง ๆ เช่น เชื้อพวกกลุ่มแอนแอโรปส์

Agar Diffusion Test

ในการทดสอบความไวของเชื้อด้วย dilution test ค่อนข้างยุ่งยาก เพราะต้องเจือจางแต่ละตัว ซึ่งจะเสียเวลาและเปลืองค่าใช้จ่าย จึงอาจเลือกใช้ agar diffusion test เพราะความแรงยาที่ใช้ทดสอบนั้นสามารถใช้เพียงความเข้มข้นเดียว อีกทั้งยังวิธีการอย่างหลังนี้ใช้ในกรณีที่ต้องการผลเร่งด่วนได้ เช่น สามารถทดสอบกับสิ่งส่งตรวจจากคนไข้โดยตรง

วิธี agar diffusion test อาศัยหลักการที่ว่า เมื่อใส่ยาต้านจุลชีพปริมาณหนึ่งไว้ภายในภาชนะบรรจุ (reservoir) ซึ่งอยู่บน agar medium ที่ได้เพาะเชื้อไว้ ภายหลังการบ่มเพาะให้สังเกตดูว่ารอบ reservoir ที่ตัวยาซึมไปนั้นจะมีบริเวณใสที่ไม่มีเชื้อเจริญเกิดขึ้นหรือไม่ วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบยาเพียงความเข้มข้นเดียว แล้วดูขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น เพราะขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้พบว่าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำหรับ reservoir ที่ใช้เมื่อดูจากพื้นผิว agar จะมีลักษณะเป็นวงกลม ซึ่งอาจเป็นหลุมที่เจาะลงในเนื้อ agar (well) ถ้วยทรงกระบอก (cylinder cup) เม็ดยา (tablet) หรือกระดาษซับวงกลม (filter paper disc) แต่เนื่องจาก reservoir สามแบบแรกยุ่งยากในการใช้ และผลที่ได้แปรผันมาก ในปัจจุบันจึงนิยมใช้ reservoir ที่เป็นกระดาษซับวงกลม

สมัยแรกๆ วิธีการเริ่มด้วยการเพาะเชื้อลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียว แล้วใช้แท่งแก้วหรือแท่งเหล็กกรองเจาะบนผิววุ้นให้มีช่อง เติมสารละลายของยาต้านจุลชีพลงไปในช่องวุ้นเหล่านั้น ยาต้านจุลชีพจะแพร่กระจายในเนื้อวุ้น ถ้ามีความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดนั้น แบคทีเรียจะไม่เจริญบริเวณรอบๆ บริเวณที่มียาต้านจุลชีพดังกล่าว ถ้ามีบริเวณที่ถูกยับยั้งมาก หมายถึง ยาหรือสารต้านจุลชีพชนิดนั้นมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียชนิดนั้นมาก ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีโดย Bondi และคณะ ในปี 1947 โดยใช้แผ่นกระดาษกรองหรือกระดาษซับวงกลม (filter paper disc) ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้มากบางครั้งอาจเรียกวิธีการทดสอบที่ใช้แผ่นกระดาษดังกล่าวนี้ว่า disc sensitivity test (นันทนา, 2537)

4. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

วิวัฒน์ และคณะ (2523) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสมุนไพรไทย 9 ชนิด และใช้ส่วนของสมุนไพรต่างๆ กัน คือ แกแรและเปล้าใหญ่ (แก่น) ทองพันชั่ง (ทั้งต้น) น้อยหน่า (ใบ) สะแกนา (เมล็ด) เล็บมือนาง (ผล) สีพันคณฑา (ราก) หญ้าแห้วหมู (หัว) และเข็มแดง (ดอกและราก) โดยใช้วิธี disc diffusion ทำการทดสอบกับเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 เป็นตัวแทนกรัมบวก *Salmonella typhi*, *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10045 เป็นตัวแทนของกรัมลบ พบว่า ทองพันชั่งที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ และน้ำ ให้ผลกับกรัมบวกเพียงเล็กน้อย และไม่ให้ผลการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 10045 เลย

จริยา และคณะ (2532) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของใบฝรั่งและเปลือกมังคุดกับเชื้ออุจจาระร่วง 12 สายพันธุ์ คือ *Vibrio* 2 สายพันธุ์ *Shigella* 4 สายพันธุ์ *Salmonella* 5 สายพันธุ์ Enteropathoginic *E. coli* 1 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อโรคอุจจาระ 12 สายพันธุ์ จะไม่เจริญถ้าใช้ความเข้มข้นของสารสกัดโดยการต้มจากใบฝรั่ง เท่ากับ 20 mg/ml และจากเปลือกมังคุด เท่ากับ 100 mg/ml แสดงว่าสารสกัดจากใบฝรั่งมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Madubunyi (1995) ได้สกัดสารจากเมล็ดของพืช *Garcinia kola* โดยใช้ petroleum ether และ ethanol เป็นตัวทำละลาย เมื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดโดยวิธี broth dilution พบว่าส่วนที่สกัดโดย petroleum ether สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ที่ค่า MIC 12.2 μg/ml และส่วนที่สกัดโดย ethanol สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *E. coli* ที่ค่าMIC 6.3 และ 12.5 μg/ml ตามลำดับ เมื่อนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ พบว่าเป็นสารประเภท polyisoprenylbenzophenone (kolanone)

Irobi, Moo-Young และ Anderson (1996) ได้ทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดจากพืช *Bixa orellana* ซึ่งใช้ 95% ethanol เป็นตัวทำละลาย ทดสอบหาฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยวิธี agar diffusion และ tube dilution ผลการทดสอบด้วยวิธี agar diffusion พบว่าสารสกัดจากพืช *Bixa orellana* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli, Serratia marcescens, Candida utilis* และ *Aspergillus niger* ได้ไม่ดี แต่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี เช่น *B. subtilis, S. aureus* และ *Streptococcus pneumoniae* โดยให้ขนาดของ inhibition zones อยู่ในช่วง 15 – 17 มิลลิเมตร มีค่า MIC 4 – 16 mg/ml และ ค่า MBC 16 – 64 mg/ml

Kirmizigul และคณะ (1996) ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดด้วยเมทานอลจากดอกของพืช *Cephalaria transsylvanica* และสารสกัด คือ three triterpenic acid glycosides, transsylvanoside A – C จากส่วนของดอกเช่นกัน ทำการทดสอบโดยวิธี disc diffusion พบว่าผลของทั้งสารสกัดด้วยเมทานอล และ glycoside ทั้ง 3 ตัว มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา คือ *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa, Proteus vulgaris, Corynebacterium xerosis, Klebsiella pneumoniae, C. utilis, Kluyveromyces fragilis, A. oryzae* และ *A. flavus* ตามลำดับ

Mahasneh, Abbas และ El-Oglas (1996) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่พบในประเทศบาเรห์น คือ *Capparis spinosa, Suaeda vermiculata, Prosopis farcta* และ *Salsola villosa* โดยใช้ petroleum ether, methanol, hexane, butanol และน้ำ เป็นตัวทำละลาย ทดสอบหาฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยใช้วิธี Agar diffusion ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากพืชทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ petroleum ether, methanol, butanol และ น้ำ เป็นตัวทำละลายสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli, S. typhimurium, S. aureus, B. cereus, C. albicans* และ *Fusarium oxysporum* โดยจะให้ inhibition zone ขนาดต่างๆ กันตั้งแต่ 7 ถึง 14 มิลลิเมตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Sandar (1996) ตัวอย่างสารสกัดหยาบที่เตรียมจากเปลือกของลำต้น ของพืชสมุนไพร 16 ชนิดจาก 9 วงศ์ที่ต่างกัน และทำการตรวจหาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกรัมบวก (*B. subtilis* และ *S. aureus*) และแบคทีเรียกรัมลบ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*) พบว่าส่วนใหญ่มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียกรัมบวกดีกว่าแบคทีเรียกรัมลบ

Gonzalez และคณะ (1997) ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและความสามารถในการต้านเซลล์ของพืช 7 ชนิดจาก สกุล *Argyranthemum* พบว่าสารสกัดจาก *Argyranthemum adauctum, A. foeniculaceum* และ *A. frutescens* มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกรัมบวก (*S. aureus, S. epidermidis, S. albus, B. subtilis, B. pumilus, B. megaterium* และ *Micrococcus luteus*) แบคทีเรียกรัมลบ (*E. coli, P. aeruginosa, P. mirabilis, K. pneumoniae* และ *S. typhimurium*) และมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์ HeLa และ Hep-2 line

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

<u>วัสดุอุปกรณ์</u>

1. ส่วนสกัดเอทานอลจากส่วนของใบและกิ่งของพืชที่บริเวณหมู่เกาะแสมสาร จำนวน 14 ชนิด ได้แก่

1.1 นางดำ (*Diospyros castanea* (Craib) Fletcher) รหัส PTL 1001, PTS 1001

1.2 ลำบิดดง (*D. filipendula* Pierre ex Lec) รหัส PTL 1002, PTS 1002

1.3 มะพลับใหญ่ (*D. malabarica* (Desv.) kostel.var.siamensis (Hochr.)Phengkl) รหัส PTL 1003, PTS 1003

1.4 มะเกือกา (*D. Rubra* Lec) รหัส PTL 1004, PTS 1004

1.5 เม่าเหล็ก (*D. toposia* Ham. var.topoia Ham) รหัส PTL 1005, PTS 1005

1.6 พลองใบรี (*Memecylon plebejem* Kurz.var.ellipsoideum Craib) รหัส PTL 1006, PTS 1006

1.7 พลองใบเล็กหนา (*M. edule* Roxb.var.orientale Craib) รหัส PTL 1007, PTS 1007

1.8 พลองใบใหญ่ (*M. ovatum* J.E. Smith) รหัส PTL 1008, PTS 1008

1.9 พลองใบเล็กบาง (*M. Pauciflorum* Blume) รหัส PTL 1009, PTS 1008

1.10 ชิงชี่ (*Capparis micracantha* A.DC) รหัส PTL 1010, PTS 1010

1.11 ติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum formosum*(Jack)Dyer.var.formosum (Jack) Dyer) รหัส PTL 1011, PTS 1011

1.12 พะวา (*Gacinia speciosa* Wall) รหัส PTL 1012, PTS 1012

1.13 มะนาวผี (*Atlantia monophylla* Corr) รหัส PTL 1013, PTS 1013

1.14 มะกรูดผี (*A. trimera*(O.Liv)Burkill) รหัส PTL 1014, PTS 1014

<u>หมายเหตุ</u>

PTL : ส่วนสกัดจากส่วนใบ

PTS : ส่วนสกัดจากส่วนกิ่ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. แบคทีเรีย

2.1 *E. coli* ATCC 25922

2.2 *E. coli* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรงพยาบาลสมเด็จ ฯ ณ ศรีราชา จำนวน 20 ไอโซเลท

3. สารเคมี

3.1 0.85 % NaCl

3.2 Ethanol 95 %

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 Tryptic soy broth (TSB)

4.2 Muller – Hinton agar (MHA)

4.3 Muller – Hinton broth (MHB)

4.4 Nutrient agar (NA)

5. ยาปฏิชีวนะ

5.1 Ceftazidime 30 μg/disc

6. อุปกรณ์ในการทดลอง

6.1 Disc เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

6.2 ไม้พันสำลีขนาดมาตรฐาน

7. Mcfarland turbidity standard No. 0.5

<u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>

การสกัดสาร

1. นำใบและกิ่งของพืชสด น้ำหนัก 6.2 กิโลกรัม สับให้เป็นชิ้นเล็กๆ ตากแดดให้แห้ง แล้วบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดใส่ถุงผ้า มัดปากถุงให้เรียบร้อยแล้วชั่งน้ำหนัก

2. นำถุงผ้าที่บรรจุใบหรือกิ่งของพืชที่บดละเอียดจากข้อ 1 ใส่ในถังแช่ เติมตัวทำละลาย คือ เอทานอล 95% ปริมาตร 6 ลิตร ปิดฝาให้สนิท ทิ้งไว้ 6 วัน เมื่อครบกำหนด รินส่วนสกัดที่ได้แล้วกรองด้วยสำลี ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยแช่ทิ้งไว้ครั้งละ 6 วัน บันทึกน้ำหนักของส่วนสกัดที่ได้ (ปฏิบัติการโดยภาควิชาเคมี)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1. ตรวจหาอุทธิยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ของส่วนสกัดเอทานออจากพืชโดยวิธี Disc diffusion method (Lennette *et al.*, 1985)

1.1 การเตรียม Disc ของส่วนสกัดจากพืช

1.1.1 นำส่วนสกัดของพืชซึ่งสกัดด้วยเอทานอลมาจำนวน 0.1 g ละลายด้วยเอทานอล 95 % จำนวน 1 ml จะได้ส่วนสกัดเอทานอลความเข้มข้น 1 x 10^5 µg/ml และนำไปกรองด้วยกระดาษกรองที่มี pore size 0.45 µm เป็น stock solution

1.1.2 ดูด stock solution มา 0.8 ml แล้วเติมลงในหลอดที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1.2 ml ผสมให้เข้ากัน จะได้ส่วนสกัดความเข้มข้นเป็น 4 x 10^4 µg/ml

1.1.3 จากหลอดในข้อ 1.1.2 นำไปทำ 2 – fold serial dilution ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 2 x 10^4, 1 x 10^4 และ 5 x 10^3 µg/ml ตามลำดับ

1.1.4 นำส่วนสกัดแต่ละความเข้มข้น รวมทั้งส่วนสกัดความเข้มข้น 100 mg/ml (ใช้เป็น concentrate) จำนวน 20 µl หยดใส่แผ่น disc แต่ละ disc จะมีปริมาณส่วนสกัดเอทานอล 2000, 800, 400 และ 200 µg/disc ตามลำดับ นำ disc ที่ได้ไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.2 การเตรียม disc เอทานอล (solvent control)

นำเอทานอล 95 % จำนวน 20 µl หยดใส่แผ่น disc จะได้ปริมาณของเอทานอล 95 % เท่ากับเอทานอลที่อยู่ใน disc ส่วนสกัดจากพืชที่มีความเข้มข้นสูงสุด คือ 2000 µg/disc แล้วนำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3 การเตรียม suspension ของ *E. coli* ATCC 25922 สำหรับทดสอบ

1.3.1 เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 บนอาหาร Nutrient agar (NA) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3.2 นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อมา 5 โคโลนีใส่ใน Tryptic soy broth (TSB) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 ชั่วโมง แล้วนำมาเทียบความขุ่นของเชื้อกับ McFarland เบอร์ 0.5 โดยใช้ 0.85 % NaCl เป็นตัวปรับจะได้จำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 1.5 x 10^8 CFU/ml

0427
จ 569 ก
ปรส 3

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.4 **วิธีทดสอบ Disc Diffusion**

1.4.1 ใช้ไม้พันสำลีจุ่มใน suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วนำมาป้ายบนผิวหน้าของอาหาร Muller – Hinton agar (MHA) ให้ทั่วจานอาหาร โดยป้าย 3 ครั้ง แต่ละครั้งให้หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อไป 60 องศา

1.4.2 ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง (3 - 5 นาที) จึงนำ disc ส่วนสกัดจากพืชความเข้มข้นต่างๆ ในข้อ 1.1 มาวางบนผิวหน้าอาหาร กดเบาๆ ควบคุมการทดลองโดยใช้ยาปฏิชีวนะ Ceftazidime 30 μg/disc เป็น positive control และ 95 % ethanol disc เป็น negative control

1.4.3 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตและวัดขนาดของ zone ที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อ บันทึกผล

2. **คัดเลือกชนิดของส่วนสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีที่สุดโดยวิธี Broth dilution** (Lennette *et al.*, 1985 และ Baron *et al.*, 1990)

2.1 **การเตรียมส่วนสกัดจากพืช**

2.1.1 เตรียม Muller – Hinton broth (MHB) ปริมาตร 2.0 ml ในหลอดทดลองจำนวน 1 หลอด และปริมาตร 1.0 ml จำนวน 5 หลอด

2.1.2 ดูด MHB หลอดที่มีปริมาตร 2.0 ml ออก 256 μl และเติมด้วย stock solution 256 μl เช่นกัน (จะได้ความเข้มข้น 12800 μg/ml)

2.1.3 ทำ 2 – fold serial dilution โดยดูดสารละลายข้อ 2.1.2 ปริมาตร 1 mL. ใส่ใน MHB ที่มีปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน จะได้ความเข้มข้นของส่วนสกัดเท่ากับ 6400 μg/ml ทำซ้ำในลักษณะเดียวกัน สุดท้ายจะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของส่วนสกัด 12800, 6400, 3200 และ 1,600 μg/ml โดยหลอดสุดท้าย (800 μg/ml) จะมี 2.0 ml ต้องดูดออกให้เหลือ 1.0 ml

2.2 **การเตรียม suspension ของ *E. coli* ATCC 25922 สำหรับทดสอบ**

2.2.1 เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 บนอาหาร Nutrient agar (NA) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.2 นำโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อมา 5 โคโลนีใส่ใน Tryptic soy broth (TSB) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 ชั่วโมง แล้วนำมาเทียบความขุ่นของเชื้อกับ McFarland เบอร์ 0.5 โดยใช้ 0.85 % NaCl เป็นตัวปรับ จะได้จำนวนแบคทีเรียประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2.3 suspension ของ *E. coli* ATCC 25922 ที่ใช้ต้องมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 1.5 x 10^6 CFU/ml เตรียมได้โดยดูดจากข้อ 2.2.2 มา 1.0 ml เติมลงใน MHB ปริมาตร 9 ml ผสมให้เข้ากัน จะได้จำนวนแบคทีเรียประมาณ 1.5 x 10^7 CFU/ml

2.2.4 ดูด suspension จากข้อ 2.2.3 มา 1.0 ml เติมลงใน MHB ปริมาตร 9 ml ผสมให้เข้ากัน จะได้จำนวนแบคทีเรียประมาณ 1.5 x 10^6 CFU/ml

2.3 **วิธีทดสอบ Broth dilution**

เติม suspension ของ *E. coli* ATCC 25922 (ประมาณ 1.5 x 10^6 CFU/ml ใน MHB) ปริมาตร 1.0 ml ลงในแต่ละหลอดในข้อ 2.1.3 จะเหลือความเข้มข้นของส่วนสกัด 6400, 3200, 1600 และ 800 µg/ml ตามลำดับ และแต่ละหลอดมีจำนวนเซลล์ประมาณ 5 x 10^5 CFU/ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

2.4 **การอ่านค่า MIC**

ดูด suspension จากหลอดในข้อ 2.3 ที่ได้หลังการบ่มเชื้อ เลือกหลอดที่ใสที่คาดว่าไม่มีเชื้อเจริญทุกหลอด หลอดละ 10 µl นำไป drop บน NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.5 **การอ่านค่า MBC**

อ่านจากความเข้มข้นของหลอดที่ต่ำที่สุดซึ่งไม่มีเชื้อเจริญบน NA เป็น µg/ml บันทึกผลการทดลอง

3. **ทดสอบความไวต่อส่วนสกัดจากพืชที่คัดเลือกได้ของ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ โดยวิธี Agar dilution** (Lennette *et al.*, 1985 และ Baron *et al.*, 1990)

3.1 **การเตรียมส่วนสกัดจากพืช**

3.1.1 นำ stock solution ของส่วนสกัดจากพืชที่มีความเข้มข้น 100 mg/ml ประมาณ 2 ml โดยดูด stock solution มา 1280 µl เติมลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 720 µl จะได้ส่วนสกัดที่มีความข้นข้นเป็น 64000 µg/ml

3.1.2 ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 แต่ดูดส่วนสกัดจาก stock solution มา 640 µl และ 320 µl เติมลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1360 µl และ 1680 µl จะได้ความข้นข้นเป็น 32000 µg/ml และ 16000 µg/ml ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.1.3 นำส่วนสกัดแต่ละ dilution จากข้อ 3.1.1 และข้อ 3.1.2 มา dilution ละ 2 ml ผสมรวมกับ MHA ปริมาตร 18 ml (1 : 9) หลอมที่อุณหภูมิ 45 – 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลง plate (plate ละ 20 ml) จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละ plate ดังนี้ 6400, 3200 และ 1600 μg/ml ตามลำดับ

3.2 การเตรียม suspension ของ *E. coli* ATCC 25922 สำหรับทดสอบ

3.2.1 เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจของคนไข้จำนวน 20 Isolates และ *E. coli* ATCC 25922 บนอาหาร Nutrient agar (NA) นำบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2 นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อมา 5 โคโลนีใส่ใน Tryptic soy broth (TSB) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 ชั่วโมง แล้วนำมาเทียบความขุ่นของเชื้อกับ McFarland เบอร์ 0.5 โดยใช้ 0.85 % NaCl เป็นตัวปรับจะได้จำนวนแบคทีเรียประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml

3.2.3 suspension ของ *E. coli* ATCC 25922 ที่ใช้ต้องมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 1.5×10^6 CFU/ml เตรียมได้โดยดูดจากข้อ 3.2.2 มา 1.0 ml เติมลงใน 0.85 % NaCl ปริมาตร 9 ml ผสมให้เข้ากัน จะได้จำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 1.5×10^7 CFU/ml

3.2.4 ดูด suspension จากข้อ 3.2.3 มา 1.0 ml เติมลงใน 0.85 % NaCl ปริมาตร 9 ml ผสมให้เข้ากัน จะได้จำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 1.5×10^6 CFU/ml

3.3 วิธีทดสอบ Agar dilution

3.3.1 ทำการ drop เชื้อ *E. coli* แต่ละ Isolates ปริมาตร 10 μl ลงบนผิวของอาหารในข้อ 3.1.3 จะได้จำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 1.5×10^4 CFU/ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2 ตรวจสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อในแต่ละ dilution ของส่วนสกัด บันทึกผล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ของส่วนสกัดจากพืช โดยวิธี Disc diffusion

จากการทดลองตรวจหาฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชบริเวณหมู่เกาะแสมสาร 14 ชนิด รวม 28 ตัวอย่าง พบว่า disc ของส่วนสกัดจากพืชทุกชนิดที่มีปริมาณส่วนสกัดเอทานอลของพืชน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2000 μg/disc ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ของส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของพืช 14 ชนิด โดยวิธี disc diffusion

พืช	รหัส	ซ้ำที่	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm) ของ disc ที่บรรจุส่วนสกัดเอทานอลจากพืชปริมาณต่างๆ (μg/disc)					
			2,000	800	400	200	+ve control	-ve control
นางดำ	PTL 1001	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	27	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						26 ± 0.58	
	PTS 1001	1	-	-	-	-	27	-
		2	-	-	-	-	26	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						26 ± 0.58	
ลำปิดดง	PTL 1002	1	-	-	-	-	27	-
		2	-	-	-	-	27	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						27 ± 0.58	

หมายเหตุ : - , ไม่เกิด inhibition zone ; PTL, ส่วนสกัดเอทานอลจากใบ ; PTS, ส่วนสกัดเอทานอลจากกิ่ง ; +ve control, ceftazidime disc (30 μg/disc) ; -ve control, ethanol disc ; SE, standard error

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 (ต่อ)

พืช	รหัส	ซ้ำที่	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm) ของ disc ที่บรรจุส่วนสกัดเอทานอลจากพืชปริมาณต่างๆ (μg/disc)					
			2,000	800	400	200	+ve control	-ve control
ลำบิดดง	PTS 1002	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	27	-
		3	-	-	-	-	27	-
	mean ± SE						27 ± 0.58	
มะพลับใหญ่	PTL 1003	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	26	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						26 ± 0	
	PTS 1003	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	27	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						26 ± 0.58	
มะเกือกา	PTL 1004	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	26	-
		3	-	-	-	-	27	-
	mean ± SE						26 ± 0.58	
	PTS 1004	1	-	-	-	-	27	-
		2	-	-	-	-	26	-
		3	-	-	-	-	27	-
	mean ± SE						27 ± 0.58	
เม่าเหลือก	PTL 1005	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	26	-
		3	-	-	-	-	27	-
	mean ± SE						26 ± 0.58	

หมายเหตุ : - , ไม่เกิด inhibition zone ; PTL, ส่วนสกัดเอทานอลจากใบ ; PTS, ส่วนสกัดเอทานอลจากกิ่ง ; +ve control, ceftazidime disc (30 μg/disc) ; -ve control, ethanol disc ; SE, standard error

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 (ต่อ)

พืช	รหัส	ซ้ำที่	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm) ของ disc ที่บรรจุส่วนสกัดเอทานอลจากพืชปริมาณต่างๆ (μg/disc)					
			2,000	800	400	200	+ve control	-ve control
เม่าเหลือก	PTS 1005	1	-	-	-	-	27	-
		2	-	-	-	-	27	-
		3	-	-	-	-	27	-
	mean ± SE						27 ± 0	
พลองใบรี	PTL 1006	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	26	-
		3	-	-	-	-	27	-
	mean ± SE						26 ± 0.58	
	PTS 1006	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	26	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						26 ± 0	
พลองใบเล็กหนา	PTL 1007	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	27	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						26 ± 0.58	
	PTS 1007	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	26	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						26 ± 0	
พลองใบใหญ่	PTL 1008	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	27	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						26 ± 0.58	

หมายเหตุ : - , ไม่เกิด inhibition zone ; PTL, ส่วนสกัดเอทานอลจากใบ ; PTS, ส่วนสกัดเอทานอลจากกิ่ง ; +ve control, ceftazidime disc (30 μg/disc) ; -ve control, ethanol disc ; SE, standard error

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 (ต่อ)

พืช	รหัส	ซ้ำที่	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm) ของ disc ที่บรรจุส่วนสกัดเอทานอลจากพืชปริมาณต่างๆ (µg/disc)					
			2,000	800	400	200	+ve control	-ve control
พลองใบใหญ่	PTS 1008	1	-	-	-	-	27	-
		2	-	-	-	-	27	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						27 ± 0.58	
พลองใบเล็กบาง	PTL 1009	1	-	-	-	-	27	-
		2	-	-	-	-	26	-
		3	-	-	-	-	27	-
	mean ± SE						27 ± 0.58	
	PTS 1009	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	26	-
		3	-	-	-	-	27	-
	mean ± SE						26 ± 0.58	
ชิงชี่	PTL 1010	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	26	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						26 ± 0	
	PTS 1010	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	27	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						26 ± 0.58	
ติ้วเกลี้ยง	PTL 1011	1	-	-	-	-	27	-
		2	-	-	-	-	27	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						27 ± 0.58	

หมายเหตุ : - , ไม่เกิด inhibition zone ; PTL, ส่วนสกัดเอทานอลจากใบ ; PTS, ส่วนสกัดเอทานอลจากกิ่ง ; +ve control, ceftazidime disc (30 µg/disc) ; -ve control, ethanol disc ; SE, standard error

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 (ต่อ)

พืช	รหัส	ซ้ำที่	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm) ของ disc ที่บรรจุส่วนสกัดเอทานอลจากพืชปริมาณต่างๆ (µg/disc)					
			2,000	800	400	200	+ve control	-ve control
ติ้วเกลี้ยง	PTS 1011	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	26	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						26 ± 0	
พะวา	PTL 1012	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	27	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						26 ± 0.58	
	PTS 1012	1	-	-	-	-	27	-
		2	-	-	-	-	27	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						27 ± 0.58	
มะนาวผี	PTL 1013	1	-	-	-	-	27	-
		2	-	-	-	-	27	-
		3	-	-	-	-	27	-
	mean ± SE						27 ± 0	
	PTS 1013	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	27	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						26 ± 0.58	
มะกรูดผี	PTL 1014	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	26	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						26 ± 0	

<u>หมายเหตุ</u> : - , ไม่เกิด inhibition zone ; PTL, ส่วนสกัดเอทานอลจากใบ ; PTS, ส่วนสกัดเอทานอลจากกิ่ง ; +ve control, ceftazidime disc (30 µg/disc) ; -ve control, ethanol disc ; SE, standard error

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 (ต่อ)

พืช	รหัส	ซ้ำที่	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm) ของ disc ที่บรรจุส่วนสกัดเอทานอลจากพืชปริมาณต่างๆ (μg/disc)					
			2,000	800	400	200	+ve control	-ve control
มะกรูดผี	PTS 1014	1	-	-	-	-	26	-
		2	-	-	-	-	27	-
		3	-	-	-	-	26	-
	mean ± SE						26 ± 0.58	

หมายเหตุ : - , ไม่เกิด inhibition zone ; PTL, ส่วนสกัดเอทานอลจากใบ ; PTS, ส่วนสกัดเอทานอลจากกิ่ง ; +ve control, ceftazidime disc (30 μg/disc) ; -ve control, ethanol disc ; SE, standard error

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชชนิดต่างๆ โดยวิธี broth dilution

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชชนิดต่างๆ โดยวิธี broth dilution พบว่าที่ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดเท่ากับ 6400 µg/ml ส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดง (PTL 1002 และ PTS 1002) พลองใบเล็กหนา (PTL 1007 และ PTS 1007) ส่วนสกัดเอทานอลจากใบของพลองใบเล็กบาง (PTL 1009) และติ้วเกลี้ยง (PTL 1011) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ได้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชชนิดต่างๆ โดยวิธี broth dilution

พืช	รหัส	ซ้ำที่	การเจริญของ *E. coli* ในอาหารที่มีส่วนสกัดเอทานอล ความเข้มข้นต่างๆ (µg/ml)					MIC (µg/ml)
			6400	3200	1600	800	-ve control	
นางคำ	PTL 1001	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
	PTS 1001	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
ลำบิดดง	PTL 1002	1	N	G	G	G	G	6400
		2	N	G	G	G	G	6400
		3	N	G	G	G	G	6400
	PTS 1002	1	N	G	G	G	G	6400
		2	N	G	G	G	G	6400
		3	N	G	G	G	G	6400
มะพลับใหญ่	PTL 1003	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf

หมายเหตุ : G, growth ; N, no growth ; Nf, not found ; -ve control, MHB + EtOH 95%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3 (ต่อ)

พืช	รหัส	ซ้ำที่	การเจริญของ *E. coli* ในอาหารที่มีส่วนสกัดเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ (µg/ml)					MIC (µg/ml)
			6400	3200	1600	800	-ve control	
มะพลับใหญ่	PTS 1003	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
มะเกือกา	PTL 1004	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
	PTS 1004	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
เม่าเหลือก	PTL 1005	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
	PTS 1005	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
พลองใบรี	PTL 1006	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
	PTS 1006	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
พลองใบเล็กหนา	PTL 1007	1	N	G	G	G	G	6400
		2	N	G	G	G	G	6400
		3	N	G	G	G	G	6400

หมายเหตุ : G, growth ; N, no growth ; Nf, not found ; -ve control, MHB + EtOH 95%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3 (ต่อ)

พืช	รหัส	ซ้ำที่	การเจริญของ *E. coli* ในอาหารที่มีส่วนสกัดเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ (µg/ml)					MIC (µg/ml)
			6400	3200	1600	800	-ve control	
พลองใบเล็กหนา	PTS 1007	1	N	G	G	G	G	6400
		2	N	G	G	G	G	6400
		3	N	G	G	G	G	6400
พลองใบใหญ่	PTL 1008	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
	PTS 1008	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
พลองใบเล็กบาง	PTL 1009	1	N	G	G	G	G	6400
		2	N	G	G	G	G	6400
		3	N	G	G	G	G	6400
	PTS 1009	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
ชิงชี่	PTL 1010	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
	PTS 1010	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
ติ้วเกลี้ยง	PTL 1011	1	N	G	G	G	G	6400
		2	N	G	G	G	G	6400
		3	N	G	G	G	G	6400

หมายเหตุ : G, growth ; N, no growth ; Nf, not found ; -ve control, MHB + EtOH 95%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3 (ต่อ)

พืช	รหัส	ซ้ำที่	การเจริญของ *E. coli* ในอาหารที่มีส่วนสกัดเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ (µg/ml)					MIC (µg/ml)
			6400	3200	1600	800	-ve control	
ติ้วเกลี้ยง	PTS 1011	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
พะวา	PTL 1012	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
	PTS 1012	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
มะนาวผี	PTL 1013	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
	PTS 1013	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
มะกรูดผี	PTL 1014	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf
	PTS 1014	1	G	G	G	G	G	Nf
		2	G	G	G	G	G	Nf
		3	G	G	G	G	G	Nf

หมายเหตุ : G, growth ; N, no growth ; Nf, not found ; -ve control, MHB + EtOH 95%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. **ผลการทดสอบหาค่า MBC ของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อส่วนสกัดเอทานอลจากพืชชนิดต่างๆ ด้วยวิธี drop plate**

จากการทดสอบหาค่า MBC ของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อส่วนสกัดเอทานอลจากพืชชนิดต่างๆ ด้วยวิธี drop plate พบว่าส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดง (PTL 1002 และ PTS 1002) ให้ค่า MBC เท่ากับ 6400 μg/ml (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบหาค่า MBC ของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อส่วนสกัดเอทานอลจากพืชชนิดต่างๆ ด้วยวิธี drop plate

พืช	รหัส	ซ้ำที่	จำนวนโคโลนีของ *E. coli* จากอาหารเหลวที่มีส่วนสกัดเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ (μg/ml) ที่เจริญบนอาหาร NA					MBC (μg/ml)
			6400	3200	1600	800	-ve control	
นางคำ	PTL 1001	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
	PTS 1001	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
ลำบิดดง	PTL 1002	1	0	N	N	N	N	6400
		2	0	N	N	N	N	6400
		3	0	N	N	N	N	6400
	PTS 1002	1	0	N	N	N	N	6400
		2	0	N	N	N	N	6400
		3	0	N	N	N	N	6400
มะพลับใหญ่	PTL 1003	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
	PTS 1003	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf

หมายเหตุ : N, TNTC ; Nf, not found ; SE, standard error

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4 (ต่อ)

พืช	รหัส	ซ้ำที่	จำนวนโคโลนีของ *E. coli* จากอาหารเหลวที่มีส่วนสกัดเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ (μg/ml) ที่เจริญบนอาหาร NA					MBC (μg/ml)
			6400	3200	1600	800	-ve control	
มะเกือกา	PTL 1004	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
	PTS 1004	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
เม่าเหล็ก	PTL 1005	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
	PTS 1005	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
พลองใบรี	PTL 1006	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
	PTS 1006	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
พลองใบเล็กหนา	PTL 1007	1	50	N	N	N	N	Nf
		2	45	N	N	N	N	Nf
		3	47	N	N	N	N	Nf
	mean ± SE		47 ± 2					

หมายเหตุ : N, TNTC ; Nf, not found ; SE, standard error

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4 (ต่อ)

พืช	รหัส	ซ้ำที่	จำนวนโคโลนีของ *E. coli* จากอาหารเหลวที่มีส่วนสกัดเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ (μg/ml) ที่เจริญบนอาหาร NA					MBC (μg/ml)
			6400	3200	1600	800	-ve control	
พลองใบเล็กหนา	PTS 1007	1	33	N	N	N	N	Nf
		2	10	N	N	N	N	Nf
		3	26	N	N	N	N	Nf
	mean ± SE		23 ± 7					
พลองใบใหญ่	PTL 1008	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
	PTS 1008	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
พลองใบเล็กบาง	PTL 1009	1	4	N	N	N	N	Nf
		2	14	N	N	N	N	Nf
		3	12	N	N	N	N	Nf
	mean ± SE		10 ± 3					
	PTS 1009	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
ชิงชี่	PTL 1010	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
	PTS 1010	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf

หมายเหตุ : N, TNTC ; Nf, not found ; SE, standard error

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4 (ต่อ)

พืช	รหัส	ซ้ำที่	จำนวนโคโลนีของ *E. coli* จากอาหารเหลวที่มีส่วนสกัดเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ (μg/ml) ที่เจริญบนอาหาร NA					MBC (μg/ml)
			6400	3200	1600	800	-ve control	
ติ้วเกลี้ยง	PTL 1011	1	65	N	N	N	N	Nf
		2	40	N	N	N	N	Nf
		3	50	N	N	N	N	Nf
	Mean ± SE		52 ± 7					
	PTS 1011	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
พะวา	PTL 1012	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
	PTS 1012	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
มะนาวผี	PTL 1013	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
	PTS 1013	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
มะกรูดผี	PTL 1014	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf
	PTS 1014	1	N	N	N	N	N	Nf
		2	N	N	N	N	N	Nf
		3	N	N	N	N	N	Nf

หมายเหตุ : N, TNTC ; Nf, not found ; SE, standard error

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. ผลการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดง โดยวิธี broth dilution

จากการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อหาค่า MIC และ MBC ของส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดงที่ใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุด โดยศึกษาความเข้มข้นของส่วนสกัดในช่วงความเข้มข้น 3200 - 6400 μg/ml ด้วยวิธี broth dilution พบว่าส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดงมีค่า MIC เท่ากับ 5600 μg/ml และ 4800 μg/ml ตามลำดับ และเมื่อนำเชื้อที่อยู่ในหลอดอาหารเหลวที่ผสมส่วนสกัดความเข้มข้นต่างๆ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA พบว่าเชื้อที่อยู่ในหลอดอาหารเหลวที่มีส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งที่ความเข้มข้นน้อยสุด 6400 μg/ml และ 5600 μg/ml ไม่เจริญบนผิวหน้าอาหาร NA แสดงว่ามีค่า MBC เท่ากับ 6400 μg/ml และ 5600 μg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดง โดยวิธี broth dilution

รหัส	ซ้ำที่	การเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ในอาหารเหลวที่มีส่วนสกัดความเข้มข้นต่างๆ (μg/ml)							MIC (μg/ml)	MBC (μg/ml)
		6400	5600	4800	4000	3200	+ve control	-ve control		
PTL 1002	1	N	N	G	G	G	N	G	5600	6400
	2	N	N	G	G	G	N	G	5600	6400
	3	N	N	G	G	G	N	G	5600	6400
PTS 1002	1	N	N	N	G	G	N	G	4800	5600
	2	N	N	N	G	G	N	G	4800	5600
	3	N	N	N	G	G	N	G	4800	5600

หมายเหตุ : N, no growth ; G, growth ; +ve control, MHB + ส่วนสกัด ; -ve control, MHB + EtOH 95%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* จำนวน 20 isolates ของส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดง ด้วยวิธี agar dilution

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรงพยาบาลสมเด็จฯ ณ ศรีราชา ของส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดงด้วยวิธี agar dilution พบว่าส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งที่ความเข้มข้น 6400 μg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ 18 และ 13 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ของส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดง โดย วิธี agar dilution

Isolate	ซ้ำที่	การเจริญของ *E. coli* บนอาหารที่มีส่วนสกัดเอทานอลของลำบิดดง ที่ความเข้มข้นต่างๆ (μg/ml)								
		ใบ				กิ่ง				-ve control
		6400	3200	1600	MIC (μg/ml)	6400	3200	1600	MIC (μg/ml)	
1	1	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
	2	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
	3	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
2	1	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	2	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	3	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
3	1	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	2	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	3	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
4	1	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
	2	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
	3	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
5	1	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	2	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	3	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G

หมายเหตุ : N, no growth ; G, growth ; -ve control, MHA + EtOH 30.4% (9 : 1) ; ST, *E. coli* ATCC 25922 ; Nf , not found

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	ซ้ำที่	การเจริญของ *E. coli* บนอาหารที่มีส่วนสกัดเอทานอลของลำบิดคง ที่ความเข้มข้นต่างๆ (µg/ml)								
		ใบ				กิ่ง				-ve control
		6400	3200	1600	MIC (µg/ml)	6400	3200	1600	MIC (µg/ml)	
6	1	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
	2	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
	3	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
7	1	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	2	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	3	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
8	1	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	2	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	3	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
9	1	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	2	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	3	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
10	1	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	2	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	3	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
11	1	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	2	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	3	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
12	1	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
	2	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
	3	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G

หมายเหตุ : N, no growth ; G, growth ; -ve control, MHA + EtOH 30.4% (9 : 1) ; ST, *E. coli* ATCC 25922 ; Nf , not found

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	ซ้ำที่	การเจริญของ *E. coli* บนอาหารที่มีส่วนสกัดเอทานอลของลำบิดคง ที่ความเข้มข้นต่างๆ (μg/ml)								
		ใบ				กิ่ง				-ve control
		6400	3200	1600	MIC (μg/ml)	6400	3200	1600	MIC (μg/ml)	
13	1	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
	2	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
	3	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
14	1	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	2	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	3	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
15	1	G	G	G	Nf	N	G	G	6400	G
	2	G	G	G	Nf	N	G	G	6400	G
	3	G	G	G	Nf	N	G	G	6400	G
16	1	G	G	G	Nf	N	G	G	6400	G
	2	G	G	G	Nf	N	G	G	6400	G
	3	G	G	G	Nf	N	G	G	6400	G
17	1	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	2	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	3	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
18	1	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
	2	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
	3	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
19	1	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	2	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	3	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G

หมายเหตุ : N, no growth ; G, growth ; -ve control, MHA + EtOH 30.4% (9 : 1) ; ST, *E. coli* ATCC 25922 ; Nf , not found

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

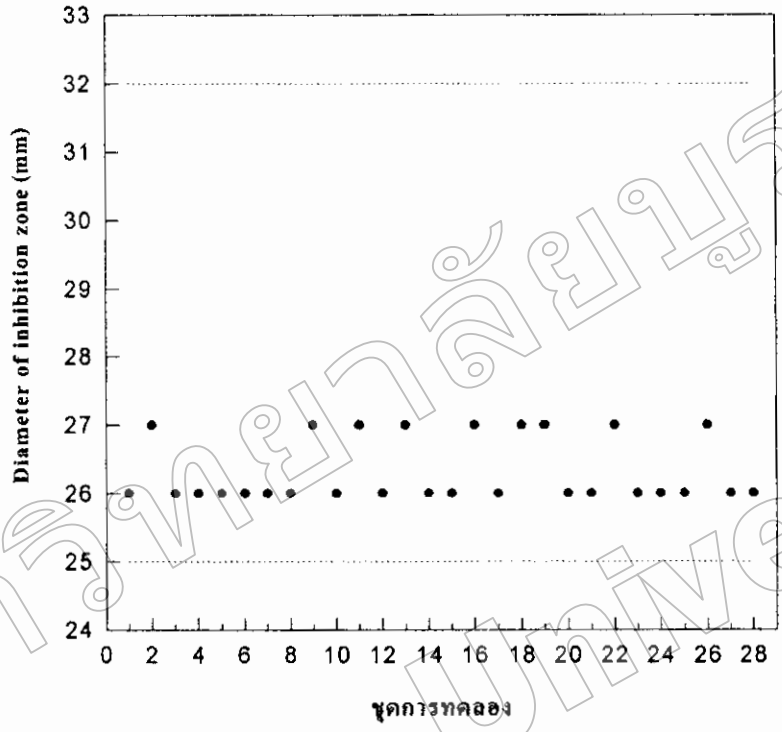
ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	ซ้ำที่	การเจริญของ *E. coli* บนอาหารที่มีส่วนสกัดเอทานอลของลำบิดดง ที่ความเข้มข้นต่างๆ (µg/ml)								
		ใบ				กิ่ง				-ve control
		6400	3200	1600	MIC (µg/ml)	6400	3200	1600	MIC (µg/ml)	
20	1	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
	2	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
	3	N	G	G	6400	G	G	G	Nf	G
ST	1	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	2	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G
	3	N	G	G	6400	N	G	G	6400	G

หมายเหตุ : N, no growth ; G, growth ; -ve control, MHA + EtOH 30.4% (9 : 1) ; ST, *E. coli* ATCC 25922 ; Nf , not found

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในการควบคุมคุณภาพของการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 โดยวิธี disc diffusion ของแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้ยาปฏิชีวนะ ceftazidime 30 μg/disc พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง Inhibition zone ของ ceftazidime 30 μg/disc ต่อ *E. coli* ATCC 25922 ในแต่ละชุดการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 25 – 32 มิลลิเมตร ตามมาตรฐานของ NCCLS (กราฟที่ 1)



กราฟที่ 1 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone ของ ceftazidime disc เมื่อทดสอบกับ *E.coli* ATCC 25922 ในแต่ละชุดการทดลอง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ของส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของพืชที่พบบริเวณหมู่เกาะแสมสารจำนวน 14 ชนิด จากพืช 5 วงศ์ คือ Ebenaceae, Melastomataceae, Capparaceae, Guttiferae และ Rutaceae จำนวน 28 ตัวอย่าง โดยวิธี disc diffusion พบว่าส่วนสกัดเอทานอลจากพืชทุกชนิดที่บรรจุใน disc น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2000 μg/disc ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 แต่เมื่อนำส่วนสกัดเอทานอลทั้งหมดมาทดสอบโดยวิธี broth dilution พบว่าที่ความเข้มข้นสูงที่สุดที่ใช้ในการทดสอบ 6400 μg/ml มีเพียงส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดง (*Diospyros filipendula* Pierre ex Lec) เท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งและฆ่า *E. coli* ATCC 25922 ได้ โดยความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของส่วนสกัดจากใบและกิ่งของลำบิดดงที่ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 (MIC) มีค่าเท่ากับ 5600 μg/ml และ 4800 μg/ml ตามลำดับ และความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของส่วนสกัดจากใบและกิ่งของลำบิดดงที่ฆ่า *E. coli* ATCC 25922 (MBC) มีค่าเท่ากับ 6400 μg/ml และ 5600 μg/ml ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดเอทานอลจากกิ่งของลำบิดดงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 มากกว่าส่วนสกัดเอทานอลจากใบของลำบิดดง เมื่อนำส่วนสกัดเอทานอลดังกล่าวไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรงพยาบาลสมเด็จฯ ณ ศรีราชา จำนวน 20 ไอโซเลท โดยวิธี agar dilution พบว่าส่วนสกัดเอทานอลจากกิ่งของลำบิดดงที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด 6400 μg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยเพียง 13 ไอโซเลท ในขณะที่ส่วนสกัดเอทานอลจากใบของลำบิดดงที่ความเข้มข้นเดียวกันมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวถึง 18 ไอโซเลท แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ในส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดงอาจจะเป็นสารคนละชนิดกัน

อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของพืช 14 ชนิด ซึ่งอยู่ในวงศ์ Ebenaceae, Melastomataaceae, Capparaceae, Guttiferae, และ Rutaceae รวม 28 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 โดยวิธี disc diffusion พบว่าส่วนสกัดเอทานอลของพืชทั้งหมด 28 ตัวอย่าง ที่มีปริมาณของส่วนสกัดใน disc น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2000 ไมโครกรัม/disc ไม่ปรากฏ inhibition zone การที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะส่วนสกัดเอทานอลไม่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 หรือส่วนสกัดเอทานอลมีสารออกฤทธิ์

ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 แต่ความเข้มข้นของส่วนสกัดที่แพร่ออกมาไม่เพียงพอที่จะแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ได้ อาจเนื่องมาจากสารต้านจุลชีพที่พบในพืชชนิดนั้นๆ มีความสามารถในการแพร่ผ่านตัวกลางที่เป็นวุ้นในอาหารที่ใช้ทดสอบได้ต่ำมาก หรือไม่สามารถแพร่กระจายได้ ซึ่งสารแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติในการแพร่ผ่านตัวกลางที่แตกต่างกัน (มาลิน, 2540) หรือนอกจากนี้แล้ววุ้นที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ polysaccharide ซึ่งมีประจุเป็นลบ เนื่องจากมีหมู่ acidic sulfate บน polysaccharide ดังกล่าว ดังนั้นถ้าสารต้านจุลชีพที่มีอยู่ในส่วนสกัด เป็นสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น cationic ก็จะสามารถจับกับหมู่ acidic sulfate ที่อยู่ในวุ้นได้ ทำให้การออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพลดลง (นันทนา, 2534) ในการทดลองนี้ใช้ปริมาณส่วนสกัดสูงสุดทดสอบเพียง 2000 ไมโครกรัม/disc นั้นอันเนื่องมาจากขีดความสามารถในการละลายในตัวทำละลายของส่วนสกัดและขีดความสามารถเรื่องความจุของแผ่น disc มาตรฐานที่จุได้เพียง 20 µl ในการควบคุมคุณภาพของการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 โดยวิธี disc diffusion ของแต่ละชุดการทดลองโดยใช้ยาปฏิชีวนะ ceftazidime 30 µg/disc พบว่าค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง Inhibition zone ของ *E. coli* ATCC 25922 ในแต่ละชุดการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 25 – 32 มิลลิเมตร ตามมาตรฐานของ NCCLS (กราฟที่ 1) และสาเหตุที่ใช้วิธี disc diffusion เป็นวิธีแรกในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อส่วนสกัดเอทานอลจากพืชชนิดต่างๆ นั้นเพราะวิธี disc diffusion สามารถทำได้สะดวกรวดเร็วอ่านผลได้เร็วและในการทดสอบ disc ของส่วนสกัดนั้นสามารถเตรียมได้หลายชนิดและในปริมาณต่างๆ กันในการทดสอบครั้งเดียว

จากนั้นจึงนำส่วนสกัดทั้งหมดมาทดสอบหาส่วนสกัดเอทานอลที่สามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีที่สุดโดยใช้วิธี broth dilution เพื่อแก้ปัญหาเรื่องความสามารถในการแพร่ผ่านตัวกลางของสารต้านจุลชีพเพราะวิธีนี้เชื้อที่ทดสอบจะสัมผัสโดยตรงกับสารต้านจุลชีพที่ละลายอยู่ในอาหารที่เป็นของเหลวและแก้ปัญหาเรื่องการเพิ่มความเข้มข้นเนื่องจากวิธี broth dilution ไม่มีปัญหาเรื่องความจุเหมือนในแผ่น disc จากการทดลองพบว่าส่วนสกัดที่ให้ผลในการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 คือ ส่วนสกัดจากใบและกิ่งของลำบิดดงที่ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดเท่ากับ 6400 µg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและฆ่า *E. coli* ATCC 25922 ได้ แต่พบว่าผลจากการทำ 2 – fold serial dilution นั้นใช้ความเข้มข้นจาก 3200 ถึง 6400 µg/ml ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่กว้างมาก จึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อหาค่า MIC และ MBC ที่มีค่าใกล้เคียงกับค่าจริงมากที่สุดซึ่งอาจอยู่ในช่วง 3200 ถึง 6400 µg/ml ซึ่งทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยวิธี broth dilution โดยแบ่งความเข้มข้นจาก 3200 ถึง 6400 µg/ml เป็น 3200, 4000, 4800, 5600 และ 6400 µg/ml ตามลำดับ จากการทดสอบพบว่า ส่วนสกัดจากใบของลำบิดดงให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 5600 และ 6400 µg/ml ตามลำดับ และส่วนสกัดจากกิ่งของลำบิดดงให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 4800

และ 5600 μg/ml ตามลำดับ อีกประการหนึ่งจะเห็นได้ว่าค่า MIC ที่ต่ำสุดมีความเข้มข้นสูงถึง 4800 μg/ml จึงทำให้อธิบายได้อีกข้อหนึ่งว่าทำไมการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion จึงไม่ได้ผล เพราะปริมาณส่วนสกัดของ disc ที่ใช้ทดสอบสูงสุดเพียง 2000 ไมโครกรัม/disc ในการทดสอบด้วยวิธี broth dilution นั้นในบางครั้งอาจประสบกับปัญหาเรื่องของการอ่านผล เพราะบางครั้งสีของอาหารหรือสีของส่วนสกัดที่ใช้อาจมีความเข้มมากจนไม่สามารถอ่านผลด้วยสายตาได้

จากนั้นจึงนำส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดงไปทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลสมเด็จฯ ณ ศรีราชา จำนวน 20 ไอโซเลทโดยวิธี agar dilution การที่เลือกใช้วิธีนี้ในการทดสอบเพราะว่าในความเข้มข้นหนึ่งๆ นั้นสามารถทดสอบกับเชื้อได้หลายตัวอย่าง และไม่มีปัญหาเรื่องการแพร่ของส่วนสกัดและเรื่องของความจุของส่วนสกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถึงแม้ในการเตรียมจะยุ่งยากกว่าวิธีอื่นๆ ผลการทดสอบพบว่าส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดงที่ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดเท่ากับ 6400 μg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลสมเด็จฯ ณ ศรีราชาได้ จำนวน 18 และ 13 ไอโซเลท ตามลำดับ พบว่าส่วนสกัดเอทานอลของลำบิดดงจากส่วนใบมีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลสมเด็จฯ ณ ศรีราชาได้ดีกว่าส่วนสกัดเอทานอลจากกิ่ง ซึ่งจะเห็นได้ว่าในพืชแต่ละส่วนและในแต่ละชนิดนั้นจะให้ผลการทดสอบที่ไม่เหมือนกัน ซึ่งสารออกฤทธิ์ในส่วนสกัดเอทานอลจากใบและกิ่งของลำบิดดงอาจมีสารต้านจุลชีพต่างชนิดกันหรืออาจเป็นสารชนิดเดียวกันแต่มีปริมาณต่างกัน ผลการทดสอบที่ได้ในลักษณะนี้แสดงให้เห็นว่าสารต้านจุลชีพซึ่งเป็นสารเคมีที่พบในพืชแต่ละชนิดจะมีอยู่เฉพาะในบางส่วนหรือบางชนิดและในปริมาณที่ต่างกันไปของพืชแต่ละชนิด (วันดี, 2539)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าตัวทำละลายที่ใช้ในครั้งนี้มีเพียงเอทานอลและน้ำเพียงสองตัว และจากการทดลองพบว่าส่วนสกัดมีขีดจำกัดในเรื่องของการละลายในตัวทำละลายทำให้การทดสอบด้วยวิธี disc diffusion มีปัญหาเรื่องปริมาณของส่วนสกัดใน disc ฉะนั้นจึงควรมีการใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นในการสกัดเพิ่มเติม เพราะตัวของสารต้านจุลชีพบางชนิดอาจไม่ละลายในเอทานอลหรือในน้ำก็ได้

จะเห็นได้ว่าการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นของส่วนสกัดเอทานอลจากพืช 14 ชนิด ซึ่งยังไม่มีรายงานการทำวิจัยมาก่อน จึงไม่มีรายงานการวิจัยที่สนับสนุนผลการทดลองครั้งนี้ และความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้เป็นความเข้มข้นของส่วนสกัดเพียงหยาบๆ การจะทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ต้องทำการสกัดสารต่อให้มีความบริสุทธิ์ซึ่งจะเป็นการศึกษาในขั้นตอนต่อไป ข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้คงเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพืชทั้ง 14 ชนิดนี้ เพื่อเป็นประโยชน์ในการป้องกันและรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อจากจุลินทรีย์ต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ข้อผิดพลาดในการทดลอง

1. ปริมาณเชื้อที่ใช้ทดสอบจะใช้การเทียบความขุ่นกับสารละลาย McFarland เบอร์ 0.5 ด้วยสายตา ซึ่งอาจเกิดความคลาดเคลื่อนในการทดสอบได้

2. ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองเป็นความเข้มข้นของส่วนสกัดหยาบเท่านั้น จึงอาจทำให้ผลที่ได้มาคลาดเคลื่อนได้

ข้อเสนอแนะ

1. สารต้านจุลชีพที่พบในพืชแต่ละชนิดอาจจะมีอยู่เพียงบางส่วนของพืชเท่านั้น ดังนั้นควรจะทำการศึกษาในส่วนอื่นๆ ด้วย เช่น ราก ดอก และผล

2. ในการสกัดสารควรใช้ตัวทำละลายที่มีราคาถูกและหาง่ายก่อน เช่น น้ำ

3. ในการสกัดสารควรมีการใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นๆ ด้วยเพราะสารต้านจุลชีพบางชนิดอาจไม่ละลายในเอทานอล

4. การเจือจางส่วนสกัดด้วยวิธี two-fold serial dilution อาจให้ค่าความเข้มข้นของส่วนสกัดในช่วงที่กว้างเกินไป ซึ่งค่า MIC และ MBC ที่ได้อาจไม่ถูกต้องตามความเป็นจริง

5. ในการทดลองด้วยวิธี agar dilution ต้องระวังเรื่องอุณหภูมิของอาหาร และส่วนสกัดให้ดีเพราะสารต้านจุลชีพอาจถูกทำลายด้วยความร้อนได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เอกสารอ้างอิง

1. กนกรัตน์ ศิริพานิชกร. **โรคติดเชื้อ**. กรุงเทพฯ : โฮลิสติก พับลิชชิ่ง, 2541
2. จริยา สินเดิมสุข, สมเกียรติ ดีกิจเสริมพงศ์, วีณา จารุปรีชาชาญ. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาโรคอุจจาระร่วงระหว่างใบฝรั่งและเปลือกมังคุด. **วารสารเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล** 2532 ; 16 : 32 – 35
3. เต็ม สมิตินันทน์. **ไม้มีค่าทางเศรษฐกิจของไทย**. กรุงเทพฯ : กรมป่าไม้, 2518
4. นันทนา อรุณฤกษ์. **การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปธ์**. กรุงเทพฯ : โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์, 2537
5. บัญญัติ สุขศรีงาม. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. กรุงเทพฯ : โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์, 2525
6. มาลิน จุลศิริ. **ยาต้านจุลชีพ**. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน, 2539
7. วันดี กฤษณะพันธ์. **สมุนไพรน่ารู้**. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2539
8. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. **สารานุกรมสมุนไพร**. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์, 2540
9. วิวัฒน์ จันทรสาธิต, สมเดช สายจิตต์บริสุทธิ์, อัครพงษ์ โชติค้ำวงศ์. **ฤทธิ์ในการต้านเชื้อของสมุนไพรไทย**. วิทยานิพนธ์. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยมหิดล, 2523
10. สมพนธ์ บุณยเคปต์, สมศักดิ์ โล่ห์เลขา. **การวินิจฉัยและการรักษาโรคติดเชื้อที่พบบ่อย**. กรุงเทพฯ : อักษรสัมพันธ์, 2532
11. โสภณ คงสำราญ, เชิดศักดิ์ ธีระบุตร, นงนุช ศรีปฐมวัฒน์ และคณะ. **แบคทีเรียทางการแพทย์**. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์พิฆเณศ, 2524
12. Baron E J, Peterson L R, Finegold S M. **Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology**. St.Louis : Mosby-Year Book, Inc, 1990
13. Buchanan R E, Gibbons N E. **Bergey' s of Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore : The William&Wilkins Company, 1974
14. Phengklai C. **Thai Forest Bulletin (Botany) No. 11**. Bangkok : Forest Herbarium, 1978
15. Gonzalez G A, Reyes R G, Braun A E, *et al.* Biological Activities of Some *Argyranthemum* Species. **Phytochemistry** 1997; 45 : 963 – 967
16. Irobi O N, Moo-Young M, Anderson W A. Antimicrobial Activity of Annatto (*Bixa orellana*) Extract. **International Journal of Pharmacognosy** 1996 ; 34 : 87 – 90
17. Kirmizigul S, Aml H, Ucar F, Akdemir K. Antimicrobial and Antifungal Activities of three New Triterpenoid Glycosides. **Phytotherapy Resaarch** 1996 ; 10 : 274 – 276
18. Lennette E H, Balows A, Hausler W J, Shadomy H J. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington DC. : American Society for Microbiology, 1985

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

19. Madubunyi I I. Antimicrobial Activity of The Constituents of *Garcinia kola* Seeds. **International Journal of Pharmacognosy** 1995 ; 33 : 232 – 237

20. Mahasneh A M, Abbas J A, El-Oglas A A. Antimicrobial of Extracts of Herbal Plants Used in The Traditional Medicine of Bahrain. **Phytotherapy Research** 1996 ; 10 : 251 – 253

21. Rao K S. Antimicrobial Activity of Some Medical Plants of Papua New Guinea. **International Journal of Phramacognosy** 1996 ; 34 : 223 – 225

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก

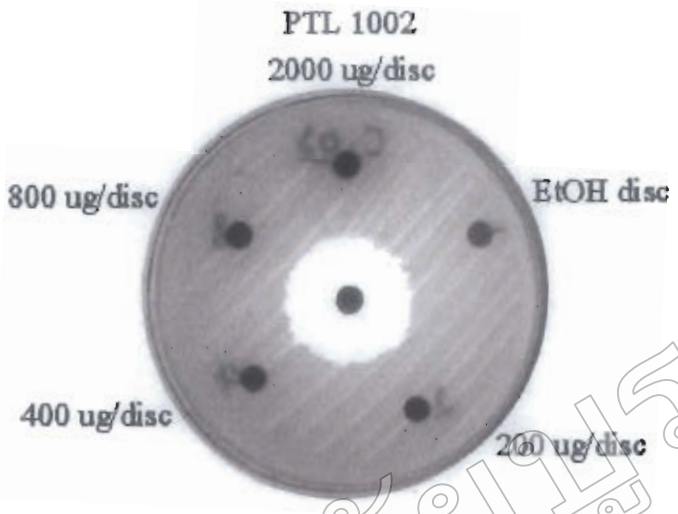
มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก

ภาพที่ 1 ลำบิดดง (*Diospyros filipendula* Pierre ex Lec)

(ที่มา : Chamlong Phengklai, 1978)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



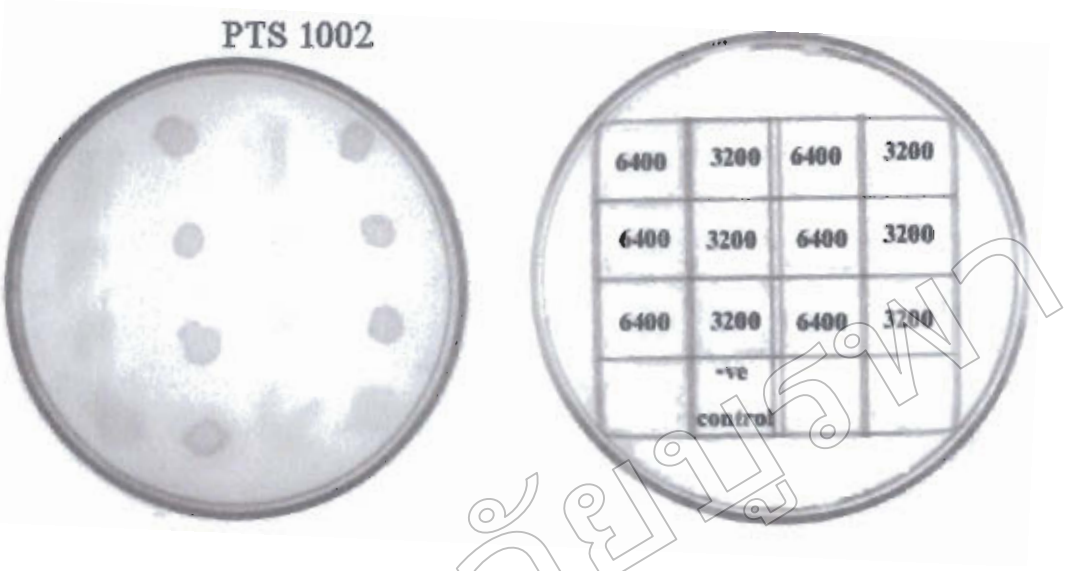
ภาพที่ 2 การทดสอบความไวของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อส่วนสกัดเอทานอลจากใบของลำบิดดง (PTL 1002) โดยวิธี disc diffusion

ผลการทดสอบ : ไม่ปรากฏ Inhibition zone ของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อส่วนสกัดเอทานอลจากใบของลำบิดดง

ภาพที่ 3 การทดสอบความไวของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อส่วนสกัดเอทานอลจากกิ่งของลำบิดดง (PTS 1002) โดยวิธี broth dilution

ผลการทดสอบ : ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการจริญของ *E. coli* ATCC 25922 เท่ากับ 6400 µg/ml

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาที่ 4 การ drop plate เพื่อหาค่า MIC ของส่วนสกัดเอทานอลจากกิ่งของลำบิดดง (PTS 1002)

ผลการทดสอบ : ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการจริญและฆ่า *E. coli* ATCC 25922 เท่ากับ 6400 µg/ml

ภาพที่ 5 การทดสอบความไวเพิ่มเติมของ *E. coli* ATCC 25922 ต่อส่วนสกัดเอทานอลจากกิ่งของลำบิดดง (PTS 1002) โดยวิธี broth dilution

ผลการทดสอบ : ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการจริญและฆ่า *E. coli* ATCC 25922 เท่ากับ 4800 และ 5600 µg/ml ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 6 การทดสอบความไวของ *E. coli* ATCC 25922 และ *E. coli* จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย ต่อส่วนสกัดเอทานอลจากใบของลำบิดดง (PTL 1002) โดยวิธี agar dilution

ผลการทดสอบ : ที่ความเข้มข้น 6400 µg/ml ของส่วนสกัดเอทานอลจากใบของลำบิดดง สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 และ *E. coli* จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจำนวน 18 ไอโซเลท

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Mueller - Hinton Agar (MHA)

ประกอบด้วย

Beef infusion from	300.0	กรัม
Casamino	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Bacto-agar	17.0	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมด 336 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH 7.3 ± 2.0 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Mueller - Hinton Broth (MHB)

ประกอบด้วย

Beef infusion from	300.0	กรัม
Casamino	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม

นำส่วนผสม 319 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้ละลายฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. Nutrient Agar (NA)

ประกอบด้วย

Beef Extract	3.0 กรัม
Peptone	5.0 กรัม
agar	15.0 กรัม

นำสารที่ชั่งได้แต่ละชนิด ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้ละลาย ปรับค่า pH 6.8 ± 0.2 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. Tryptic Soy Borth (TSB)

ประกอบด้วย

Tryptone	17.0 กรัม
Soytone	3.0 กรัม
Dextrose	2.5 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Dipotasssium phosphate	2.5 กรัม

นำสารที่ชั่งได้แต่ละชนิด ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH 7.3 ± 0.2 ต้มให้ละลาย ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่ง ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารเคมี

1. Mcfarland turbidity standard No. 0.5

ประกอบด้วย

Barium chloride ($BaCl_2 . 2H_2O$) 1 : 175% (w/v)	0.50	มิลลิลิตร
sulfuric acid (H_2SO_4) 1% V/V	9.95	มิลลิลิตร

นำสารละลาย 0.048 M $BaCl_2$ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับ 0.36 M H_2SO_4 ปริมาตร 9.95 มิลลิลิตร โดยนำสารละลายทั้งสองใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิดสนิท แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. 0.85 % Normal Saline

ประกอบด้วย

NaCl	0.85	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ชั่ง NaCl 0.85 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University