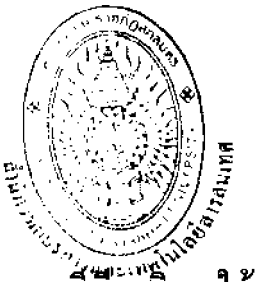


การศึกษาคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนของผ้าย้อมคราม

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

วิทยานิพนธ์

ของ

ปราชญ์สกล ช่วยสุดสกุลชัย

เสนอต่อมหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษา

ธันวาคม 2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

THE STUDY OF UNDERARM BACTERIAL INHIBITION PROPERTIES OF INDIGO DYED TEXTILES

By

PRADSAKON CHOUISUDSAKUNCHAI

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements for

The Master Degree of Science in Science Education

at Sakon Nakhon Rajabhat University

December 2009

All Rights Reserved Sakon Nakhon Rajabhat University

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษา

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนของผ้าย้อมคราม

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ ปราชญ์สกล ช่วยสุดสกุลชัย

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบ

(ดร. สำเร็จ คันธี)

..... กรรมการสอบและประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ดร.อุปถัมภ์ โพธิกนิษฐ์)

.....กรรมการสอบ

(ดร.ธงชุฑา สุวรรณประเสริฐ)

..... กรรมการสอบและกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อนุรัตน์ สายทอง)

..... กรรมการสอบ

(พันโทฉัตรมงคล คนขยัน) ผู้ทรงคุณวุฒิ

โครงการจัดตั้งบัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร.ประยูร บุญใช้)

ผู้อำนวยการโครงการจัดตั้งบัณฑิตวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

คณะกรรมการประจำสาขารับรองแล้ว

.....

(ดร. สำเร็จ คันธี)

ประธานสาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษา

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

เมื่อวันที่ เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2552

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งจาก ดร.อุปถัมภ์ โพธิกนิษฐ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และผศ.อนุรัตน์ สายทอง กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาแนะนำเสนอแนะ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่มาตลอดตั้งแต่ต้นจนสำเร็จเรียบร้อย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือด้วยดี

ขอขอบพระคุณ หอผ้าครามสกลนครที่ให้ทุนสนับสนุนบางส่วน ทำให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีและขอขอบพระคุณ นายแพทย์พัฒนพงษ์ วงศ์กาฬสินธุ์ ผู้อำนวยการโรงพยาบาลพระอาจารย์ฝั้น อาจาโร ที่ได้กรุณาให้ใช้สถานที่และเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ นางสายทองทิพย์ ช่วยสุดสกุลชัย และสมาชิกในครอบครัว ที่กรุณาให้การสนับสนุนให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจในการจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ปราชญ์สกล ช่วยสุดสกุลชัย

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

ชื่อเรื่อง การศึกษาคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนของผ้าย้อมคราม
ผู้วิจัย นายปราชญ์สกล ช่วยสุดสกุลชัย
กรรมการที่ปรึกษา ดร. อุปถัมภ์ โพธิกนิษฐ์
ผศ. อนุรัตน์ สายทอง
ปริญญา วท.ม. (วิทยาศาสตรศึกษา)
สถาบัน มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร
ปีที่พิมพ์ 2552

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติและปริมาณความสามารถต่ำสุด ของผ้าย้อมครามที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขน โดยใช้วิธีดิสก์ดิฟฟิวชันในการศึกษาความสามารถการยับยั้งการเจริญเติบโตโดยวิธีดูจาก inhibition zone การเตรียมการทดลองมี 5 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่หนึ่งเตรียมสารยับยั้ง ขั้นตอนที่สองการเตรียมแผ่นทดสอบ ขั้นตอนที่สามเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ขั้นตอนที่สี่เตรียมเชื้อเริ่มต้น และขั้นตอนที่ห้าทดสอบคุณสมบัติการยับยั้ง

ผลการวิจัยพบว่าแผ่นควบคุมที่หนึ่ง แผ่นควบคุมที่สอง แผ่นที่ย้อมคราม 2 ซ้ำ และแผ่นที่ย้อมคราม 4 ซ้ำ ไม่มี inhibition zone ส่วนแผ่นที่ชุบสารสกัดหยาบ แผ่นที่ย้อมคราม 6 ซ้ำ แผ่นที่ย้อมคราม 8 ซ้ำ แผ่นที่ชุบครามผงบริสุทธิ์ และแผ่นที่ชุบเนื้อคราม มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนพบ inhibition zone เกิดขึ้น โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 11.0 , 11.7, 12.3, 15.6 และ 18.3 มิลลิเมตรตามลำดับ โดยแผ่นที่ย้อม 6 ซ้ำ มีปริมาณความสามารถต่ำสุดต่อการยับยั้ง

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

TITLE The study of underarm bacterial inhibition properties of indigo dyed textiles.

AUTHOR Pradsakon Chouisudsakunchai

ADVISORS Dr. Auphatham Phothikanith

Asst.Prof. Anurat Saithong

DEGREE M.Sc.(Science Education)

INSTITUTE Sakon Nakhon Rajabhat University

YEAR 2009

ABSTRACT

The objective of this research was to study the inhibition properties and the minimal quantities of indigo dyed textiles to underarm bacteria. The observing zone of bacterial culture was monitored by disc diffusion method. The method has five step; 1. Prepare the inhibition substance, 2. Prepare the disc testing, 3. Prepare the bacterial nutrition, 4. Feed the bacteria and 5. Test the inhibition properties.

The results showed that there were no inhibition zone on the control discs and on the twice and four times of indigo dyed textile discs. The inhibition zone showed on six and eight times dyed textile discs, pure indigo powder dyed textile disc and indigo cake dyed textile disc with diameter 11.0 and 11.7, 12.3, 15.6 and 18.3 mm, respectively. The lowest capability of bacterial inhibition was the six time dyed textile disc.

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	สมมติฐานการวิจัย	3
	ขอบเขตของการศึกษา	3
	ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย	3
	นิยามศัพท์เฉพาะ	4
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
	เอกสารที่เกี่ยวข้อง	5
	ต้นคราม	5
	สารเคมีจากต้นคราม	9
	การใช้ครามเป็นยารักษาโรค	13
	สารเคมีของสีครามในกระบวนการทำสีครามธรรมชาติ	14
	การผลิตเนื้อคราม	17
	การเตรียมน้ำย้อม	18
	การย้อมสีคราม หรือการย้อมหม้อนิล	20
	ผิวหนัง	21
	เชื้อ *Bacillus subilis*	21
	อาหารเลี้ยงเชื้อ	23
	การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์	25
	การเก็บรักษาเชื้อให้บริสุทธิ์	26
	การทดสอบการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้าน	28
	กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งของสารเคมีต่อเชื้อแบคทีเรีย	31

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

บทที่		หน้า
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	33
	งานวิจัยในประเทศ	33
	งานวิจัยต่างประเทศ	36
3	วิธีดำเนินการวิจัย	38
	เชื้อทดสอบ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	38
	เชื้อทดสอบ	38
	อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	38
	สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	39
	วิธีการทดลอง	40
	ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมสารยับยั้ง	40
	การเตรียมสารสกัดหยาบ	40
	การเตรียมเนื้อคราม	40
	การเตรียมผ้าย้อมครามด้วยวิธีทางเคมี	40
	ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมแผ่นทดสอบ	42
	ขั้นตอนที่ 3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	42
	การเตรียม Mueller Hinton Agar	42
	การเตรียม Blood Agar	43
	การเตรียม Brain Heart Infusion Broth	43
	ขั้นตอนที่ 4 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น	44
	ขั้นตอนที่ 5 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้ง	44
4	ผลการทดลอง และอภิปรายผล	46
	ผลการทดลอง	46
	อภิปรายผล	48

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
5	สรุปผล และข้อเสนอแนะ	52
	สรุปผล	52
	ข้อเสนอแนะ	52
	บรรณานุกรม	54
	ภาคผนวก	56
	ภาคผนวก ภาพแสดงงานวิจัย	57
	ประวัติย่อผู้วิจัย	63

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ครามจากพืชสกุลต่าง ๆ 6 ชนิด	5
2	ครามสกุล *Indigaera* วงศ์ PAPILIONAEAE (LEGUMINOSAE) 13 ชนิด	6
3	ครามสกุล *Indigaera* (X= 8 ; 2n =16) 3 ชนิดที่ถูกใช้ประโยชน์อย่างมาก	7
4	สารเคมีในใบของครามชนิด *I. tinctoria* และ *I. arrecta*	9
5	สารเคมีที่พบในครามชนิดต่างๆ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการทดสอบความเป็นพิษ	10
6	การใช้ครามสกุลต่าง ๆ เพื่อเป็นยารักษาโรคในต่างประเทศ	13
7	สารที่เป็นองค์ประกอบของกลิ่นตัวบริเวณใต้วงแขนโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS	23
8	ปริมาณของเนื้อครามที่ใช้ในการย้อม	41
9	จำนวนของแผ่นทดสอบ	42
10	ตำแหน่งการวางแผ่นทดสอบในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ	45
11	ขนาดของ inhibition zone	48

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 ปฏิกิริยาของการแช่ใบครามสด 14
2 ปฏิกิริยาของการกวนน้ำคราม เพื่อตกตะกอนเนื้อคราม 15
3 ปฏิกิริยาการเปลี่ยน Indigo blue เป็น indigo white 15
4 ปฏิกิริยาการเปลี่ยน indigo white เป็น Indige blue 16
5 ปฏิกิริยารวมของการทำสีคราม 17
6 รูปร่าง การติดสี และสปอร์ภายใน (endospore) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* 22
7 ผลการทดสอบการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียต่อยาสารต้าน 30
8 ลักษณะของ inhibition zone ในจานเลี้ยงเชื้อ เกิดจากสารสกัดหยาบและ ผ้าย้อมครามทั้ง 4 ผืน..... 46
9 ลักษณะของ inhibition zone ในจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเกิดจากเนื้อคราม 47
10 ลักษณะของ inhibition zone ในจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเกิดจากครามผงบริสุทธิ์..... 47
11 กราฟแสดงค่าความสามารถจำนวนซ้ำของผ้าย้อมครามต่อการยับยั้ง 49
12 กราฟแสดงค่าความสามารถของปริมาณเนื้อครามต่อการยับยั้ง 50
13 ตัวอย่าง *Bacillus subtilis* ในหลอดทดลองของอาหารเลี้ยงเชื้อ 57
14 ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อผงสำเร็จรูป 57
15 ตัวอย่างลักษณะโคโลนี *Bacillus subtilis* ใน blood agar 58
16 ตัวอย่างผ้าย้อมคราม 58
17 ตัวอย่างครามผงบริสุทธิ์ 59
18 ตัวอย่างเนื้อคราม 59
19 ตัวอย่างน้ำแช่ใบคราม 60
20 ตัวอย่างน้ำปูนใส 60
21 ตัวอย่างเครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave) 61
22 ตัวอย่างเครื่องอบแห้ง (Hot air oven)..... 61
23 แสดงตัวอย่างเครื่องบ่มเพาะเชื้อ(Incubator) 62
24 แสดงตัวอย่างเตาให้ความร้อน(Hot plate) 62

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

การทำสีครามและย้อมครามธรรมชาติมีมานานกว่า 5,000 ปี ในเขตร้อนของโลก เช่นอเมริกากลาง แอฟริกา เอเชียตะวันออกกลาง เอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งจีน ญี่ปุ่น และเกาหลี โดยแต่ละแห่งได้สีครามจากพืชต่างชนิดกัน แต่กระบวนการทำสีและการย้อมสีครามคล้ายคลึงกัน และอีกเรื่องหนึ่งที่คล้ายคลึงกันก็คือแต่ละแห่งทำสีครามน้อยลงไป ตั้งแต่ช่วงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 เมื่อเข้าสู่ศตวรรษที่ 20 มีการทำสีครามและย้อมครามในชนบทบางแห่งเท่านั้น การทำสีครามในประเทศไทยมีสถานการณ์ไม่ต่างจากที่อื่นๆ แต่เมื่อประเทศไทยประสบปัญหาสิ่งแวดล้อม ปัญหาเศรษฐกิจและปัญหาสังคม ทำให้ประชาชนส่วนหนึ่งหันมาสนใจผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ซึ่งสีครามและผ้าย้อมครามเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอย่างหนึ่งที่เกิดได้ในชุมชน กระบวนการทำไม่ทำลายสุขภาพและสิ่งแวดล้อม ต่างจากสีย้อมจากสารเคมีสังเคราะห์ซึ่งส่วนใหญ่เป็นออกไซด์ของโลหะหนัก และโลหะหนักหลายชนิดเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นผู้ที่ตระหนักในสุขภาพของชุมชนจึงหันมานิยมสีย้อมธรรมชาติ อีกทั้งสร้างรายได้แก่ครอบครัวและชุมชน

ผ้าย้อมครามเป็นผลิตภัณฑ์ที่โด่งดังของจังหวัดสกลนคร เป็นสินค้าที่ทำรายได้ให้แก่ผู้ผลิตและเพิ่มอาชีพให้แก่ครอบครัวและชุมชน ด้วยคุณสมบัติที่เด่นของผลิตภัณฑ์ผ้าย้อมครามกล่าวกันว่า ในบรรดาสีย้อมธรรมชาตินี้สีครามได้รับการยอมรับว่าเป็นราชาแห่งสีย้อม เพราะสีสด ติดทนนานไม่ต้องใช้สารช่วยติดใดๆ แต่มีเทคนิคการทำที่หลากหลายละเอียดอ่อน ซับซ้อน จึงเป็นลิขสิทธิ์ของคนที่ขยันและใจรักจริงๆ และต้องใช้ภูมิปัญญาที่สั่งสมกันมาหลายปีและใช้วัตถุดิบเฉพาะอย่าง จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ผ้าย้อมครามมีราคาสูงกว่าผ้าอย่างอื่น ยังมีคำบอกเล่าจากผู้ใช้ผ้าย้อมครามว่าเมื่อใส่ผ้าย้อมครามแล้วทำให้กลิ่นตัวลดน้อยลงกว่าสวมใส่ผ้าอย่างอื่น และรายงานการศึกษาจากประเทศจีนพบว่าสารอินดิรูบินที่มีในใบครามสามารถรักษาการอักเสบและติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส (นิตยา ชะนะญาติ. 2544 : 19) และ

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

มีการศึกษาของทีมวิจัยจากประเทศเกาหลี พบว่าอินดิโกและอินดิรูบินสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียสองชนิดคือ Bacillus *subtilis* และ *Escherichia coli* (ซี คุง ลิม และคณะ., 2005 : Arailable http: // aem.asm.org / cgi / content / full / 71 /12 / 7768)

กลิ่นตัวเป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นกับทุกคนอยู่ที่ว่าแต่ละคนจะมีกลิ่นตัวมากน้อยแค่ไหนซึ่งทำให้เป็นที่น่ารังเกียจแก่บุคคลรอบข้าง เนื่องจากในชีวิตประจำวันของมนุษย์มีกิจกรรมต่างๆ มากมายทำให้ร่างกายเกิดสารคัดหลั่งที่มาจากต่อมเหงื่อ (Apocrine gland) ที่บริเวณรักแร้เป็นส่วนใหญ่ แต่ปกติจะไม่มีกลิ่นแรงยกเว้นจะมีแบคทีเรียเจริญเติบโตทำให้เกิดกลิ่นแรงได้ กล่าวคือ แบคทีเรียจะใช้สารที่ขับออกมาจากต่อมเหงื่อในการสร้างพลังงานแล้วขับของเสียออกมาหลายชนิด นอกจากนี้ต่อมไขมันจะผลิตความมันออกมาตามรูขุมขนโดยเฉพาะเวลาวิ่งเล่น เดินเร็ว อยู่ในอากาศร้อน เหงื่อออกมาจากรูเปิดของต่อมเหงื่อซึ่งอยู่ไม่ห่างจากรูเปิดขุมขนมากนัก เมื่อทั้งความมันและเหงื่อไหลซึมออกมาจากรูเปิดบนผิวหนังสักระยะหนึ่งและมีสภาพแวดล้อมที่อับชื้นพอเหมาะจะทำให้แบคทีเรียต่างๆ ที่อาศัยอยู่บนผิวหนังเจริญเติบโตการแพร่พันธุ์ออกมาจำนวนมากพร้อมทั้งส่งกลิ่นเหม็นออกมาเป็นกลิ่นตัว โดยมีแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่เป็นสาเหตุของปัญหานี้คือแบคทีเรียที่ชื่อ *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบอยู่บนผิวหนังโดยเฉพาะบริเวณใต้วงแขน (พูนฉวี สมบัติศิริ. 2548 : 44)

ด้วยเหตุผลข้างต้นเพื่อยืนยันในคุณสมบัติของผ้าย้อมคราม ผู้วิจัยจึงออกแบบการศึกษาคุณสมบัติของผ้าย้อมครามในการยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนโดยใช้วิธีดิสก์ดิฟฟิวชัน(Disc diffusion method) ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโต ดังนั้นจากผลงานการวิจัยนี้จะช่วยยกระดับและรับรองคุณภาพผลิตภัณฑ์ผ้าย้อมครามให้มีคุณค่าสูงขึ้นและเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาขั้นต่อๆ ไปในอนาคตที่เกี่ยวข้องกับคราม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อทราบถึงคุณสมบัติทางด้านการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนของผ้าย้อมครามโดยมีวัตถุประสงค์ของการศึกษาได้แก่

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของผ้าย้อมคราม เนื้อคราม ครามผงบริสุทธิ์และสารสกัดหยาบจากใบครามในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขน

2. เพื่อศึกษาปริมาณความสามารถต่ำสุดต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนของผ้าย้อมคราม

สมมติฐานการวิจัย

ผ้าย้อมคราม เนื้อคราม ครามผงบริสุทธิ์และสารสกัดหยาบจากใบครามมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขน

ขอบเขตของการศึกษา

1. ใบครามสดที่ใช้ศึกษาเป็นครามงอ นำมาทำเป็นสารสกัดหยาบโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย และเตรียมเนื้อครามเพื่อนำไปเป็นสารยับยั้ง

2. แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาคือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3. ศึกษาโดยใช้แผ่นทดสอบวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เตรียมจากผ้าทอเข็นมือชุบสารสกัดหยาบจากใบคราม ผ้าทอเข็นมือชุบเนื้อคราม ผ้าทอเข็นมือชุบครามผงบริสุทธิ์ และผ้าทอเข็นมือย้อมครามจากน้ำย้อมครามเปียกจากศูนย์ย้อมคราม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร โดยการเตรียมสีด้วยวิธีทางเคมี

4.ศึกษาคุณสมบัติของผ้าย้อมคราม ในแง่ของการมีคุณสมบัติต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขน ซึ่งศึกษาในระบบการเลี้ยงเชื้อภายในจานเลี้ยงเชื้อทำการวิเคราะห์คุณสมบัติดังกล่าว โดยวิธีการแพร่ผ่านแผ่นผ้าทอเข็นมือโดยวิธีดิสก์ดิฟฟิวชัน

5. อาหารเลี้ยงเชื้อในการศึกษาคือ Mueller Hinton Agar, Brain Heart Infusion Broth และ Blood Agar

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1. ทำให้ทราบคุณสมบัติของผ้าย้อมคราม สารสกัดหยาบจากใบคราม เนื้อคราม และครามผงบริสุทธิ์ ในการยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขน

2. ทำให้ทราบความสามารถต่ำสุดต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนของผ้าย้อมคราม

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

3. ทำให้ได้ข้อมูลเพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ผ้าย้อมครามเพื่อใช้ป้องกันการเกิดกลิ่นตัวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย

4. ยกระดับและรับรองคุณภาพผลิตภัณฑ์ผ้าย้อมครามซึ่งเป็นภูมิปัญญาอันล้ำค่าของท้องถิ่น ทำให้มีคุณค่าเพิ่มมากขึ้น

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. Inhibition zone หมายถึง บริเวณยับยั้งไม่มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และมีลักษณะใสเป็นวงกลมรอบแผ่นทดสอบ

2. แบคทีเรียบริเวณใต้วงแขน หมายถึง แบคทีเรียที่ชื่อ *Bacillus subtilis* ATCC6633

3. ผ้าทอเข็นมือ หมายถึง เส้นใยของฝ้ายที่นำมาทอเป็นผ้าโดยใช้คนทำ

4. สารสกัดหยาบ หมายถึง น้ำกรองจากการแช่ใบครามสดด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5. แผ่นควบคุมที่หนึ่ง หมายถึง แผ่นทดสอบวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เตรียมจากผ้าทอเข็นมือไม่ได้ชุบสารยับยั้ง

6. แผ่นควบคุมที่สอง หมายถึง แผ่นทดสอบวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เตรียมจากผ้าทอเข็นมือชุบน้ำปูนใส

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

ต้นคราม

ต้นคราม เป็นไม้พุ่มสูงประมาณ 1-2 เมตร ชอบขึ้นในดินร่วนซุย สารอินทรีย์มากและชอบแดดจัดแต่ไม่ชอบน้ำฝนปริมาณมากและไม่ทนน้ำท่วมขังจึงเติบโตได้ในระดับสูงกว่าระดับน้ำทะเล 1,650-2,000 เมตร พบโดยทั่วไปในธรรมชาติเช่น ในทุ่งร้าง ข้างถนน ริมน้ำและทุ่งหญ้า มีอยู่ด้วยกันหลายชนิดหลายพันธุ์ดังนี้

1. ชนิดของคราม

ครามเป็นพืชสกุล *Indigofera* ซึ่งมีทั้งหมดราวๆ 700 ชนิด ส่วนใหญ่กำเนิดในเขตร้อนแถบแอฟริกาและตอนใต้ของหิมาลายา ประมาณ 40 ชนิด กำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปัจจุบัน *Indigofera* ส่วนใหญ่ถูกปลูกกระจายอยู่ในเขตร้อนทั้งหมดครามที่ถูกใช้ประโยชน์อย่างมากและโดดเด่นมีอยู่ 3 ชนิดในประเทศไทยมีข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของครามราวๆ 20 ชนิด ดังแสดงในตาราง 1 และ 2

ตาราง 1 คราม จากพืชสกุลต่างๆ 6 ชนิด

ชื่อท้องถิ่น	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	ลักษณะต้น
ฮ่อม,ฮ่อมเมือง	*Baphicacanthus cusia* Brem.	Acanthaceae	ล้มลุก
ครามแจะ	*Tetraglochidiu bibracteatum* (B1.)	Acanthaceae	พุ่มเตี้ย
ครามเถา (เปิก)	*Marsdenia tinctoria* R.	Asclepiadaceae	พุ่ม
ครามน้ำ	*Breynia retusa* Alston	Euphorbiaceae	พุ่มเลื้อย
ครามป่า	*Caryopteris paniculata* Clarke	Verbenaceae	
	Tephrosia purpurea Pers.	Leguminosae	

(อนุรัตน์ สายทอง. 2543: 9)

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

ตาราง 2 ครามสกุล *Indigofera* วงศ์ PAPILIONACEAE (LEGUMINOSAE) 13 ชนิด

ชื่อท้องถิ่น (สถานที่)	ชื่อชนิดและนักวิจัย	ลักษณะต้น
จุยอาเหมื่อ (กระเหรี่ยงเชียงใหม่)	*caloneura* Kurz *US/S*	-
ครามดอย (ภาคเหนือ)	*elliptica* Roxb. *S*	พุ่ม
ครามขน (เชียงใหม่)	*hirsute* Linn. *H*	ล้มลุก
ครามเขา (เชียงใหม่)	*lacei* Craib *S*	พุ่ม
จ๊าผักชี (เชียงใหม่) โสนนก (นครสวรรค์)	*siamensis* Hoss. *S*	-
ครามป่า (ภาคเหนือ ภาคกลาง) ปายเสมา (ภาคเหนือ) ไพ่สะเม่า (ลำพูน)	*sootepensis* Craib *S*	พุ่ม
ครามเครือ (เชียงใหม่)	*spicata* Forsk. *TrH*	เลื้อย
บ่าหิ่งเม่น (เชียงใหม่)	*squalida* Prain *S*	-
ครามเถื่อน (เชียงใหม่) ครามใหญ่ (อุบลราชธานี)	*suffruticosa* Mill. *US/S*	พุ่มเล็ก
คราม (สามัญทั่วไป) นะฆอ (กระเหรี่ยงแม่ฮ่องสอน)	*tinctoria* Linn. *ExS*	พุ่ม
ลูกพวน,โสนเถา (กาญจนบุรี) ลูกอึ่งเล็ก (ปราจีนบุรี)	*trifoliata* Linn. *TrH*	-
ชะคราม (สามัญทั่วไป) ช้าคราม (สุโขทัย)	*uncinata* Roxb. *S*	-
ครามช้าง (แม่ฮ่องสอน) ครามหลวง (ลำปาง) หน่อคอมี (กะเหรี่ยงแม่ฮ่องสอน)	*zollingeriana* Mig. *S/ST*	พุ่มยืนต้น

(อนุรัตน์ สายทอง. 2543 : 10)

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

ครามที่ให้ประโยชน์มากและเป็นที่รู้จักแพร่หลายมีอยู่ 3 ชนิด มีลักษณะและถิ่นที่กำเนิดดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ครามสกุล *Indigofera* (X = 8 ; 2n = 16) 3 ชนิดที่ถูกใช้ประโยชน์อย่างมาก

ชนิดของคราม	ชื่ออื่นๆ และถิ่นที่กำเนิด	ลักษณะ
1. *Indigofera arrecta*	ชื่อ Natal-indigo, Bengal-indigo Java-indigo (En). Indonesia : tom atal, tom katemas (Javanese) ถิ่นกำเนิด อยู่แถบตะวันออกและแถบใต้ของแอฟริกาถูกนำเข้าไปปลูกในลาว เวียตนาม ลูซอนของฟิลิปปินส์ สุมาตรา ชวา ซัมบา และฟลอเรสของอินโดนีเซีย	ไม้พุ่มสูงถึง 3 เมตรขนาดของดอกยาว 5 มิลลิเมตร ขนาดของผลหรือฝักยาว2-2.5 เซนติเมตรลักษณะฝักตรงภายในฝักมี 6-8 เมล็ด
2. *I.suffruticosa* spp.*quatemalensis* *I.suffruticosa* spp. *Suffruticosa*	ชื่อ Guatemala-indigo (En).Indonesia : tom presi Indonesia : taem-taem, tagom-tagom, tom cantik. Philippines : tina-tinaan (Tagalog), tayam (Bisaya,). Thailand: khraam- thucan (Sham-Chaiang mai) khraam yai (Ubon Ratchathani) ถิ่นกำเนิด อยู่แถบอเมริกามีปลูกอยู่บ้างในชวาของอินโดนีเซีย	ไม้พุ่มสูงถึง 2.5 เมตร ชนิด suffruticosa มีขนาดของดอกยาว 5 มิลลิเมตรฝักโค้งภายในฝักมี 4-6 เมล็ด ส่วนชนิด quatemalensis มีดอกขนาดเล็กกว่าคือยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร ฝักตรงภายในฝักมี1 - 3 เมล็ด
3. *I. tinctoria*	ชื่อ Common indigo. Indian indigo (En). Indonesia : tom Jawa, tarum alus, tarum aju. Malaysia : nila, tarum. Philippines : tagung-tagung (Bisaya), taiom (llokano), taiung (Pampango). Combodia : trom. Laos : khaam. Thailand : khraam (general), na-kho (Karen, Mae Hong Son), Vietnam : cham, cham nhuom. ถิ่นกำเนิด คาดว่ากำเนิดในเอเชียและกระจายไปทั่วในเขตร้อน	ไม้พุ่มสูงราวๆ1เมตร ขนาดของดอกยาว 5 มิลลิเมตร ฝักตรงหรือฝักโค้งเล็กน้อย ภายในฝักมี 7-12 เมล็ด

(อนุรัตน์ สายทอง. 2543 : 11)

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

2. การปลูก การดูแลและการเก็บใบคราม

2.1 การปลูก เตรียมพื้นที่ดอนน้ำไม่ท่วมขัง ดินร่วนซุยไม่อุ้มน้ำและแดดจัด เช่น พื้นที่ชายป่า หัวไร่ปลายนา ไถพรวนดินประมาณเดือนกุมภาพันธ์–มีนาคม หว่านเมล็ดครามให้ห่างหรือใช้วิธีหยอดหลุมเป็นแถวหลุมละ 3–4 เมล็ดแต่ละแถวห่างกันประมาณ 40–60 เซนติเมตร ย่างเข้าหน้าฝนเมล็ดครามจะงอกเป็นต้นเล็กๆ ค่อนข้างบอบบาง

2.2 การดูแล เมื่อครามงอกเป็นต้นเล็กๆ ต้องคายหญ้าทุกสัปดาห์ ต้นครามที่ใกล้กันเกินไปควรถอนทิ้งบ้างครามที่ห่างพอดีได้รับปุ๋ยและแดดอย่างเต็มที่กิ่งก้านกางออก ใบหนาสีเขียวเข้ม เมื่อครามอายุ 3–4 เดือน หรือสังเกตจากการออกดอกหรือตอนเช้าตรู่สังเกตเห็นสีน้ำเงินหยดใต้ต้นคราม แสดงว่าครามแก่จนให้สีครามได้แล้ว

2.3 การเก็บเกี่ยว ถ้าเป็นครามบ้านฝักตรง ใบค่อนข้างกลมกิ่งก้านกางออก ต้นเตี้ยใบแก่เกือบพร้อมกันทั้งต้น ไม่ค่อยมียอดอ่อนๆ และจะแก่เร็วกว่าครามงอ จะเก็บโดยวิธีเกี่ยวกิ่งก้านทั้งต้นเหลือเพียงตอซึ่งจะแตกกิ่งใบอีก และเก็บได้อีกหนึ่งครั้ง จึงเก็บครามพันธุ์นี้ได้ 2 ครั้งต่อการปลูก 1 ครั้งหรือในเวลา 1 ปี ครามบ้านมีอายุเพียงปีเดียว หากเป็นครามงอฝักโค้งใบค่อนข้างรีรูปไข่ ใบใหญ่กว่าครามบ้าน ต้นสูงกว่า มียอดอวบอ่อน การเก็บครั้งแรกให้เก็บใบแรก ที่แก่ก่อนไปใช้งาน ครั้งต่อไปตัดกิ่งล่างซึ่งใบส่วนใหญ่แก่แล้วครั้งต่อๆ ไปจึงตัดกิ่งถัดขึ้นไปครามงอแตกกิ่งใหม่ได้เรื่อยๆ เก็บโดยวิธีเดิมคือเก็บใบแก่ก่อนและไล่ตามใบส่วนบนไปเรื่อยๆ ปีหนึ่งๆ สามารถเก็บใบครามนี้ได้ถึง 12 ครั้ง และครามงอมีอายุถึง 2–3 ปี ช่วงเวลาที่เหมาะสมกับการเก็บครามแต่ละครั้งคือช่วงเช้าตรู่ก่อนพระอาทิตย์ขึ้นหากเก็บช่วงสายแดดจัดใบครามจะแห้งและกรอบง่ายควรสวมใส่เสื้อผ้าที่มิดชิดไปเก็บครามเพราะครามมีขนเล็กๆ มากมาย มองไม่เห็นแต่จะทำให้ระคายเคืองและคันตามเนื้อตัวมาก ประเทศอินเดียปลูกคราม *I. arrecta* มากให้ผลผลิตใบครามสูงกว่าชนิดอื่นๆ โดย *I. arrecta* ให้ผลผลิตใบครามปีละ 22–100 ตันต่อเฮกตาและผลิตเนื้อครามได้ 137- 325 กิโลกรัมต่อเฮกตาต่อปี ส่วน *I.tinctoria* ให้ผลผลิตใบครามปีละ 10–13 ตันต่อเฮกตา (Prosea 1992 : 83)

2.4 การเก็บเมล็ดพันธุ์ เก็บได้เมื่อฝักเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองเริ่มเป็นสีน้ำตาลเก็บทั้งฝักผึ่งแดดให้แห้งและเก็บในที่ร่ม อากาศถ่ายเท อย่าปล่อยไว้จนฝักเป็นสีดำคาต้นเมล็ดจะงอกยาก ก่อนนำไปหว่านหรือหยอดหลุมให้โขลกฝักครามเบาๆ พอให้แตกหรือแช่เมล็ดในน้ำ 2 วัน ตลุกขี้เถ้าไม้ก่อนเพื่อป้องกันแมลงรบกวน สำหรับ *Indigofera suffruticosa* ปลูกโดยวิธีตัดกิ่งปักชำ (Prosea 1992 : 82)

สารเคมีจากต้นคราม

ต้นคราม ประกอบด้วนสารเคมีหลายชนิด ใช้ประโยชน์ได้ทั้งเป็นยารักษาโรค เป็นสีย้อมและใช้เป็นปุ๋ย นอกจากนี้ยังพบสารเคมีบางกลุ่มมีพิษกับสัตว์ทดลองใบของครามประกอบด้วยสารเคมีต่างๆ คิดน้ำหนักร้อยละของครามแห้ง ดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 สารเคมีในใบของครามชนิด *I. tinctoria* และ *I. arrecta*

สารเคมี	ร้อยละจากน้ำหนักใบครามแห้ง	
	I. tinctoria	*I. arrecta*
ไนโตรเจน (N)	5.11	4.46
ไดฟอสฟอรัสเพนทอกไซด์ (P_2O_5)	0.78	0.02
โพแทสเซียมออกไซด์ (K_2O)	1.68	1.95
แคลเซียมออกไซด์ (CaO)	5.35	4.48

(อนุรัตน์ สายทอง. 2543 : 13)

นอกจากนี้ยังมีข้อมูลการวิจัยพบว่าครามชนิดต่างๆประกอบด้วยสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางเภสัชและมีพิษต่อสัตว์ทดลอง ดังแสดงในตาราง 5

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

ตาราง 5 สารเคมีที่พบในครามชนิดต่างๆ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการทดสอบความเป็นพิษ

ชนิดของคราม	สารเคมี	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	การทดสอบความเป็นพิษ
Indigofera tinctoria Linn.	degueline; deguelin, dehydro: galactomannan; hesperidin; histamine; indirubin; kaempferal; naringin; quercetin; rotenone; rutin; sorbose; stachyose; sumatrol; tephrosin.	ยับยั้งความเป็นพิษต่อตับ ขับน้ำดี แก้ท้องเสีย ยับยั้งพยาธิไส้เดือน กระตุ้นเม็ดเลือดขาว ยับยั้งเนื้องอก	สารสกัดส่วนเหนือ ดินด้วยเอทานอล 95 % หรือเอทานอล : น้ำ (1:1) ฉีดเข้าในช่องท้องของหนูถีบจักรมีค่าขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งมากกว่า 1 ก/กก การให้หนูถีบจักรกินในขนาด 6 ก./กก. เป็นเวลา 7 วัน ไม่พบความเป็นพิษ
I.hiruta Linn.	alanine; alanine,phenyl: arginine; aspartic acid; canavanine; cysteine; glutamic acid; glycine; gossypin; hesperidine;	ยับยั้งเนื้องอก	สารสกัดเมทานอล : น้ำฉีดเข้าช่องท้องในหนูถีบจักรตัวผู้ขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครั้งหนึ่งมีค่าเท่ากับ 46 มก./กก.

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

ตาราง 5 สารเคมีที่พบในครามชนิดต่างๆ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการทดสอบความเป็นพิษ (ต่อ)

ชนิดของคราม	สารเคมี	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	การทดสอบความเป็นพิษ
I.suffruticosa Mill.	canavanin; ∝ -D-glucose, 2-3-4-6-tetra-o-(3-nitro-propanoyl): indigo; indirubin; louisfieserone (5-6);(+)-D-pinitol;β-sitosteral.	ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านยีสต์ ฆ่าแมลง ฆ่าหอย	-
	Apollinine;ascorbic acid; benzoic acid,parahydroxy; betulinic acid; Caffeic acid; chalcone, β-hydroxy- benzofuran;cholesterol; coumestone, 3-9-dihydroxy-2- methoxy; coumestone,3-9-dihydroxy;cyanidin; deguelin; deguelin,dehydro; delphinidin; (-)-derricin, iso:dehydro; elliptone;flavanone, 5-7-dimethoxy-8-(2-3-epoxyflavonoid - 3-methyl-butyl); flavanone, 7-methoxy-8-(3-methoxy-3-methyl-butyl-1-enyl); flemichapparin B; flemichapparin C; giabranin,dimethyl; Kanjone; Karanjic acid,methyl; karanjin; lanceolatin A; lanceolatin B;linoleic acid; linolenic acid; lonchocarpin,iso; (-)-lonchocarpin, iso; lupeol; maackiain;(-)-maackiain; maxima isoflavone A;	ต้านเชื้อบิดมีตัวต้านเชื้อแบคทีเรียป้องกันฟันผุ ต้านเชื้อรา กระตุ้นเชื้อรา ฆ่าพยาธิ ฆ่าหอย ไล่แมลง แก้ปวด ต้านการอักเสบ กดระบบประสาทส่วนกลาง เสริมฤทธิ์บาร์บิทูเรต ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดความดันโลหิต ยับยั้งการงอกของพืช ยับยั้งการเป็นพิษต่อตับ กระตุ้นเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส และ กลูตาเมต-ออกซาโลอะวิเทตทรานส์มิเนส เพิ่มระดับบิลิรูบินในพลาสมาเป็นพิษต่อเซลล์	สารสกัดทั้งต้นด้วยเอทานอลละน้ำ ฉีดเข้าช่องท้องหนูถีบจักร ขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งมีค่าเท่ากับ350มล./กก. สารสกัดทั้งต้นด้วย เอทานอล (70%) ฉีดเข้าช่องท้องหนูถีบจักร ขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งมีค่า เท่ากับ 1.138 ก./กก. สารสกัดทั้งต้นด้วยเบนซินขนาด 100 ม./กก.ฉีดเข้าช่องท้องหนูขาว พบความเป็นพิษ

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

ตาราง 5 สารเคมีที่พบในคราม ชนิดต่างๆ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการทดสอบความเป็นพิษ (ต่อ)

ชนิดของคราม	สารเคมี	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	การทดสอบความเป็นพิษ
	Maxima isoflavone C; maxima isoflavone D; maximai soflavoneG; obovatin,O-methyl; oleic acid;palmitic acid ;palmitoleic acid; pongmol; pongamol methyl ether; pongamol, metyl;pongamol, O-methyl; protein; protocatechuic acid; purpureamethide; purpurenone;(+)-purpurin; purpuritenin; purpuriteninA; puprritenin B; quercetin; quercetin glucoside; rotenolone; rotenone; (a) – hydroxy; rutin; semiglabrin, pseudo; semiglabrinol; β-sitosterol;α-spinasterol;stearic acid; stigmasta-7-14-dien-3-β-ol;Stigmasterol;tephroglabrin;tephrone; tephrosia flavanone; tephrosin; tephrosin,iso; tepurindiol; terephthalic acid; n-tetratriacontane; α - toxicarol; triacontan-1-ol; ursolic acid		

(อนุรัตน์ สายทอง. 2543 : 14-16)

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

การใช้ครามเป็นยารักษาโรค

เมื่อ 40–50 ปีก่อน หากเกิดอาการฟกช้ำเนื่องจากหกล้มหรือตกจากที่สูง ญาติผู้ใหญ่จะนำเสื้อย้อมครามใส่หวดนึ่งข้าวเก่าที่ไม่ใช้แล้วนำไปนึ่งเหมือนกับนึ่งข้าวเหนียว พอไอน้ำผ่านออกมาจากปากหวดนึ่งข้าวจะนำเสื้อย้อมครามร้อนๆ นั้นม้วนเป็นก้อนประคบบริเวณที่ฟกช้ำพอความร้อนลดลง นำไปนึ่งอีกให้ร้อนและนำมาประคบซ้ำกระทำวันละ 2–3 ครั้ง เช้า–เย็น รอยฟกช้ำจะหายเร็วส่วนข้อมูลจากต่างประเทศใช้ส่วนต่างๆของครามรักษาโรคต่างๆ มากมาย ดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 การใช้ครามสกุลต่างๆ เพื่อเป็นยารักษาโรคในต่างประเทศ

ส่วนของคราม	วิธีใช้	รักษาโรค	ประเทศ
ทั้งหมด	ต้มดื่ม	มะเร็ง	จีน
ใบสด	ขยี้ทาภายนอก	หิด	จีน
ใบสด	คั้นเอาน้ำผสม Ectiptaprostrata ใช้ภายนอก	ใช้บำรุงเส้นผม	อินเดีย
ใบสด	แช่น้ำร้อนดื่ม	แก้โรคลมบ้าหมู	อินเดีย
ทั้งต้น	คั้นเอาน้ำดื่มหรือทาภายนอก	แก้พิษงู	โซมาเลีย
ราก	สกัดด้วยน้ำธรรมดาใช้ภายนอก	ส่งเสริมการปลูกผม	อินเดีย
ใบสด	ใช้ภายนอก คั้นน้ำดื่ม	หืด แก้พิษงู ไอกรน	อินเดีย
		ม้ามโตตับโต	อินเดีย
		ประสาท อาการเต้นถี่ของหัวใจ	
ใบสด	กินใบ ต้ม ดื่ม ใช้ภายนอก	โรคกระเพาะอาหาร	โซมาเลีย

(อนุรัตน์ สายทอง. 2543 : 17)

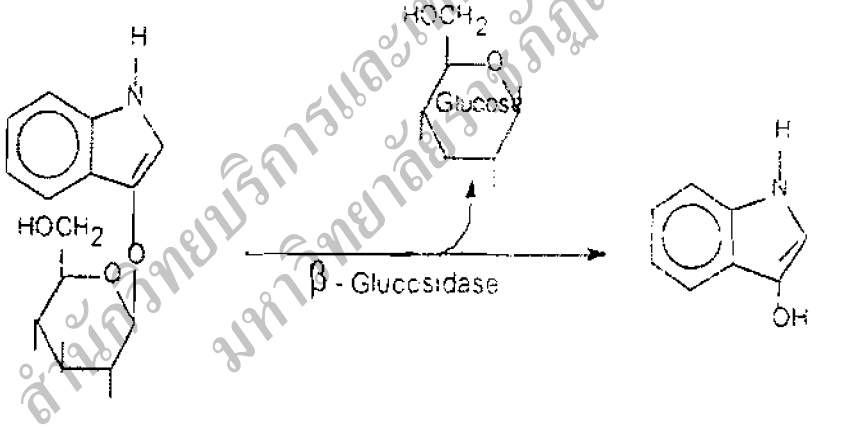
ในทางการแพทย์ของประเทศจีนใช้อินดิรูบินในการรักษาโรคเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดผิดปกติ รักษาการอักเสบและติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารต้านมะเร็งโดยจากการศึกษาพบว่า อินดิรูบินสามารถยับยั้งการเกิด Lewislung carcinoma ในหนู mice และ Walker carconosacoma 256 ในหนู rats และเมื่อให้อินดิรูบินในขนาด 300-450 มิลลิกรัมต่อวัน แก่คนไข้ที่เป็น Chronic myelocytic leukemia พบว่า 26 % ไม่

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

ตอบสนองต่อการรักษา 33.4 % ตอบสนองต่อการรักษา และเมื่อให้อินดิรูบินเป็นเวลา 1.5-6 เดือน พบว่าทำให้การทำงาน 5' -mucleotidase ในเม็ดเลือดขาวมากขึ้นทำให้อาการรุนแรงของโรคลดลง

สารเคมีของสีครามในกระบวนการทำสีครามธรรมชาติ

สีครามธรรมชาติถูกสกัดจากใบครามสดในรูปของสารต้นตอ (precursor) หลังจากนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีอีกหลายครั้ง จึงเกิดเป็นสีครามเกาะกับเสื้อผ้า สารต้นตอในใบครามคือสารอินดิแคน (Indican หรือ indoxyl - β-D - glucoside) เป็นสารไม่มีสีและไม่ละลายน้ำ แต่เมื่อถูกแช่ในน้ำเอนไซม์ชนิดหนึ่งในใบคราม คือ บีตา--กลูโคสิเดส (β-glucosidase) จะช่วยทำให้อินดิแคนแตกออกเป็น 2 ส่วน คือ อินดอกซิล (Indoxyl) และกลูโคส สาร 2 ชนิดนี้เป็นสารไม่มีสี ละลายน้ำได้ ทั้งคู่จึงละลายได้ในน้ำคราม ดังแสดงในภาพประกอบ 1



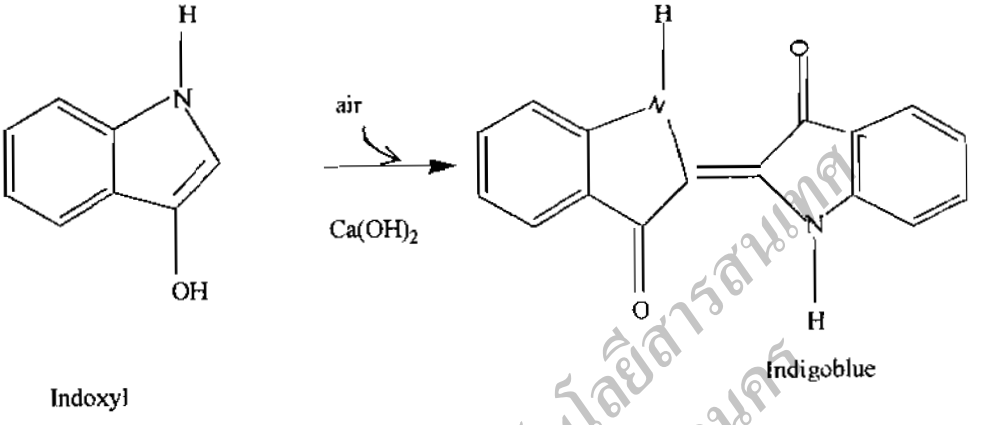
ภาพประกอบ 1 ปฏิกิริยาของการแช่ใบครามสด

(อนุรัตน์ สายทอง. 2543 : 33)

ปฏิกิริยาการเปลี่ยนอินดิแคนในใบครามไปเป็นอินดอกซิลในน้ำครามเป็นปฏิกิริยาแบบดูดความร้อน นั่นคือ ที่อุณหภูมิของการแช่ 30, 40 และ50 องศาเซลเซียสจะใช้เวลาในการแช่เพื่อให้ได้ปริมาณสีครามสูงสุดเป็น 18, 15 และ 9.30 ชั่วโมงตามลำดับ อินดอกซิลถูกออกซิไดส์ได้ง่ายด้วยออกซิเจนในอากาศยิ่งทำให้สารละลายเป็นด่างอินดอกซิล

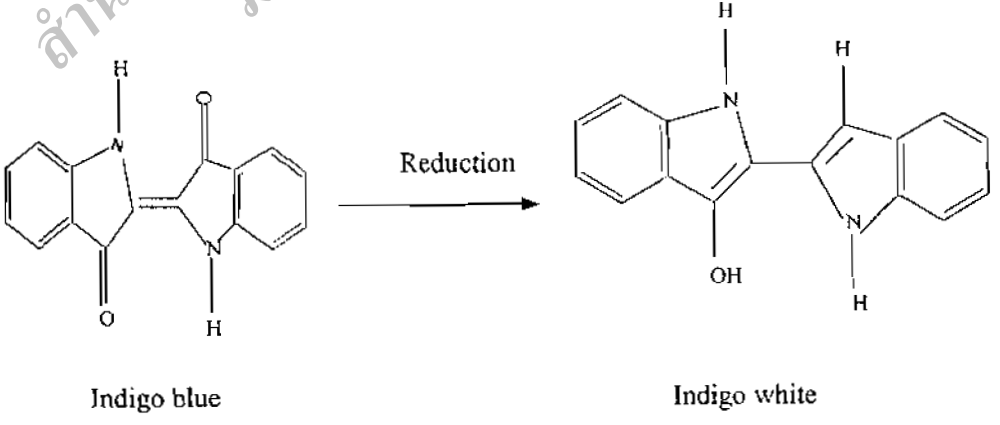
สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

ยิ่งถูกออกซิไดส์ได้ง่ายขึ้น กลายเป็นสาร Indigo blue ไม่ละลายน้ำ เมื่อเติมปูนขาวในน้ำครามและกวนแรงๆ ให้เกิดฟองมากๆจึงเกิดเนื้อครามตกตะกอนจมอยู่ก้นภาชนะดังแสดงในภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 ปฏิกิริยาของการกวนน้ำครามเพื่อตกตะกอนเนื้อคราม
(อนุรัตน์ สายทอง. 2543 : 34)

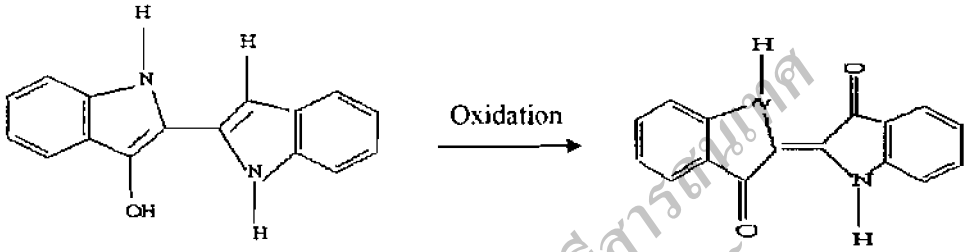
การเตรียมสีครามเป็นการทำให้ Indigo blue เปลี่ยนเป็น Indigo white ซึ่งละลายได้ดีในด่าง การเปลี่ยนแปลงนี้เป็นปฏิกิริยารีดักชันซึ่งใช้ตัวรีดิวซ์ได้หลายชนิดดังกล่าวแล้วอีกวิธีหนึ่งใช้แบคทีเรียชนิด บาซิลลัส เช่น Bacillus alkaliphylus มาทำการหมัก ปฏิกิริยารีดักชันของ Indigo blue เกิดขึ้นดังแสดงในภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 ปฏิกิริยาการเปลี่ยน Indigo blue เป็น indigo white
(อนุรัตน์ สายทอง. 2543 : 35)

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

เมื่อเกิดสีครามในน้ำย้อมโดยสังเกตสีของน้ำย้อมเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเขียวปนเหลือง จึงทำการย้อมผ้าที่ชุบน้ำแล้วบิดจนหมาด Indigo white ที่ละลายในน้ำย้อมจะแทรกซึมเข้าเนื้อฝ้ายจับเซลลูโลสของใยผ้าฝ้ายด้วยพันธะไฮโดรเจนเมื่อยกผ้าฝ้ายขึ้นจากน้ำย้อมสัมผัสกับอากาศ Indigo white จะถูกออกซิไดส์โดยออกซิเจนในอากาศกลับเป็น Indigo blue ถูกขังอยู่ภายในโครงสร้างของใยฝ้ายดังเดิม ดังแสดงในภาพประกอบ 4



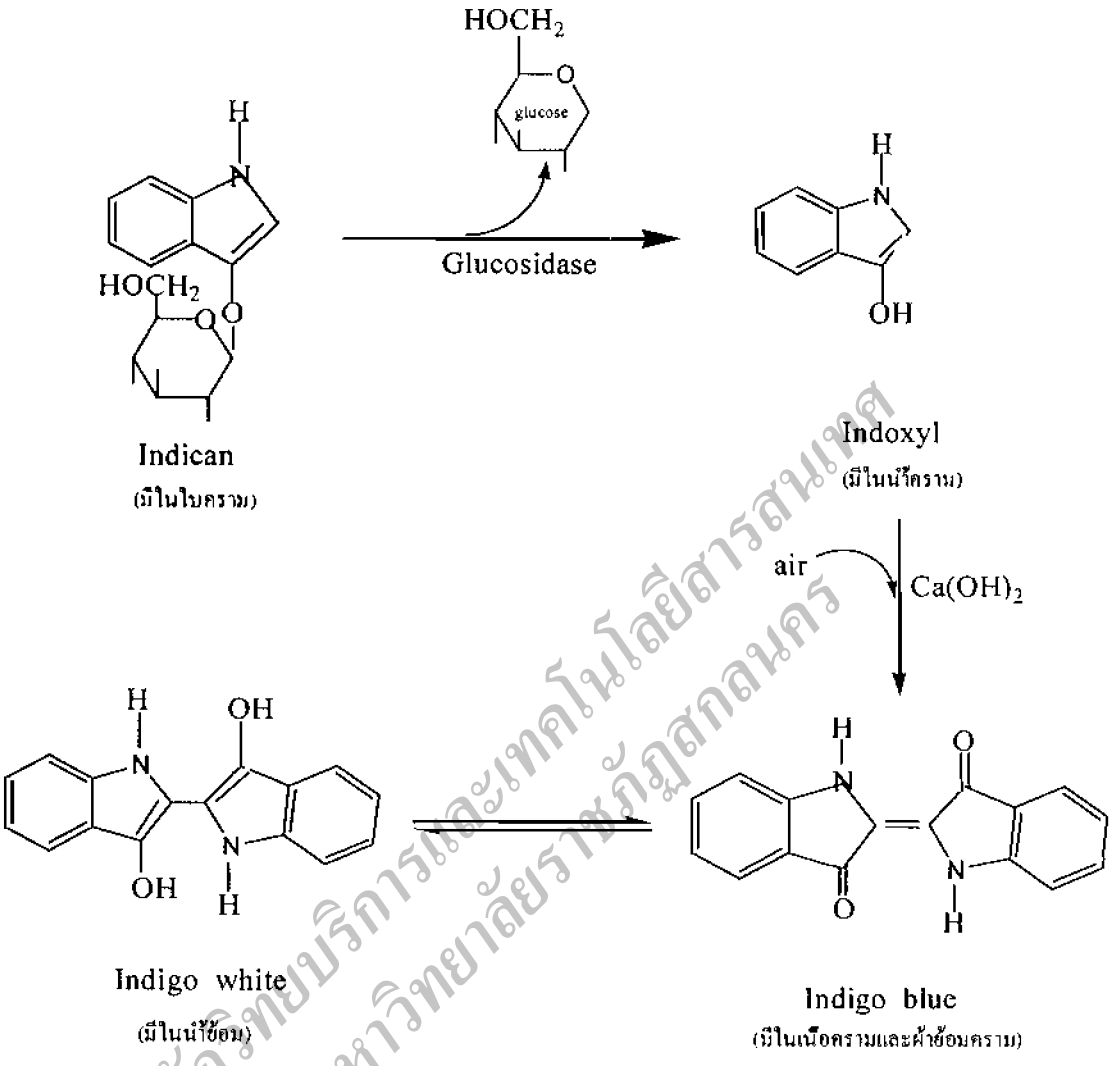
Indigo white Indigo blue

ภาพประกอบ 4 ปฏิกิริยาการเปลี่ยน Indigo white เป็น Indigo blue
(อนุรัตน์ สายทอง, 2543 : 3)

ใยไหมและขนสัตว์มีโครงสร้างทางเคมีเป็นพอลีเพปไทด์ จึงทำการย้อมด้วยสีครามได้ไม่ดีเท่าฝ้ายซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีเป็นเซลลูโลส อย่างไรก็ตามการย้อมเส้นไหมที่อุณหภูมิต่ำจะดูดซับสีดีกว่าการย้อมที่อุณหภูมิสูงแสดงว่าการย้อมสีครามเป็นกระบวนการคายความร้อน นั่นคือ เมื่อย้อมที่อุณหภูมิสูงขึ้นการติดสีจะลดลง

การทำสีครามธรรมชาติเป็นปฏิกิริยาเคมีทุกขั้นตอนโดยใช้สารเคมีต้นตอที่มีในใบคราม เอนไซม์ในใบคราม ออกซิเจนในอากาศ แบคทีเรียบาซิลัสในธรรมชาติ ขี้เถ้าและปูนขาวก็ได้จากธรรมชาติปฏิกิริยาต่อเนื่องในกระบวนการทำสีครามและการย้อมครามแสดงในภาพประกอบ 5

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร



สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

ภาพประกอบ 5 ปฏิกิริยารวมของการทำสีคราม

(อนุรัตน์ สายทอง. 2545 : 29)

การผลิตเนื้อคราม

ด้วยประวัติอันยาวนานของการทำสีครามและครามได้กระจายขึ้นทั่วบริเวณเขตร้อนทั้งหมดทำให้มีวิธีผลิตสีย้อมจากต้นครามหลากหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของครามวัตถุดิบอื่นที่เกี่ยวข้อง ยุคสมัยและท้องถิ่นต่างๆ โดยจำแนกออกเป็น 2 แบบตามลักษณะของใบคราม คือผลิตจากใบครามสดกับผลิตจากใบครามแห้ง

1. การผลิตจากใบครามสด

โดยแช่ใบครามสดในน้ำ 1 วัน แยกใบครามออกจึงเติมปูนขาวผสมลงไปพร้อมๆ กับกวนช้าๆ และสังเกตสีของน้ำครามเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนมีฟองสีน้ำเงินจึงหยุดเติมและกวนน้ำครามแรงๆ จนฟองสีน้ำเงินแตกยุบตัวอย่างเร็วพักไว้ 1 คืน จึงรินของเหลวใสสีน้ำตาลทิ้ง จะได้ตะกอนคล้ายโคลนสีน้ำเงินของครามเรียกว่า เนื้อคราม เก็บไว้ในโอ่งดินหมั่นดูไม่ให้แห้ง โดยเติมน้ำขี้เถ้าเล็กน้อยให้ชื้นอยู่เสมอ เนื้อครามที่เก็บไว้ใช้ทำสีครามได้ 2–3 ปี

2. การผลิตจากใบครามแห้ง

ในประเทศเขตอบอุ่นเช่นเกาหลีและญี่ปุ่นมีใบครามสดช่วงเวลาสั้นเขาจะเก็บใบครามแห้งและครามผงไว้เพื่อเตรียมสีครามโดยชาวเกาหลีใช้ใบครามแห้งแช่ในไฮโดรเจนซัลไฟต์ (HSO_3^-) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ซึ่งเป็นวิธีการที่เร็วแต่ได้สีน้ำเงินไม่เข้ม สำหรับในญี่ปุ่น เมื่อย่างเข้าหน้าหนาวชาวญี่ปุ่นจะเก็บใบครามสดตากแห้ง ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 วัน จึงเอาใบครามแห้งชุบน้ำพอให้ชื้นบรรจุใส่ถุงตาข่ายวางบนฟางข้าวทับด้วยถุงฟางข้าวชั้นและของหนักๆ ทับอีกชั้นหนึ่ง ทิ้งไว้ประมาณ 20 วัน เปิดปากถุงตาขายคลุกเคล้าพลิกกลับใบคราม ปิดถุงและทับด้วยถุงฟางชั้นอย่างเดิมอีกประมาณ 100 วันจึงนำใบครามหมักแล้วนี้ตำให้ละเอียดด้วยครกกระเดื่องหรือครกหินทำเป็นก้อนกลมๆ (indigo ball) ขนาดเท่าลูกพลัม (plum) ตากให้แห้ง ซึ่งใช้เวลา 3–7 วัน และเก็บไว้ใช้ เมื่อต้องการสีครามผสมก้อนครามกับน้ำขี้เถ้าสัดส่วน 5 : 4 เติมน้ำอุ่นทุกวันๆ ละน้อย ทำให้ของเหลวร้อนขึ้น ระวังอย่าให้ร้อนเกินไป คนเบาๆ และช้าๆ หลังจากนั้นปิดฝาภาชนะและทิ้งไว้อีก 30 วันจึงย้อมได้ อีกวิธีหนึ่งใช้ครามผงที่ได้จากธรรมชาติและได้จากการสังเคราะห์ละลายในน้ำปูนขาวและผงฝุ่นสังกะสีอุ่นอุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส และคนช้าๆ พร้อมกับเติมเมทานอล ใช้เวลาประมาณ 5 นาทีจึงหยุดอุ่น ปิดฝาภาชนะและทิ้งไว้ 3-5 ชั่วโมง จึงทดสอบการเกิดสีครามโดยใช้ผ้าสีขาวจุ่นเมื่อยกขึ้นสังเกตฝ้ายเป็นสีเขียวสักครู่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินทำการย้อมได้

การเตรียมน้ำย้อม

สีครามรูปแบบที่คงตัวเก็บไว้ได้ในภาวะปกติคือ Indigo blue แต่สีครามที่ใช้ย้อมติดใยเซลลูโลส คือ Indigo white การเตรียมสีครามเพื่อย้อมก็คือการทำให้ Indigo blue เปลี่ยนเป็น Indigo white นั่นเอง คนอีสานโบราณเตรียมสีครามโดยใช้โอ่งดินหรือหม้อดินเป็นภาชนะ ย้อมผ้าฝ้ายด้วยน้ำย้อมครามหลายๆ ซ้ำ แต่ละซ้ำห่างกัน 6-8 ชั่วโมง จนผ้าเป็นสีน้ำเงินเข้มและวาวดั่งสีนิล จึงเรียกภาชนะบรรจุน้ำย้อมครามว่าหม้อนิล เรียกผ้าย้อมครามว่า ผ้าย้อม

168787

หม้อ หรือผ้าจุบหม้อนิล ถ้าครั้งใดย้อมผ้าแล้วสีครามไม่ติดผ้าฝ้าย ก็จะบอกว่าหม้อนิลหนี ซึ่งความจริงหม้อนิลยังอยู่ที่เดิม Indigo white ต่างหากที่หนีไปอยู่ในรูป Indigo blue ซึ่งไม่ละลายน้ำจึงไม่ติดเส้นฝ้าย การเตรียมน้ำย้อมมี 3 แบบดังนี้

1. เตรียมจากน้ำคราม

การเตรียมน้ำย้อมจากน้ำครามโดยการนำใบครามสดมาแช่น้ำประมาณ 24 ชั่วโมง จึงแยกกากทิ้งได้น้ำครามสีเขียวปนฟ้า ฟองใสไม่มีสี ผสมปูนขาวขนาดที่พอเหมาะ น้ำครามจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ฟองสีน้ำเงิน ฟองทนไม่แตกยุบ นำฝ้ายมาย้อมได้

2. เตรียมจากเนื้อครามหรือครามผง

การเตรียมน้ำย้อมจากเนื้อครามหรือครามผงของภูมิปัญญาไทยส่วนใหญ่ Indigo blue ที่ใช้ในรูปเนื้อครามเปียก เฉพาะแถบอีสานใต้ใช้ครามแห้งซึ่งทำจากเนื้อครามปั้นเป็นก้อนผึ่งแดดให้แห้งเรียกว่าตรม โดยนำมาผสมกับขี้เถ้าในสัดส่วนที่พอเหมาะเพื่อให้เกิด Indigo white ในสารละลายด่างน้ำขี้เถ้าโดยสัดส่วนอย่างน้อย 180 กรัมต่อน้ำขี้เถ้า 500 มิลลิลิตร และปฏิกิริยาเกิดที่พีเอช 10.5–11.0 ถ้าเติมเนื้อครามมากเกินไปทำให้พีเอชของน้ำย้อมสูงเกินไป จึงใช้เวลานานในการลดพีเอชของน้ำย้อมลง แต่ถ้าปรับพีเอชเริ่มต้นที่ 10.5 จะทำให้เกิด Indigo white เร็วขึ้นในเวลาน้อยที่สุด 7-10 วัน

3. การเตรียมน้ำย้อมจากครามผงด้วยวิธีทางเคมี

3.1 เตรียมถังย้อม ตวงน้ำ 10 ลิตร บรรจุในภาชนะขนาดจุมากกว่า 15 ลิตร เติมปูนขาว 10 กรัม และฝุ่นสังกะสี 3 กรัม ผสมให้เข้ากันปิดฝาภาชนะไว้นานกว่า 6 ชั่วโมง

3.2 เตรียมถังเติม

3.2.1 อุ่นน้ำ 600 มิลลิลิตรในภาชนะเคลือบหรือสแตนเลสขนาดจุประมาณ 1 ลิตร

3.2.2 ชั่งครามผงบริสุทธิ์สำเร็จรูป 75 กรัม ในภาชนะเคลือบหรือสแตนเลสเช่นกัน ผสมเอทานอลเล็กน้อยคนให้กลมกลืนกัน แบ่งน้ำอุ่นจากข้อ 3.2.1 เล็กน้อยผสมลงในเนื้อคราม ค่อยๆ คนอย่างช้าๆ ให้เหลว

3.2.3 ชั่งปูนขาว 20 กรัมกับฝุ่นสังกะสี 6 กรัม ในภาชนะเคลือบหรือสแตนเลส แบ่งของเหลวจากข้อ 3.2.2 ทีละน้อยผสมลงไป ค่อยๆ คน อย่างช้าๆ ให้ผสมกันดีทั้งหมด

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

3.2.4 ผสมของเหลวข้อ 3.2.3 ทั้งหมดลงในน้ำอุ่นข้อ 3.2.1 นำภาชนะตั้งไฟอ่อนๆ อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส ใช้แท่งแก้วคน คนของเหลวแรงๆให้เกิดฟอง ใช้เวลาคนประมาณ 5 นาที หรือสังเกตเห็นของเหลวเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเขียวปนเหลือง ฟองใสไม่มีสีเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินขุ่น ยกภาชนะลงจากเตา พักของเหลวไว้ไม่น้อยกว่า 6 ชั่วโมง

3.2.5 ผสมของเหลวข้อ 3.2.4 ลงในถังย้อมที่พักไว้ 6 ชั่วโมงแล้วเช่นเดียวกัน ใช้ของเหลวจากถังย้อมล้างของเหลวจากภาชนะของข้อ 3.2.4 ให้หมด ปิดภาชนะพักของเหลวในถังย้อมไว้อีก 6 ชั่วโมง

3.2.6 เตรียมเส้นฝ้าย 90 กรัม ชุบน้ำให้เปียกและบิดให้หมาด นำลงย้อมประมาณ 15 นาที สังเกตสีของเส้นฝ้าย เก็บฝ้ายในภาชนะปิดให้ชื้นอยู่เสมอ

3.2.7 เตรียมถังเติมใหม่ โดยทำซ้ำข้อ 3.2.1-3.2.4 จึงเติมของเหลวที่เตรียมไว้ลงถังย้อมเดิม พักของเหลวในถังย้อมไว้อีก 6 ชั่วโมง นำผ้าที่ย้อมแล้ว 1 ซ้ำลงย้อมอีกทำซ้ำเรื่อยๆ จนได้สีเข้มเป็นที่พอใจ

การย้อมสีครามหรือการย้อมหม้อนิล

หลังจากก่อหม้อนิลและโจกครามทุกเช้าเย็น ให้สังเกตสีของของเหลวซึ่งเริ่มแรกเป็นสีน้ำเงิน หลายวันต่อมาจะเป็นสีเขียวและเหลือง ลักษณะของเหลวจะเข้มกว่าเดิม ส่วนผิวหน้าของของเหลวในโอ่ง เริ่มแรกจะมีฟองสีน้ำเงินค่อนข้างใส ปริมาณน้อยและแตกเร็ว หลายวันต่อมาฟองสีน้ำเงินขุ่นมัวคงทนไม่แตกง่าย กลิ่นของของเหลวเปลี่ยนไปสีของของเหลวลักษณะของฟองและกลิ่นเป็นสิ่งที่บอกให้ผู้ชำนาญการย้อมครามว่า หม้อนิลมาแล้ว จึงเตรียมฝ้ายหรือผ้าที่จะย้อม แต่สำหรับผู้ยังที่ไม่ชำนาญอาจทดสอบโดยใช้เส้นฝ้ายเปียกน้ำจุ่มในหม้อนิลและยกขึ้น สังเกตสีน้ำเงินที่เกิดบนเส้นฝ้ายจึงทำการย้อม การทำให้ฝ้ายเปียกน้ำอย่างทั่วถึงโดยการแช่ขยำกับน้ำ ใช้ไม้ผิวเรียบทุบฝ้ายเปียกกับพื้นเรียบหลายๆ ครั้ง ซึ่งเรียกว่าการฆ่าฝ้าย เมื่อฝ้ายเปียกดีแล้วบิดให้หมาดที่สุดเท่าที่จะทำได้นำลงย้อมขยำกับสีครามในโอ่ง ขยำฝ้ายเคลื่อนไปตามลำดับเป็นวงตามลักษณะของเส้นฝ้าย เพื่อป้องกันฝ้ายพันกันและให้สีแทรกเข้าเกาะติดเนื้อฝ้ายสม่ำเสมอไม่เกิดรอยด่าง ย้อมขยำครั้งหนึ่งๆ ประมาณ 15 นาที หรือสังเกตจากสีของเหลวเหลืองน้อยลงกลายเป็นเขียว จึงบิดฝ้ายให้หมาดซึ่งฝ้ายจะมีสีเขียวอมเหลืองเมื่อกระตุกฝ้ายหมาดๆนั้นเพื่อคลี่เส้นฝ้าย ฝ้ายจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มขึ้นเรื่อยๆ

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ประมาณ 2–3 นาที สีเข้มคงที่ หากยังไม่เข้มพอย้อมในหม้อนิลหม้อใหม่อีกทำซ้ำๆ ประมาณ 6--10 ครั้ง จะได้ฝ้ายสีน้ำเงินเข้ม ถ้าผู้ทำครามก่อหม้อนิล 10 หม้อ จะได้ฝ้ายย้อมหม้อนิลภายในช่วงเวลาเดียว ถ้ามีหม้อนิล 5 หม้อ ต้องย้อม 2 ช่วงเวลา เช้า–เย็น 1 วัน ถ้าก่อหม้อนิลหม้อเดียวจะต้องย้อมถึง 5 วัน ในกรณีก่อหม้อนิลไว้น้อยหม้อต้องย้อมในช่วงเวลาต่างกัน ให้เก็บฝ้ายหมาดๆ ไว้ในถุงพลาสติกปิดปากถุงเพื่อไม่ให้ฝ้ายแห้ง ช่วงเวลาต่อไปจะย้อมซ้ำได้ทันที ถ้าฝ้ายแห้งจะติดสีไม่สม่ำเสมอเกิดรอยด่างในฝ้ายเมื่อได้สีเข้มจนพอใจแล้วบิดให้หมาดผึ่งให้แห้งล้างน้ำ ล้างฟองและน้ำขี้เถ้าออก จึงบิดและนำไปผึ่งจนแห้งได้ฝ้ายย้อมครามตามต้องการ

ผิวหนัง

ผิวหนังจัดว่าเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดของร่างกาย แบ่งออกได้เป็น 3 ชั้นคือ ชั้นนอกสุด อีพีเดอร์มิส ชั้นถัดลงมาเป็นเดอร์มิส ซึ่งมีความหนากว่าชั้นแรกและสุดท้ายคือชั้นที่เรียกว่า Subcutaneous connective layer ซึ่งเป็นชั้นที่หนาที่สุด ชั้นนี้ประกอบไปด้วย fatty tissue , blood vessel และเส้นประสาทต่างๆ จำนวนมาก

ตามปกติผิวหนังเป็นอวัยวะของร่างกายที่มีโอกาสสัมผัสกับแบคทีเรียในอากาศหรือจากวัตถุต่างๆ ได้มากที่สุด แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่จะไม่สามารถเจริญบนผิวหนังได้ เนื่องจากเป็นสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ผิวหนังที่อยู่ในส่วนต่างๆ ของร่างกายแต่ละบริเวณจะมีโครงสร้างและหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งเป็นผลทำให้ชนิดและจำนวนจุลินทรีย์บนผิวหนังในแต่ละส่วนของร่างกายแตกต่างกันไปด้วย โดยทั่วไปแล้วพบว่ามีแบคทีเรียไม่กี่ชนิดที่จะสามารถมีชีวิตอยู่รอดบนผิวหนังเป็นเวลานานๆ ได้เนื่องจากผิวหนังจะมีการขับสารบางอย่างออกมาทำลายเซลล์แบคทีเรียได้ ตัวอย่างเช่น ต่อมเหงื่อขับไลโซโซม ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ หรือต่อมซีบาเซียสหลั่งสารประกอบพวกไลปิด ซึ่งมีแบคทีเรียบางชนิดสามารถสลายสารประกอบนี้ให้เป็นกรดไขมันซึ่งกรดไขมันนี้จะเป็นพิษต่อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เป็นต้น

เชื้อ Bacillus subtilis

1. คุณสมบัติโดยทั่วไป

1.1 เคลื่อนไหวได้ด้วยฟลาเจลลัมที่อยู่รอบตัว

1.2 สามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลส (catalase)

1.3 ลักษณะโคโลนีจะเป็นลักษณะหยาบ แบน แผ่ออกเป็นวง มีเส้นรอบวงหยัก

1.4 รูปร่างเป็นแท่งแกรมบวก ความยาว 1.5-2.5 ไมโครเมตร มีสปอร์ภายใน (endospore) ดังแสดงในภาพประกอบ 2.6

ภาพประกอบ 6 รูปร่าง การติดสีและสปอร์ภายใน (endospore) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* (The Genus Bacillus. (online) .Arailable HTTP : http // textbookofbacteriology.net / Bacillus.html.)

2. แหล่งแพร่เชื้อ

Bacillus subtitis พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในดิน ในน้ำ ในอากาศ และฝุ่นละออง เป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบบนผิวหนังของคน

3. คุณสมบัติในการก่อโรค

Bacillus subtitis ส่วนใหญ่ไม่ก่อให้เกิดโรคในคนปกติ แต่ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือติดยาเสพติด อาจติดเชื้อ *Bacillus subtitis* ได้ เช่น การติดเชื้อของแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก แผลผ่าตัด แผลฉีดยา ผู้ป่วยโรคไตที่ทำการฟอกเลือด (hemodialysis) โดย

พบว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือด สมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningoencephalitis) ปอดบวม เยื่อบุหัวใจอักเสบ(endocarditis) การติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในช่องท้อง ถุงหุ้มหัวใจอักเสบ (pericarditis) เยื่อหุ้มปอดอักเสบ (pleuritis) การติดเชื้อของตา นอกจากนี้อาจทำให้เกิดอาการของอาหารเป็นพิษ

4. สารให้กลิ่นตัวที่ผลิตขึ้น

Bacillus subtilis สามารถผลิตสารที่มีลักษณะเป็นสารละลายใสที่ให้กลิ่นตัว เมื่อนำสารละลายกลิ่นตัวไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี / แมสสเปกโทรเมตรี(GC/MS) ได้ผลดังตาราง 7

ตาราง 7 สารที่เป็นองค์ประกอบของกลิ่นตัวบริเวณใต้วงแขน โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS

Peak Number	Compounds	Retention Time (min)	Relative percentage	Formula
1	Butylated hydroxytoluene	12.495	32.253	$C_{15}H_{24}O$
2	Diethyl phthalate	13.189	26.160	$C_{12}H_{22}O_4$
3	1,2 - Benzenedicarboxylic acid	22.972	13.099	$C_{24}H_{38}O_4$
4	Phenol,1,2,4 - bis(1- methyl-1-phenyl)	22.360	12.232	$C_{24}H_{26}O$
5	Dibutyl phthalate	17.145	7.050	$C_{16}H_{22}O_4$

(พูนฉวี สมบัติศิริ. 2548 : 44)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งตามส่วนผสมขององค์ประกอบของอาหาร ได้แก่

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทราบส่วนประกอบทางเคมีแน่นอน (Artificial media หรือ Non-synthetic media) อาหารเลี้ยงเชื้อนี้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อพืชหรือสัตว์ ซึ่งมีสารอินทรีย์อยู่มากมาย เช่น ประกอบด้วยเพปโตน (peptone) สารสกัดเนื้อ (meat extract) สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) เป็นต้น

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

1.2 อาหารสังเคราะห์ (synthetic media หรือ chemically defined media) อาหารสังเคราะห์เป็นอาหารที่ทราบองค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอน

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งตามประโยชน์ได้แก่

2.1 Enriched media เป็นอาหารที่ใช้เฉพาะกับแบคทีเรียบางชนิดที่เลี้ยงยาก เพราะเลี้ยงในอาหารธรรมดาได้ยากหรือไม่เจริญในอาหารธรรมดาเลย อาหารชนิดนี้ต้องเติมสารบางอย่าง เช่น เลือด ซีรัมหรือสารที่สกัดจากเนื้อเยื่อหรือสัตว์เพื่อเร่งการเจริญของแบคทีเรียลงในอาหารเอ็นบีหรือเอ็นเอหรืออาหารชนิดเตตราไธโอเนตมีเดีย จะกระตุ้นการเจริญของ *Samonella typhosa* แต่ยับยั้งการเจริญของ *E.coli*

2.2 Selective media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกจุลินทรีย์ที่ต้องการออกจากจุลินทรีย์อื่นที่ปะปนอยู่ โดยการเติมสารเคมีบางอย่างลงไปเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ โดยไม่มีผลต่อจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่ง เช่น การเติมสีคริสตัลไวโอเลต เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก โดยไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ

2.3 Differential media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกชนิดของแบคทีเรียที่เจริญปะปนอยู่ในอาหารนั้นโดยอาศัยความแตกต่างของโคโลนี เช่น บลัดอะการ์มีเดีย เป็นอาหารวุ้นที่เติมเลือด ถ้าแบคทีเรียนั้นย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้จะเกิดบริเวณใสๆ รอบโคโลนี ซึ่งแสดงว่าได้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ส่วนแบคทีเรียพวกไม่ทำลายเม็ดเลือดแดงจะไม่เกิดบริเวณใสๆ รอบโคโลนี จึงใช้แยกแบคทีเรียเหล่านี้ได้

2.4 Assay media เป็นอาหารที่มีองค์ประกอบพิเศษเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณของวิตามิน กรดอะมิโน และสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้ยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ด้วย

2.5 Media for characterization of microorganism เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจสอบสมบัติในการเจริญของจุลินทรีย์ ในอาหารรวมทั้งสมบัติที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาและชีวเคมี

2.6 Media for enumeration of microorganism เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ใช้ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์บางชนิด เช่น จุลินทรีย์ในน้ำหรือนม องค์ประกอบของอาหารจะต้องเหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านั้น

2.7 Maintenance media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เก็บรักษาเชื้อที่มีชีวิตให้นานที่สุดโดยเชื้อยังมีสมบัติเหมือนเดิม จึงมีการลดองค์ประกอบบางอย่างในอาหารเพื่อให้เชื้อ

มีการเจริญเติบโตน้อยลง และปลดปล่อยของเสียน้อยลง เช่นน้ำตาลกลูโคสในอาหารจะเพิ่มการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้สร้างกรดได้มากมายและทำให้เชื้อตายเร็ว ดังนั้นจึงต้องลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสให้น้อยลง

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (streak plate) และการทำให้เชื้อกระจายในจานเพาะเชื้อ (spread plate) วิธีนี้ต้องการให้เชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นมาก ค่อยๆกระจายออกไปหรือมีความเจือจางจนพอที่จะทำให้แต่ละเซลล์แยกออกจากกันได้ ดั้งนั้นการขีดในจานเพาะเชื้อที่ดีต้องให้รอยขีดมีระยะทางยาวมากที่สุด เพื่อเซลล์จะได้แยกจากกัน และแต่ละเซลล์จะมีการแบ่งตัวมากขึ้นจนเป็นโคโลนีที่มองเห็นด้วยตาเปล่าการขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อมีดังนี้

1. การขีดเชื้อแบบง่าย (simple streak) โดยการใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ลนไฟจนร้อนแดงและทิ้งให้เย็นลงสักครู่หนึ่ง แตะเชื้อที่ต้องการจะแยกให้บริสุทธิ์มาขีดบนวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในจานที่จุดเริ่มต้น เชื้อแบคทีเรียจะมีจำนวนมาก เมื่อขีดในจานเพาะเชื้อไปเรื่อยๆ จำนวนแบคทีเรียจะเหลือน้อยลงจนอาจแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆได้

2. การขีดเชื้อแบบตัดกัน (cross streak) เป็นวิธีขีดเชื้อที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ห่วงเขี่ยที่เผาไฟและรอให้เย็น แล้วแตะเชื้อมาขีดบนอาหารวุ้นตามแนว 1-2 ประมาณ 3-4 เส้น เผาห่วงเขี่ยเชื้อจนร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่มีมากไป และรอให้เย็นบนอาหารวุ้นตามแนว 2-3 โดยให้รอยขีดตัดผ่าน ตอนปลายของแนว 1-2 เล็กน้อย ทำนองเดียวกันเผาเขี่ยเชื้อและขีดตามแนว 3-4 และแนว 4-5 ดังนั้นเชื้อจะหนาแน่นมากตามแนวขีดในตอนแรกๆ แต่ตอนท้ายๆเชื้อจะเจือจางและแยกแต่ละเซลล์ออกจากกันได้นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แต่ละเซลล์จะเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ได้ ซึ่งสามารถตรวจได้ด้วยการย้อมสีแกรม

3. การทำให้เชื้อกระจาย (spread plate) มีหลักการเดียวกันโดยใช้แท่งแก้วงอเป็นรูปสามเหลี่ยม และมีด้ามยื่นออกมาให้จับได้ก่อนใช้ต้องทำให้แท่งแก้วปราศจากเชื้อใดๆ โดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% และลนไฟหลังจากที่ใช้แท่งแก้วนี้เขี่ยเชื้อ ปริมาณเล็กน้อยให้ทั่วจานอาหารวุ้น เพื่อเป็นการทำให้เซลล์ต่างๆ แยกและกระจายออกจากกัน ในกรณีที่หยดเชื้อมีความเข้มข้นมาก อาจต้องกระจายเชื้อหลายจานโดยใช้แท่งแก้วอันเดิมกระจายบนอาหารวุ้นใหม่ต่อไป เพื่อให้เชื้อเจือจางลงหรืออาจทำให้เชื้อเจือจางซัสเพนชั่นของเชื้อก่อนจะกระจาย

บนอาหารก็ได้ การแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีนี้มีข้อดีคือ ใช้เครื่องมือน้อย สะดวก รวดเร็ว และใช้ตัวอย่างเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงนิยมใช้วิธีนี้ในห้องปฏิบัติการ

4. การพอเพลท (pour plact tcchnique) หลักการพอเพลท คือ การทำให้ตัวอย่างเชื้ออยู่ในหลอดอาหารวุ้นที่หลอมเหลวแล้วและเทลงในจานเพาะเชื้อ อาหารวุ้นจะถูกหลอมเหลวและทิ้งไว้ให้อุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งจะผสมตัวอย่างเชื้อลงไปและทำให้กระจายอย่างสม่ำเสมอ ตัวอย่างอาจจะถูกทำให้เจือจางโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ ถ่ายเชื้อไปสู่อาหารวุ้นหลอดต่อไป ซึ่งมีผลให้จำนวนเซลล์แบคทีเรียในอาหารวุ้นหลอดหลังๆ มีความเจือจางมากพอจนสามารถแยกกระจายจากกันและเจริญขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ได้ โคโลนีจะเกิดขึ้นทั้งบนผิววุ้นและใต้วุ้น

วิธีการโดยถ่ายซัสเพนชั่น (Suspension) ของเชื้อแบคทีเรีย 1 ห่วง ไปยังอาหารวุ้นที่หลอมเหลวและอุ่นแล้ว โดยวิธีที่ปราศจากเชื้อ (aseptic technique) เขย่าหลอดด้วยนิ้วมือหรือด้วยเครื่องสั่นเพื่อให้เชื้อกระจายทั่วหลอดอาหารได้สม่ำเสมอ ถ่ายเชื้อที่ผสมในอาหารจากหลอดที่ 1 ไปยังอาหารวุ้นและจากหลอดที่ 2 ไปยังหลอดที่ 3 ในลักษณะเดียวกัน เทอาหารวุ้นหลอมเหลวจากหลอดลงสู่จานเพาะเชื้อหลอดละ 1 จาน แกว่งจานเพาะเชื้อไปมาเบาๆ เพื่อให้อาหารวุ้นและเชื้อที่ผสมอยู่กระจายทั่วก้นจาน

การเก็บรักษาเชื้อให้บริสุทธิ์

ในการศึกษาเชื้อให้บริสุทธิ์ จะต้องมีวิธีการเก็บรักษาเชื้อให้มีชีวิตรอดอยู่ ซึ่งในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จะมีที่เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์มีหลายวิธี ซึ่งเลือกวิธีใดขึ้นอยู่กับแรงงาน ค่าใช้จ่ายเครื่องมือ คุณค่าและประโยชน์ของเชื้อ เป็นต้นวิธีการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์มีดังนี้

1. การถ่ายเชื้อไปสู่อาหารใหม่

ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีนี้ต้องคำนึงถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และช่วงเวลาในการเปลี่ยนอาหาร เพราะต้องใช้อุณหภูมิและชนิดของอาหารที่ทำให้เชื้อบริสุทธิ์นั้นเจริญอย่างช้าๆ มากกว่าที่จะทำให้เจริญอย่างรวดเร็วเพื่อให้ระยะเวลาในการย้ายเชื้อยาวนานที่สุด วิธีการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์โดยการถ่ายเชื้อไปสู่อาหารใหม่ มีข้อเสียเปรียบที่ไม่อาจป้องกันการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสายพันธุ์ได้ เพราะอาจเกิดการกลายพันธุ์หรือการผ่าเหล่า

2. ปิดทับด้วยน้ำมันแร่

แบคทีเรียที่เจริญอยู่บนอาหารวุ้นผิวเอียง (agar slant) จะถูกปิดทับด้วยน้ำมันแร่ที่ปราศจากเชื้อหนาประมาณครึ่งนิ้ว โดยวิธีนี้สามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ได้เป็นปีๆ การเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีนี้มีข้อดี คือ สามารถเขี่ยเชื้อออกมาใช้ศึกษาหรือนำไปเลี้ยงต่อได้โดยใช้เข็มที่ปราศจากเชื้อเขี่ยออกมา และยังเก็บเชื้อหลอดเดิมไว้ได้

3. ไลโอฟิไลเซชั่น (Lyophilization)

ไลโอฟิไลเซชั่น เป็นการทำให้เชื้อแห้งโดยเร็วในสภาพเย็นจนแข็ง (freeze–dry) มีวิธีทำได้โดยบรรจุเชื้อในหลอดแก้วขนาดเล็กทำให้เย็นจัดจนแข็งอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส ถึง -78 องศาเซลเซียส โดยจุ่มลงหลอดในน้ำแข็งแห้งที่แช่อยู่ในแอลกอฮอล์และต่อเข้ากับท่อดูดอากาศ ทำให้เกิดสภาพสุญญากาศขึ้นภายในหลอด น้ำแข็งในหลอดจะระเหิดออกไปและเชื้อจุลินทรีย์จะแห้งสนิท ปิดปากหลอดโดยใช้ไฟลนให้ปากหลอดหลอมติดกัน ข้อดีของวิธีนี้คือ การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ไว้ได้นานมากโดยที่เชื้อยังมีชีวิตอยู่และไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะพันธุกรรมและยังใช้เนื้อที่ในการเก็บรักษา แต่วิธีนี้เสียค่าใช้จ่ายสูงมาก เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่

4. การเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำมาก

การเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำมาก เช่น การเก็บรักษาเชื้อไว้ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิ-196 องศาเซลเซียส เป็นวิธีที่เก็บรักษาไว้ได้นาน โดยวิธีนี้เซลล์จะถูกเตรียมไว้เป็นซัสเพนชั่น (suspension) ที่เข้มข้นอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารป้องกันอันตรายให้แก่เซลล์อันจะเกิดจากผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้น สารนั้นได้แก่ กลีเซอรอลหรือไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide,DMSO) เซลล์ซัสเพนชั่นจะเก็บไว้ในขวดเล็กๆ ที่ปิดผนึกและแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -150 องศาเซลเซียสแล้วจึงเก็บขวดเหล่านั้นไว้ในถังที่มีไนโตเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งเป็นถังขนาดใหญ่ที่มีสภาพเป็นสุญญากาศ

วิธีนี้ไนโตรเจนเหลวได้ผลดีกับเชื้อหลายชนิดที่ไม่สามารถเก็บรักษาไว้ด้วยวิธีไลโอฟิไซเซชั่น (liophilization) และในเชื้อส่วนใหญ่จะยังมีชีวิตอยู่ได้นานตั้งแต่ 10-30 ปี โดยไม่มีการเปลี่ยนลักษณะอย่างไรก็ตามการเก็บรักษาโดยวิธีนี้เสียค่าใช้จ่ายแพง เนื่องจากต้องมีการเติมไนโตรเจนเหลวเป็นระยะ

การทดสอบการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้าน

การทดสอบการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้านแบคทีเรีย เป็นการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ เพื่อวัดความสามารถของสารต้านจุลชีพในการที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่างๆ และนำผลที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการรักษาผู้ป่วยต่อไป รวมทั้งใช้ในการศึกษาแนวโน้มการดื้อยาของเชื้อด้วย วิธีทดสอบการยับยั้งที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป คือ modified Kirby–Bauer method ซึ่งใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ไม่ยุ่งยาก และผลที่ได้จะใกล้เคียงกับผลที่ได้รับในการรักษาผู้ป่วย ใช้หลักการของ disc diffusion โดยเจือจางเชื้อให้ได้ความขุ่นเท่ากับความขุ่นมาตรฐาน แล้วเพาะลงบนอาหารเพาะเชื้อนำสารต้านแบคทีเรียที่ทราบปริมาณ (โดยอาจใช้เป็น disc หรือ tablet)มาวางบนผิววุ้น เพื่อให้สารต้านแบคทีเรียนั้นซึมเข้าไปในอาหารแล้วดูการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นมีวิธีเตรียมการทดสอบดังนี้

1. วิธีเตรียมอาหารเพาะเชื้อ

สำหรับการทดสอบเชื้อทั่วไป ให้ใช้ Mueller–Hinton medium pH 7.2–7.4 เทลงในจานเพาะเชื้อที่มีผิวด้านล่างแบนราบ ให้มีความหนาประมาณ 4 มม. ถ้าใช้จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มม. จะใช้อาหารเพาะเชื้อประมาณ 25-30 มล. ถ้าใช้จานเพาะเชื้อขนาด 150 มม. จะใช้อาหารเพาะเชื้อ 60–70 มล. ผิวหน้าของอาหารเพาะเชื้อต้องเรียบ และมีระดับสม่ำเสมอไม่เอียงลาดก่อนนำมาใช้จะต้องทำให้ผิวหน้าของอาหารเพาะเชื้อแห้งเสียก่อน

2. วิธีเตรียมความขุ่นมาตรฐานสำหรับเทียบจำนวนเชื้อ

ความขุ่นมาตรฐาน McFarland standard No. 0.5 เตรียมโดยใช้ 1.175% $BaCl_2.2H_2O$ จำนวน 0.5 มล. ผสมกับ 1% H_2SO_4 จำนวน 99.5 มล. เก็บไว้ในหลอดทดลองจุกเกลียวที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดได้นาน 6 เดือน ก่อนใช้เทียบความขุ่นต้องเขย่าให้เข้ากันทุกครั้ง และควรใช้หลอดทดลองขนาดเดียวกับที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ความขุ่นมาตรฐาน McFarland No.0.5 นี้ตรวจสอบได้โดยใช้ spectrophotometer วัดค่า absorbance ที่ 625 nm จะได้ค่า OD ระหว่าง 0.08–0.10 การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบการยับยั้ง อาจทำได้ 2 วิธี คือ growth method (GM) และ direct colony suspension method (DCS)

2.1 วิธีเตรียมเชื้อด้วยวิธี growth method (GM)

2.1.1 เลือก isolated colony ที่มีลักษณะเหมือนกัน จำนวน 3–5 colonies โดยใช้ loop แตะส่วนบนของ colony ใส่ในอาหารเพาะเชื้อ (เช่น tryptic soy broth) หลอดละประมาณ 2 มิลลิลิตร

2.1.2 นำไปอบ (incubate) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-6 ชั่วโมง ให้มีความขุ่นเท่ากับความขุ่นของ McFarland standard No. 0.5 ถ้าเชื้อขุ่นมากกว่าความขุ่นมาตรฐานให้เจือจางด้วย normal saline solution (NSS) หรือ tryptic soy broth การเทียบความขุ่น อาจทำได้โดยการวัดด้วย spectrophotometer หรือถ้าเทียบด้วยสายตา ให้จับหลอดของเชื้อและหลอด McFarland standard คู่กัน วางเทียบบนกระดาษสีขาวซึ่งขีดไว้ด้วยสีดำ และควรให้มีแสงสว่างอยู่พอเพียงเชื้อที่มีความขุ่นเท่ากับความขุ่นมาตรฐานนี้ จะมีจำนวนเชื้อประมาณ 1–2 × 10^8 cfu/ml วิธี growth method นี้ ไม่แนะนำให้ใช้ในการเตรียมเชื้อ *Staphylococcus species* , *Haemophilus species*, *Streptococcus* และ *Neisseria gonorrhoeae* เพื่อทดสอบการยับยั้งต่อสารต้านจุลชีพด้วยวิธีนี้

2.2 วิธีเตรียมเชื้อด้วยวิธี Direct colony suspension method (DCS)

ซึ่งทำโดยเชื้อที่เป็น isolated colony ซึ่งเพาะบนอาหารเพาะเชื้อชนิด nonselective medium (เช่น blood agar) ไม่เกิน 16–24 ชั่วโมง ใส่ใน NSS หรือ BROTH เช่น tryptic soy broth ปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นมาตรฐาน ตามวิธีข้างต้น (ไม่ต้องอบที่ 35 องศาเซลเซียส ก่อน) วิธี DCS นี้ สามารถใช้เตรียมเชื้อทั่วไป รวมทั้ง fastidious organism เพื่อใช้ทดสอบการยับยั้งต่อสารต้านจุลชีพ

ควรระมัดระวังไม่ให้เชื้อเจือจางหรือขุ่นกว่าความขุ่นมาตรฐานตามที่กำหนด เพราะอาจจะทำให้ผลการทดสอบผิดพลาดได้

3. วิธีการทดสอบ

3.1 หลังจากเทียบขุ่นกับ McFarland แล้วให้เพาะลงบนอาหารเพาะเชื้อโดยใช้ sterile swab จุ่มลงในเชื้อ หมุน swab หลายๆ ครั้ง เพื่อให้เชื้อซึมเข้าให้ทั่ว แตะ swab กับผิวด้านในของหลอดแล้วหมุนให้ swab พอหมาดๆ นำมาป้ายเป็น 3 ระนาบ ให้เชื้อกระจายทั่วผิวของอาหารเพาะเชื้อ แล้วป้ายรอบขอบด้านในของอาหารเพาะเชื้ออีกครั้งหนึ่ง

3.2 ปล่อยให้ผิวอาหารเพาะเชื้อแห้ง (ห้ามเกิน 15 นาที) ใช้คีมคีบ (Forceps) ที่ทำให้ปราศจากเชื้อ (โดยลนกับเปลวไฟแล้วปล่อยให้เย็น) คีบสารต้านจุลชีพ (แผ่น disc หรือ tablet) มาวางบนผิวของอาหารเพาะเชื้อกดเบาๆ ให้แผ่น disc ติดกับวุ้น ถ้าใช้จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มม. ไม่ควรวาง disc เกิน 5 ชนิด ถ้าใช้จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มม. ไม่ควรวาง disc เกิน 12 ชนิด

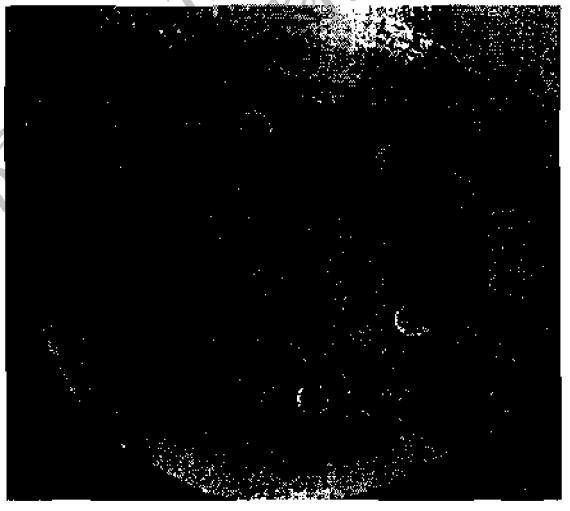
3.3 นำไปอบ (incubate) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทันทีหรือภายใน 15นาที โดยวางคว่ำให้ด้านที่เป็นวุ้นอยู่ข้างบน เลี้ยงเชื้อไว้ค้างคืน (16-18 ชั่วโมง)

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

4. วิธีการอ่านผลการทดสอบ

4.1 นำจานเพาะเชื้อที่อบ (incubate) ครบเวลาแล้วมาตรวจสอบ ถ้าเตรียมเชื้อได้ถูกต้องขอบของ inhibition zone จะเรียบ เชื้อที่ขึ้นนอก zone จะขึ้นอย่างสม่ำเสมอ ไม่หนาเกินไปและไม่บางเกินไป (confluent lawn of growth) ไม่มี Colony ที่แยกอยู่เดี่ยวๆ หากมีแสดงว่าความเข้มข้นของเชื้อที่นำมาทดสอบน้อยเกินไป และหากเชื้อที่ขึ้นหนาแน่นมาก แสดงว่าความเข้มข้นของเชื้อที่นำมาทดสอบมากเกินไป ต้องทดสอบใหม่

4.2 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เป็นมิลลิเมตร โดยใช้ sliding calipers หรือไม้บรรทัดเทียบกับตาราง 3 แล้วรายงานเป็น R (resistant), I(intermediate) หรือ S (susceptible) ในการบันทึกผลการทดสอบเพื่อเป็นหลักฐานควรบันทึกขนาด zone เป็นมิลลิเมตร ด้วยการอ่าน inhibition zone ให้ดูด้วยตาเปล่าว่าไม่มีเชื้อแบคทีเรียขึ้นใน zone โดยทั่วไปจะไม่สนใจเชื้อที่ขึ้นบางๆ หรือ colony เล็กมากที่ขอบของ zone ที่ต้องดูด้วยแว่นขยาย แต่ถ้ามี colony เดี่ยวๆ ขึ้นใน inhibition zone จะต้อง subculture และวิเคราะห์เชื้อใหม่ รวมทั้งทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพอีกครั้งด้วย สำหรับตัวอย่างผลที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธีดิสก์ดิฟฟิวชันเทสต์ได้แสดงไว้ในภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 ผลการทดสอบการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้าน

(มาลิน จุลศิริ. 2538 : 343)

5. ปัจจัยที่อาจกระทบต่อผลทดสอบ

5.1 ตัวยาที่ทดสอบ ที่สำคัญคือความเข้มข้นของยาในกระดาษซับที่ใช้ทดสอบ ในที่นี้โดยปกติแผ่นกระดาษซับกลม หรือแผ่นดิสก์ (paper disc) ที่มียาต้านแบคทีเรียสามารถหาซื้อได้จากบริษัทผู้ผลิต หรือขอจากบริษัทที่เป็นตัวแทนจำหน่าย แผ่นดิสก์ประเภทดังกล่าวมักมีความแรงของยากำหนดแน่นอน แต่ก็อาจเตรียมขึ้นใช้ยาเองด้วยวิธีการง่ายๆ ได้ นอกจากความเข้มข้นของยา คุณลักษณะของยา เช่น น้ำหนักโมเลกุล ความสามารถในการซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ จะกระทบต่อขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นได้ เช่นกัน

5.2 ความหนาของอาหารแข็ง โดยทั่วไปจะกำหนดปริมาณ 4 มิลลิเมตร ซึ่งไม่กระทบขนาดบริเวณใสมากนักการเทอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 25 และ 60 มิลลิลิตร ลงในจานใส่อาหารที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 9 และ 15 เซนติเมตร ตามลำดับ จะความหนาดังกล่าวได้

5.3 การวางแผ่นกระดาษ ภายหลังการกระจายเชื้อทั่วอาหารแข็งแล้ว การวางแผ่นดิสก์ที่มีตัวยาไม่ควรให้นานเกิน 15 นาที แต่ถ้าถ้าภายหลังการเพาะเชื้อแล้วผิวอาหารแข็งตัวเปียกชื้นจะต้องทิ้งให้แห้งระยะหนึ่ง เพื่อป้องกันจากแผ่นกระดาษปะปนเข้าไปในที่เปียกชื้น

5.4 อุณหภูมิและเวลาการบ่มเพาะ มีผลกระทบต่อการเจริญและการซึมของยาในอาหารได้ ภายหลังวางดิสก์ที่มียาแล้ว ควรเข้าตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิเหมาะกับการเจริญของเชื้อทันที

กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งของสารเคมีต่อเชื้อแบคทีเรีย

กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารเคมี หมายถึง กลไกหรือวิธีการที่สารมีผลต่อแบคทีเรียโดยทำให้แบคทีเรียนั้นหยุดการเจริญเติบโตหรือถูกทำลายลง จำแนกได้ดังนี้

1. กลุ่มสารที่มีกลไกการออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (inhibition of cell wall synthesis) โดยมีกลไกยับยั้งโครงสร้างพื้นฐาน (building block) ของผนังเซลล์ รบกวนการใช้สารฟอสโฟไลปิดที่ใช้ในการเชื่อมสารโครงสร้างพื้นฐานโดยขับยั้งปฏิกิริยาทรานสเปปไทเดชัน (transpeptidation reaction) เป็นผลให้ผนังเซลล์ไม่สามารถสร้างได้อย่างสมบูรณ์ สารในกลุ่มนี้จึงมีฤทธิ์ฆ่าทำลายแบคทีเรียได้อย่างเฉพาะเจาะจงมาก

2. กลุ่มสารที่มีกลไกการออกฤทธิ์โดยรบกวนหน้าที่ของเซลล์เมมเบรนในการห่อหุ้มเซลล์ (interfere with bacterial cell membrane function) หน้าที่ของเซลล์

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

เมมเบรน คือ ห่อหุ้มของเหลวภายในเซลล์ซึ่งมีความเข้มข้นสูงกว่าภายนอกเซลล์เพื่อไม่ให้แตกออกและยังควบคุมการซึมผ่านของสารต่างๆ เข้าและออกเซลล์ สารในกลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์โดยทำให้โครงสร้างของเซลล์เมมเบรนซึ่งเป็นสารพวกฟอสโฟไลปิดเปลี่ยนแปลงไปและทำให้เกิดการรั่วของสารภายในเซลล์ เช่น ฟอสเฟตและนิวคลีโอไซด์นอกจากนี้ทำให้คุณสมบัติในการซึมผ่านของเมมเบรนเสียไป โดยทำให้เกิดเป็นรูในเมมเบรนทำให้สารซึมผ่านเข้าเซลล์ได้มากกว่าปกติ ซึ่งเป็นผลให้แบคทีเรียไม่สามารถจะอยู่ได้ ฤทธิ์ของสารจึงเป็นแบบฆ่าทำลาย

3. กลุ่มสารที่มีกลไกการออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสร้างโปรตีน (inhibition of protein synthesis) โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งขั้นตอนเริ่มต้นในการสร้างโปรตีน ซึ่งสารจะจับกับไรโบโซมทำให้หน้าที่การทำงานของไรโบโซมเปลี่ยนแปลงไป การจับกับไรโบโซมเป็นแบบไม่ถาวร ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างโปรตีนจึงเป็นแบบย้อนกลับได้ทำให้กลไกการออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียเป็นแบบยับยั้งการเจริญเติบโต

4. กลุ่มสารที่มีกลไกการออกฤทธิ์โดยรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึม (antimetabolite) สารในกลุ่มนี้จะมีโครงสร้างคล้ายกับสารที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมตาบอลิซึม ทำให้ยับยั้งการสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ถ้าหยุดให้สารกระบวนการเมตาบอลิซึมก็กลับเข้าสู่ภาวะปกติได้ สารในกลุ่มนี้จึงมีกลไกการออกฤทธิ์เพียงยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ชั่วคราว

5. กลุ่มสารที่มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการการสร้างกรดนิวคลีอิค สารกลุ่มนี้ได้แก่

5.1 สารที่มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ซึ่งสารกลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไจเรส (gyrase) ทำให้ลักษณะโครงสร้างของดีเอ็นเอ ซึ่งมีลักษณะเป็นสายสองเส้นพันกันแบบ superhelix เปลี่ยนแปลงไปไม่สามารถทำหน้าที่เป็นแม่แบบที่จะให้เกิดการถอดรหัสได้แบคทีเรียจึงถูกทำลาย

5.2 สารที่มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ ซึ่งสารกลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์โดยเข้าไปจับกับเอนไซม์ RNA polymerase ทำให้การสังเคราะห์อาร์เอ็นเอหยุดชะงักแบคทีเรียจึงถูกทำลาย

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยในประเทศ

สำหรับผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการยับยั้งจุลินทรีย์ มีตัวอย่างดังนี้

พูนฉวี สมบัติศิริ (2548) ศึกษาสารยับยั้งแบคทีเรียของกลิ่นตัวบริเวณใต้วงแขนด้วยน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร 4 ชนิด คือ ใบแมงลักคา ใบมะเกี๋ยง ใบสะระแหน่ และใบสาบเสือ โดยนำสารให้กลิ่นที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมากลั่นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นนำสารให้กลิ่นมาสกัดด้วยตัวทำละลายไดเอทิลอีเทอร์ และนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี / แมสสเปกโทรเมทรี แล้วนำน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียใต้วงแขนโดยวิธีดูจาก clear zone ผลการวิจัยพบว่าแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกลิ่นบริเวณใต้วงแขน คือ *Bacillus subtilis* ซึ่งแบคทีเรียนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส องค์ประกอบหลักของสารให้กลิ่นที่แบคทีเรียนี้ผลิตขึ้น ได้แก่ Butylated hydroxytoluene (32.25%),Diethylphthalate(26.16%),1,2-Benzenedicarboxylic acid (13.09%), Phenol,2,4-bis(1-methyl-1-phenylethyl)(12.232%) และ Dibutylphthalate (7.056%) ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจากน้ำมันหอมระเหย พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบแมงลักคา (2.33 cm) ใบมะเกี๋ยง (2.07 cm) ใบสะระแหน่ (1.68 cm) ใบสาบเสือ (1.0 cm) มีประสิทธิภาพการยับยั้งดีตามลำดับ

นิพัฒน์ ลิ้มสงวน (2547) ศึกษาความสามารถของคาเทชิน ที่สกัดได้จากชาเขียวของไทยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ 6 สายพันธุ์ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* NCIMB 3610, *Strereptococcus faecalis* NCTC 00775 , *Salmonella typhi* ATCC 13311, *Pseudomonas fluorescens* NCDO 1524 และ *Escherichia coli* NCTC 10538(K12)) โดยวิธีแพร่ผ่านแผ่นกระดาษกลม (disc diffusion method) พบว่าคาเทชินที่สกัดได้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งนี้ประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของทาเคชินที่ใช้โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งก็เพิ่มมากขึ้นตาม ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์โดยคาเทชินดังกล่าวมีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* > *Salmonella typhi* > *pseudomonas fluorescens* > *Staphylococcus aureus* > *Sterptococcus faecalis* (เมื่อ

เปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของ Tetracycline) แต่มีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli*

สุมลวรรณ ชุ่มเชื้อ (2534) ได้ศึกษาโดยใช้สมุนไพร 3 ชนิด คือ น้ำนมราชสีห์ ฟ้าทลายโจร และว่านหางจระเข้ ซึ่งน้ำนมราชสีห์ และฟ้าทลายโจรใช้ทั้งต้นมาทำให้แห้งบดละเอียด ส่วนว่านหางจระเข้ใช้เฉพาะใบสดหั่นเป็นชิ้นเล็กๆแช่ในตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น methanal,hexane และ dichoromethane เป็นเวลา 40 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบกับเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคหนองใน เพื่อดูผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโดยวิธี paper disc diffusion และวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้น ผลการทดลองปรากฏว่า สารสกัดจากราชสีห์ และฟ้าทลายโจรที่สกัดด้วย methanol และ dichloromethane เท่านั้นที่มีผลการยับยั้งการเจริญ เมื่อนำสารสกัดจากนมราชสีห์ และฟ้าทลายโจรทั้งที่ใช้ methanol และ dichloromethane เป็นตัวทำละลายมาแยกส่วนโดยวิธี thinlayer chromatography พบว่าสารสกัดจากนมราชสีห์ที่สกัดด้วย methanol ที่มีผลยับยั้งการเจริญของ *N. gonorrheae* คือส่วนที่มีค่า R_f = 0.43 และสารสกัดจากนมราชสีห์ที่สกัดด้วย dichloromethane ส่วนที่มีผลยับยั้งการเจริญของ *N. gonorrheae* คือส่วนที่มีค่า R_f = 0.40 ส่วนที่สารสกัดจากฟ้าทลายโจรที่สกัดด้วย methanol ที่มีผลยับยั้งการเจริญของ *N. gonorrheae* คือ ส่วนที่มีค่าR_f = 0.34 และสารสกัดจากฟ้าทลายโจรที่สกัดด้วย dichloromethane พบว่าส่วนที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *N. gonorrhea* คือส่วนที่มีค่า R_f = 0.36

แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ (2525 : 265) ได้นำพืชสมุนไพร 5 ชนิดในวงศ์ Zingiberacea คือ กระชาย (*Gastrochilus pandulatus Ridl .*) , ขมิ้น (*Curcuma longa linn .*), ข่า (*Alpinia galangal sv.*), ขิง (*Zingiber officinalis Rosc.*), และไพล (*Zingiber Casunar Roxb.*) นำมาทำให้แห้งแล้วบดละเอียดและแช่ใน diethyl ether pertroleum ether และน้ำกลั่นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองเอากากออก นำของเหลวที่กรองได้ไปกรองด้วยเครื่องกรองแบคทีเรียอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำสารที่ได้ไปทดสอบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *Bacillus subtilis , Escherichia coli , Psuedomonas aeruginosa , และ Staphylococcus aureus , โดยใช้วิธี* agar disc diffusion พบว่าสารสกัดจากข่าโดยใช้ diethyl ether เป็นตัวทำละลายมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดที่ทดสอบเชื้อที่มีความไวต่อสารสกัดจากข่าสูงสุดได้แก่ *Bacillus subtilis* ,รองลงมาได้แก่ เชื้อ *Escherichiacoli* . *Staphylococcus aureus และ Psuedomonas aeruginosa* ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากข่าโดยใช้ Petroleum ether และน้ำ

เป็นตัวทำละลาย และสารสกัดจากกระชาย ขมิ้น และไพล โดยใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิด ไม่ปรากฏว่ามีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ

สุจินต์ ตันติสิษฐกุล และมาลี พรเทวีทรัพย์ (2543) ศึกษาประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่า เปลือกแคแสดให้ผลดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ*Pseudomona sareginosa* และ *Staphylococcus aureus* ส่วนดอกเข็มให้ผลการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aerginosa* ,*Protus mirabilis*,*Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* สารสกัดจากกระทือมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomons aerginosa* , *Proteus mirabilis* และ *Bacillus subtilis*

ธิดารัตน์ บุญรอด, เย็นจิตร เตชะดำรงศิลป์ และปัทมาวดี เสตะกัณฑะ (2544) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและคุณภาพทางเคมีของใบหว้าที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Syzygium cumini* (L.) Skeels วงศ์ Myrtaceae ที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติต่างๆในจังหวัดนครปฐม และนนทบุรี จำนวน 16 ตัวอย่าง พบว่า ใบหว้าแห้งที่จะนำมาใช้ประโยชน์ทางยามีคุณภาพดังนี้คือ มีปริมาณแทนนิน ซึ่งเป็นสาระสำคัญที่มีฤทธิ์ฝาดสมาน ไม่น้อยกว่าร้อยละ 6.0 โดยน้ำหนักปริมาณน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสาระสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงและบิดที่เกิดจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacaillus subtilis* , *Shigella dysenteriae* และ *Vibrio cholerae* 01 EI Tor ไม่น้อยกว่าร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก และปริมาณความชื้นไม่เกินร้อยละ 8.0 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก และจัดทำเอกลักษณ์ทางเคมีด้วย

ธิดารัตน์ บุญรอด และณฉัตรา จันทร์สุวานิชย์ (2543) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อบักเตรี จากสารสกัดใบหว้าพบเทอร์ปีนอยด์ 2 ชนิด คือ Betulinic acid กับ Ursolic acid ได้ถูกแยกจากส่วนออกฤทธิ์ที่ได้จากการสกัดใบหว้าด้วยคลอโรฟอร์มและ Ursolic acid นี้เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่ยังไม่มีรายงานว่าเคยพบในพืชชนิดนี้มาก่อน พิสูจน์โครงสร้างของสารเหล่านี้โดยการวิเคราะห์ข้อมูลด้านสเปกโทรสโกปีและเปรียบเทียบกับค่าที่มีรายงานไว้แล้ว

ปัทมาวดี เสตะกัณฑะ ธิดารัตน์ บุญรอด และจารีย์ บันสิทธิ์ (2542) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสมุนไพร โดยนำสมุนไพร 10 วงศ์ 20 ชนิด จำนวน 63 สารสกัดโดยวิธี Agar dilution method ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 21 ชนิด 24 สายพันธุ์ และเชื้อรา 1 สายพันธุ์ พบว่าสมุนไพร 18 ชนิด จำนวน 30 สารสกัดมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียบางชนิดได้ และไม่พบสารสกัดจากสมุนไพรใดมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทุกชนิด ในจำนวนนี้มีสมุนไพร 10 ชนิดที่

มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิดและสมควรนำไปทำการศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อประโยชน์ต่อการพัฒนาการผลิตยาได้แก่ นนทรี ฝาด พริกขี้หนู โพทะเล มะไฟเดือนห้า ลูกใต้ใบ หญ้าใต้ใบ หญ้าขัดใบป้อม หญ้าขัดมอญ และหญ้าขัดเล็ก

งานวิจัยต่างประเทศ

แยม และคณะ (1997) ศึกษาการนำสารสกัดจากชา (Tea extract) มาศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค จากการศึกษาพบว่า สารสกัดจากชาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus* และ *Yersinia enterocolitica* ที่ความเข้มข้นปกติในการชงชา และเมื่อนำสารสกัดจากชามาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีพาร์ติชันโครมาโทกราฟี(partition chromatography) ทำให้ทราบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับปริมาณของ EGC , EGCG และ ECG ในชา

ชู และคณะ(1999) ได้ศึกษาจุลินทรีย์ 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Proteus vulgalis, Pseudomonas fluorescens, Salmonella sp.* และ *Staphylococcus aureus* พบว่า ชาที่ไม่ผ่านการหมัก(Tea flush และ green tea) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสูงกว่าชาที่ผ่านการหมัก และยังพบอีกว่า การผลิตชาในฤดูร้อนให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งที่สูงกว่าชาที่ผลิตในฤดูอื่นๆ อีกด้วย

ซากานะกะ และคณะ (2000) การศึกษาประสิทธิภาพของสารพอลิฟีนอลจากชา (tea polyphenols) ในการยับยั้งการเจริญของสปอร์ของแบคทีเรียโดยศึกษาในเชื้อ*Bacillus sp.* และ *Clostridium sp.* พบว่าสปอร์ของเชื้อดังกล่าวทนต่อความร้อนได้ลดลง เมื่อมีการใช้สารพอลิฟีนอลจากชา (EGCG ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในสารพอลิฟีนอลจากชา แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่สูงในการยับยั้งการเจริญของสปอร์ของแบคทีเรียทั้งสอง) ดังนั้นเมื่อมีการใช้สารพอลิฟีนอลจากชาควบคู่กับการใช้อุณหภูมิสูงก็สามารถลดสปอร์ของแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว

ฮี คุง ลิม และคณะ (2005) ได้ศึกษาการนำเอาโครงสร้างสารให้สี Indirubin และ Indigo blue ทำการทดสอบความสามารถในการต้านแบคทีเรียที่มีลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมเหมือนกัน คือลักษณะที่เป็นประเภทเดียวกันกับ Acidobacteria โดยคัดเลือกเอาเชื้อที่เป็นเป้าหมายคือ *Bacillus Subtilis* และ *Escherichia coli* โดยใช้วิธี The double-agar–layer method พบว่าสารให้สีทั้งสองสามารถต้านแบคทีเรียดังกล่าวได้ คือว่าสารให้สีทั้งสองมี

ความสามารถในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในรหัสของการควบคุมในยีนของแบคทีเรีย

งานวิจัยดังกล่าวช่วยสนับสนุนความน่าสนใจในการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนโดยทำให้ได้รู้จักเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของกลิ่นตัวนำข้อมูลมาขยายต่อยอดโดยโยงเข้ากับส่วนของครามตกผลึกออกมาเป็นงานวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งงานวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมดนั้นมีส่วนช่วยให้ผู้วิจัยได้รู้จักกระบวนการตลอดจนวิธีการต่างๆ และได้ข้อมูลความรู้มากมายนำมาประยุกต์ในการออกแบบการศึกษาวิจัยออกมาเป็นงานของตนเองในครั้งนี้

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนของผ้าย้อมครามในครั้งนี้ ใช้เชื้อทดสอบ วัสดุอุปกรณ์สารเคมี และวิธีการทดลองดังนี้

เชื้อทดสอบ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้อทดสอบ

เชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633

2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

2.1 แท่งแก้วคนสาร

2.2 ไมโครปีเปต (Micropipette)

2.3 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Rack)

2.4 ขวดรูปชมพู่ (Flask)

2.5 กรวยแก้ว (Funnel)

2.6 ถาดสำหรับตากใบคราม

2.7 ถังสำหรับย้อมคราม

2.8 ใบคราม

2.9 ผ้าทอเข็นมือ

2.10 เครื่องอบแห้ง (Hot air oven)

2.11 กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์

2.12 เครื่องชั่งแบบละเอียด (Analytical balance)

2.13 หลอดทดลอง (Test tube)

2.14 บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.15 ช้อนตักสาร (Spatula)

2.16 สำลี (Cotton wool)

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

2.17 กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 4)

2.18 ปิเปต (Pipette)

2.19 คีม (Forceps)

2.20 ตะเกียงบุนเสน (Burner)

2.21 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

2.22 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

2.23 ไม้บรรทัด (sliding calipers)

2.24 เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)

2.25 ขวดน้ำกลั่น (Wash bottom flask)

2.26 เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave)

2.27 เตาให้ความร้อน (Hot plate)

2.28 เครื่องบ่มเพาะเชื้อ (Incubator)

2.29 หม้อต้มอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.30 หม้อแสตนเลส

2.31 เตาแก๊ส

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1 ปูนขาว

3.2 อาหารแข็ง Mueller Hinton Agar

3.3 อาหารแข็ง Blood Agar

3.4 อาหารเหลว Brain Heart Infusion Broth

3.5 เนื้อครามเปียก

3.6 ครามผงบริสุทธิ์

3.7 ฝุ่นผงสังกะสี

3.8 เอทานอล

3.9 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

วิธีการทดลอง

การศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งโดยวิธีดิสก์ดิฟฟิวชัน(Disc diffusion method) แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ขั้นตอน

1. ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมสารยับยั้ง มีการเตรียมดังนี้

1.1. การเตรียมสารสกัดหยาบ

1.1.1 นำใบครามสดที่ตรวจสอบเอกลักษณ์ถูกต้องแล้วมาล้างให้สะอาดแล้วผึ่งให้แห้ง

1.1.2 ชั่ง 20 กรัม แช่ในตัวทำละลายน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ(Sterile water) จนท่วม นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสารสกัดมากรองด้วยกระดาษกรองจะได้สารสกัดหยาบจากใบคราม เตรียมเป็นสารยับยั้ง

1.2 การเตรียมเนื้อคราม

1.2.1 ชั่งใบคราม 100 กรัม แช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Sterile water) จนท่วม นาน 48 ชั่วโมง กรองแยกกากใบครามทิ้ง

1.2.2 ค่อยๆ เติมปูนขาวในน้ำครามกวนให้เป็นฟองมากๆ จนฟองแตกยุบตัวอย่างรวดเร็ว ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง รินของเหลวใสสีน้ำตาลชั้นบนทิ้งเก็บตะกอนเนื้อครามไว้เตรียมเป็นสารยับยั้ง

1.3 การเตรียมผ้าย้อมครามด้วยวิธีทางเคมี

1.3.1 เตรียมถังย้อม ตวงน้ำ 5 ลิตร บรรจุในภาชนะขนาดจุมากกว่า 7 ลิตร เติมปูนขาว 5 กรัม และผุ่นสังกะสี 1.5 กรัม ผสมให้เข้ากันปิดฝาภาชนะไว้นาน 6 ชั่วโมง

1.3.2 เตรียมถังเติม

1.3.2.1 อุ่นน้ำ 300 มิลลิลิตรในหม้อสแตนเลสขนาดจุประมาณ 1 ลิตร

1.3.2.2 ชั่งเนื้อครามเปียก 37.5 กรัม ในหม้อสแตนเลสเช่นกัน ผสมเอทานอลเล็กน้อยคนให้กลมกลืนกัน แบ่งน้ำอุ่นจากข้อ 1.3.2.1 เล็กน้อยผสมลงในเนื้อครามค่อยๆ คนอย่างช้าๆ จนเหลว

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

1.3.2.3 ชั่งปูนขาว 10 กรัมกับฝุ่นสังกะสี 3 กรัม ในหม้อแสตนเลส แบ่งของเหลวจากข้อ 2 ทีละน้อยผสมลงไป ค่อยๆ คน อย่างช้าๆ ให้ผสมเข้ากัน

1.3.2.4 ผสมของเหลวข้อ 1.3.2.3 ทั้งหมดลงในน้ำอุ่นข้อ 1.3.2.1 นำภาชนะตั้งไฟอ่อนๆ อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส ใช้แท่งแก้วคน คนของเหลวแรงๆ ให้เกิดฟอง ใช้เวลาคนประมาณ 5 นาที หรือสังเกตเห็นของเหลวเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเขียวปนเหลือง ฟองใสไม่มีสีเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินขุ่น ยกภาชนะลงจากเตา พักของเหลวไว้ 6 ชั่วโมง

1.3.2.5 ผสมของเหลวข้อ 1.3.2.4 ลงในถังย้อมที่พักไว้ 6 ชั่วโมงแล้วเช่นเดียวกัน ใช้ของเหลวจากถังย้อมล้างของเหลวจากภาชนะของข้อ 1.3.2.4 ให้หมด ปิดภาชนะ พักของเหลวในถังย้อมไว้อีก 6 ชั่วโมง

1.3.2.6 เตรียมผ้าทอเข็นมือ 45 กรัม ชุบน้ำให้เปียกและบิดให้หมาด นำลงย้อม 15 นาที

1.3.2.7 เตรียมถังเติมใหม่ โดยทำซ้ำข้อ 1.3.2.1-1.3.2.4 จึงเติมของเหลวที่เตรียมไว้ลงถังย้อมเดิม พักของเหลวในถังย้อมไว้อีก 6 ชั่วโมง นำผ้าที่ย้อมแล้ว 1 ซ้ำลงย้อมอีก

1.3.2.8 ทำซ้ำจะได้ผ้าย้อมครามตามต้องการคือ 1.3.2.2, 1.3.2.4, 1.3.2.6 และ 8 ซ้ำ เพื่อนำไปเตรียมเป็นแผ่นทดสอบหาความสามารถต่ำสุดต่อการยับยั้ง โดยปริมาณของเนื้อครามที่ใช้ในการย้อมแต่ละซ้ำดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 ปริมาณของเนื้อครามที่ใช้ในการย้อม

จำนวนในการย้อม (ซ้ำ)	ปริมาณของเนื้อครามที่ใช้ย้อม (กรัม)
2	75.0
4	150.0
6	225.0
8	300.0

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

2. ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมแผ่นทดสอบ (Disc)

นำผ้าทอเข็นมือที่ยังไม่ได้ย้อมและผ้าย้อมครามตัดให้เป็นแผ่นวงกลม (Disc) เส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยเครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที อบให้แห้ง มีทั้งหมด 9 แผ่นนำไปชุบสารยับยั้ง ดังแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 จำนวนของแผ่นทดสอบ

จำนวนแผ่นทดสอบ	ชนิดแผ่นทดสอบ
แผ่นที่ 1	แผ่นควบคุมที่หนึ่ง
แผ่นที่ 2	แผ่นควบคุมที่สอง
แผ่นที่ 3	แผ่นที่ชุบสารสกัดหยาบ
แผ่นที่ 4	แผ่นที่ชุบเนื้อคราม
แผ่นที่ 5	แผ่นที่ชุบครามผงบริสุทธิ์
แผ่นที่ 6	แผ่นที่ย้อมคราม 2 ซ้ำ
แผ่นที่ 7	แผ่นที่ย้อมคราม 4 ซ้ำ
แผ่นที่ 8	แผ่นที่ย้อมคราม 6 ซ้ำ
แผ่นที่ 9	แผ่นที่ย้อมคราม 8 ซ้ำ

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

3. ขั้นตอนที่ 3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อมี 3 ชนิด มีขั้นตอนการเตรียมแต่ละชนิดดังนี้

3.1 การเตรียม Mueller Hinton Agar สัดส่วนสารเคมีที่ใช้

Beef extract	2.0	g.
Acid Hydrolysate of Casein	17.5	g.
Starch	1.5	g.
Agar	17.0	g.

วิธีการ ใส่น้ำกลั่น 1 ลิตร ในหม้อ เติมส่วนผสมทั้งหมดลงไปคนให้เข้ากัน นำไปต้มจนวุ้นละลาย แล้วเทใส่ขวดรูปชมพู่นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วนำไปปรับให้อุณหภูมิลดลง เพื่อเวลาเทอาหารจะได้ไม่เกิดฝ้าบนจานอาหาร โดยนำไปแช่ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำอาหารมาเทใส่จานที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยอบใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทิ้งให้อาหารแข็งตัว แล้วนำจานอาหารไปอบให้หน้าอาหารแห้ง โดยใช้ Hot air oven ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

3.2 การเตรียม Blood Agar สัดส่วนสารเคมีที่ใช้

Heart Muscle, Infusion from (Solids)	2.0	g.
Pancreatic Digest of Casein	13.0	g.
Yeast Extract	5.0	g.
Sodium Chloride	5.0	g.
Agar 15.0 g.		

วิธีการ ใส่น้ำกลั่น 1 ลิตร ในหม้อ เติมส่วนผสมทั้งหมดลงไปคนให้เข้ากัน นำไปต้มจนวุ้นละลาย แล้วเทใส่ขวดรูปชมพู่นำไปทำให้ปราศจากเชื้อ โดยใช้เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วนำไปปรับให้อุณหภูมิลดลง เพื่อเวลาเทอาหารจะได้ไม่เกิดฝ้าบนจานอาหาร โดยนำไปแช่ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำอาหารมาเทใส่จานที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยอบใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เทอาหารใส่จานเพาะเชื้อ ทิ้งให้อาหารแข็งตัว แล้วนำจานอาหารไปอบให้หน้าอาหารแห้งโดยใช้ Hot air oven ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

3.3 การเตรียม Brain Heart Infusion Broth สัดส่วนสารเคมีที่ใช้

Calf Brains, Infusion from	200.0	g.
Beef Heart, Infusion from	250.0	g.
Bacto Protcase Peptone	10.0	g.
Bacto Dextrose	2.0	g.
Sodium Chloride	5.0	g.
Disodium Phosphate	2.5	g.

สถาบันวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

วิธีการ ใส่น้ำกลั่น 1 ลิตร ในหม้อ เติมส่วนผสมทั้งหมดลงไปคนให้เข้ากัน นำไปต้มจนวุ้นละลาย แล้วเทใส่ขวดรูปชมพู่นำไปทำให้ปราศจากเชื้อ โดยใช้เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วนำไปปรับให้อุณหภูมิลดลง เพื่อเวลาเทอาหารจะได้ไม่เกิดฝ้า โดยนำไปแช่ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำมาเทอาหารใส่หลอดทดลองปิดฝา

3.4 ขั้นตอนที่ 4 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

3.4.1 ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Isolation) ก่อนโดยนำเชื้อมาขีด (streak) ลงในจานอาหารแข็ง Blood Agar นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.2 เมื่อครบเวลานำห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) เขี่ยโคโลนีเดี่ยวๆ 3 โคโลนี มาถ่ายลงในหลอดอาหารเหลว (Brain Heart Infusion Broth)

3.4.3 นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมงนำออกมาเทียบความขุ่นปรับให้ได้เท่ากับความขุ่นของ Mc Farland NO.0.5 จะได้เชื้อเริ่มต้นประมาณ 1-2 $\times 10^{8}$ CFU / ml (Colony forming unit)

3.5 ขั้นตอนที่ 5 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งโดยวิธี ดิสก์ดิฟฟิวชัน(Disc diffusion method)

3.5.1 ใช้อาหารแข็ง Mueller Hinton Agar จำนวน 3 จานเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5.2 ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ นำมาขีดบนจานอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar ทั้ง 3 จานให้ทั่ว ทิ้งไว้ 5 นาที

3.5.3 ใช้คีม (Forceps) ปราศจากเชื้อคีบแผ่นทดสอบที่เตรียมไว้นำมาวางบนจานอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar ตามตำแหน่งทั้งสามจานโดยให้ระยะห่างแต่ละแผ่นห่างเท่ากันอย่างเหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 10

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

ตาราง 10 ตำแหน่งการวางแผ่นทดสอบในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

แผ่นที่	ชนิดแผ่นทดสอบ	จานที่ 1	จานที่ 2	จานที่ 3
1	แผ่นควบคุมที่หนึ่ง	/	/	/
2	แผ่นควบคุมที่สอง		/	
3	แผ่นที่ชุบสารสกัดหยาบ	/		
4	แผ่นที่ชุบเนื้อคราม		/	
5	แผ่นที่ชุบครามผงบริสุทธิ์			/
6	แผ่นที่ย้อมคราม 2 ซ้ำ	/		
7	แผ่นที่ย้อมคราม 4 ซ้ำ	/		
8	แผ่นที่ย้อมคราม 6 ซ้ำ	/		
9	แผ่นที่ย้อมคราม 8 ซ้ำ	/		

3.5.4 นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อออกมาอ่านผลสังเกต Inhibition zone และทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเป็นมิลลิเมตร โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำข้อมูลมาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

บทที่ 4

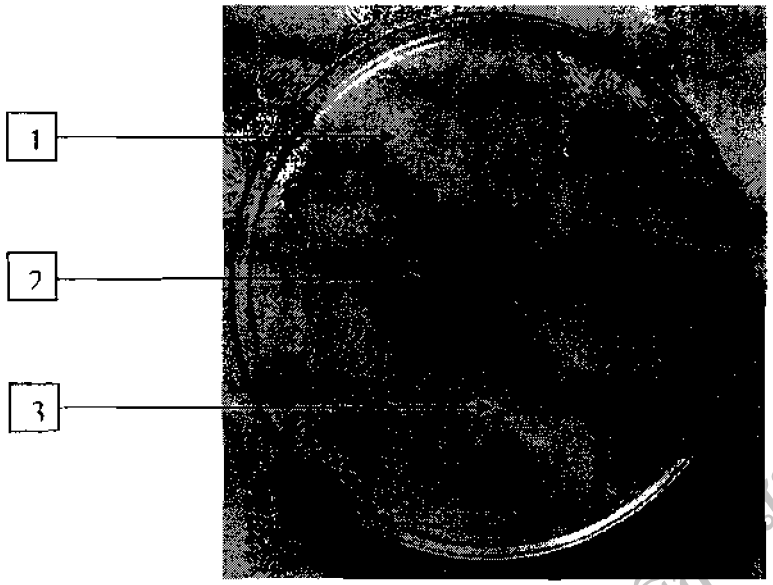
ผลการทดลอง และอภิปรายผล

ผลการทดลอง

จากการศึกษาคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนของสารสกัดหยาบเนื้อคราม ครามผงบริสุทธิ์ และผ้าย้อมครามทั้ง 4 ผืน ผลการทดลองพบว่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนสามารถมองลักษณะของ inhibition zone ซึ่งเกิดจากการยับยั้งของสารสกัดหยาบ เนื้อคราม ครามผงบริสุทธิ์ และผ้าย้อมครามทั้ง 4 ผืนพร้อมแผ่นควบคุม ได้ดังภาพประกอบ 8, 9 และ 10

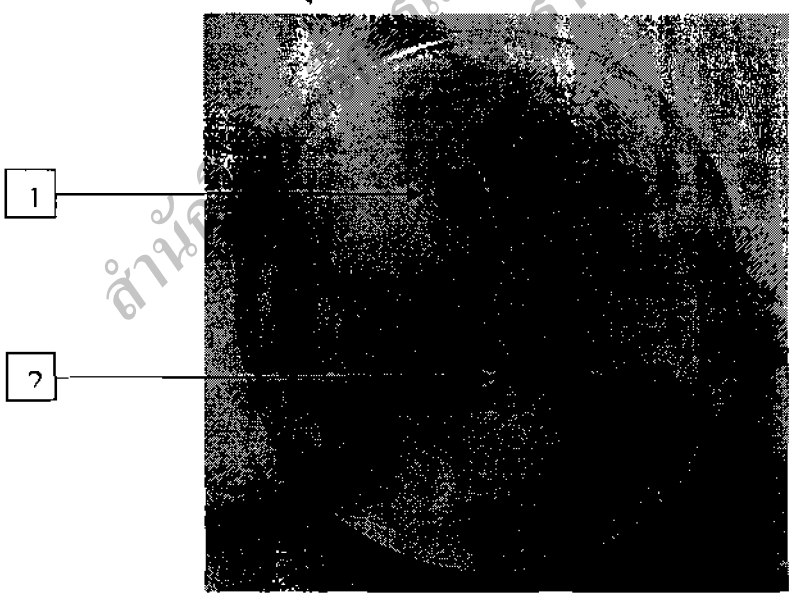
ภาพประกอบ 8 ลักษณะของ inhibition zone ในจานเลี้ยงเชื้อ เกิดจากสารสกัดหยาบและผ้าย้อมครามทั้ง 4 ผืน

ทั้งนี้หมายเลข 5 คือ แผ่นที่ชุบสารสกัดหยาบและ 1 , 2 , 3 , 4 คือ แผ่นที่ย้อมคราม 2, 4 , 6 และ 8 ซ้ำตามลำดับ ส่วนหมายเลข 6 คือ แผ่นควบคุมที่หนึ่ง



ภาพประกอบ 9 ลักษณะของ inhibition zone ในจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเกิดจากเนื้อคราม

ทั้งนี้หมายเลข 1 คือ แผ่นควบคุมที่หนึ่ง หมายเลข 2 คือ แผ่นที่ชุบเนื้อคราม ส่วนหมายเลข 3 คือ แผ่นควบคุมที่สอง



ภาพประกอบ 10 ลักษณะของ inhibition zone ในจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเกิดจากครามผงบริสุทธิ์

ทั้งนี้หมายเลข 1 คือ แผ่นที่ชุบครามผงบริสุทธิ์ หมายเลข 2 คือ แผ่นควบคุมที่หนึ่ง และทำการวัดขนาดของ inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนของสารสกัดหยาบ เนื้อคราม ครามผงบริสุทธิ์และผ้าย้อมครามทั้ง 4 ผืน ได้ผลดังตาราง 11

ตาราง 11 ขนาดของ inhibition zone

ชนิดแผ่นทดสอบ	เส้นผ่าศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)			เฉลี่ย (มิลลิเมตร)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
1. แผ่นควบคุมที่หนึ่ง	0.0	0.0	0.0	0.0
2. แผ่นควบคุมที่สอง	0.0	0.0	0.0	0.0
3. แผ่นที่ชุบสารสกัดหยาบ	11.0	10.0	12.0	11.0
4. แผ่นที่ชุบเนื้อคราม	18.0	19.0	18.0	18.3
5. แผ่นที่ชุบครามผงบริสุทธิ์	16.0	15.0	16.0	15.6
6. แผ่นที่ย้อมคราม 2 ซ้ำ	0.0	0.0	0.0	0.0
7. แผ่นที่ย้อมคราม 4 ซ้ำ	0.0	0.0	0.0	0..0
8. แผ่นที่ย้อมคราม 6 ซ้ำ	12.0	11.0	12.0	11.7
9. แผ่นที่ย้อมคราม 8 ซ้ำ	12.0	12.0	13.0	12.3

จากตารางผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า ผ้าทอเข็นมือชุบสารสกัดหยาบ ผ้าย้อมครามที่ย้อม 6 ซ้ำ ผ้าย้อมครามที่ย้อม 8 ซ้ำ ผ้าทอเข็นมือชุบครามผงบริสุทธิ์ และผ้าทอเข็นมือชุบเนื้อคราม มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนได้จากน้อยไปหามากตามลำดับและในผ้าย้อมครามที่ย้อม 2 ซ้ำ ผ้าย้อมครามที่ย้อม 4 ซ้ำ แผ่นควบคุมที่สอง และแผ่นควบคุมที่หนึ่งไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขน

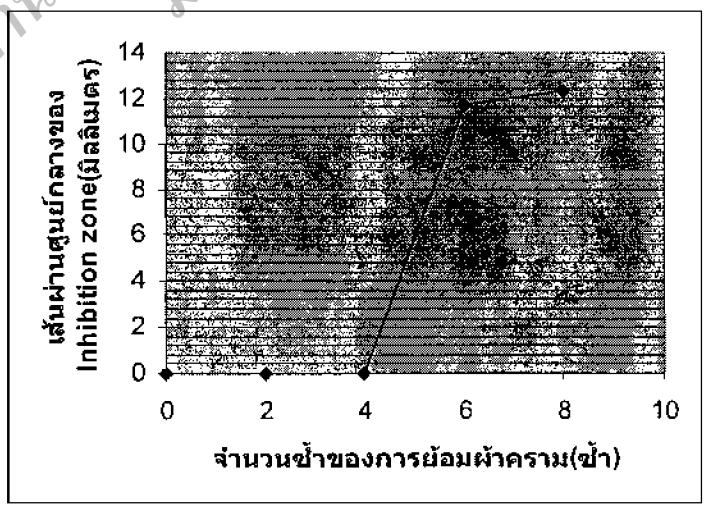
อภิปรายผล

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนของผ้าทอเข็นมือชุบสารสกัดหยาบและชุบเนื้อครามทำให้ทราบได้ว่าในใบครามมีสารเคมีต้นตอในการทำสีครามธรรมชาติและในเนื้อครามซึ่งเป็นวัตถุดิบในผลิตภัณฑ์ผ้าย้อมครามนั้นมีสารที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียใต้วงแขนได้ ส่วนในสารสกัดหยาบแม้จะมี inhibition zone

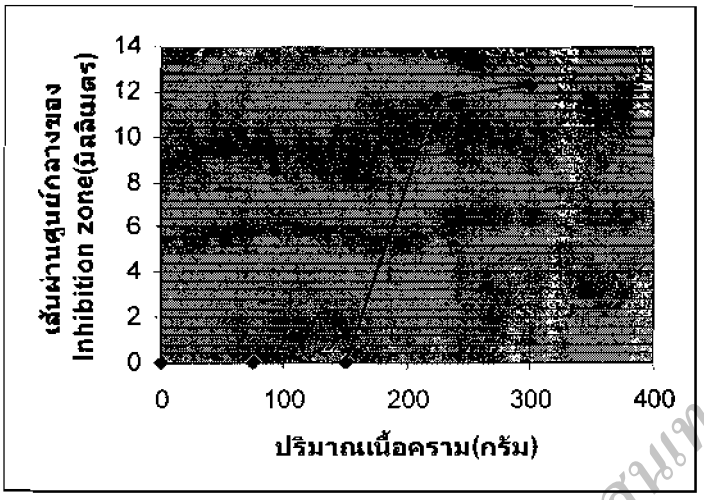
สถาบันวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

และวัดขนาดได้เพียง 11.0 มิลลิเมตรและเมื่อเทียบกับเนื้อครามที่วัดได้ 18.3 มิลลิเมตรนั้น ซึ่งเป็นเพราะในสารสกัดหยาบมีกลุ่มของสารเคมีที่ละลายในน้ำมีความสามารถในการยับยั้งน้อยกว่าในเนื้อครามที่มีกลุ่มของสารเคมีที่ไม่ละลายในน้ำ ซึ่งทำให้ทราบว่าในใบครามสดมีสารเคมีต้นตอในการทำสีครามธรรมชาตินั้นมีกลุ่มของสารเคมีที่ละลายในน้ำและไม่ละลายในน้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขน แต่ในกระบวนการย้อมสีครามนั้นส่วนมากแล้วจะต้องมีการเตรียมเนื้อครามก่อนและใช้ปูนขาวตกตะกอนเนื้อคราม จากผลการทดลองที่ใช้แผ่นควบคุมที่สองทดสอบการยับยั้งนั้นพบว่าไม่สามรถยับยั้งได้ ซึ่งทำให้ทราบว่าปูนขาวไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการยับยั้งแต่อย่างไร

จากการศึกษาความสามารถต่ำสุดในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขน พบว่าแผ่นควบคุมที่หนึ่ง ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้คือไม่เกิด inhibition zone ให้สังเกตเห็น แสดงว่าแผ่นควบคุมที่หนึ่งนั้นก็ไม่เกี่ยวข้องกับกลไกการยับยั้งแต่อย่างไร ในส่วนของผ้าย้อมครามที่ย้อม 2 ซ้ำ และ 4 ซ้ำ ใช้ปริมาณเนื้อครามในการย้อม 75.0 กรัม และ150.0 กรัม ตามลำดับ ก็ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้เช่นเดียวกัน เป็นเพราะปริมาณของเนื้อครามที่เข้าไปยึดเกาะกับเส้นใยฝ้ายมีปริมาณน้อยจึงทำให้ความสามารถไม่มากพอที่จะทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ และในการศึกษาผ้าย้อมคราม 6 ซ้ำ กับ 8 ซ้ำ ใช้เนื้อคราม 225.0 กรัม และ 300.0 กรัม นั้นมีปริมาณเนื้อครามมากพอทำให้เกิด inhibition zone ให้สังเกตเห็นและวัดขนาดได้ 11.7 และ12.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเนื้อครามและจำนวนซ้ำของการย้อมกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ได้ดังภาพประกอบ 11 และ 12



ภาพประกอบ 11 กราฟแสดงค่าความสามารถจำนวนซ้ำของผ้าย้อมครามต่อการยับยั้ง



ภาพประกอบ 12 กราฟแสดงค่าความสามารถของปริมาณเนื้อครามต่อการยับยั้ง

จากทั้งสองกราฟแสดงให้เห็นว่าขนาด inhibition zone เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของเนื้อครามที่เข้าไปยึดเกาะกับเส้นใยของฝ้ายและทำให้ทราบถึงความสามารถต่ำสุดในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนของผ้าย้อมคราม คือ ผ้าย้อมครามที่ย้อม 6 ซ้ำ ซึ่งใช้ปริมาณเนื้อครามในการย้อม 225.0 กรัม ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการสวมใส่ผ้าย้อมครามเพื่อใช้ป้องกันกลิ่นตัวที่เกิดจากแบคทีเรียต้องใช้ผ้าที่สีเข้มผ่านการย้อมหลายๆ ซ้ำ

ส่วนการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนของผ้าทอเข็นมือชุบเนื้อครามและผ้าทอเข็นมือชุบครามผงบริสุทธิ์นั้น พบว่าผ้าทอเข็นมือชุบเนื้อครามมีความสามารถในการยับยั้งวัดขนาด inhibition zone ได้ 18.3 มิลลิเมตร ส่วนผ้าทอเข็นมือชุบครามผงบริสุทธิ์วัดได้ 15.6 มิลลิเมตร ซึ่งน้อยกว่าเนื้อครามนั้น แสดงว่าในเนื้อครามมีสารอื่นๆ นอกจากอินดิโก อย่างเช่นสารอินดิรูบิน ซึ่งมีอยู่ในเนื้อครามนั้นช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ซึ่งสอดคล้องกับรายงานทางวิชาการของประเทศจีนและรายงานของทีมวิจัยจากประเทศเกาหลีรายงานว่า อินดิรูบินมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ทำให้เนื้อครามมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนได้มากกว่าครามผงบริสุทธิ์

ส่วนกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของเนื้อครามนั้น น่าจะเกี่ยวข้องเนื้อครามไปมีผลกับกลไกในการเกิดกระบวนการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อ หรือจากกลไกของการเกิดกระบวนการยับยั้งการสร้างโปรตีนของเชื้อ มีผลให้เซลล์ถูกทำลายรบกวนการทำงานของไรโบโซม หรือเกิดจากกระบวนการที่เมตาบอลิซึมของเชื้อถูกรบกวนเกิดการเปลี่ยนแปลง

เอนไซม์แคตาเลสที่เชื้อสร้างขึ้นมา เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงวิธีการสร้างเมตาบอไลซ์ของเชื้ออย่างใดอย่างหนึ่ง หรืออาจเป็นไปได้ทั้งหมดซึ่งกลไกดังกล่าว มีผลทำให้เชื้อถูกทำลายหรือหยุดการเจริญเติบโต และข้อควรระวังของการทดลองในขั้นตอนการเตรียมเชื้อเริ่มต้น ต้องให้ได้เท่ากับความขุ่นของ Mc Farland NO.0.5 จะได้เชื้อเริ่มต้นประมาณ $1\text{-}2 \times 10^{8}$ CFU / ml(Colony forming unit) ถ้ามากหรือน้อยเกินไปทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนได้ และขั้นตอนการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งในการใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ แล้วกดไม้พันสำลีกับข้างหลอดให้แห้งพอหมาดๆ นำมาขีดบนจานอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar ให้ทั่วต้องให้หมาดเพราะการขีดจะทำให้เชื้อขึ้นหนาแน่นมาก ทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนได้ ส่วนในขั้นตอนการนำแผ่นทดสอบไปชุบสารยับยั้งอย่าชุบมากจนเลอะ เพราะเวลานำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อสารยับยั้งจะไหลออกมารอบๆแผ่นทดสอบ ทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนได้เช่นเดียวกัน

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

บทที่ 5

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผล

จากการศึกษาคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนของผ้าย้อมคราม ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขน โดยนำเอาแผ่นทดสอบดังนี้ แผ่นที่ชุบสารสกัดหยาบ แผ่นที่ชุบเนื้อคราม แผ่นที่ชุบครามผงบริสุทธิ์ แผ่นที่ย้อมคราม 2ซ้ำ แผ่นที่ย้อมคราม 4 ซ้ำ แผ่นที่ย้อมคราม 6 ซ้ำ แผ่นที่ย้อมคราม 8 ซ้ำ และแผ่นควบคุมทั้งสองแผ่น มาทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งกับแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขน พบว่า แผ่นควบคุมที่หนึ่ง แผ่นควบคุมที่สอง แผ่นที่ย้อมคราม 2 ซ้ำ และแผ่นที่ย้อมคราม 4 ซ้ำไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนได้ ส่วนแผ่นที่ชุบสารสกัดหยาบ แผ่นที่ย้อมคราม 6 ซ้ำ แผ่นที่ย้อมคราม 8 ซ้ำ แผ่นที่ชุบครามผงบริสุทธิ์ และแผ่นที่ชุบเนื้อคราม มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขน โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ได้ 11.0 11.7 12.3 15.6 และ18.3 มิลลิเมตร จากน้อยไปหามากตามลำดับ และความสามารถต่ำสุดในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนของผ้าย้อมคราม คือ ผ้าย้อมครามที่ย้อม 6 ซ้ำ ซึ่งใช้ปริมาณของเนื้อครามในการย้อม 225.0 กรัม

ข้อเสนอแนะ

1. ยังมีแบคทีเรียที่เป็นเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนังสามารถอาศัยและเจริญเติบโตอยู่บนผิวหนังของคนอีกมาก เช่น เชื้อ *Staphylococcus epidermidis* และ *Streptococcus viridan* เป็นต้น ซึ่งเชื้อเหล่านี้เมื่อเจริญเติบโตบนผิวหนังของคนแล้วก็จะสร้างกลิ่นออกมากลายเป็นกลิ่นตัวได้ ดังนั้นควรศึกษาสมบัติยับยั้งต่อเชื้อเหล่านี้ของผ้าย้อมครามเพิ่มอีกด้วย

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

2. ควรทำการศึกษากับคนโดยให้คนใส่ผ้าย้อมครามและผ้าอย่างอื่นเปรียบเทียบกัน โดยการใส่เชื้อที่มีจำนวนเท่ากันบริเวณใต้วงแขนแล้วนำมาเพาะเชื้อนับจำนวนเชื้อใหม่

3. ควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของอินดิโกว่ามีกลไกหรือวิธีการที่อินดิโกมีผลต่อเชื้อโดยทำให้เชื้อนั้นหยุดการเจริญเติบโตหรือถูกทำลายลงว่ามีกลไกอย่างไร เช่นรบกวนการสร้างสารที่จำเป็นในการดำรงชีพของเชื้อ ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ รบกวนหน้าที่การทำงานของเซลล์เมมเบรนและยับยั้งการสร้างโปรตีน เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในชีวิตประจำวันทั้งทางด้านเกษตรทางด้านสุขภาพและด้านอื่นๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการนำไปพัฒนาเรื่องครามต่อไป

4. ควรศึกษาทางเภสัชวิทยาด้วยการทดสอบการเจือจางสารเคมีที่มีในใบครามด้วยวิธี Dilution susceptibility test เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration หรือ MIC) เพื่ออ้างอิงกำหนดเป็นค่ามาตรฐานกับเชื้ออื่นๆ ที่มีความสำคัญทางการแพทย์

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

บรรณานุกรม

ธิดารัตน์ บุญรอด และ ฉุนัตรา จันทร์สุวานิชย์. "องค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อบักเตรีจากสารสกัดใบหว้า," วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 42(2) : 109-11; เมษายน – มิถุนายน 2543.

นงค์ลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพ ฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2541.

นิตยา ชะนะญาติ. การพัฒนาการสกัดอินดิโกจากครามและย่อมเพื่อใช้ในการย้อมสีธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์ วท.ม. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2544.

นิพัฒน์ ลิ้มสงวน. ความสามารถของคาเทชินจากชาเขียวของไทยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2547.

ปัทมาวดี เสตะกัณณะ, ธิดารัตน์ บุญรอด และ จารีย์ บันสิทธิ์. "การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ในสมุนไพรไทย," วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 41(4) : 381-393 ; ตุลาคม–ธันวาคม 2542.

พูนฉวี สมบัติศิริ.การศึกษาสารยับยั้งแบคทีเรียบริเวณใต้วงแขนด้วยน้ำมันหอมระเหยจาก

มาลิน จุลศิริ. วิทยาการทางคลินิกเกี่ยวกับจุลชีวปรสิตและภูมิคุ้มกัน. พิมพ์ครั้งที่ 2.นนทบุรี : มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช, 2538.

พืชสมุนไพร. ลำปาง : มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง, 2548.

วิภาวดี แมนมนตรี.แบคทีเรียวินิจฉัย. พิมพ์ครั้งที่ 2 . ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2537.

วิไล หนุนภักดี. วิทยาการทางคลินิกเกี่ยวกับจุลชีวปรสิตและภูมิคุ้มกัน. พิมพ์ครั้งที่ 2. นนทบุรี : มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช, 2538.

แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ. สถานภาพทางการวิจัยการแพทย์แผนไทย. กรุงเทพ ฯ : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2539.

สุจินต์ ตันติสิษฐกุล และ มาลี พรทวีทรัพย์. ประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีผลยับยั้งแบคทีเรีย. ปัตตานี : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2543.

สุมลวรรณ ชุ่มเชื้อ. การสกัดและผลของสารสกัดที่สกัดได้จากสมุนไพรบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2534.

สมพร ศรีเฟื่องฟุ้ง. วิทยาการทางคลินิกเกี่ยวกับจุลชีว ปรสิต และภูมิคุ้มกัน. พิมพ์ครั้งที่ 2 นนทบุรี : มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช, 2538.

สระบุรี ไชยมงคล. จุลชีววิทยา. สกลนคร: มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร, 2540.

สระบุรี. ปฏิบัติการจุลชีววิทยา. สกลนคร : มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร, 2545.

อนุรัตน์ สายทอง. การผลิตสีครามจากต้นคราม. สกลนคร : มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร, 2543.

อนุรัตน์ สายทอง. การเตรียมสีครามจากครามผงธรรมชาติ. สกลนคร : มหาวิทยาลัยราชภัฏ สกลนคร, 2544.

อนุรัตน์ สายทอง. การพัฒนาชุดความรู้ของภูมิปัญญาชาวไทญ้อด้านสิ่งทอ. สกลนคร : มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร, 2545.

อนุรัตน์ สายทอง.เคมีของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. สกลนคร : มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร, 2546.

อภิญญา ผลิโกมล. แบคทีเรีย. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2537.

Chou , C. , Lin , L. and Chung , K. Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season, International Journal of Food Microbiology. 48 : 125 – 130 ; 1999.

Sakanaka , S. , Juneja , L.R. and Taniguchi , M. Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore – forming bacterial, Journal of Bioscience and Bioengineering. 90(1) : 81 – 85 ; 2000.

Yam , T.S. , Shas , S. and Hamilton – Miller ,J.M.T. Microbiological activity of Whole and fractionated crude extracts of tea (Camellia sinensis) , and of teacomponents. FEMS Microbiology Letters. 152 : 169 – 174 ; 1997.

The Genus Bacillus. (online) .Arailable HTTP :http : // textbookofbacteriology.net / Bacillus.html. (2009, August 10).

Lim, He K. and other. Characterization of a Forest Soil Metagenome Clone That Confers Indirubin and Indigo Production on *Escherichia coli*, [Online]. Available : http: // aem.asm.org / cgi / content / full / 71 /12 / 7768. (2009, August 10).

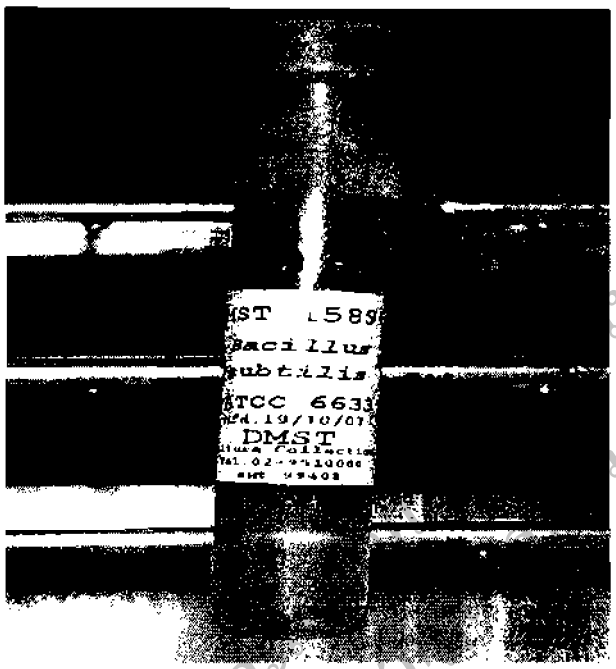
ศูนย์วิทยทรัพยากร มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร สถาบันวิจัยและเทคโนโลยีสารสนเทศ

ภาคผนวก

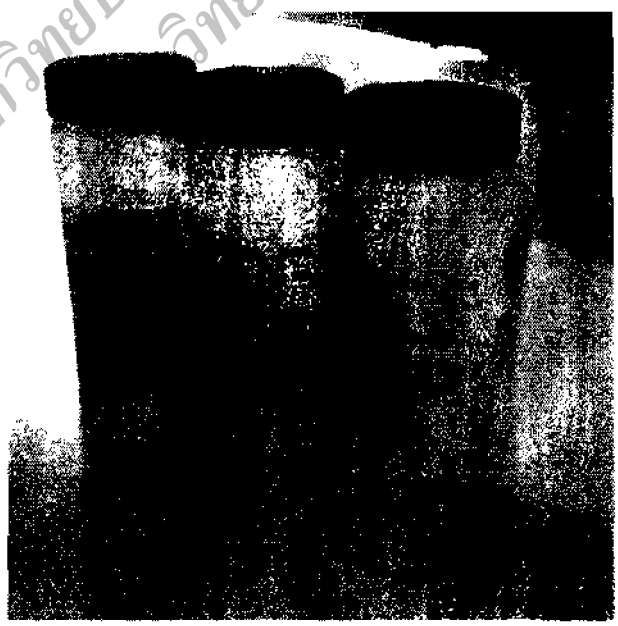
สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

ภาคผนวก

ภาพประกอบงานวิจัย

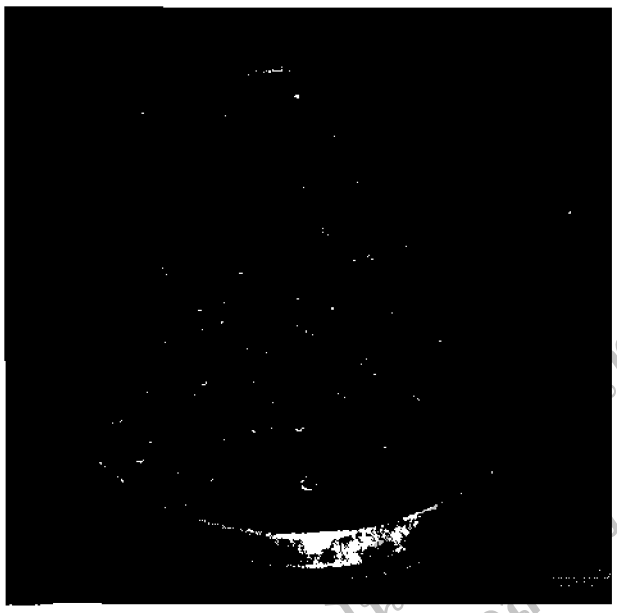


ภาพประกอบ 13 ตัวอย่าง *Bacillus subtilis* ในหลอดทดลองของอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพประกอบ 14 ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อผงสำเร็จรูป

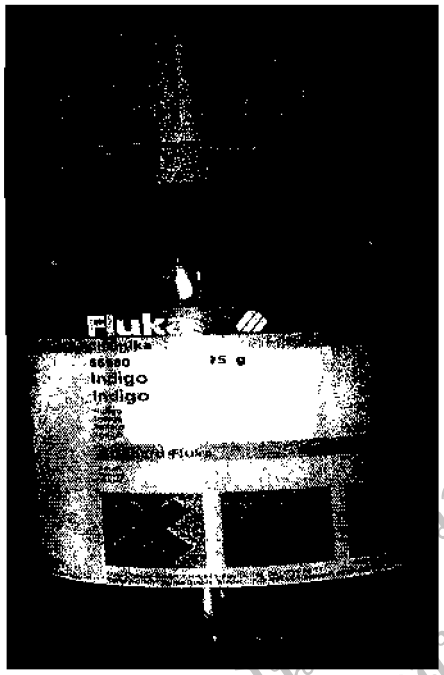
สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ วิทยาลัยราชภัฏ



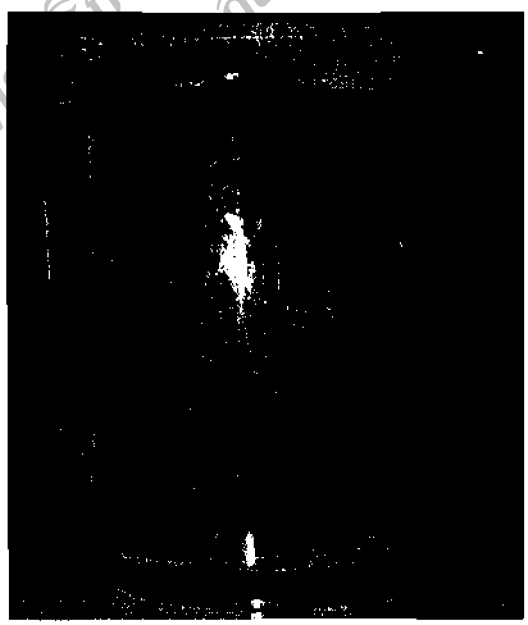
ภาพประกอบ 15 ตัวอย่างลักษณะโคโลนี *Bacillus subtilis* ใน blood agar

ภาพประกอบ 16 ตัวอย่างผ้าย้อมคราม

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร



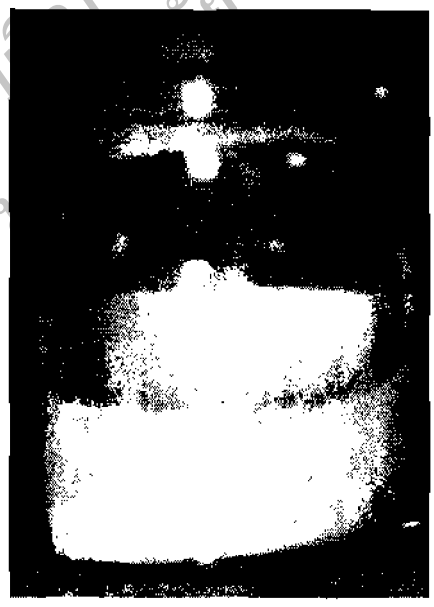
ภาพประกอบ 17 ตัวอย่างตรามผงบริสุทธิ์



ภาพประกอบ 18 ตัวอย่างเนื้อตราม

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

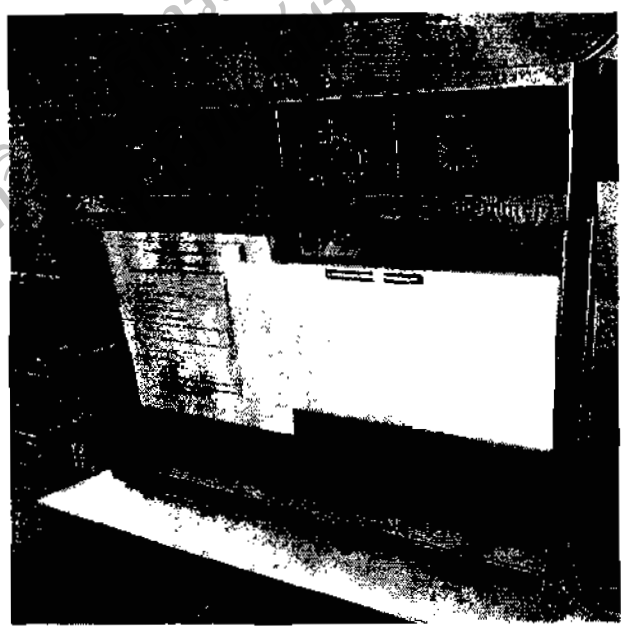
ภาพประกอบ 19 ตัวอย่างน้ำแช่ใบคราม



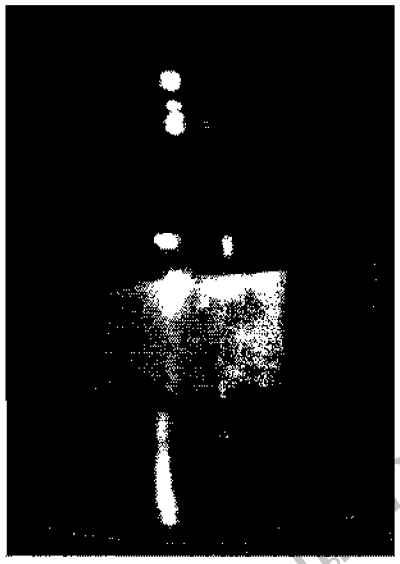
ภาพประกอบ 20 ตัวอย่างน้ำปูนใส

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

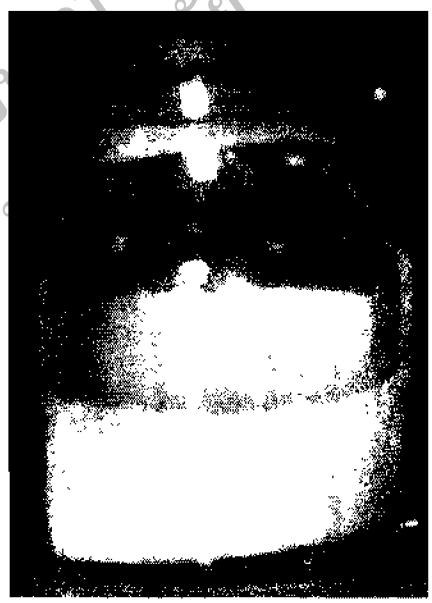
ภาพประกอบ 21 ตัวอย่างเครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave)



ภาพประกอบ 22 ตัวอย่างเครื่องอบแห้ง (Hot air oven)

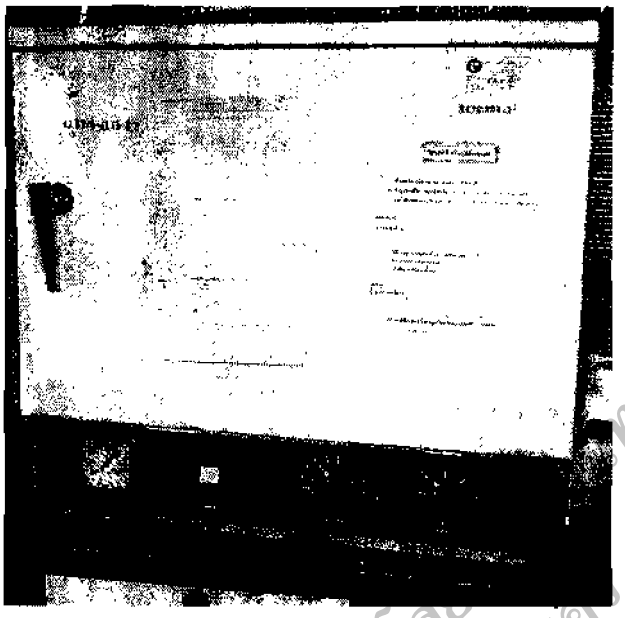


ภาพประกอบ 19 ตัวอย่างน้ำแช่ใบคราม



ภาพประกอบ 20 ตัวอย่างน้ำปูนใส

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร



ภาพประกอบ 23 ตัวอย่างเครื่องบ่มเพาะเชื้อ (Incubator)

ภาพประกอบ 24 ตัวอย่างเตาให้ความร้อน (Hot plate)

168787

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นายปราชญ์สกล ช่วยสุดสกุลชัย
วัน เดือน ปีเกิด	4 ตุลาคม 2515
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	14 หมู่ 11 ต.พรรณา อ.พรรณานิคม จ.สกลนคร 47130 โทร (042) 779397 มือถือ 084-7896162
ตำแหน่งปัจจุบัน	เจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชำนาญงาน
สถานที่ทำงาน	โรงพยาบาล พระอาจารย์ฝั้น อาจาโร ต.พรรณา อ.พรรณานิคม จ.สกลนคร 47130 โทร (042) 779141
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2522	ป.6 โรงเรียนสกลนครวันครู (2501) สกลนคร
พ.ศ. 2528	ม.3 โรงเรียนสกลราชวิทยานุกูล สกลนคร
พ.ศ. 2531	ม.6 โรงเรียนสกลราชวิทยานุกูล สกลนคร
พ.ศ. 2534	ประกาศนียบัตรพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2539	ปริญญาสาธารณสุขศาสตรบัณฑิต (ศส.บ.) สาขาชันสูตรสาธารณสุข มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช
พ.ศ. 2549	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิทยาศาสตรศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2536 เจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ โรงพยาบาล พระอาจารย์ฝั้น อาจาโร ต.พรรณา อ.พรรณานิคม จ.สกลนคร จนถึงปัจจุบัน

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร