

รายงานวิจัยประจำปีงบประมาณ 2544

เรื่อง

การทดสอบเบื้องต้นของฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียของโปรตีนไหมที่ฉายรังสี
Preliminary study of anti-bacterial activity of irradiated silk protein

โดย

ดร. จินตนา บุนนาค

ดร. กัญญา ตันตวิสุทธิกุล

ดร. จารุณีย์ ทองผาสุก

RCH
QP
552
SH

เลขหมึ..... ๑๗๘๒๘
เลขทะเบียน..... 45287
วัน, เดือน, ปี..... 22 ส.ค. 2546

ภาควิชาครุศาสตร์เกษตร
คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม

b. 11203080
i.....

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

มีนาคม 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบเบื้องต้นของฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียของโปรตีนไหมที่ฉายรังสี

Preliminary study of anti-bacterial activity of irradiated silk protein

บทคัดย่อ

ได้ทำการทดสอบเบื้องต้นของฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ อีโคไล (*Escherichia coli*) และ ชนิดแกรมบวก สแตฟไฟโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ของโปรตีนไหมชนิดไฟโบรอิน (fibroin) ที่ผสมกับโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ [poly(vinyl) alcohol] แล้วฉายรังสีที่ปริมาณ 20 30 40 และ 50 กิโลเกรย์ โดยใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์การต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย คือ วิธีอะการดิสดิฟฟิวชัน (Agar disk diffusion method) พบว่า ไฟโบรอินโปรตีนไหม 3 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ 3 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ แล้วฉายรังสี 50 กิโลเกรย์ มีคุณสมบัติเป็นสารดูดซับน้ำ (hydrogel) ที่ดี และมีคุณสมบัติฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดได้ ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นที่ได้นี้มีประโยชน์อย่างมากในการที่จะนำโปรตีนไหมไปใช้ในการทำผ้าปิดแผลไฟไหม้ หรือน้ำร้อนลวก (burn wound dressing) ทางด้านการแพทย์ต่อไปได้

Abstract

Preliminary study of silk fibroin protein effects on anti-bacterial activity of two kinds bacteria, *Escherichia coli*, gram negative, and *Staphylococcus aureus*, gram positive. The hydrogels were prepared as solution blends of 3 % silk fibroin protein and 3 % poly(vinyl) alcohol(PVA) and were irradiated by using gamma ray at 20, 30, 40 and 50 kGy under nitrogen atmosphere. To clarify anti-bacterial activity of hydrogels, modified of the Agar disk diffusion method and American Association of Textile Chemists and Colorists were carried out. It was found that 3 % silk fibroin protein and 3 % PVA at 50 kGy irradiation was suitable condition for preparation hydrogel to have both high water absorption and the highest of ant-bacterial activity. These results will be very useful for application of silk protein to produce burn wound dressing in medical field.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ประเทศไทยมีการผลิตไหมเป็นอันดับที่ 5 ของโลก และในแต่ละปีมีการผลิตได้มากถึง 13,000 ตัน ในจำนวนนี้ได้สูญหายไปโดยไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์หรือนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยไม่คุ้มค่า ซึ่งมีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เป็นของเหลือทิ้ง เป็นผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมปีละหลายตัน โดยของเหลือเหล่านี้มีทั้งที่เป็นของแข็งและของเหลว ถ้าสามารถที่จะนำของเหลือทิ้งเหล่านี้โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนจากไหมได้แก่ ไฟโบรอิน (Fibroin) และ เซรีซิน (Sericin) มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ใช้ประโยชน์กับมนุษย์ได้กว้างขวางมากยิ่งขึ้น ก็จะเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อม และเป็นการเพิ่มมูลค่าและเพิ่มคุณค่าของไหมไทยให้มากยิ่งขึ้นไม่เพียงแต่เป็นสินค้าสำหรับสวมใส่ประดับร่างกายเพียงอย่างเดียว จึงเป็นการช่วยส่งเสริมเศรษฐกิจของประเทศไทยให้ดีขึ้นได้อีกทางหนึ่งด้วย

ปัจจุบันนี้การปรับปรุงผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ เครื่องสำอาง และส่วนประกอบของอาหาร ได้นำเอาโปรตีนจากไหมไปใช้ประโยชน์กันมากขึ้น เช่น การปรับปรุงคุณภาพในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ไฮโดรเจล (hydrogel) หรือ พอลิเมอร์ดูดซับน้ำ ซึ่งมีความสำคัญและได้รับความสนใจอย่างมากในวงการแพทย์ ในการนำมาประยุกต์ใช้ทำเลนส์สัมผัส (contact lenses) วัสดุตกแต่งบาดแผลจากไฟไหม้ (burn wound dressing) ตลอดจนใช้เคลือบวัตถุที่ต้องนำมาใช้สัมผัสกับร่างกาย เช่น ใช้เคลือบอวัยวะเทียมที่ใช้ในร่างกาย เป็นต้น

การใช้รังสีพลังงานสูง เช่น รังสีแกมมา อิเล็กตรอน ปรับปรุงแรงยึดระหว่างพอลิเมอร์ผสม เนื่องจากเมื่อพอลิเมอร์ผสมได้รับพลังงานสูงจะเกิดการรวมตัวของอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดพันธะเชื่อมโยงเป็นโครงสร้างร่างแหที่เสถียร จึงใช้เทคโนโลยีนี้ในการผลิตผลิตภัณฑ์พอลิเมอร์ผสมที่มีคุณภาพตามต้องการ

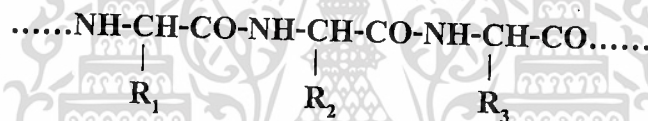
การผลิตพวกพอลิเมอร์ไฮโดรเจลจากโปรตีนไหมหรือการนำโปรตีนจากไหมไปใช้ประโยชน์ดังกล่าว ในทางการแพทย์ ทางอาหาร เครื่องสำอาง และทางสิ่งแวดล้อม ต้องทราบคุณสมบัติทางเคมีและกิจกรรมทางชีววิทยา ของโปรตีนไหมที่ผ่านการฉายรังสี จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาข้อมูลทางเทคโนโลยีเบื้องต้น เพื่อที่จะสามารถใช้เป็นข้อมูลให้กับสาขาต่างๆที่ต้องการนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมได้ดียิ่งต่อไป นอกจากนี้ยังไม่มีผู้ใดในประเทศไทยที่ได้ศึกษาข้อมูลดังกล่าวแล้วด้วยเหตุนี้จึงเป็นแรงจูงใจทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาเพื่อเพิ่มความเข้าใจที่ดียิ่งขึ้นในการนำไปใช้ประโยชน์ได้เหมาะสมต่อไป

การตรวจค้นคว้าวเอกสาร

เส้นใยไหม

ไหม คือ เส้นใยโปรตีนธรรมชาติ ซึ่งประกอบด้วย ไฟโบรอิน (Fibroin) ประมาณ 75% มีลักษณะเป็นเส้นใย ประกอบด้วยธาตุสำคัญ คือ C H O N ซึ่งมีรายละเอียด ดังตารางที่ 1 (วีระศักดิ์ อุดมกิจเดชา, 2542) และ เซริซิน (Sericin) ประมาณ 23% และส่วนประกอบอื่น เช่น ไขมัน ขี้ผึ้ง และ สารอินทรีย์ต่างๆ ประมาณ 2% เส้นจากรังไหม 97% เป็นโปรตีนบริสุทธิ์

เส้นใยธรรมชาติกลุ่มที่ได้จากสัตว์ทุกชนิดจะเป็นเส้นใยโปรตีนทั้งหมด ซึ่งมีโครงสร้างต่อกันด้วยกรดอะมิโน (amino acids) ซึ่งต่อกันเป็นโซ่ยาว ที่เรียกว่า polypeptide chains แสดงในภาพที่ 1 (วีระศักดิ์ อุดมกิจเดชา, 2542)



ภาพที่ 1 การเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลด้วย amide (peptide) links
ที่มา: วีระศักดิ์ อุดมกิจเดชา, 2542 : 93

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของธาตุต่างๆในไฟโบรอิน

ธาตุ	เปอร์เซ็นต์
คาร์บอน	48.0-49.0
ไฮโดรเจน	6.40-6.51
ไนโตรเจน	17.35-18.89
ออกซิเจน	26.00-27.90

ที่มา: วีระศักดิ์ อุดมกิจเดชา, 2542 .

ไฟโบรอิน มีคุณสมบัติ คือ ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลาย ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลัก 4 ชนิด ซึ่งได้แสดงไว้ดังตารางที่ 2 (Komatsu, K., 1979) คือ ไกลซีน (Glycine) อะลานีน (Alanine) เซอรีน (Serine) และ ไทโรซีน (Tyrosine) โครงสร้างไฟโบรอินของไหมเลี้ยงเป็นแบบ G-A-G-A ซึ่ง G คือ Glycine และ A คือ Alanine ในบางกรณี A เปลี่ยนไปเป็น Serine หรือ Tyrosine

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของกรดอะมิโนของเซอรีนและไฟโบรอิน(กรดอะมิโนเป็นกรัมในโปรตีน 100 กรัม)

กรดอะมิโน		เซอรีน	ไฟโบรอิน
Non-polar Amino acid	Glycine	8.66	41.25
	Alanine	3.51	28.87
	Valine	3.14	2.63
	Leucine	1.02	0.32
	Isoleucine	0.77	0.44
	Proline	0.66	-
	Phenylalanine	0.50	0.58
	Acid amino acid	Aspartic acid	17.03
Glutamic acid		7.46	0.69
Basic amino acid	Arginine	6.07	0.86
	Histidine	1.88	-
	Lysine	4.95	0.17
Oxy amino acid	Serine	27.32	13.22
	Threonine	7.48	0.81
	Tyrosine	4.43	10.96
Sulfur-complex amino acid	Methionine	-	-
	Cystine	0.20	-
รวม		95.08	101.56

ที่มา : Komatsu, K. (1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบัติทางเคมีของไหม

คุณสมบัติการละลายและความคงตัวของไหม และชีวภาพ ของเส้นไหมมีดังต่อไปนี้ คือ

1. เส้นไหมไม่ถูกทำลายด้วยกรดทั่วไป แต่กรดและด่างที่มีความเข้มข้นสูง สามารถทำลายเส้นไหมได้ ด่างแก่มีผลทำให้เส้นไหมมีความมันลดลง นอกจากนี้ไหมถูกทำลายด้วยสารที่มีส่วนผสมของเกลือคลอไรด์ผสมอยู่ ได้แก่ เหนือ น้ำยาดับกลิ่น และน้ำเกลือทั่วไป ไหมมีความทนต่อสารซักฟอก คล้ายขนสัตว์ และสารซักฟอก ประเภท ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือโซเดียมเปอร์บอเรต ภายใต้ภาวะการซักปกติจะไม่เกิดผลเสียต่อไหม แต่สามารถถูกทำลายด้วยสารซักฟอกประเภทออกซิไดซ์ เช่น พวกโซเดียมไฮโปคลอไรท์ผสมอยู่ได้
 2. ราและแมลง ปกติไหมไม่เกิดราง่าย ยกเว้นทิ้งไว้ในภาวะค่อนข้างเปียกชื้นเป็น เวลานาน ไหมที่สะอาดจะไม่มีปัญหาเรื่องแมลง และรา
 3. แสง ผ้าไหมมีความอ่อนไหวต่อแสงแดด โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากถูกแสงแดดโดยตรงเป็นเวลานาน จะทำให้ผ้าไหมเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองและความแข็งแรงก็จะลดลงด้วย
 4. การข้อมสี ไหมมีความสามารถในการรับสีข้อมได้ดีมาก อาจข้อมด้วยสีที่เป็นแอสิด เบสิก หรือสี ไคเรก ผ้าไหมเมื่อข้อมสีแล้วจะมีสีเข้มกว่าขนสัตว์และสามารถข้อมสีในอุณหภูมิต่ำกว่าด้วย
- การใช้งานของไหมเป็นไปอย่างกว้างขวางด้วยสมบัติที่ดีเด่นหลายประการดังที่กล่าวมาแล้ว นอกจากนี้ยังสามารถใช้ผ้าไหมผสมกับใยอื่นๆได้ด้วย เช่น ไหมผสมฝ้าย ไหมผสมลินิน หรือไหมผสมขนสัตว์ เป็นต้น

ไฮโดรเจล (Hydrogel)

ไฮโดรเจล เป็นวัสดุที่สามารถบวมน้ำและดูดซับน้ำไว้ภายในโครงสร้างได้ โดยไม่เกิดการละลาย ซึ่งอาจเรียกรูปแบบของวัสดุประเภทนี้ในสถานะแห้งว่า “xerogels” (Giuliano, F. et al., 1999) ภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล จะมีพันธะเชื่อมโยง 3 มิติ เป็นร่างแห ทำให้ไฮโดรเจลสามารถดูดซับและบวมน้ำโดยไม่เกิดการละลาย ไฮโดรเจลที่ได้จากธรรมชาติ เช่น วุ้น (agar) เจลาติน หรือได้จากการสังเคราะห์ เช่น โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ [poly(vinyl alcohol)] สามารถดูดน้ำเข้าไปอยู่ภายในโครงร่างตาข่ายได้ 90% หรือมากกว่า ไฮโดรเจลยังได้จากการสังเคราะห์ พอลิเมอร์หรือมอนอเมอร์

สมบัติของไฮโดรเจลและการนำไปใช้งาน

ไฮโดรเจลสามารถดูดซับน้ำและไอออนได้ โดยสมบัติเชิงกลและรูปร่างไม่เปลี่ยนแปลงซึ่งสมบัติดังกล่าวคล้ายคลึงกับอวัยวะบางอย่างในร่างกายคน เช่น กล้ามเนื้อ เอ็น ถ้าใส่เล็ก เป็นต้น นอกจากนี้ไฮโดรเจลยังมีคุณสมบัติเข้ากันได้ดีกับสารชีวภาพ เช่น เลือด น้ำเหลือง เนื้อเยื่อ จึงสามารถนำมาทำเลนส์สัมผัส วัสดุตกแต่งบาดแผลจากไฟไหม้ ตลอดจนใช้เคลือบวัตถุที่ต้องนำมาใช้สัมผัสกับร่างกาย ใช้เคลือบอวัยวะเทียมที่ใช้ในร่างกาย

แผลที่เกิดจากอุบัติเหตุไฟไหม้หรือน้ำร้อนลวกนั้น มีความเสี่ยงสูงมากต่อการเกิดการติดเชื้อโรคจากสิ่งแวดล้อม และการสูญเสียน้ำจากร่างกาย โดยทั่วไปแล้วการรักษาพยาบาลแผลไฟไหม้ ธรรมดา หรือแผลถลอก ทำได้โดยการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อหรือศัลยกรรมแต่งผิวหนังเพื่อช่วยแก้ปัญหาการสูญเสียผิวหนัง และเร่งการรักษาบาดแผลให้ยิ่งเร็วขึ้น โดยแผ่นผิวหนังที่ใช้อาจเป็นแผ่นผิวหนังที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากห้องปฏิบัติการ ซึ่งต้องใช้เวลาและมีข้อเสียบางประการ ดังนั้นผิวหนังเทียมจึงเป็นทางเลือกที่สำคัญทางหนึ่งที่สามารถช่วยแก้ปัญหา โดยไฮโดรเจลเดสซิ่ง (Hydrogel dressing) เป็นวัสดุที่มีแนวโน้มที่นำมาใช้เป็นผิวหนังเทียมปิดรักษาบาดแผลที่นิยมมากที่สุด วัสดุตกแต่งบาดแผลหรือผิวหนังเทียมที่ใช้นั้นแบ่งเป็นกลุ่มได้ดังนี้

1. กลุ่มธรรมดา (conventional) ได้แก่ ผ้าก๊อซ (gauze) ผ้าพันแผลที่อิมมูบิลด้วยซีซีฟิ่ง หรือน้ำมันซิลิโคน เป็นต้น
2. กลุ่มชีวภาพ (biological) ได้แก่ ผิวหนังศพ สัตว์ ฟองน้ำ และคอลลาเจน เป็นต้น
3. กลุ่มสังเคราะห์ (synthesis) ได้จากพอลิเมอร์สังเคราะห์

สมบัติของวัสดุตกแต่งบาดแผลที่ดี มีคุณสมบัติดังนี้

1. สามารถดูดซับของเหลวออกจากร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ
2. มีความยืดหยุ่นและความแข็งแรงเชิงกลสูง
3. มีความโปร่งใส
4. ยอมให้ก๊าซออกซิเจนแพร่ซึมเข้าไปถึงผิวหนังของบาดแผลได้
5. สามารถควบคุมการปล่อยยาได้ และปราศจากเชื้อโรค***
6. มีความเสถียรคงทน
7. ใช้ง่าย ราคาถูก และเก็บรักษาได้ง่าย

(Kunioka, M. et al., 1995; Peppas, N.A., 1977a)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาคุณสมบัติฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของโปรตีนไหมที่ผ่านการฉายรังสี สำหรับที่จะนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ และเภสัชภัณฑ์

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. เศษเส้นไหมที่ทิ้งแล้ว
2. สารโพลิไวนิลแอลกอฮอล์
3. แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
4. เอทานอลแอลกอฮอล์
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ (AATCC agar)
6. กระดาษกรอง (Blank paper discs) เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
7. เครื่องวัดการดูดกลืนของแสง (spectrophotometer)
8. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)

เชื้อแบคทีเรีย

1. *Escherichia coli* (Gram negative)
2. *Staphylococcus aureus* (Gram positive)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมโปรตีนไหม

นำเศษไหมที่ทิ้งแล้ว (STBII) (ได้รับการอนุเคราะห์จากบริษัทชินาโนเคนจิ(ประเทศไทย)จำกัด ตั้งอยู่ที่ อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี) ประมาณ 5 กรัม มาต้มลงในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 80-90 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเส้นไหมที่ผ่านการต้มแล้วไปแช่ลงในเมทานอลแล้วแช่ต่อในสารละลายของ 0.5% Na_2CO_3 คนตลอดเวลาประมาณครึ่งชั่วโมง แล้วนำไปล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งน้ำกลั่นกลายเป็นกลาง นำเศษเส้นไหมที่สะอาดแล้วไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำเศษเส้นไหมที่ได้ผ่านการลอกกาออกจนหมดแล้ว (degummed ซึ่งจะคงเหลืออยู่แต่ไฟโบรอินโปรตีนเท่านั้น) ไปเก็บในโถสุญญากาศเพื่อนำไปใช้งานวิจัยต่อไป

2. การเตรียมสารละลายไฟโบรอินโปรตีนไหม

- 2.1 นำเศษเส้นไหม จากข้อ 1 ตัดมา 30 กรัม ละลายด้วยสารละลายของแคลเซียมคลอไรด์ (ประกอบด้วย 73 กรัม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 54 ml H_2O + 47 ml $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Ajisawa, A., 1998) ที่อุณหภูมิ 100 °C
- 2.2 นำสารละลายไฟโบรอินใส่ลงในถุงไดอะไลซิส (dialyze) ทำการไดอะไลซิส ด้วยน้ำที่ไม่มีไอออน (deionized water) โดยทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำให้บ่อยครั้ง แล้วนำไปใส่ในหลอดแก้ว

3. การเตรียมสารละลายโพลีไวนิลแอลกอฮอล์

นำ 3 กรัม ของโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ ละลายในน้ำกลั่นที่ทำให้ปลอดเชื้อแล้ว (sterilized water) 97 มิลลิลิตร

4. การเตรียมไฮโดรเจล ซึ่งเป็นสารผสมระหว่างไฟโบรอินและโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (silk fibroin/PVA hydrogel)

- 4.1 นำ 3% ของโปรตีนไหมที่ได้จากข้อ 2.2 ไปผสมกับ 3% ของสารละลายโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ จากข้อ 3 ในหลอดแก้ว บั่นด้วย vortex ผสมให้เข้ากันอย่างดี
- 4.2 นำหลอดแก้วที่บรรจุส่วนผสมในข้อ 4.1 ไปบรรจุก๊าซไนโตรเจนไม่ให้เป็นฟองอากาศ แล้วปิดฝาหลอดแก้วให้สนิทด้วยพาราฟินอีกรอบหนึ่ง แล้วนำไปฉายรังสี

5. การฉายรังสี

นำตัวอย่างที่บรรจุในหลอดแก้วที่ปิดสนิทไปฉายรังสีโดยใช้รังสีแกมมาจากต้นกำเนิดรังสี CO-60 (Gamma Cell-220) ปริมาณรังสี คือ 20 30 40 และ 50 กิโลเกรย์ โดยใช้อัตราแรงของรังสี 100 เกรย์ต่อนาที ณ สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

6. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

- 6.1 เตรียมอาหารแข็ง AATCC agar ประกอบด้วย เปปโตน (peptone) 10 กรัม บีฟเอ็กซ์แทรก (beef extract) 5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม วุ้น (agar) 15 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตรสำหรับอาหารเหลวเตรียมเช่นเดียวกันยกเว้นไม่ใส่วุ้นลงไปนำไป autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็น แล้วนำไปเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ

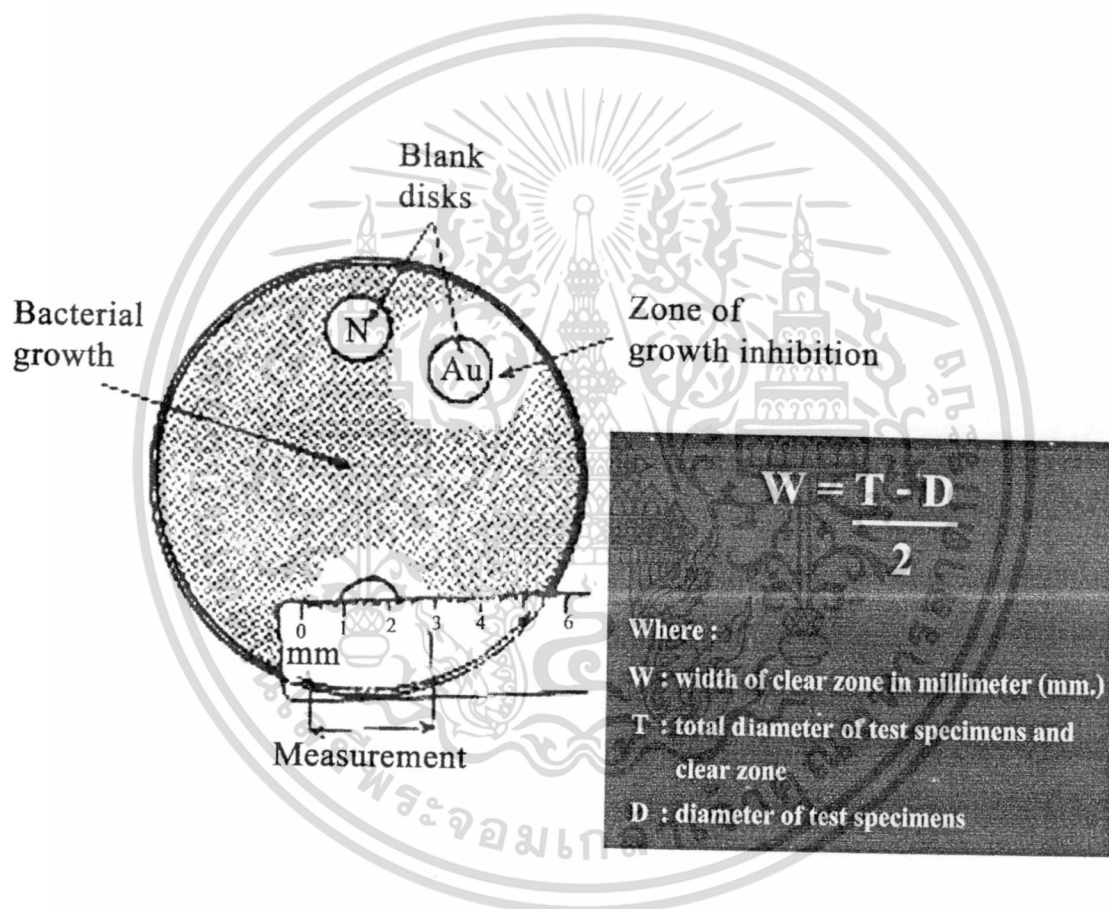
6.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมี 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* (*E. coli*) เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ และ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก มีอายุ 18-24 ชั่วโมงโดยการถ่ายเชื้อจากหลอด stock ที่เก็บไว้ในตู้เย็น ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์จากเจ้าหน้าที่ของโรงพยาบาลบาราศนราดรุร นำไปบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อให้ได้อายุดังกล่าวในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C จากนั้นจึงนำเชื้อที่เลี้ยงได้ตามอายุแล้ว ไปทำการปรับปริมาณของเชื้อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้เครื่องวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ OD(optical density) 660nm จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ของโปรตีนใหม่ต่อไป

7. การทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียของไฮโดรเจล

วิธีการทดสอบได้ประยุกต์ใช้วิธี agar disk diffusion (Harold J. B., 1998) และ วิธี AATCC test 90-1970 (American Association of Textile Chemists and Colorists, 1977) วิธีการมีดังต่อไปนี้

- 7.1 หลอมอาหารแข็ง AATCC ในขวด 150 ml ทำให้เย็นลงประมาณ 45 °C เติมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ ที่เตรียมได้จากข้อ 6.2 ลงไป แล้วเขย่าให้เข้ากันดี
- 7.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลายของเชื้อที่ต้องการทดสอบซึ่งทำให้ได้จำนวน 1.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรแล้ว ลงในงานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri-dish) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวดี
- 7.3 นำตัวอย่างไฮโดรเจล ซึ่งเป็นสารผสมระหว่างไฟโบรอินและโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (silk fibroin/PVA hydrogel) ที่ผ่านการฉายรังสี แล้ว จากข้อ 4.3 มา ทบหลอดแก้วให้แตก แล้วเชื่อมไฮโดรเจลที่แข็งตัวดี เป็นชิ้นบางๆ ด้วยคัตเตอร์ชนิดคมมาก ระหว่างปฏิบัติการจะทำในสภาวะปลอดเชื้อ (Aseptic technique)
- 7.4 นำชิ้นไฮโดรเจล จากข้อ 7.3 ไปทดสอบโดยการวางลงในงานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบอยู่ ของข้อ 7.2 แล้วกดแผ่นไฮโดรเจลลงไปอย่างเบาๆ เพื่อให้สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อ พร้อมกับวางกระดาษกรองที่ว่างเปล่า (blank paper disc) ซึ่งจุ่มลงในสารละลายโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ สารละลายโปรตีนใหม่ และสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอิน และโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ ที่ไม่ผ่านการฉายรังสี เป็นแผ่นควบคุม (control) โดยใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อ
- 7.5 นำงานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีแผ่นทดสอบตัวอย่างและแผ่นควบคุมในข้อ 7.4 ไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

- 7.6 สังเกตและวัดบริเวณโปร่งใสรอบๆแผ่นไฮโดรเจล และแผ่นควบคุม วิธีการวัด ดังแสดงในภาพที่ 2 (Harold J. B., 1998)
- 7.7 คำนวณความกว้างบริเวณโปร่งใส แสดงวิธีการคำนวณดังในภาพที่ 2 การเกิดบริเวณโปร่งใส และขนาดความกว้างของบริเวณโปร่งใส เป็นสิ่งบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของฤทธิ์การต่อต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นๆ ถ้าบริเวณโปร่งใสกว้างมากแสดงว่ามีฤทธิ์การต่อต้านเชื้อแบคทีเรียของโปรตีนใหม่นั้นมากด้วย



ภาพที่ 2 การวัดและการคำนวณบริเวณโปร่งใส (clear zone) เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. คุณสมบัติฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ *Escherichia coli* ของไฮโดรเจลซึ่งเป็นสารผสมระหว่างไฟโบรอินและโพลีไวนิลแอลกอฮอล์

ได้ตรวจสอบคุณสมบัติฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ของสารผสมระหว่างไฟโบรอินและโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (silk fibroin/PVA hydrogel) ที่ผ่านการฉายรังสี ปริมาณ 20- 50 กิโลเกรย์ พบบริเวณ โปร่งใสรอบๆแผ่นไฮโดรเจลที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณดังกล่าว ซึ่งบริเวณ โปร่งใสรอบๆแผ่นไฮโดรเจลที่วางลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ดังแสดงในภาพที่ 3 (ฉายรังสีปริมาณ 20 กิโลเกรย์) และ ภาพที่ 4 (ฉายรังสีปริมาณ 50 กิโลเกรย์) นั้นแสดงให้เห็นว่า แผ่นไฮโดรเจลมีคุณสมบัติฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ *E. coli* ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Tsubochi, K.(1996) ได้รายงานไว้ว่าเส้นไหมโดยส่วนใหญ่มีโปรตีนไฟโบรอินเป็นส่วนประกอบอยู่ มีฤทธิ์การต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกเชื้อรา ดังจะเห็นได้จากผ้าไหมทนทานต่อการเกิดเชื้อราได้อย่างดีในทำนองเดียวกับพวกผ้าขนสัตว์

2. คุณสมบัติฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของไฮโดรเจลซึ่งเป็นสารผสมระหว่างไฟโบรอินและโพลีไวนิลแอลกอฮอล์

ได้ตรวจสอบคุณสมบัติฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ของไฮโดรเจลซึ่งเป็นสารผสมระหว่างไฟโบรอินและโพลีไวนิลแอลกอฮอล์(silk fibroin/PVA hydrogel) ที่ผ่านการฉายรังสี ปริมาณ 20- 50 กิโลเกรย์ พบบริเวณ โปร่งใสรอบๆแผ่นไฮโดรเจลที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณดังกล่าว บริเวณ โปร่งใสรอบๆแผ่นไฮโดรเจลที่วางลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ดังแสดงในภาพที่ 5 (ฉายรังสีปริมาณ 20 กิโลเกรย์) และ ภาพที่ 6 (ฉายรังสีปริมาณ 50 กิโลเกรย์) นั้นแสดงให้เห็นว่า แผ่นไฮโดรเจลมีคุณสมบัติฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ *S. aureus* ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Tsubochi, K.(1996) ได้รายงานไว้ว่าเส้นไหมโดยส่วนใหญ่มีโปรตีนไฟโบรอินเป็นส่วนประกอบอยู่ มีฤทธิ์การต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้

3. ผลของปริมาณรังสีต่อประสิทธิภาพของฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิด

ได้ตรวจสอบและคำนวณความกว้างบริเวณ โปร่งใสที่เป็นการบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของแผ่นไฮโดรเจลที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณต่างๆกัน (20-50 กิโลเกรย์) ดังแสดงในภาพที่ 7 พบว่า ความกว้างบริเวณ โปร่งใส กว้างขึ้นตามปริมาณรังสีที่สูงขึ้น

โดยเฉพาะอย่างยิ่งความกว้างบริเวณ โปร่งใสที่เกิดจากฤทธิ์การต่อต้านเชื้อ *E. coli* จะเห็นได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 7) ความกว้างบริเวณ โปร่งใสรอบๆแผ่นไฮโดรเจลที่ได้จากสารผสมระหว่างไฟโบรอิน โปรตีนไหมกับสารละลายโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ที่ผ่านการฉายรังสี 50 กิโลเกรย์ มีความกว้างมากกว่าของแผ่นไฮโดรเจลที่ฉายรังสี 20 กิโลเกรย์ การที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากปริมาณรังสีสูงขึ้นทำให้เกิดการทำลายพันธะทางเคมีของโปรตีนไหมเป็นสาเหตุให้โปรตีนแตกเป็นสายสั้นๆที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Pewlong, V. et al., 2000) เป็นผลให้การละลายของโปรตีนไหมเพิ่มขึ้น ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของฤทธิ์การต่อต้านเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Matsubashi, S. et al.(1997) และ Tokura, S. et al. (1997) ได้รายงานผลการวิจัยว่า การฉายรังสีกับไคโตซาน (chitosan) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพฤทธิ์การต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซานได้ และได้สรุปว่าฤทธิ์การต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน นอกจากนี้พบว่าแผ่นไฮโดรเจลให้ผลในการต่อต้านเชื้อ *S. aureus* ได้น้อยกว่าของเชื้อ *E. coli* ดังนั้นการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ยังขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด ดังในรายงานของ Harold J.B. (1998) หรือ มาลิน จุลศิริ (2540) การออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆอีกหลายประการ เช่น ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ อัตราการซึมผ่านของสารละลายที่ต้องการทดสอบ และความเข้มข้นของสารละลายหรือสารที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์อีกด้วย

สรุปผล

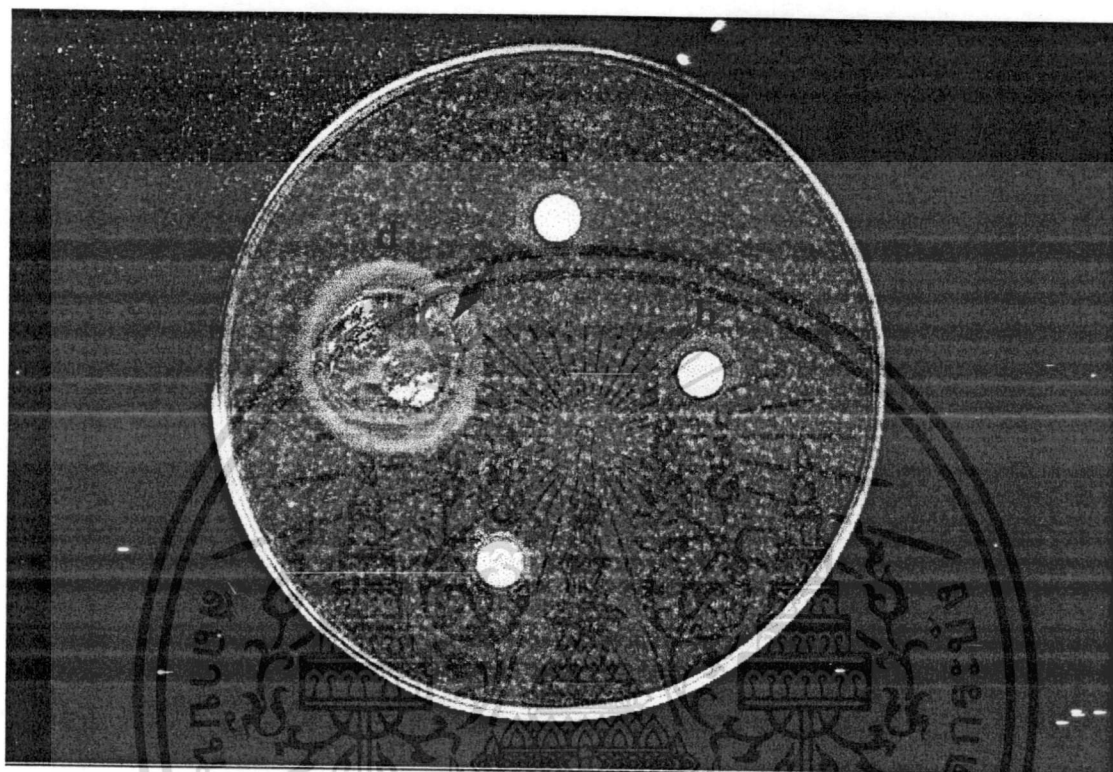
จากการทดสอบเบื้องต้นของฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียสองชนิด คือ *E. coli* ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และ *S. aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกของโปรตีนไหมชนิดไฟโบรอิน (fibroin) ที่ผสมกับโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ แล้วฉายรังสีที่ปริมาณ 20 30 40 และ 50 กิโลเกรย์ โดยใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์การต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย คือวิธี อะการ์ดิฟฟิวชัน (Agar disk diffusion method) พบว่า ไฟโบรอินโปรตีนไหม 3 เปอร์เซ็นต์ผสมกับ 3 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ แล้วฉายรังสี 50 กิโลเกรย์ มีคุณสมบัติเป็นสารดูดซับน้ำ (hydrogel) ที่ดี และมีคุณสมบัติฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดได้ ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นที่ได้นี้มีประโยชน์อย่างมากในการที่จะนำโปรตีนไหมไปใช้ในการทำผ้าปิดแผลไฟไหม้ หรือน้ำร้อนลวก (burn wound dressing) ทางด้านการแพทย์ต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ฝ่ายจุลชีวิทยา โรงพยาบาลบาราศนราธิราช ที่ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบและขอขอบคุณ บริษัทชินาโนเคนจิ(ประเทศไทย) จำกัด ที่ได้อนุเคราะห์เศษเส้นไหมที่เหลือให้มาใช้ในการวิจัย และขอขอบคุณ คุณอาร์ภย์ วิทิตธีรานนท์ กองการวัดกัมมันตภาพรังสี ที่ได้ช่วยฉายรังสีและทำการวัดปริมาณรังสีให้

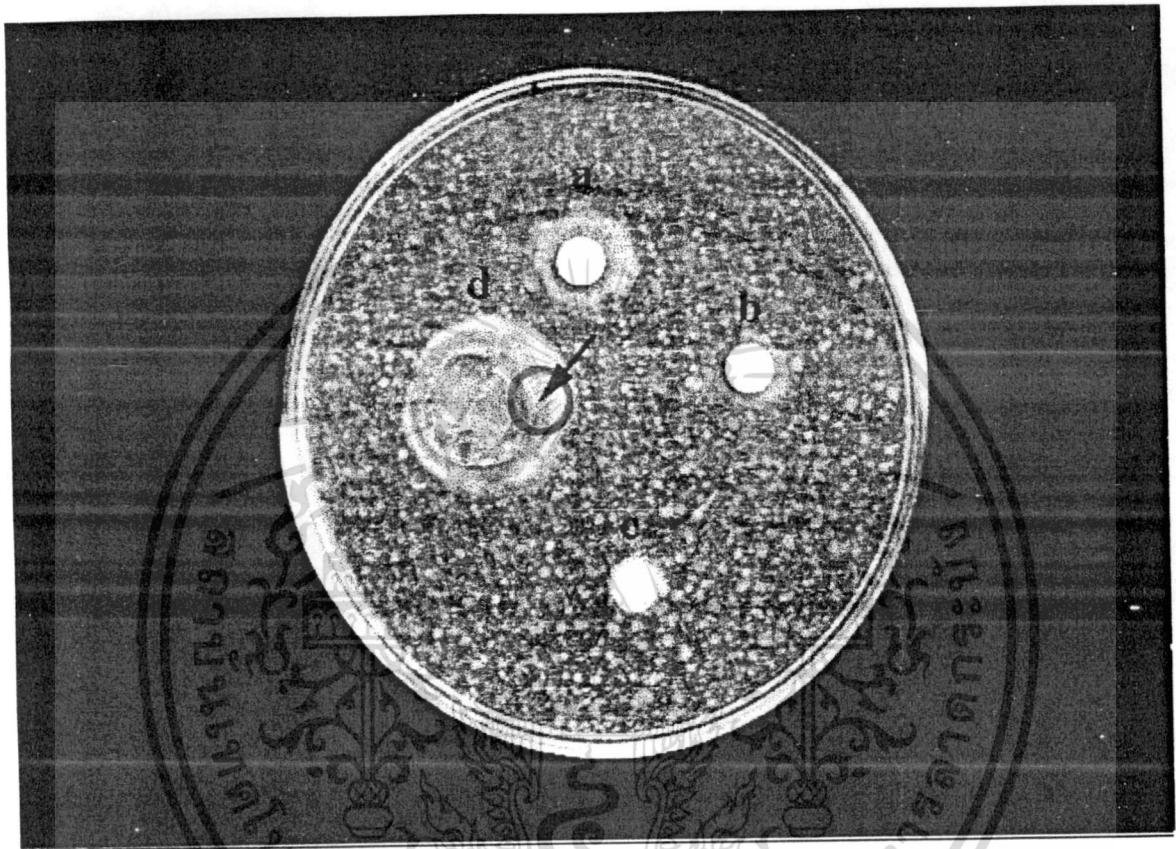


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



- ภาพที่ 3 บริเวณ โปร่งใสที่เกิดจากฤทธิ์การต่อต้านเชื้อ *E. coli* ของโปรตีนไหมที่ฉายรังสี 20 กิโลเกรย์
- a : สารละลายโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA)
 - b : โปรตีนไหมผสมกับ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์
 - c : สารละลายโปรตีนไหม
 - d : ไฮโดรเจล (โปรตีนไหมผสมกับโพลีไวนิลแอลกอฮอล์แล้วฉายรังสี)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



- ภาพที่ 4 บริเวณโปร่งใสที่เกิดจากฤทธิ์การต่อต้านเชื้อ *E. coli* ของ โปรตีนไหมที่ฉายรังสี 50 กิโลเกรย์
- a : สารละลายโพลีไวนิลแอลกอฮอล์
 - b : โปรตีนไหมผสมกับโพลีไวนิลแอลกอฮอล์
 - c : สารละลายโปรตีนไหม
 - d : ไฮโดรเจล (โปรตีนไหมผสมกับโพลีไวนิลแอลกอฮอล์แล้วฉายรังสี)

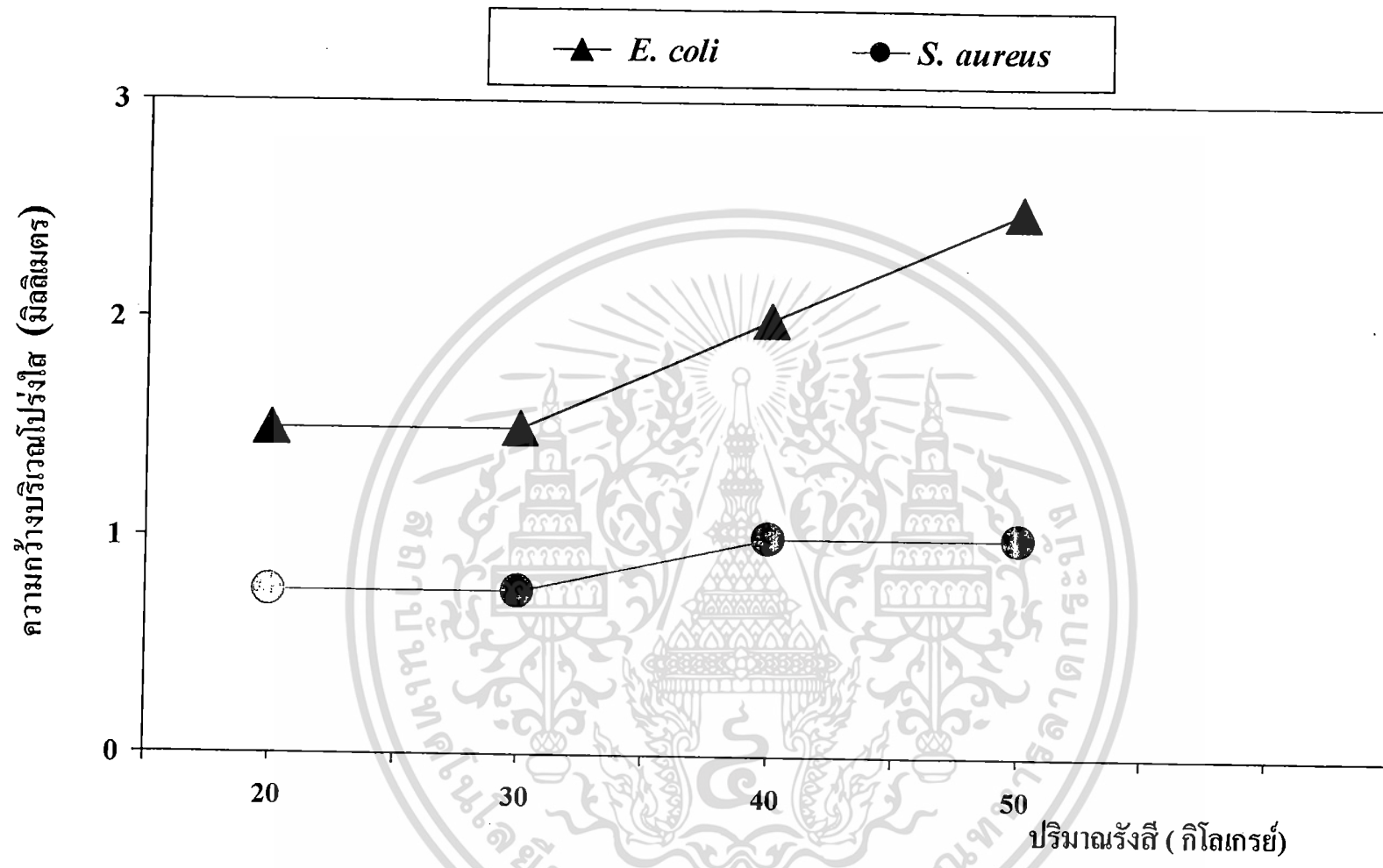
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 บริเวณโปร่งใสที่เกิดจากฤทธิ์การต่อต้านเชื้อ *S. aureus* ของโปรตีนไหมที่ฉายรังสี 50 กิโลเกรย์

- a : สารละลายโพลีไวนิลแอลกอฮอล์
- b : โปรตีนไหมผสมกับโพลีไวนิลแอลกอฮอล์
- c : สารละลายโปรตีนไหม
- d : ไฮโดรเจล (โปรตีนไหมผสมกับโพลีไวนิลแอลกอฮอล์แล้วฉายรังสี)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานที่ปรึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
45287
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 ความกว้างบริเวณโปร่งใสที่เกิดจากฤทธิ์การต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด ของโปรตีนไหมผสมกับ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ที่ฉายรังสีปริมาณต่างๆกัน

เอกสารอ้างอิง

1. มาลิน จุลศิริ .2540. ยาด้านจุลชีพ. กรุงเทพฯ:สถาบันการพัฒนาสาธารณสุขเอเชีย. 209 น.
2. เมธิน ผดุงกิจ . 2542 . ผลของบัวบกต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสองชนิดที่ก่อโรคผิวหนัง.
มหาสารคาม : วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. 109 น.
3. วีระศักดิ์ อุดมกิจเดชา. 2542. วิทยาศาสตร์เส้นใย. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
314 น.
4. American Association of Textile Chemists and Colorists, (AATCC) Committee,
Antibacterial activity of fabrics, detection of : Agar plate method, *AATCC Test method*
90-1977 (1977).
5. Ajisawa, A. Dissolution of silk fibroin with calciumchloride/ethanol aqueous solution,
J. Seric. Sci. Jpn. 67, 91-94 (1998).
6. Chaisupakitsin, M., Yoshii, F., and Takeshita, H., Preparation of hydrogel from silk
fibroin by γ -irradiation, Private communication (2000).
7. Giuliano, F., Masuhiro, T. and Silvia, B. *J. Appl. Polym. Sci.*, 21, 1763-1770 (1999).
8. Harold J. Benson, Microbiological applications : Laboratory manual in general
microbiology, 7th ed., Boston, WCB/McGraw Hill, 468p. (1998).
9. Komatsu, K. Chemistry and structure of silk. *JARQ* 13 (1), 64-72 (1979).
10. Kunioka, M. and Choi, H. *J. Appl. Polym. Sci.*, 58, 569-573 (1995).
11. Kunioka, Choi, H. *J. Appl. Polym. Sci.*, 58, 801-806 (1995).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. Matsuhashi, S. and Kume, T. *J. sci. Food Agric*, 73, 237-241 (1997).
13. Peppas, N.A., and Merrile, E. W. *J. Biomed. Mater. Res.* 11, 423-434 (1977a).
14. Peppas, N.A., and Merrile, E. W. *J. Appl. Polym. Sci.*, 21, 1763-1770 (1977b).
15. Pewlong, V., Sudatis, B., Takeshita, H., Yoshii, F., and Kume, T. *JAERI-Conf 2000-003*, 46-152 (2000).
16. Pham Thi Le Ha and T. Kume., *Food Irradiation*, 34, 43-46 (1999)
17. Rosiak, J. M., Rucinka-Rybus, A., and Pekala, W., *US Patent no. 4871490* (1989).
18. Tokura, S., Ueno, K., Miyazaki, S., and Nishi, N. *Macromol. Symp.*, 120, 1-9 (1997).
19. Tsubouchi, K., New applications of silk, *Farming Japan*, 30(5), 36-41 (1996).
20. Yoshii, F., Makuuchi, K., Darwis, D., Iriawan, T., Razzak, M.T., and Rosiak, J. M. *Radiat. Phys. Chem.* 46, No. 2, 169-174 (1995).