

รายงานการวิจัย

การผลิตวัสดุปิดแผลจากเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียร่วมกับสารสกัด
เปลือกมังคุดและศึกษาสมบัติของวัสดุปิดแผลที่ได้
(Production of Wound Dressing from Bacterial Cellulose with
Mangosteen Extracts and In Vitro Evaluation of Wound Dressing)



รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภารัตน์ รักชลธี
ดร.วนิดา จันทร์วิกุล

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ประจำปีงบประมาณ 2553 - 2554

ศษ

คณะวิทยาศาสตร์

๑164

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

๒๕๕๓-๒๕๕๔

b. 12638158

เลขหมู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด

เลขทะเบียน

137329

รับเดือนปี

22 ส.ย. 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2553 – 2554 ซึ่งสำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของนักศึกษาปริญญาตรี และปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สาขาชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนมาใช้ในการวิจัย

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
หัวหน้าโครงการวิจัย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการวิจัย	การผลิตวัสดุปิดแผลจากเซลล์ลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียร่วมกับสารสกัดเปลือกมังคุดและศึกษาสมบัติของวัสดุปิดแผลที่ได้
ผู้วิจัย	รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ผศ.ดร.สุภารัตน์ รักชลธี ดร.วนิดา จันทร์วิกุล

บทคัดย่อ

การเตรียมวัสดุปิดแผลจากแบคทีเรียลเซลล์ลูโลสที่ผลิตจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ร่วมกับการใช้สารสกัดจากสมุนไพร ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษา การยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเหง้าไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) และเปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) ที่ได้จากการสกัดแบบหมัก (Maceration) ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเมทานอล นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบกับ เชื้อ *Escherichia coli* TISTR 887 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ด้วยวิธี disc diffusion ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสูงกว่าสารสกัดจากเหง้าไพล โดยสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่สกัด ด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 *Staphylococcus epidermidis* TISTR 518 และ *Micrococcus luteus* TISTR 884 เท่ากัน คือ 0.195 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* TISTR 887 เท่ากับ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงนำสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดจากตัวทำละลาย เมทานอล มาใช้ร่วมกับแบคทีเรียลเซลล์ลูโลส โดยจุ่มแผ่นแบคทีเรียลเซลล์ลูโลสลงใน สารสกัดเปลือกมังคุด เพื่อผลิตเป็นแผ่นวัสดุปิดแผลต้านเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นทำแห้งด้วยวิธีการ freeze dry ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ใช้ร่วมกับแบคทีเรียลเซลล์ลูโลส โดยไม่มีความเป็นพิษต่อ เซลล์สัตว์ทดสอบ L929 เท่ากับ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ แบคทีเรียของแผ่นแห้งแบคทีเรียลเซลล์ลูโลสที่ใช้ร่วมกับสารสกัดเปลือกมังคุด (เส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 6.00 มิลลิเมตร) พบว่ามีบริเวณการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 *S. epidermidis* TISTR 518 และ *M. luteus* TISTR 884 เท่ากับ 12.16 ± 0.28 11.94 ± 0.04 และ 12.98 ± 1.32 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* TISTR 887 แผ่นวัสดุปิด แผลจากแบคทีเรียลเซลล์ลูโลสที่จุ่มในสารสกัดเปลือกมังคุด มีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ และอัตราการ ซึมผ่านก๊าซออกซิเจนเพิ่มขึ้น มีอัตราการดูดซับน้ำเท่ากับ 4.44 เท่าของน้ำหนักแห้ง ค่าความ แข็งแรงดึง ค่ามอดูลัสของยัง และค่าการยืด ณ จุดขาด เท่ากับ 13.33 ± 1.95 นิวตันต่อตารางเมตร 270.36 ± 61.67 นิวตันต่อตารางเมตร และร้อยละ 2.78 ± 0.67 ตามลำดับ เมื่อนำแผ่นแห้ง แบคทีเรียลเซลล์ลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดมาดูดซับน้ำให้เป็นแผ่นเปียก พบว่ามีค่าการยืด ณ จุด ขาด สูงกว่าแผ่นแบคทีเรียลเซลล์ลูโลสแห้ง 3.89 เท่า

คำสำคัญ : วัสดุปิดแผล, แบคทีเรียลเซลล์ลูโลส, สารสกัดเปลือกมังคุด, สารสกัดไพล, การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Project	Preparation and Properties of Wound Dressings from Bacterial Cellulose Incorporated with Mangosteen Peel Extract
Researcher	Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul Asst. Prof. Suparat Rakchontee Dr. Wanida Janvikul

ABSTRACT

The wound dressings were prepared from bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* TISTR 976 and incorporated with the herbal crude extract which showed a high antibacterial activity efficiency. In this study, the antibacterial activity of Phlai (*Zingiber cassumunar* Roxb.) and mangosteen peel (*Garcinia mangostana* L.) crude extracts obtained from the maceration methods with hexane, ethyl acetate and methanol were investigated against *Escherichia coli* TISTR 887 and *Staphylococcus aureus* TISTR 118 by disc diffusion method. The result showed that the antibacterial activity of mangosteen peel crude extract with methanol was more effective than that of Phlai crude extract. The same minimum inhibitory concentration (MIC) of mangosteen peel crude extract with methanol against *S. aureus* TISTR 118, *Staphylococcus epidermidis* TISTR 518 and *Micrococcus luteus* TISTR 884 were 0.195 mg/ml whereas was found its MIC against *E. coli* TISTR 887 was 3.125 mg/ml. The mangosteen peel crude extract were impregnated into bacterial cellulose to produce antibacterial wound dressings by immersing bacterial cellulose in crude extract and then being freeze-dried. The maximum concentration of crude extract which was non cytotoxic to L929 cells was 6.25 mg/ml. The inhibition zone of the dried bacterial cellulose incorporated with mangosteen peel extract (diameter = 6.00 mm) against *S. aureus* TISTR 118, *S. epidermidis* TISTR 518 and *M. luteus* TISTR 884 were 12.16 ± 0.28 , 11.94 ± 0.04 and 12.98 ± 1.32 mm, respectively, but it did not show the growth inhibition of *E. coli* TISTR 887. The wound dressing from the bacterial cellulose immersed in mangosteen crude extract demonstrated an increased water vapour transmission rate and an increased oxygen transmission rate. The water absorption of the dressing was 4.44 times of its dry weight. Its tensile strength, Young's modulus, and elongation at break were 13.33 ± 1.95 N/m², 270.36 ± 61.67 N/m² and 2.78 ± 0.67 %, respectively. At wet state, the bacterial cellulose immersed in mangosteen crude extract possessed elongation at break 3.89 times of that of the dry bacterial cellulose.

Keywords : wound dressings, bacterial cellulose, mangosteen peel extract, Phlai extract, antibacterial

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....	2
บทคัดย่อภาษาไทย.....	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	4
สารบัญเรื่อง.....	5
สารบัญตาราง.....	6
สารบัญภาพ.....	7
บทที่ 1 บทนำ.....	8
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....	8
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	8
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	9
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	9
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	10
บทที่ 3 วิธีการทดลอง.....	23
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	36
บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินงาน.....	61
บรรณานุกรม.....	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1	ระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบโดยวิธี Agar Diffusion..... 31
ตารางที่ 4.1	ลักษณะของแผ่นเชลลูโลสที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่างๆ..... 37
ตารางที่ 4.2	ลักษณะของสารสกัดหยาบไพลและร้อยละของสารที่สกัดได้..... 39
ตารางที่ 4.3	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากไพล ในชั้นของตัวทำละลายชนิดต่างๆ..... 40
ตารางที่ 4.4	แสดงลักษณะของสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดและร้อยละของสารที่สกัดได้..... 42
ตารางที่ 4.5	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเปลือกมังคุด จากชั้นของตัวทำละลายชนิดต่างๆ..... 43
ตารางที่ 4.6	ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> TISTR 118 และ <i>E. coli</i> TISTR 887 ของสารสกัดหยาบไพลและสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดโดยวิธี Broth dilution... 44
ตารางที่ 4.7	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดไพล และเปลือกมังคุดจากตัวทำละลาย 3 ชนิด..... 45
ตารางที่ 4.8	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ เปลือกมังคุดแห่งที่สกัดจากเมทานอล..... 47
ตารางที่ 4.9	ระดับปฏิบัติการความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ทดสอบ L929 กับ แผ่นแห้งเชลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดและชุดควบคุม..... 51
ตารางที่ 4.10	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งเชื้อของแผ่นเชลลูโลสที่จุ่มสารสกัด จากเปลือกมังคุดจากเมทานอลด้วยวิธี Disc diffusion..... 53
ตารางที่ 4.11	ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของแผ่นแห้งเชลลูโลส ด้วยวิธี Broth dilution..... 54
ตารางที่ 4.12	ผลอัตราการซึมผ่านไอน้ำและออกซิเจนของแผ่นเชลลูโลส..... 59
ตารางที่ 4.13	อัตราการซึมผ่านของไอน้ำของแผ่นวัสดุปิดแผลทางการค้าชนิดต่างๆ..... 59
ตารางที่ 4.14	ค่าคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นแห้งเชลลูโลสและแผ่นแห้งเชลลูโลส ภายหลังจากการแช่น้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง..... 60

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 การสร้างเส้นใยเซลลูโลสจากเซลล์ของแบคทีเรียที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM).....	11
ภาพที่ 2.2 ลักษณะเส้นใยเซลลูโลสที่สานทับกันเป็นโครงสร้างตาข่ายและมีเซลล์แบคทีเรียแทรกอยู่ระหว่างเส้นใยเซลลูโลส.....	12
ภาพที่ 2.3 วิธีการสังเคราะห์เส้นใยเซลลูโลสของ <i>A. xylinum</i>	13
ภาพที่ 2.4 ภาพการใช้แผ่นปิดแผลจากแบคทีเรียเซลลูโลสของ DermaFill®.....	15
ภาพที่ 3.1 แผนภาพแสดงการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี Agar Diffusion.....	36
ภาพที่ 4.1 ลักษณะแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในฟลาสก์.....	34
ภาพที่ 4.2 ลักษณะแผ่นเซลลูโลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	38
ภาพที่ 4.3 ลักษณะของแผ่นเซลลูโลสที่ผ่านการเตรียมโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์.....	38
ภาพที่ 4.4 ผลการยับยั้งเชื้อของสารสกัดหยาดไพลจากตัวทำละลายสกัดชนิดต่างๆโดยวิธี disc diffusion.....	41
ภาพที่ 4.5 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากไพลและเปลือกมังคุดโดยวิธี Broth dilution.....	46
ภาพที่ 4.6 ลักษณะแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดแล้วทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง....	48
ภาพที่ 4.7 แสดงลักษณะของเซลล์ L929 ที่ทดสอบความเป็นพิษ.....	49
ภาพที่ 4.8 แสดงลักษณะของเซลล์ L929 ในจานเพาะเซลล์ที่ทดสอบด้วยแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดจากเปลือกมังคุด.....	50
ภาพที่ 4.9 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด.....	52
ภาพที่ 4.10 ลักษณะสัณฐานของแผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	55
ภาพที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์แผ่นเซลลูโลสและสารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วยเทคนิค FTIR.....	56
ภาพที่ 4.12 กราฟอัตราการดูดซับน้ำของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด.....	57

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

โดยปกติร่างกายของคนเราสามารถสร้างผิวหนังใหม่ ทดแทนผิวหนังเก่าที่หลุดลอกอยู่ตลอดเวลา แต่เมื่อผิวหนังถูกทำลาย เช่น จากไฟไหม้ น้ำร้อนลวก หรือบาดแผลที่มีลักษณะเรื้อรัง จนผิวหนังชั้นในหรือชั้นหนังแท้ได้รับความเสียหาย ร่างกายจะไม่สามารถสร้างผิวหนังใหม่ขึ้นมาทดแทนได้อีก ซึ่งก่อให้เกิดความเจ็บปวดแก่ผู้ป่วย แนวทางที่ใช้ในการรักษาหรือช่วยบรรเทาอาการเจ็บปวด คือ การนำวัสดุมาปิดบริเวณบาดแผล เพื่อทำหน้าที่เสมือนผิวหนังชั่วคราว ปัจจุบันมีวิธีการนำเนื้อเยื่อผิวหนังของผู้ป่วย มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ แล้วนำมาปลูกถ่ายทดแทนผิวหนังที่เสียหายให้แก่ผู้ป่วย ซึ่งใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นการศึกษาวัสดุต่างๆ เพื่อนำมาใช้เป็นแผ่นปิดบาดแผล จึงยังคงมีการวิจัยอย่างต่อเนื่อง โดยวัสดุดังกล่าวควรมีคุณสมบัติในการป้องกันการสูญเสียน้ำ ป้องกันการติดเชื้อ และควรมีคุณสมบัติในการเร่งการรักษาบาดแผลให้สร้างเนื้อเยื่อใหม่ได้เร็วขึ้น โดยที่ร่างกายต้องไม่มีปฏิกิริยาต่อต้านต่อวัสดุนี้ เซลลูโลสที่ผลิตโดยแบคทีเรีย เป็นวัสดุทางชีวภาพที่มีราคาไม่แพง เนื่องจากสามารถผลิตได้จากการใช้น้ำมะพร้าวแก่ ซึ่งเป็นสิ่งเหลือทิ้งทางการเกษตรของประเทศไทย มาเป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเซลลูโลสจากแบคทีเรียมีคุณสมบัติเหมาะสม ที่สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุปิดแผลหลายประการ เช่น มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) สามารถยึดเกาะกับบาดแผลได้แนบสนิท และป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ไม่ให้เข้าสู่บาดแผล (Rebello และคณะ. 1987., Fontana และคณะ. 1990) กำจัดของเสียของบาดแผล ป้องกันการสูญเสียน้ำ และรักษาอุณหภูมิ ความชื้นแก่บาดแผล ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เอื้อต่อการฟื้นตัวของบาดแผล (Waring และคณะ. 2001., Walker และคณะ. 2003) แต่เซลลูโลสที่ผลิตโดยแบคทีเรีย ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาแนวทางในการเพิ่มคุณสมบัติของแผ่นแบคทีเรียลเซลลูโลสให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ โดยศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเหง้าไพลและเปลือกมังคุด และคัดเลือกส่วนของสารสกัดที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย มาใช้ร่วมกับแผ่นเซลลูโลสเพื่อผลิตเป็นแผ่นวัสดุปิดแผล เนื่องจากแผ่นวัสดุปิดแผลที่สามารถลดการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ที่มีกพบการติดเชื้อบริเวณบาดแผลได้ จะมีส่วนช่วยให้บาดแผลมีการฟื้นตัวได้เร็วขึ้น ส่งผลให้ผู้ป่วยได้รับความทรมานจากบาดแผลลดน้อยลง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

วิทยานิพนธ์นี้มีจุดมุ่งหมายในการเตรียมแผ่นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่มักเกิดการติดเชื้อบริเวณบาดแผลได้ โดยศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเหง้าไพลและเปลือกมังคุด และคัดเลือกสารสกัดเพื่อนำมาใช้ร่วมกับเซลลูโลสจากแบคทีเรีย เพื่อที่จะนำมาพัฒนาเป็นแผ่นวัสดุปิดแผลต้านเชื้อต่อไป

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

สกัดสารจากไพลและเปลือกมังคุด โดยการสกัดเย็นแบบหมัก (maceration) ใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเมทานอล นำสารสกัดหยาบที่ได้แต่ละส่วนมาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยวิธี disc diffusion ทดสอบกับเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 887 ตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก จากนั้นนำสารสกัดในส่วนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้สูงมาหาค่า MIC โดยใช้วิธี Broth dilution ผลิตแผ่นเซลล์ูโลสโดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว นำสารสกัดมาใช้ร่วมกับแผ่นเซลล์ูโลส โดยจุ่มแผ่นเซลล์ูโลสในสารสกัดแล้วทำให้แห้งด้วยการ freeze dry จากนั้นนำแผ่นแห้งเซลล์ูโลสที่ร่วมกับสารสกัด มาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนู (L929) ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ *S. aureus* TISTR 118 *Staphylococcus epidermidis* TISTR 518 *Micrococcus luteus* TISTR 884 และ *E. coli* TISTR 887 ศึกษาลักษณะสัณฐานของแผ่นวัสดุจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) วิเคราะห์เอกลักษณ์ของแผ่นวัสดุที่ได้ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ศึกษาอัตราการดูดซับน้ำ อัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ รวมทั้งสมบัติเชิงกล ได้แก่ ค่าความแข็งแรงดึง (Tensile strength) ค่ามอดูลัสของยัง (Young's Modulus) ค่าการยืด ณ จุดขาด (Elongation at break)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำเซลล์ูโลสจากแบคทีเรียหรือวุ้นมะพร้าว มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าเพิ่มขึ้น โดยนำมาใช้ร่วมกับสารสกัดจากพืชสมุนไพร เพื่อผลิตเป็นวัสดุปิดแผล และเป็นการนำวัสดุเหลือใช้มาใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น น้ำมะพร้าวแก่ ซึ่งนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อให้จุลินทรีย์ผลิตแผ่นเซลล์ูโลส หรือเปลือกมังคุดซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร จึงเป็นการลดปัญหามลภาวะ จากการทิ้งของเหลือทิ้งเหล่านี้สู่สิ่งแวดล้อม และเป็นแนวทางในการผลิตแผ่นวัสดุปิดแผล เพื่อลดการนำเข้าแผ่นวัสดุปิดแผลจากต่างประเทศที่มีราคาสูงได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

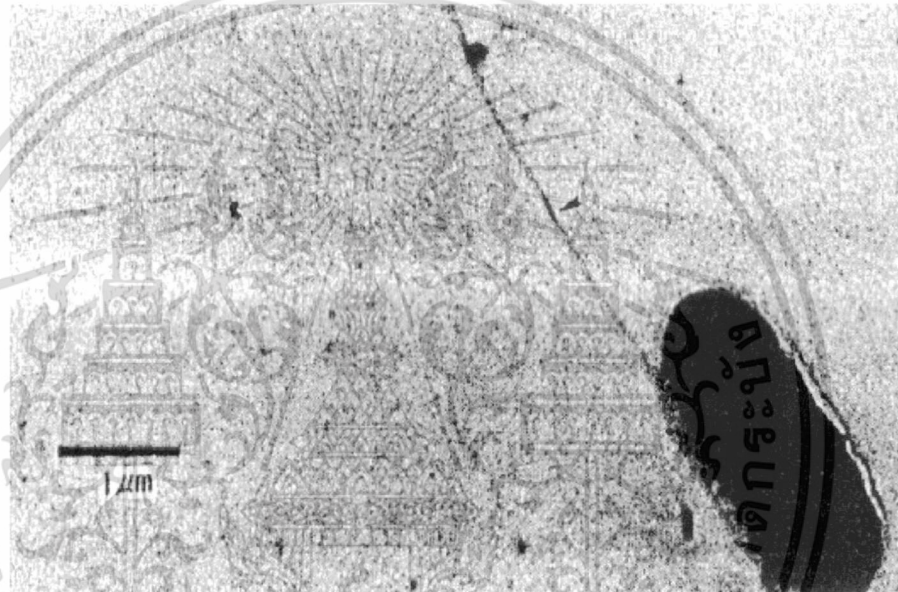
2.1 เซลลูโลสจากแบคทีเรีย

ในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ จุลินทรีย์สามารถสร้างเยื่อชีวภาพ (biofilms) เช่น เซลลูโลส เพื่อประโยชน์ในการดำรงชีวิตของตัวเอง (Watnick และคณะ. 2000) ช่วยป้องกันตนเองจากอันตรายต่างๆภายนอกที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต (Costerton และคณะ. 1999) และจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสังเคราะห์เซลลูโลสได้ เช่น สาหร่าย (*Vallonia* sp.) รา (*Saprolegnia* sp. *Dictyostelium* sp. *Discoideum* sp.) แบคทีเรีย (*Acetobacter* sp. *Achromobacter* sp. *Agrobacterium* sp. *Pseudomonas* sp. *Rhizobium* sp. *Sarcina* sp. *Alcaligenes* sp. *Zoogloca* sp.) แต่ไม่ใช่จุลินทรีย์ทั้งหมดที่สามารถปลดปล่อยเซลลูโลสที่สังเคราะห์ออกมาในลักษณะเส้นใยสู่ภายนอกเซลล์ได้ *Acetobacter xylinum* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์เซลลูโลสแล้วปลดปล่อยเส้นใยเซลลูโลสออกสู่นอกเซลล์ได้ เป็นสายพันธุ์ที่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการสังเคราะห์เซลลูโลสมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากให้ผลผลิตเซลลูโลสที่มีความบริสุทธิ์สูงปราศจากลิกนิน เพคติน หรือ เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลสที่สังเคราะห์ได้ไม่มีความเป็นพิษ ไม่ก่อให้เกิดโรค และมีลักษณะโครงสร้างที่ดีคือ เส้นใยเซลลูโลสเป็นสายยาว ใช้เวลาในการสังเคราะห์เซลลูโลสในเวลานั้น มีคุณสมบัติเชิงกล เช่น ค่าความแข็งแรงดึง (tensile strength) และค่าสภาพการยืดหยุ่น (modulus) ที่สูง และเมื่อเปรียบเทียบกับเซลลูโลสจากพืช พบว่ามีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) และค่าความเป็นผลึก (crystallinity) สูงกว่าเซลลูโลสจากพืช เซลลูโลสจากแบคทีเรียจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง เช่น อาหาร อະคุดิก ไดอะแฟรมในไมโครโฟน หูฟัง ผลิตเป็นกระดาษที่มีความแข็งแรง รวมทั้งการนำมาประยุกต์ใช้ในการแพทย์ เช่น แผ่นปิดแผล ผิวนั่งเทียม หลอดเลือดเทียม และเป็นโครงร่างให้แก่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Czaja และคณะ. 2007., Fontana และคณะ. 1997., Wan และคณะ. 2006., Wan และคณะ. 2007) แต่ทั้งนี้ลักษณะของเซลลูโลสที่ได้ขึ้นกับชนิดสารเคมีหรือสารอาหารที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโตด้วยเช่นกัน (George และคณะ. 2005)

เซลลูโลสจากแบคทีเรีย (bacterial cellulose หรือ microbial cellulose) ประเทศไทยรู้จักในชื่อวุ้นมะพร้าว (Nata de coco) เป็นสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ ดี-กลูโคส ต่อเป็นสายยาวด้วยพันธะเบตา 1-->4 กลูโคซิดิก เส้นใยเซลลูโลสจะถูกปล่อยเป็นสายยาวสู่นอกเซลล์ ดังภาพที่ 2.1 ซึ่งแสดงการสร้างเส้นใยเซลลูโลส และปล่อยออกจากเซลล์ของแบคทีเรีย จากนั้นเส้นใยจะสานทับกัน เกิดเป็นโครงสร้างผลึก ของสายกลูแคนที่บิดเป็นริบบิ้น ส่งผลให้เกิดเป็นโครงสร้างสามมิติ ลักษณะเป็นแผ่นเจลลิตินอยู่บริเวณผิวน้ำของอาหารเหลว (Czaja และคณะ. 2007., Dubey และคณะ. 2002., Oshima และคณะ. 2008) เชื้อ *A. xylinum* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง (rod) มักพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ทั่วไปในน้ำส้มสายชู เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มีสถานะนิ่ง อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส จะผลิตเส้นใยเซลลูโลสที่เกาะประสานตัวกันเป็นแผ่นหนาที่บริเวณผิวน้ำของอาหาร (Goelzer และคณะ. 2009., Dubey และคณะ. 2002., George และคณะ. 2005., Pandey และคณะ. 2005) ภายในแผ่นเซลลูโลสมีช่องว่างขนาดเล็ก ที่เกิดจากการสาน

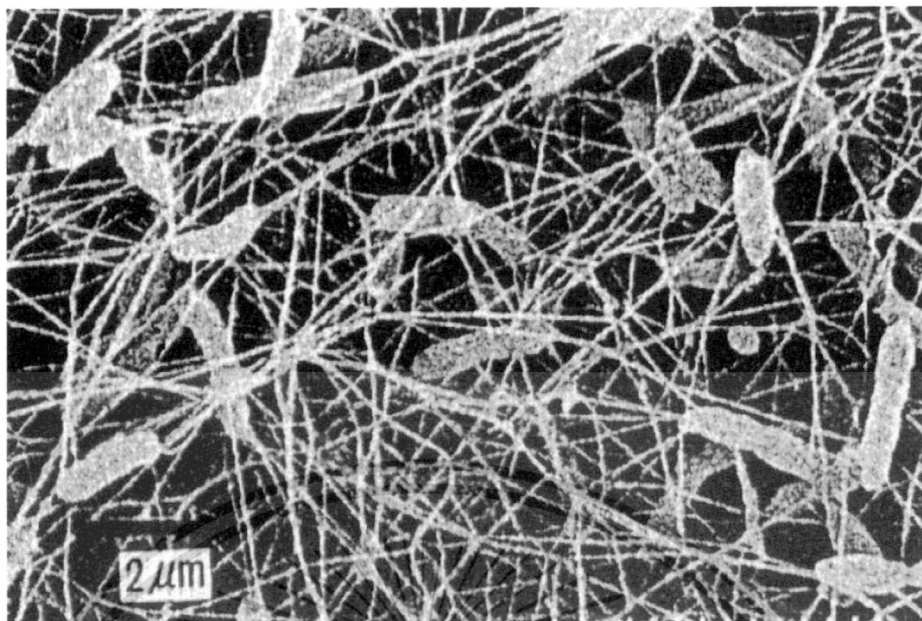
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทับกันของเส้นใย และระหว่างเส้นใยเซลล์แบคทีเรียจะเจริญเติบโตอยู่ภายในแผ่น แสดงดังภาพที่ 2.2 บริเวณผิวหน้าอาหารเป็นบริเวณที่มีการสัมผัสอากาศมากที่สุด และ *A. xylinum* เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศเป็นอย่างมากในการเจริญเติบโต ดังนั้นการสังเคราะห์เซลลูโลส และอาศัยอยู่ภายในแผ่นเซลลูโลสที่สร้างขึ้น จึงช่วยให้เซลล์ของ *A. xylinum* ได้รับอากาศได้อย่างเต็มที่ เนื่องจากแผ่นเซลลูโลสนั้นมีคุณสมบัติในการยอมให้อากาศ และของเหลวเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกได้ จึงช่วยรักษาความชื้น แหล่งอาหาร ให้เหมาะสมต่อการแบ่งเซลล์ ทำให้เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนแม้อยู่บนพืชผักผลไม้ได้ นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันอันตราย จากรังสีอัลตราไวโอเล็ตให้แก่เซลล์อีกด้วย (Vandamme และคณะ. 1998., Hestrins และ Schramm. 1954., Ross และคณะ. 1991)



ภาพที่ 2.1 การสร้างเส้นใยเซลลูโลสจากเซลล์ของแบคทีเรียถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

ที่มา : Klemm และคณะ (2001)

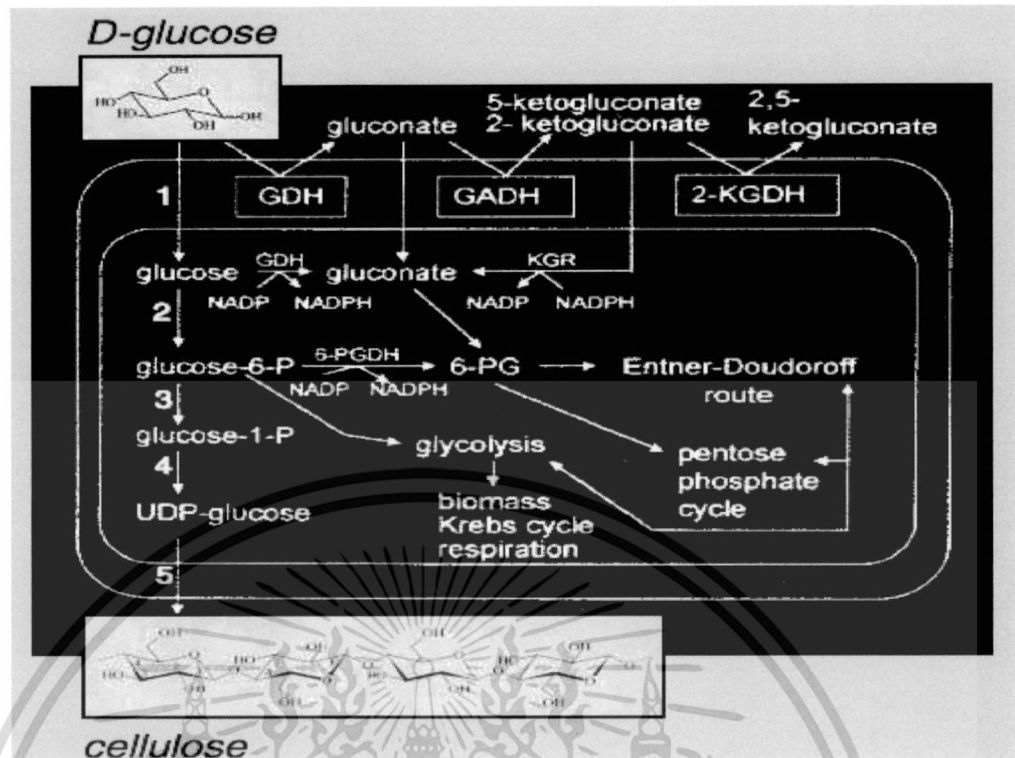


ภาพที่ 2.2 ลักษณะเส้นใยเซลลูโลสที่สานทับกันเป็นโครงสร้างตาข่าย และมีเซลล์แบคทีเรียแทรกอยู่ระหว่างเส้นใยเซลลูโลส
ที่มา : Klemm และคณะ (2001)

การสังเคราะห์เซลลูโลสเป็นการสร้างสารโมเลกุลใหญ่จากสารโมเลกุลเล็ก โดยมีวิธีการสังเคราะห์เซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* แสดงดังภาพที่ 2.3 และสามารถสรุปเป็น 5 ขั้นตอน ดังนี้

1. จุลินทรีย์นำ ดี-กลูโคส เข้าสู่ภายในเซลล์ โดยเอนไซม์กลูโคสเพอร์เมส (glucosepermease)
2. เปลี่ยนกลูโคสเป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟตโดยเอนไซม์กลูโคไคเนส (glucokinase)
3. เปลี่ยนกลูโคส-6-ฟอสเฟตเป็นกลูโคส-1-ฟอสเฟตโดยเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเทส (phosphoglucomutase)
4. เปลี่ยนกลูโคส-1-ฟอสเฟตเป็น ยูดีพี-กลูโคส (UDP-glucose) โดยเอนไซม์ ยูดีพี-กลูโคสไพโรฟอสฟอไรเลส (UDP-glucosepyrophosphorylase)
5. เปลี่ยน UDP-glucose เป็นเซลลูโลสออกสู่นอกเซลล์โดยเอนไซม์ เซลลูโลสซินเทส (cellulosesynthase)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 วิธีการสังเคราะห์เส้นใยเซลลูโลสของ *A. xylinum*
ที่มา: Klemm และคณะ (2001)

อาหารเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* โดยทั่วไปแล้วมักใช้สูตรอาหารของ Hestrin และ Schramm (HS medium) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล ดี-กลูโคส ร้อยละ 5 แอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 0.1 กรดอะซิติก ร้อยละ 1 เพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง เส้นใยเซลลูโลสที่ปล่อยออกมา มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-25 นาโนเมตร ซึ่งขนาดเล็กเป็น 100 เท่าของเส้นใยเซลลูโลสจากพืช มีความยาวประมาณ 1-9 ไมโครเมตร ยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน เนื่องจากความละเอียดของเส้นใยในระดับนาโน จึงส่งผลให้มีพื้นที่ผิวมากในการอุ้มน้ำ (มากกว่า 200 เท่าของน้ำหนักแห้ง) และด้วยเหตุเดียวกันนี้จึงส่งผลให้มีค่าความยืดหยุ่นสูง แผ่นเปียกมีค่าความแข็งแรงสูง ดูดซับของเหลวได้ในปริมาณสูงมากกว่าเซลลูโลสที่เป็นอนุพันธ์จากพืช (Klemm และคณะ. 2001., Czaja และคณะ. 2007)

2.2 วัสดุปิดแผลจากแบคทีเรียเซลลูโลส

เมื่อผิวหนังถูกทำลาย เช่น จากไฟไหม้ น้ำร้อนลวกหรือบาดแผลที่มีลักษณะเรื้อรังจนผิวหนังชั้นในหรือชั้นหนังแท้ได้รับความเสียหาย ร่างกายจะไม่สามารถสร้างผิวหนังใหม่ขึ้นมาทดแทนได้ ซึ่งก่อให้เกิดความเจ็บปวดแก่ผู้ป่วย และหากร่างกายสูญเสียผิวหนังมากกว่าร้อยละ 60 ของพื้นที่ผิวหนังทั้งหมด จะเสี่ยงต่อการเสียชีวิต เนื่องจากการสูญเสียน้ำในร่างกาย และการติด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

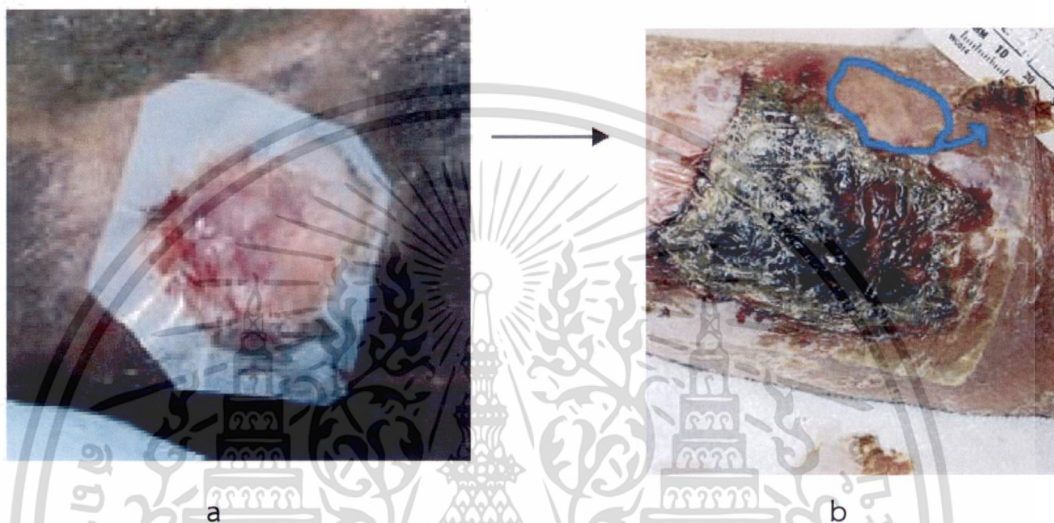
เชื้อที่เกิดขึ้นได้ง่าย แนวทางที่ใช้ในการรักษาหรือช่วยบรรเทาอาการเจ็บปวด คือการหาวัสดุมาปิดบริเวณบาดแผล เพื่อทำหน้าที่เสมือนผิวหนังชั่วคราว หรือหาผิวหนังทดแทนชนิดถาวร โดยการขูดผิวหนังส่วนอื่นมาปลูกบริเวณแผล ซึ่งผู้ป่วยจะได้รับความเจ็บปวดเช่นกัน หากผิวหนังถูกทำลายเป็นบริเวณกว้างหรือมากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่ผิวร่างกายผู้ป่วยจะไม่มีผิวหนังที่ดีเหลือเพียงพอต่อการขูดมาปลูกถ่ายได้ ปัจจุบันได้มีการใช้วิธีนำเนื้อเยื่อผิวหนังของผู้ป่วยแยกเป็นเซลล์เดี่ยว นำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เพื่อขยายขนาด แล้วนำมาปลูกถ่ายทดแทนให้แก่ผู้ป่วย ซึ่งต้องใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นการหาวัสดุปิดบาดแผล เพื่อทำหน้าที่เป็นผิวหนังชั่วคราวจึงยังคงมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง โดยวัสดุดังกล่าวควรมีคุณสมบัติในการป้องกันการสูญเสียน้ำ ป้องกันการติดเชื้อ ร่างกายต้องไม่มีปฏิกิริยาต่อต้านต่อวัสดุนี้ และสามารถเร่งการรักษาบาดแผลโดยให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ได้เร็วขึ้น ในอดีตวัสดุที่ใช้ปิดแผลทำจากผ้า เช่น ผ้าก๊อซ หรือผ้าใยสังเคราะห์ จะก่อให้เกิดความเจ็บปวดแก่ผู้ป่วยเนื่องจากไม่สามารถรักษาความชื้น และยังทำให้บาดแผลมีการสูญเสียน้ำ ต่อมาได้มีการพัฒนาวัสดุปิดแผลที่ทำจากพอลิเมอร์หรือโพลีที่มีประสิทธิภาพดีขึ้น เช่น ไฮโดรเจล ไฮโดรคอลลอยด์ จนกระทั่งในปัจจุบันได้ใช้วัสดุทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงในการใช้เป็นวัสดุปิดแผล เช่น อัลจิเนต คอลลาเจน ไคโตซาน และแบคทีเรียเซลลูโลส ซึ่งวัสดุเหล่านี้มีคุณสมบัติด้านต่างๆที่แตกต่างกัน เช่น อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ การซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน การรักษาความชื้น การดูดซับของเหลวบริเวณบาดแผล การยึดเกาะกับบาดแผล และความยืดหยุ่นของวัสดุ ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นคุณสมบัติสำคัญ ที่ใช้ในการพิจารณาถึงความเหมาะสมต่อลักษณะและระดับความรุนแรงของบาดแผล

แบคทีเรียเซลลูโลสเป็นวัสดุทางชีวภาพที่มีการวิจัยในการนำมาเป็นวัสดุปิดแผลมากในระดับหนึ่ง เนื่องจากคุณสมบัติของแบคทีเรียเซลลูโลสมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวัสดุปิดแผลหลายประการ เช่น ไม่เกิดปฏิกิริยาการต่อต้านในสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) สามารถยึดเกาะกับบาดแผลได้แนบสนิท และมีประสิทธิภาพการป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ไม่ให้เข้าสู่บาดแผล (Robello และคณะ. 1987., Fontana และคณะ. 1990) กำจัดของเสียของบาดแผล รักษาความชื้น ป้องกันการสูญเสียน้ำ ช่วยให้ความอบอุ่นแก่บาดแผล ซึ่งเอื้อต่อการฟื้นตัวของบาดแผล (Waring และ Parsons. 2001., Walker และคณะ. 2003) มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรเจลธรรมชาติ ซึ่งมีคุณสมบัติดีกว่าไฮโดรเจลที่ได้จากการสังเคราะห์จากกระบวนการทางโพลีเมอร์ เช่น ประกอบด้วยน้ำสูงถึงร้อยละ 98-99 ดูดซับของเหลวได้ดี แผ่นเปียกมีค่าความแข็งแรงสูง มีความบริสุทธิ์ทางเคมีสูง ความร้อนจากการทำให้ปลอดเชื้อไม่ทำให้โครงสร้างและคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป (Klemm และคณะ. 2001) แบคทีเรียเซลลูโลสมีคุณสมบัติคล้ายผิวหนังของมนุษย์ จึงสามารถประยุกต์ใช้เป็นผิวหนังเทียม เพื่อใช้ในการรักษาบาดแผลจากการถูกไฟไหม้ได้เป็นอย่างดี (Czaja และคณะ. 2006) เส้นใยเซลลูโลสที่มีขนาดเล็กมากนี้ เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ระบบการสมานพันพบบาดแผลมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Czaja และคณะ. 2006., George และคณะ. 2005., Grzegorzczyn และ Ezak. 2007) แผ่นเซลลูโลสสามารถกักเก็บน้ำได้สูง ไม่แห้ง มีความเป็นรูพรุนสูง ยอมให้สารปฏิชีวนะหรือตัวยาผ่านเข้าสู่แผลได้ และมีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อจากภายนอกได้ (Czaja และคณะ. 2006., Grzegorzczyn และ Ezak. 2007., Pitanguy และคณะ. 1988) ด้วยคุณสมบัติต่างๆของเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่กล่าวมานั้น ช่วยสนับสนุนให้เซลลูโลสเป็นวัสดุที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นวัสดุปิดแผล (Dubey และคณะ. 2002., Ciechanska. 2004., Pitanguy และคณะ. 1988) นอกจากนี้แบคทีเรียเซลลูโลส ยังถูกนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์อื่นๆ เช่น หลอดเลือดเทียม โครงสร้างค้ำจุนในวิศวกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (Ring และคณะ. 1986., Fontana. 1990., Klemm และคณะ. 2001., Alvarez และคณะ. 2004., Svensson และคณะ. 2005)

ปัจจุบันแผ่นปิดแผลที่ผลิตจากแบคทีเรียลเซลลูโลสมีการผลิตและจำหน่ายสู่ตลาด และมีเครื่องหมายการค้า เช่น Biofill[®] Gengiflex[®] และ DermaFill[®] ภาพที่ 2.4 แสดงลักษณะการใช้งานจริงของแผ่นปิดแผลจากแบคทีเรียลเซลลูโลส ยี่ห้อ DermaFill[®] ซึ่งสามารถยึดเกาะกับบาดแผลได้ และมีการหลุดลอกออกจากบาดแผลได้โดยไม่ต้องปิดทับด้วยสิ่งใด (a) และการหลุดลอกออกได้เองของแผ่นปิดแผล (b)



ภาพที่ 2.4 การใช้แผ่นปิดแผลจากแบคทีเรียลเซลลูโลสของ DermaFill[®] ซึ่งสามารถปิดที่บาดแผลได้โดยไม่ต้องปิดทับด้วยสิ่งใด (a) และการหลุดลอกออกได้เองของแผ่นปิดแผล (b)

ที่มา: <http://www.mctdermafill.com/education.html>

2.3 การทดสอบวัสดุและผลิตภัณฑ์การแพทย์ (กมลรัตน์ ธนัทประภัทร์ และคณะ. 2548)

การทดสอบผลิตภัณฑ์การแพทย์มีความจำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ทดสอบในทุกขั้นตอนการผลิต นับตั้งแต่การวิเคราะห์ทดสอบวัตถุดิบ เพื่อให้ได้วัตถุดิบที่ปลอดภัยและปราศจากความเป็นพิษ เพื่อนำมาใช้ในการผลิต การวิเคราะห์ทดสอบในระหว่างกระบวนการผลิต ไปจนถึงการวิเคราะห์ทดสอบผลิตภัณฑ์ก่อนนำออกจำหน่ายใช้งาน

ข้อควรพิจารณาในการเลือกวัตถุดิบชนิดหนึ่งๆ เพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ มีหลายประการ เช่น วัตถุดิบที่เลือกใช้ต้องไม่มีสารเคมีตกค้างที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ วัตถุดิบเหล่านั้นเมื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์แล้วต้องไม่เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติภายหลังผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterilization) ดังนั้นในการวิเคราะห์ทดสอบวัตถุดิบ ควรดำเนินการตั้งแต่การวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ทางเคมี ทางกล และทางชีววิทยา รวมถึงการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้น (screening test) ของวัตถุดิบ เมื่อมีการปรับปรุงสูตร หรือมีการเปลี่ยนแปลงแหล่งที่จัดซื้อวัตถุดิบ นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการผลิต ควรมีการวิเคราะห์ทดสอบวัสดุ อุปกรณ์การแพทย์ จึงจำเป็นต้องมีการเลือกใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการผลิตที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนต่าง ๆ ที่จะไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์ ทั้งด้านการเปลี่ยนแปลงสมบัติของวัสดุ โดยเฉพาะสมบัติที่พื้นผิว และด้านความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ รวมถึงการวิเคราะห์ทดสอบ เพื่อควบคุมมาตรฐานของกระบวนการผลิตและสภาวะแวดล้อมให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มวัสดุอุปกรณ์การแพทย์ แม้ว่าจะผลิตจากวัตถุดิบที่จัดเป็นเกรดทางการแพทย์ (medical grade) ได้ เมื่อถูกแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ก็จำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ตรวจสอบสมบัติ ทางเคมี ทางกล และทางชีววิทยา เพื่อให้มั่นใจว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมต่อการใช้งานตามวัตถุประสงค์ และมีการตรวจสอบเพื่อยืนยันความปลอดภัยก่อนออกจำหน่ายและนำไปใช้งานกับผู้ป่วย การทดสอบที่จำเป็น เช่น การทดสอบหาสารเคมีตกค้างบนผลิตภัณฑ์ การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) การทดสอบความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อมนุษย์ (biocompatibility) การทดสอบอายุวางจำหน่าย (Shelf life qualification) เป็นต้น

2.3.1 สมบัติเฉพาะของวัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์

วัสดุอุปกรณ์การแพทย์ควรมีสมบัติต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

2.3.1.1 สมบัติทางชีววิทยา (Biological Properties)

1. ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ รวมถึงระบบต่าง ๆ ภายในร่างกาย
2. มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์และเนื้อเยื่อ
3. มีความจำเพาะต่อเซลล์และเนื้อเยื่อในบริเวณที่เข้าไปแทนที่
4. มีความสามารถในการเหนี่ยวนำและไม่เหนี่ยวนำให้เซลล์และเนื้อเยื่อ โดยรอบตำแหน่งที่ใส่วัสดุฝังใน ให้มีการเจริญเติบโตบนพื้นผิวของวัสดุ ซึ่งขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการใช้งาน

2.3.1.2 สมบัติทางเคมี (Chemical Properties)

1. มีความทนทานต่อการกัดกร่อนเมื่ออยู่ภายในร่างกาย
2. มีความสามารถในการย่อยสลายได้ด้วยกลไกต่าง ๆ ภายในร่างกายตามระยะเวลาที่เหมาะสมและสารที่เกิดจากการย่อยสลายจะต้องไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย โดยอัตราการสลายตัวของวัสดุที่ดีจะต้องสอดคล้องกับอัตราการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อที่เข้าไปแทนที่ หรือต้องไม่ย่อยสลาย ตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

2.3.1.3 สมบัติทางกล (Mechanical Properties)

1. มีความแข็งแรงเพียงพอต่อการรับน้ำหนักของร่างกายในบริเวณที่ใช้งาน
2. มีค่าโมดูลัสที่ใกล้เคียงกับบริเวณที่เข้าไปแทนที่
3. มีความทนทานสูงต่อการขัดสี (ไม่เกิดอนุภาคหลุดออกมาได้ง่าย)

2.3.2 ประเภทของวัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์

เพื่อทราบถึงวิธีการทดสอบที่ถูกต้องและเหมาะสม จึงจำเป็นต้องมีการจัดจำแนกวัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์ ออกเป็นประเภทต่าง ๆ ซึ่งปัจจุบันสามารถจำแนกประเภทโดยพิจารณาจากบริเวณที่มีการสัมผัสและระยะเวลาในการสัมผัสกับร่างกาย โดยจะพิจารณา ทั้งสองแบบควบคู่กัน ซึ่งวัสดุตกแต่งแผล (Wound dressing) จัดเป็นวัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์ ประเภทที่สัมผัสกับผิว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของร่างกาย (Surface-contacting devices) ชนิดที่สัมผัสกับส่วนที่เป็นบาดแผล ส่วนระยะเวลาที่สัมผัสแบ่งได้ดังนี้

- a. ระยะเวลาในการใช้งานไม่เกิน 24 ชั่วโมง (limited exposure)
- b. ระยะเวลาในการใช้งานตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแต่ไม่เกิน 30 วัน (prolonged exposure)
- c. ระยะเวลาในการใช้งานเกินกว่า 30 วัน ขึ้นไป (permanent contact)

ดังนั้นวัสดุตกแต่งแผล ซึ่งจัดอยู่ในประเภทที่สัมผัสกับส่วนที่เป็นบาดแผล (Breached or compromised surface) มีการทดสอบเบื้องต้น (Initial evaluation/screening test) ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบพื้นฐานที่วัสดุอุปกรณ์การแพทย์แต่ละประเภทจำเป็นต้องดำเนินการตามที่กำหนด โดยแบ่งตามระยะเวลาที่สัมผัส คือวัสดุที่มีระยะเวลานานขึ้น จะต้องทำการทดสอบระดับที่จำเพาะเจาะจง โดยคำนึงถึงความปลอดภัยสูงขึ้น

สมบัติเบื้องต้นที่สำคัญด้านชีววิทยาที่วัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์แทบทุกชนิดจำเป็นต้องมี ได้แก่ ความไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และเนื้อเยื่อ รวมถึงระบบต่างๆภายในร่างกาย หากเป็นวัสดุฝังในจะต้องมีสมบัติของการเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์และเนื้อเยื่อ วิธีการทาง *in vitro* ที่นิยมใช้ทดสอบ ได้แก่ การทดสอบความเป็นพิษ (*in vitro* cytotoxicity testing) และการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility testing)

2.3.3 การทดสอบความเป็นพิษ (*in vitro* Cytotoxicity Testing)

การทดสอบความเป็นพิษเป็นวิธีการทดสอบที่ดำเนินการภายในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) จัดเป็นวิธีการทดสอบเบื้องต้น (screening test) เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก วิธีการทดสอบ เช่น

1) วิธี Test on Extracts

เป็นการทดสอบเพื่อประเมินการตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงต่อสิ่งที่สกัดได้จากตัวอย่างที่ทดสอบ โดยการประเมินผลจากการถูกทำลายของเซลล์ วิธีนี้เหมาะสมสำหรับวัสดุอุปกรณ์การแพทย์ทุกประเภท

2) วิธี Agar overlay

เป็นการทดสอบความเป็นพิษของตัวอย่าง โดยการทดสอบตัวอย่างกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง (Agar media) และประเมินความเป็นพิษของตัวอย่างต่อเซลล์โดยพิจารณาจากการถูกทำลายของเซลล์ในอาหารแข็ง วิธีนี้เหมาะสมกับวัสดุอุปกรณ์การแพทย์ที่อยู่ในรูปของเหลว

ในการเลือกวิธีการทดสอบนั้น เบื้องต้นจะพิจารณาจากลักษณะทางกายภาพของวัสดุอุปกรณ์การแพทย์ที่ต้องทดสอบ เช่น วัสดุอุปกรณ์การแพทย์ที่เป็นของแข็ง มีรูปร่างชัดเจน สามารถวัดหรือทำการชั่งน้ำหนักได้ วิธีทดสอบมักเลือกใช้วิธีหนึ่งได้แก่ วิธี test on extracts ซึ่งเป็นการทดสอบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการทดสอบมีการปลดปล่อยสิ่งที่มีความเป็นพิษ หรือสารเคมีตกค้างที่มีผลกระทบต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบหรือไม่ ในการวิเคราะห์ผลการทดสอบนั้นจะขึ้นอยู่กับวิธีการทดสอบที่เลือกใช้ สามารถวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบผลเชิงคุณภาพ (qualitative) และ/หรือเชิงปริมาณ (quantitative) กับผลของชุดควบคุมต่าง ๆ ได้แก่ ชุดควบคุมผลลบ (negative control) ชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รีเอเจนท์ (reagent control) ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่ไม่แสดงผลใด ๆ ของการทำลายเซลล์ และชุดควบคุมผลบวก (positive control) ซึ่งจะแสดงผลของการถูกทำลายของเซลล์อย่างชัดเจน การติดตามผลดำเนินการด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสง

ในการวิเคราะห์ผลเชิงคุณภาพ จะพิจารณาจากการถูกทำลายของเซลล์ เช่น ความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิววัสดุ (cell attachment) รูปร่างของเซลล์ (cell morphology) การเกิดช่องว่างภายในเซลล์ (vacuolization) การถูกทำลายของเซลล์ (cell lysis) ในการวิเคราะห์ผลจะมีเกณฑ์การตัดสินเพื่อใช้ในการพิจารณา ซึ่งจะมีในเอกสารมาตรฐานบางฉบับได้กำหนดไว้ เช่น ISO 10993 และ USP 28 เป็นต้น ในการวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณ จะแสดงผลเป็นจำนวนตัวเลขโดยพิจารณาจากผลการวัดการตายของเซลล์ และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ได้แก่จำนวนเซลล์ ปริมาณของโปรตีน การปลดปล่อยและการลดลงของสีย้อมเซลล์ (vital dye) เป็นต้น

2.3.4 การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility testing)

ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ คือความสามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุกับเนื้อเยื่อในร่างกายบริเวณตำแหน่งที่วัสดุเข้าไปแทนที่อยู่ โดยมีหรือไม่มีอาการเจริญของเนื้อเยื่อที่ปกติดบนพื้นผิวหรือเจริญเข้าไปภายในจนเป็นเนื้อเดียวกันกับวัสดุทั้งนี้จะไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาการระคายเคือง อักเสบ การแพ้ การตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม รวมถึงต้องไม่ก่อให้เกิดมะเร็ง ในกรณีที่เป็นวัสดุที่ไม่มีสมบัติดังกล่าว เมื่อเข้าสู่ร่างกาย และร่างกายมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม จะเกิดการสร้างเนื้อเยื่อพังผืดขึ้นล้อมรอบวัสดุที่ใส่เข้าไปทำให้ร่างกายเกิดความผิดปกติ ในการตอบสนองความเข้ากันได้ทางชีวภาพ โดยทั่วไปแล้ววิธีที่ใช้ในการทดสอบมี 2 วิธี ได้แก่

1. *In vivo* test เป็นการทดสอบภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตโดยผ่าตัดใส่วัสดุฝังในเข้าไปในร่างกายของสัตว์ทดลอง
2. *In vitro* test เป็นการทดสอบในสภาวะจำลองเสมือนในร่างกายซึ่งกระทำภายในห้องปฏิบัติการ โดยการนำเซลล์เลี้ยงหรือเซลล์ที่เติบโตจากเนื้อเยื่อมาทดสอบโดยตรงกับพื้นผิวของวัสดุ ซึ่งจำเป็นต้องเลือกใช้ชนิดของเซลล์ที่เหมาะสมกับการใช้งานของวัสดุ การทดสอบสามารถใช้ ศึกษาลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ การเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์บนพื้นผิววัสดุ เป็นต้น

2.4 มังคุด

มังคุดชื่อสามัญ mangosteen ชื่อทางพฤกษศาสตร์ (*Garcinia mangostana* Linn.) เป็นผลไม้เมืองร้อน จัดอยู่ในวงศ์ Guttiferae มักเจริญเติบโตในเขตร้อนชื้นของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ในเขตประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย ศรีลังกา ฟิลิปปินส์ และประเทศไทย ประชาชนในเขตดังกล่าวนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเปลือกผลมังคุด มาใช้ในทางการแพทย์ โดยใช้รักษาอาการปวดท้อง ท้องร่วง โรคบิด แผลติดเชื้อ แผลเป็นหนอง และมะเร็งเรื้อรัง (Jose และคณะ. 2008)

มังคุดมีลำต้นสูงประมาณ 6-25 เมตร ใบเป็นแบบใบเดี่ยว ขนาดใหญ่ ลักษณะคล้ายรูปไข่ กว้าง 4.5 - 10 เซนติเมตร ยาว 25-35 เซนติเมตร เปลือกผลมีสีม่วงเข้มหรือแดงเข้ม เนื้อผลสีขาว เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นุ่ม และชุ่มน้ำ รสชาติหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย และมีกลิ่นหอม มังคุดได้รับสมญานามว่า ราชินีแห่งผลไม้ เนื่องจากเป็นที่หนึ่งในด้านรสชาติของผลไม้เมืองร้อน เปลือกของผลมังคุดมีประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรม ประเทศในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้นำมาใช้รักษาอาการสิว และแผลติดเชื้อ (Mahabusarakam และคณะ. 1987., Pierce. 2003) โรคบิดอะมีบา (Garnett และ Sturton. 1932., Chopra และคณะ. 1956) เปลือกมังคุดนำมาใช้ในการป้องกันแผลติดเชื้อ และแผลเป็นหนอง (Balasubramanian และ Rajagopalan. 1988) และบิด (Sen และคณะ. 1980) นอกจากนี้สารจากเปลือกมังคุดยังเป็นสารที่มีความปลอดภัยสูง (พิเชษฐ วิริยจิตรา. 2531)

มีการศึกษาวิจัยถึงสารสกัดของมังคุดพบว่า เปลือกมังคุดอุดมด้วยสารในกลุ่มของแซนโทน ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต้านการเกิดมะเร็ง (antitumoral) ต้านอาการภูมิแพ้ (antiallergic) ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) ต้านเชื้อไวรัส (antiviral) ต้านเชื้อรา (antifungal) นอกจากนี้สามารถพบแซนโทนในส่วนของลำต้น ผล และใบ (Jung และคณะ. 2006., Jose และคณะ. 2008)

สารสกัดจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และต้านเชื้อ *S. aureus*, *Helicobacter pylori*, *Propionibacterium acnes* และ *S. epidermidis* (Mahabusarakam และคณะ. 1983., Chomnawang และคณะ. 2005., Chomnawang และคณะ. 2007., Kosem และคณะ. 2007., Hen และคณะ. 2008., Itoh และคณะ. 2008)

สารสกัดเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย อันเป็นสาเหตุของการเกิดหนอง คือ *Staphylococcus aureus* และ *S. aureus* ที่ดื้อยา methicillin (MRSA) (ธวัชชัย เชื้อประไพศิลป์ และคณะ. 2536., เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร และคณะ. 2537., Sutabhaha และคณะ. 1997) ส่วนสารจากการสกัดเปลือกมังคุดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ จะให้ผลยับยั้งแบคทีเรีย ด้วยความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) และฆ่าแบคทีเรียด้วยความเข้มข้นต่ำสุด (MBC) ต่อ MRSA ได้ดีกว่ายาปฏิชีวนะ methicillin ถึง 20 เท่า และ 100 เท่า ตามลำดับ แต่ให้ผลยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MIC และ MBC) ต่อ *S. aureus* เท่ากับ ยาปฏิชีวนะ methicillin (Sutabhaha และคณะ. 1997) สารสกัดจากมังคุดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้เป็น 3 เท่าของแอสไพริน (ธวัชชัย เชื้อประไพศิลป์ และคณะ. 2536) สารสกัดจากเปลือกมังคุดชื่อว่า แมนโกสทิน (Mangostin) เมื่อกรอกปากหรือฉีดเข้าช่องท้องหนูขาว มีผลระงับการอักเสบที่อุ้งเท้าหนู (Shankaranarayan และคณะ. 1979)

2.5 ไพล

ไพล จัดเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่ง ที่มีมากในประเทศไทยและใช้ในการบรรเทาอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ เคล็ดขัดยอก และผิวหนังอักเสบ รวมทั้งช่วยในเรื่องของฝี หนอง สิว แผลงัสต์ว์กัดต่อย และรักษาโรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ

ไพล มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Zingiber cassumunar* Roxb. จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ชื่อพ้องได้แก่ *Zingiber cassumunar* Roxb. *Zingiber purpureum* Roscoe. และชื่อท้องถิ่น เช่น ปุลอย ปุเลย มินสะล่าง ว่านไฟ เป็นพืชล้มลุก ตระกูลเดียวกับพวกขิงและข่า ใบเล็กยาว ปลายใบแหลม เหง้าไพล มีสีเหลืองอมเขียว กลิ่นหอม ต้นสูง 1-1.5 เมตร เป็นไม้ล้มลุกเจริญ

งอกงามในฤดูฝนและแห้งตายในฤดูหนาว ตามภูมิปัญญาไทย จะใช้ใบไพล แก้อาการคลื่นเนื้อตัว แก้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เขียนไว้สำหรับการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อย ดอกโพลใช้กระจายเลือดที่เป็นลิ่มเป็นก้อน รากโพล ใช้แก้เลือดกำเดาออกทางจมูก แก้อาเจียน เป็นโลหิต หัวโพล ใช้ขับระดูประจำเดือนสตรี มักใช้เหง้าโพล ฝนทาแก้อาการบวม เคล็ดยอก หรือ โขลกพอกบาดแผลเพื่อสมานแผล ในยาแผนไทยใช้โพลเข้าเป็นตัวยาลึกในตำรับยาสามัญประจำ บ้าน ชื่อว่า ยาประสะโพล ซึ่งใช้แก้อาการจุกเสียด แก่ระดูไม่ปกติ ขับน้ำคาวปลา หรือเป็นยาประคบ แก่ปวดเมื่อย เป็นต้น

สารสกัดโพลจากส่วนใบ และเหง้าโพล (*Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade) จากการสกัดด้วยน้ำ เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยเทคนิค micro-dilution พบว่าสารสกัดทั้งจากส่วนใบและเหง้า สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus licheniformis*, *B. spizizenii* และ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas stutzeri* (Sivasothy และคณะ. 2010)

น้ำมันสกัดจากโพล (*Zingiber cassumunar*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เชื้อราที่มักพบการเจริญบนผิวหนัง (dermatophytes) และยีสต์ (yeasts) โดยมีผลต่อ dermatophytes มากที่สุด รองลงมาได้แก่ ยีสต์ และ แบคทีเรียตามลำดับ (Pithayanukul และคณะ. 2007)

(E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene (DMPBD) ซึ่งสกัดจากโพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) สามารถลดการบวม (edema) บริเวณหูของหนูได้ดีกว่ายาที่ใช้แบบมาตรฐาน และลดการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Jeenapongsa และคณะ. 2003)

สารสกัดโพลที่สกัดด้วยเฮกเซน มีฤทธิ์ในการลดการอักเสบได้ (Pongprayoon. 1997) สาร *cassumunarins* ที่พบในโพล มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่หูของหนูได้ดีกว่าสาร *curcumin* (Masuda และคณะ. 1995) จากการทดสอบสารชนิดหนึ่งที่แยกได้จากโพลที่สกัดด้วยเมทานอล พบว่ามีฤทธิ์ลดการหลั่งสารที่ทำให้เกิดการแพ้ และอักเสบของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ผิวหนังมนุษย์ (Masahiro และคณะ. 2004)

สารสกัดจากโพลที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคของระบบทางเดินหายใจ แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* *S. aureus* และ *K. pneumoniae* ได้ (Habsah และคณะ. 2000) ส่วนสารสกัดจากโพลด้วย ไดเอทิลอีเทอร์ น้ำ และปิโตรเลียมอีเทอร์ ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* *E. coli* *P. aeruginosa* และ *S. aureus* (อารีรัตน์ ลออปึกษา และ สุรัตนา อำนวยผล. 2531)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อุดมลักษณ์ สุขอัติตะ และคณะ (2549) ศึกษาการสกัดและการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด จากการนำเปลือกมังคุดสดและแห้ง มาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและการสกัดเปลือกมังคุดสดและแห้ง แบบต่อเนื่องด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน อะซิโตน และ เมทานอล โดยใช้วิธีการสกัดเย็น (Maceration) และวิธีการสกัดร้อนด้วยเครื่อง Soxhlet extraction apparatus พบว่าการสกัดสารจากเปลือกมังคุดแห้งด้วยตัวทำละลายเอทานอลได้สารสกัดหยาบมากที่สุดคือ ร้อยละ 26.59 จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลือกมังคุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 5 ชนิด คือ *S. Aureus* *S. epidermidis* *P. acnes* *Candida albicans* และ *Trichophyton mentagrophytes* ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดสดโดยวิธีการสกัดเย็นด้วยเอทานอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* *S. epidermidis* *P. acnes*. และ *T. mentagrophytes* ได้ดีที่สุด สารสกัดจากเปลือกมังคุดไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* เมื่อนำสารสกัดจากเปลือกมังคุดสดจากการสกัดเย็นด้วยเอทานอล มาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดโดยวิธี agar dilution พบว่า มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* *P. acnes* *S. epidermidis* *T. mentagrophytes* ได้เท่ากับ 128 256 4096 และ 8192 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Maneerung และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตแผ่นวัสดุปิดแผล โดยใช้เซลลูโลสจากแบคทีเรีย ซึ่งทำให้อิมมัตว์ด้วยสารละลายซิลเวอร์นาโน (silver nano) โดยนำเซลลูโลสที่ผลิตจากเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 จุ่มลงในสารละลายซิลเวอร์นาโนในเตรท เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ให้แก่แผ่นเซลลูโลส ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* โดยวิธี disc diffusion และวิธี colony forming count พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดี โดยเมื่อใส่แผ่นเซลลูโลสที่อิมมัตว์ด้วยซิลเวอร์นาโน ในอาหารเหลวที่มีเชื้อทั้งสองชนิด พบว่าจำนวนการเจริญเติบโตเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ลดลงคิดเป็นร้อยละ 99.9 และ 99.7 ตามลำดับ

จตุวัตร ผดุงการ และคณะ (2009) ศึกษาแผ่นแปะต้านเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดเปลือกมังคุด โดยการสกัดสารแอลฟาแมงโกสติน (α -mangostin) จากเปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) ด้วย เอทานอล แยกให้เป็นสารบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ซึ่งพบว่าสามารถสกัดสาร α -mangostin เท่ากับ ร้อยละ 77.86 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ของปริมาณสารสกัดจากเปลือกมังคุด จากนั้นจึงนำสารสกัดจากเปลือกมังคุดไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* *S. aureus* และ *P. acnes* พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อทั้ง 3 ชนิดเท่ากับ 1.95 3.9 และ 3.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดจากเปลือกมังคุด มาพัฒนาเป็นสูตรตำรับแผ่นแปะเพื่อต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ เพคติน (pectin) ผงวุ้น (agar) โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) และเอซิลเซลลูโลส (ethyl cellulose) เป็นส่วนประกอบ พบว่าแผ่นแปะที่ประกอบด้วยสารเหล่านี้ ยกเว้นเอซิลเซลลูโลสมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. epidermidis* *S. aureus* และ *P. acnes*

นุศวดี พจนานุกิจ และสมใจ ขจรชีพพันธ์งาม (2010) ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวของสารสกัดจากพืชสมุนไพร ทดสอบการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* และ *S. aureus* โดยสมุนไพรที่ศึกษาคือ เปลือกมังคุด ขมิ้นชัน และใบบัวบก นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้ ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสามารถสกัดแซนโทน (xanthone) จากเปลือกมังคุดได้ 1.1929 มิลลิกรัมต่อกรัมของเปลือกมังคุด สารเคอร์คูมิน จากขมิ้นชัน 0.8753 มิลลิกรัมต่อกรัมของขมิ้นชัน และสารเอเซียติโคไซด์ กับสารกรดเอเซียติกจากใบบัวบก ได้ 0.0142 และ 0.096 มิลลิกรัมต่อกรัมของใบบัวบก ตามลำดับ จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อของสารสกัดพบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) มากกว่าสารสกัดจากขมิ้นชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และใบบัวบก ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากัน และการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) ของสารสกัดจาก เปลือกมังคุด ขมิ้นชัน และใบบัวบก ต่อเชื้อ *P. acnes* มีค่าเท่ากับ 12.5 25.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และต่อเชื้อ *S. aureus* มีค่าเท่ากับ 6.25 12.5 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่าเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารสกัดจาก เปลือกมังคุด ขมิ้นชัน และใบบัวบก ต่อเชื้อ *P. acnes* มีค่าเท่ากับ 25.0 50.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ต่อเชื้อ *S. aureus* มีค่าเท่ากับ 12.5 50.0 และ 200.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อของสารสกัดจากพืชทั้งสามชนิด พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้สูงสุด

Saibuatong และ Phisalaphong (2010) ศึกษาการผลิตแผ่นคอมโพสิทระหว่างเซลลูโลสกับเจลวุ้นทางจระเข้ โดยการเติมเจลวุ้นทางจระเข้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตเซลลูโลสของแบคทีเรีย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำมะพร้าว เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 แอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 0.5 และกรดอะซิติก ร้อยละ 1 เติมเจลวุ้นทางจระเข้ ปริมาตรร้อยละ 0-50 โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เติมหิวเชื้อ *A. xylinum* เพาะเลี้ยงในงานเพาะเชื้อ สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน หลังจากนั้นล้างตัวอย่างด้วยน้ำปราศจากไอออน แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างตัวอย่างจนมีค่า pH เป็นกลาง จึงนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR พบว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเจลวุ้นทางจระเข้กับเส้นใยเซลลูโลส และเมื่อนำแผ่นคอมโพสิทระหว่างเซลลูโลสกับเจลวุ้นทางจระเข้ ทดสอบค่าความแข็งแรงเชิงกล ความเป็นผลึก การดูดซับน้ำ และการซึมผ่านของน้ำเปรียบเทียบค่าการทดสอบกับเซลลูโลสปกติ พบว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของรูพรุน (pore size) ของแผ่นคอมโพสิทแบบแห้ง กับแผ่นเซลลูโลสปกติ พบว่า ขนาดของรูพรุนเฉลี่ยของแผ่นคอมโพสิทมีค่าลดลงประมาณ 1/5 ของแผ่นเซลลูโลสปกติ ซึ่งมีผลให้การซึมผ่านของน้ำลดลง

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

Acetobacter xylinum TISTR 976

Escherichia coli TISTR 887

Staphylococcus aureus TISTR 118

Staphylococcus epidermidis TISTR 518

Micrococcus luteus TISTR 884

3.2 เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ

เซลล์ L929 (mouse fibroblast) จาก ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

3.3 สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย

เหง้าไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.)

3.4 สารเคมีและอุปกรณ์

3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

3.4.1.1 อาหารสูตรน้ำมะพร้าว

3.4.1.2 อาหารสูตรสำเร็จ Nutrient Agar (NA) Scharlau Chemic. Spain

3.4.1.3 อาหารสูตรสำเร็จ Mueller Hinton Broth (MHB) BIOMARK™
Laboratories. India

3.4.1.4 อาหารสูตร Mueller Hinton Agar (MHA)

3.4.1.5 อาหารสูตร Hestrin-Schramm medium (HS medium)

3.4.1.6 อาหารสูตร Glucose Ethanol Yeast extract Agar (GEY medium)

3.4.1.7 อาหารสูตร Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)
Gibco™, Paisley, Scotland, UK

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 เคมีภัณฑ์

- 3.4.2.1 เฮกเซน เกรดการค้า ยี่ห้อ ZEN POINT
- 3.4.2.2 เอธิลอะซิเตท เกรดการค้า ยี่ห้อ ZEN POINT
- 3.4.2.3 เมทานอล เกรดการค้า ยี่ห้อ ZEN POINT
- 3.4.2.4 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เกรดวิเคราะห์ BDH PROLABO.® FRANCE
- 3.4.2.5 ทวิน 80 (tween 80)
- 3.4.2.6 โซเดียมไฮดรอกไซด์ เกรดวิเคราะห์ RANKEM. India
- 3.4.2.7 McFarland standard No. 0.5 Biomerieux. FRANCE
- 3.4.2.8 กรดอะซิติก เกรดวิเคราะห์ Scharlau Chemic. Spain
- 3.4.2.9 นิวทลเรด (Neutral red)
- 3.4.2.10 พอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง (High-Density Polyethylene : HDPE)
- 3.4.2.11 ยางธรรมชาติที่ประกอบด้วยคาร์บอนดำ (Natural rubber containing carbon black)

3.4.3 อุปกรณ์

- 3.4.3.1 เครื่อง Water vapor permeation tester รุ่น Lyssy L80-4000.
- 3.4.3.2 เครื่อง Oxygen permeation tester รุ่น Illinois 8000.
- 3.4.3.3 เครื่องระเหยสารภายใต้ระบบสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) บริษัท BUCHI VAC® R-205, V-500, V-800. Germany
- 3.4.3.4 ตู้ดูดควัน (protector laboratory hood) บริษัท SCIENCE TECHNOLOGY
- 3.4.3.5 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator) รุ่น control E2 Binder. บริษัท Scientific promotion
- 3.4.3.6 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Incubator) รุ่น INB500. บริษัทเบคไท
- 3.4.3.7 ตู้ปลอดเชื้อ (Bio Hazard class II) รุ่น V6 CLEAN.
- 3.4.3.8 ตู้ปลอดเชื้อ (Astec Micro flow) รุ่น ABS1200. บริษัท BIOQUELL Medical Limited. UK
- 3.4.3.9 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) บริษัทเบคไท ประเทศไทย
- 3.4.3.10 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (High Pressure Steam Sterilizer) รุ่น ES315 บริษัท TOMY Kogyo. Japan
- 3.4.3.11 เครื่องชั่งละเอียด 3 ตำแหน่ง (Balance) รุ่น P6803. บริษัท Mettler Toledo.
- 3.4.3.12 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Balance) รุ่น BP221S. บริษัท Sartorius
- 3.4.3.13 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น cyberscan 2000.
- 3.4.3.14 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (Ultra low temperature freezer) รุ่น forma 900 series. บริษัท Thermo scientific
- 3.4.3.15 Microtiter plate reader รุ่น iEMS ReaderMF. บริษัท Helsinki
- 3.4.3.16 เครื่องอัดรีดน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.3.17 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer) รุ่น LABCONCO.
บริษัท LABCONCO
- 3.4.3.18 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 3.4.3.19 เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyser) รุ่น TA Plus.
บริษัท Lloyd Instruments
- 3.4.3.20 เครื่องผสมสาร (Vortex) รุ่น G-560E. บริษัท Scientific Industries
INC. USA.
- 3.4.3.21 ไมโครปิเปต (Precision Microliter pipette) รุ่น Pipetman® neo.
บริษัท Gilson
- 3.4.3.22 ไมโครปิเปต (Microliter pipette) รุ่น Transferpette® บริษัท BRAND
GMBH
- 3.4.3.23 เครื่องแก้ว (Glasswares)
- 3.4.3.24 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร
- 3.4.3.25 แผ่นดิสก์ เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร
- 3.4.3.26 ภาชนะเชื้อแบบ 96 หลุม (Microtiter plate)
- 3.4.3.27 กล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast (phase contrast light microscopy)
- 3.4.3.28 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron
Microscopy) รุ่น JSM-5410 (JEOL)
- 3.4.3.29 ไม้สำลีปราศจากเชื้อ (Sterile cotton swab)
- 3.4.3.30 ดิจิตอล คาลิเปอร์ (digital caliper)
- 3.4.3.31 ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.4.3.32 ปากคีบ (Forceps)
- 3.4.3.33 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.5 การหมักเซลล์ูโลส

นำเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 จำนวน 1 โคโลนีจากอาหารแข็ง Glucose Ethanol Yeast extract (GEY) (ภาคผนวก) ลงในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250.0 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตเซลล์ูโลส อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 เพื่อผลิตแผ่นเซลล์ูโลส คือสูตรน้ำมะพร้าว ปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นนำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ ใส่ลงในขวดอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ในอัตราส่วน ร้อยละ 10 ของปริมาณอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน (หรือให้มีความหนาเฉลี่ย 5.0 มิลลิเมตร) ในสภาวะนี้ นำแผ่นเซลล์ูโลสที่ได้จากการหมักมาจัดสิ่งเจือปนต่างๆ ภายในแผ่นโดยกระบวนการทำแผ่นเซลล์ูโลสให้บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 ศึกษาการเตรียมแผ่นเซลลูโลสให้บริสุทธิ์

เปรียบเทียบวิธีการเตรียมแผ่นเซลลูโลสให้บริสุทธิ์ 3 วิธี ได้แก่

3.6.1 การต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการหมัก ล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสใส่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต้มให้เดือดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (2 ครั้ง) เพื่อย่อยสลายเซลล์แบคทีเรียภายในแผ่นเซลลูโลส จากนั้นต้มด้วยสารละลายกรดอะซิติก ร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 30 นาที เพื่อปรับค่าความเป็นด่างให้ลดลง จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดจนน้ำสุดท้ายมีค่า pH เป็นกลาง เก็บแผ่นเซลลูโลสที่ได้ในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดการใช้งาน (Maneerung และคณะ. 2008)

3.6.2 การต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และการฟอกสี

นำแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการหมัก มาล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสใส่ในสารละลายสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต้มให้เดือด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสใส่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 0.5 ต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อฟอกสีของแผ่นเซลลูโลสให้ขาว จากนั้นล้างแผ่นเซลลูโลสด้วยน้ำเปล่า และต้มในน้ำเปล่าให้เดือด 30 นาที เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น กระทั่งน้ำที่แช่แผ่นเซลลูโลสไม่มีกลิ่นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และมีค่า pH เป็นกลาง ดัดแปลงจากวิธีของ พิษพันธ์ พงษ์สกุล (2550)

3.6.3 การแช่แผ่นเซลลูโลสในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการหมัก มาล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลส แช่ในสารละลายสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสมาต้มในน้ำกลั่น 30 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำสะอาด จำนวนหลายครั้ง จนกว่ากลิ่นและความขุ่นของโซเดียมไฮดรอกไซด์หายไป และน้ำที่ล้างและแช่แผ่นเซลลูโลสมีค่า pH เป็นกลาง ดัดแปลงจากวิธีของ Saibuatong และ Phisalaphong (2010)

3.7 การสกัดสารจากไพล

นำเหง้าของไพลล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก จากนั้นนำไพลที่หั่นแล้วอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำไพลที่อบแล้วมาชั่งน้ำหนักให้ได้ 2.0 กิโลกรัม ห่อด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำมาแช่ในสารอินทรีย์ 3 ลำดับ ลำดับแรกแช่ในตัวทำละลาย เฮกเซน ปริมาตร 6.0 ลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ กรองสารที่สกัดได้ด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 90.0 มิลลิเมตร แล้วระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน เรียกสารส่วนนี้ว่าสารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซน ต่อมานำกากไพลที่สกัดด้วยเฮกเซนแล้วนั้น ห่อด้วยผ้าขาวบาง แล้วแช่ในสารอินทรีย์ลำดับต่อมาคือ ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และลำดับสุดท้ายคือ ตัวทำละลายเมทานอล โดยทำทุกขั้นตอนเหมือนวิธีสกัดสารในตัวทำละลาย เฮกเซน จนได้สารสกัดหยาบ ในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และสารสกัดหยาบในชั้นของตัวทำละลายเมทานอล ตามลำดับ (เขษณ รัตนาจารย์. 2548)

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *E. coli* TISTR 887 *S. aureus* TISTR 118 *S. epidermidis* TISTR 518 และ *M. luteus* TISTR 884 ซึ่งเจริญบนอาหาร Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก ก) ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 0.9 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร นำมาปรับเทียบความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland standard No. 0.5 จะได้เซลล์แขวนลอยที่มีความหนาแน่นประมาณ 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.9 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากโพลีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion

นำสารสกัดในแต่ละชั้นของตัวทำละลายมาเจือจางด้วย ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับการใช้ทวิน 80 (Tween80) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้สารสกัดมีความเข้มข้น 500.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA) (ภาคผนวก ก) ในจานเพาะเชื้อ ใช้ไม้พันสำลีชุบเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียทดสอบ *E. coli* TISTR 887 และ *S. aureus* TISTR 118 ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ป้ายให้ทั่วอาหารแข็ง MHA วางแผ่นดิสก์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร) ที่หยดสารสกัดปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร ชุดควบคุม ได้แก่ แผ่นดิสก์ที่หยดสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และที่หยดสารละลาย ทวิน80 ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) บนอาหารเพาะเชื้อ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองเชื้อละ 5 ข้ำ ตรวจสอบผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (clear zone) ที่เกิดขึ้น คัดเลือกส่วนของสารสกัดที่ยับยั้งฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสูงสุดมาทำการศึกษาในขั้นต่อไป

3.10 การสกัดสารจากเปลือกมังคุด

นำเปลือกมังคุดสดมาล้างให้สะอาด จากนั้นหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก นำไปบอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งน้ำหนักแห้งให้ได้ 2.0 กิโลกรัม จากนั้นแช่ด้วยสารอินทรีย์ 3 ลำดับ ทำวิธีการสกัดเช่นเดียวกับการสกัดโพลี

3.11 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากเปลือกมังคุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Disc diffusion

นำสารสกัดในแต่ละชั้นของตัวทำละลายมาเจือจางด้วย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้สารสกัดมีความเข้มข้น 500.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมอาหารแข็ง MHA ในจานเพาะเชื้อ ใช้ไม้พันสำลีชุบเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *E. coli* TISTR 887 และ *S. aureus* TISTR 118 ที่มีความหนาแน่นเซลล์แขวนลอย 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ป้ายให้ทั่ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารแข็ง MHA วางแผ่นดิสก์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร) ที่หยดสารสกัดปริมาณ 20.0 ไมโครลิตร ชุดควบคุม ได้แก่ แผ่นดิสก์ที่หยดสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) บนอาหารเพาะเชื้อ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองเชื้อละ 5 ซ้ำ ตรวจสอบผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น คัดเลือกส่วนของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสูงสุดมาทำการศึกษาในขั้นต่อไป

3.12 เปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดไพล และสารสกัดเปลือกมังคุดโดยหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) โดยวิธี Broth dilution

นำสารส่วนของสกัดหยาบจากไพลและเปลือกมังคุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* TISTR 887 และ *S. aureus* TISTR 118 ซึ่งทำให้เกิดบริเวณยับยั้งสูงสุด จากการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion มาหาค่า MIC โดยวิธี broth dilution ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* TISTR 887 *S. aureus* TISTR 118 *S. epidermidis* TISTR 518 และ *M. luteus* TISTR 884 เตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบให้มีเซลล์แขวนลอย ความหนาแน่นประมาณ 1.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำจานเพาะเชื้อขนาดเล็กแบบ 96 หลุม (Microtiter plate) มาเติมอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) หลุมละ 50.00 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารสกัดในขั้นตัวทำละลายที่คัดเลือกได้จากวิธี disc diffusion โดยเตรียมความเจือจางของสารสกัดในลักษณะลดลง 2 เท่า จากความเข้มข้นเริ่มต้น 200.00 เป็น 100.00 50.00 25.00 .. 3.13 และ 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีชุดควบคุมคือ สารละลาย DMSO ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปหยดลงหลุมในงานเพาะ ปริมาตรหลุมละ 45.0 ไมโครลิตร แล้วใส่เชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ ปริมาตรหลุมละ 5.0 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader) บันทึกความขุ่นของของเหลวในแต่ละหลุม จากนั้นนำงานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำมาวัดค่าความขุ่นของของเหลวในงานเพาะเชื้ออีกครั้งหนึ่ง จากนั้นเปรียบเทียบค่าความขุ่นระหว่างก่อนบ่มกับหลังบ่มระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ จะมีค่าความขุ่นของของเหลวหลังบ่มไม่เพิ่มขึ้นจากค่าความขุ่นของของเหลวก่อนบ่ม ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ จะนำมาบันทึกเป็นค่า MIC (มาลิน จุลศิริ. 2532)

3.13 เปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดไพลและสารสกัดเปลือกมังคุด โดยวิธี Disc diffusion

นำสารสกัดหยาบจากไพลและเปลือกมังคุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* TISTR 887 และ *S. aureus* TISTR 118 ได้สูงสุด มาเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* TISTR 887 *S. aureus* TISTR 118 *S. epidermidis* TISTR 518 และ *M. luteus* TISTR 884 โดยศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงกว่าค่า MIC ที่ได้จากการทดสอบวิธี broth dilution เนื่องจากวิธีดังกล่าวสารสกัดได้สัมผัสกับเซลล์แบคทีเรียทดสอบโดยตรง แต่วิธี disc diffusion เป็นการทดสอบ

ฤทธิ์ของสารสกัดผ่านการแพร่สารจากแผ่นดิสก์ จึงใช้ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น โดยเจือจางสารสกัดด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เตรียมอาหารแข็งในงานเพาะเชื้อ ใช้ไม้พินสำลีชุบเซลล์แขวนลอยแบบคที่เรียทดสอบ ที่มีความหนาแน่นเซลล์แขวนลอย 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ป้ายให้ทั่วอาหารแข็ง MHA วางแผ่นดิสก์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร) ที่หยดสารสกัดปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร ชุดควบคุมได้แก่แผ่นดิสก์ที่หยดสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) บนอาหารแข็ง นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองเชื้อละ 5 ซ้ำ ตรวจสอบผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (clear zone) ที่เกิดขึ้น คัดเลือกส่วนของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้สูงสุดมาทำการศึกษาในขั้นต่อไป

3.14 การเตรียมแผ่นเซลล์ูลอสร่วมกับสารสกัด

นำสารสกัดหยาบที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.13 มาเตรียมเป็นสารละลาย โดยเจือจางสารสกัดด้วยสารละลาย DMSO ลดระดับความเข้มข้นจากร้อยละ 10 เป็นร้อยละ 0.02 เพื่อลดความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ทดสอบ โดยใช้ความเข้มข้นสารสกัดที่สูงกว่าค่า MIC จากนั้นนำแผ่นเซลล์ูลอสที่ผ่านการเตรียมให้บริสุทธิ์แล้ว มาอ้อมรีดน้ำด้วยเครื่องอ้อมรีดน้ำ ฆ่าเชื้อแผ่นเซลล์ูลอสด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จุ่มแผ่นเซลล์ูลอสที่ปลอดเชื้อ ลงในสารละลายสารสกัด ใช้แผ่นเซลล์ูลอสที่จุ่มในสารละลาย DMSO ร้อยละ 0.02 เป็นชุดควบคุม แช่แผ่นเซลล์ูลอสในสารละลายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเซลล์ูลอสออกจากสารละลาย และซับด้วยกระดาษกรอง เพื่อนำสารละลายส่วนเกินที่ผิวหน้าแผ่นเซลล์ูลอสออก จากนั้นนำไปแช่แข็งในตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) 1-2 วัน บรรจุแผ่นแห้งเซลล์ูลอสที่มีสารสกัดร่วมด้วยในถุงพลาสติก เก็บในที่แห้ง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และหลีกเลี่ยงแสง

3.15 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของแผ่นแห้งเซลล์ูลอสที่จุ่มสารสกัดโดยวิธี Agar Diffusion

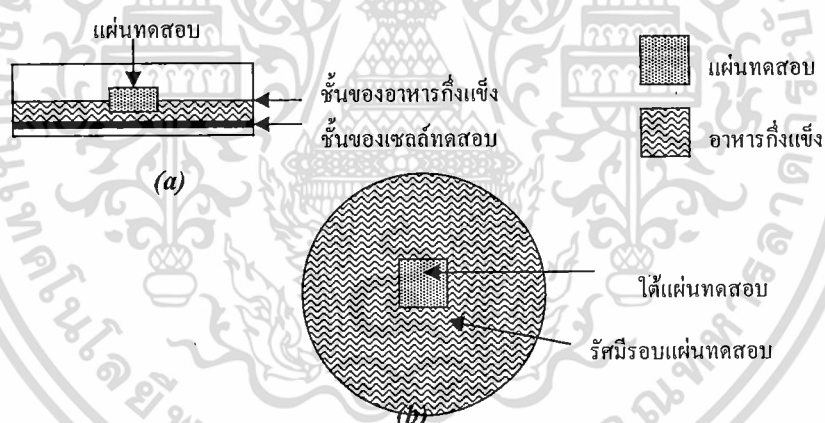
3.15.1. การเตรียมเซลล์เพื่อใช้ทดสอบ

เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบคือ L929 (mouse fibroblast) โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ในสารละลายอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (ภาคผนวก ก) ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 6.0×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรของสารละลายอาหาร นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่มีบรรยากาศ CO_2 ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเซลล์โดยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ ให้มีเซลล์เจริญขึ้นเต็มพื้นที่ของจานเพาะเลี้ยง เพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

3.15.2 การทดสอบความเป็นพิษ

ทดสอบความเป็นพิษของแผ่นแห้งเซลล์ูลอสที่จุ่มสารสกัดโดยวิธี Agar diffusion หลังจากที่ทำกรเพาะเลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเชื้อแล้ว ดูดสารละลายอาหารเก่าในจานเพาะเลี้ยงออกนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อออก ถ่ายอาหารใหม่ ซึ่งมีวุ้นร้อยละ 2 ลงในงานเพาะเซลล์ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เมื่อวุ้นแข็งนำแผ่นเซลลูโลสซึ่งตัดเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาด 10.0×10.0 ตารางมิลลิเมตร วางลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นตรงกลางงานเพาะเลี้ยงเซลล์ ดังภาพที่ 3.1 (a) นำงานเพาะเซลล์ไปบ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่มีบรรยากาศ CO_2 ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ปากกาขีดทำเครื่องหมายรอบขอบแผ่นตัวอย่างที่ด้านล่างของงานเพาะเชื้อ เพื่อแสดงตำแหน่งของวัสดุ จากนั้นคืบแผ่นตัวอย่างออก ใส่สารละลายนิวทริลเรด (neutral red) ร้อยละ 0.01 ที่ละลายใน phosphate buffer saline ลงในงานเพาะปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เพื่อย้อมสีเซลล์ โดยนิวเคลียสเซลล์ที่มีชีวิตจะติดสีของนิวทริลเรด และนำมาตรวจสอบรูปร่างลักษณะของเซลล์ และการติดสีของเซลล์บริเวณตำแหน่งใต้แผ่นวัสดุ และรัศมีรอบแผ่นทดสอบ ดังภาพที่ 3.1 (b) ด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ ในการทดสอบจะใช้ high-density polyethylene (HDPE) เป็น negative control และ natural rubber containing carbon black เป็น positive control ในการทดลองจะทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ระดับความเป็นพิษพิจารณาจากระดับของปฏิกิริยาต่อเซลล์ทดสอบ ตามเกณฑ์ตำรับของประเทศสหรัฐอเมริกา (The United States Pharmacopoeia : USP) และทะเบียนยาหลักแห่งชาติแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (National Formulary : NF) แสดงดังตารางที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 แผนภาพแสดงการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี Agar diffusion

- (a) แผนภาพมองจากด้านข้างของงานเพาะเซลล์ที่วางแผ่นทดสอบบนอาหารกึ่งแข็ง
 (b) แผนภาพมองจากด้านบนแสดงตำแหน่งของเซลล์ที่สังเกต

ตารางที่ 3.1 ระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบโดยวิธี Agar Diffusion ตามเกสซ์ตำรับของประเทศสหรัฐอเมริกาและทะเบียนยาหลักแห่งชาติแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (USP-NF)

ที่มา : USP23-NF 18. Copyright 1994. The US Pharmacopcail Convention, Inc.

ระดับ (Grade)	ปฏิกิริยา (Reactivity)	ลักษณะของบริเวณที่เกิดปฏิกิริยา (Description of reactivity zone)
0	ไม่มี (None)	ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตำแหน่งใต้และรอบแผ่นทดสอบ
1	เล็กน้อย (Slight)	บางเซลล์ในตำแหน่งใต้แผ่นทดสอบมีรูปร่างผิดปกติ/ตาย
2	อ่อน (Mild)	เฉพาะตำแหน่งใต้/รอบแผ่นทดสอบระยะไม่เกิน 0.5 ซม.
3	ปานกลาง (Moderate)	ตำแหน่งรอบแผ่นทดสอบ ระยะ 0.5-1.0 ซม.
4	รุนแรง (Severe)	ตำแหน่งรอบแผ่นทดสอบมากกว่า 1.0 ซม.

Permission Granted.

3.16 ทดสอบฤทธิ์ของแผ่นแห้งเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Broth dilution

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ซึ่งมีเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย ความหนาแน่น 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อขนาดเล็กแบบ 96 หลุม หลุมละ 100.0 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น 0 ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ แล้วนำไปบ่ม 24 ชั่วโมง กำหนดให้เป็นชุดควบคุม ที่มีร้อยละการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ ร้อยละ 100 ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อของแผ่นแห้งเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัด โดยใส่แผ่นแห้งเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัด ซึ่งตัดเป็นวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6.0 มิลลิเมตร จำนวน 1 แผ่น ลงในหลอดอาหารที่มีสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรีย ความหนาแน่น 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 100.0 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 1000 ไมโครลิตร เพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารแขวนลอยเซลล์ทั้งหมด 100.0 ไมโครลิตร ลงในจานเพาะเชื้อขนาดเล็กแบบ 96 หลุม วัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (ชุดทดลอง) เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียจากค่าความขุ่นของชุดทดลองกับชุดควบคุม (หลอดเพาะเชื้อแบคทีเรียที่ไม่เติมสารยับยั้งใดๆ มีการเจริญ ร้อยละ 100) คำนวณร้อยละการเจริญของแบคทีเรีย จากสมการ (ดัดแปลงจากวิธี Li และคณะ. 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละการเจริญของแบคทีเรียชุดทดลอง

$$= \frac{\text{ค่า OD. ที่ 24 ชั่วโมงของชุดทดลอง} - \text{ค่า OD. ที่ 0 ชั่วโมงของชุดทดลอง}}{A} \times 100$$

A คือการเจริญของแบคทีเรียชุดควบคุม

$$= \text{ค่า OD. ที่ 24 ชั่วโมงของชุดควบคุม} - \text{ค่า OD. ที่ 0 ชั่วโมงของชุดควบคุม}$$

3.17 ศึกษาลักษณะพื้นฐานของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดมาวิเคราะห์โครงสร้างลักษณะพื้นฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น JSM-5410 (JEOL) เปรียบเทียบกับแผ่นเซลลูโลสแห้งที่ไม่จุ่มสารสกัด โดยตัดแผ่นแห้งเซลลูโลสให้มีขนาด 10.0 × 10.0 ตารางมิลลิเมตร อบให้แห้ง วางแผ่นตัวอย่างลงบนแท่นวางสำหรับเคลือบทองคำ (sputter coater) เพื่อทำการเคลือบแผ่นตัวอย่างด้วยทองคำ จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และบันทึกภาพ ทดสอบที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สถาบันส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

3.18 ศึกษาเอกลักษณ์ของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

วิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบอินทรีย์ของแผ่นแห้งเซลลูโลส จากการดูดกลืนแสงในช่วงอินฟราเรด เพื่อตรวจหาสารสกัดภายในแผ่นเซลลูโลส โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด แผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด และสารสกัด โดยตัดแผ่นแห้งเซลลูโลส ขนาด 20.0 × 20.0 ตารางมิลลิเมตร อบให้แห้งเพื่อกำจัดความชื้น วางแผ่นแห้งเซลลูโลสบนแท่นวางวัตถุสำหรับตรวจสอบ ยิงลำแสงอินฟราเรด ช่วงของเลขคลื่น (wave number) เท่ากับ 400 – 4000 เซนติเมตร⁻¹ ทดสอบด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy บันทึกกราฟค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ทดสอบที่ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.19 ศึกษาอัตราการดูดซับน้ำของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด

ศึกษาอัตราการดูดซับน้ำของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด เปรียบเทียบกับแผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด โดยตัดแผ่นเซลลูโลสแห้ง ขนาด 20.0×20.0 ตารางมิลลิเมตร ชั่งน้ำหนักบันทึกเป็นน้ำหนักแผ่นแห้ง จากนั้นจุ่มแผ่นแห้งในน้ำปราศจากไอออนที่อุณหภูมิห้อง นำแผ่นขึ้นจากน้ำ ซับน้ำบริเวณผิวแผ่นวัสดุด้วยกระดาษซับ นำไปชั่งน้ำหนัก กระทั่งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง บันทึกน้ำหนักเป็นน้ำหนักแผ่นเปียกในแต่ละช่วงเวลาที่ยุ่มในน้ำ นำน้ำหนักที่บันทึกมาคำนวณอัตราการดูดซับน้ำของแผ่นเซลลูโลส ดังสมการ

$$\text{อัตราการดูดซับน้ำของแผ่นเซลลูโลส} = \frac{(B - A)}{A}$$

$$\text{ร้อยละอัตราการดูดซับสูงสุด} = \frac{(B^{\max} - A)}{A} \times 100$$

$A =$ น้ำหนักของแผ่นเซลลูโลสแห้ง (กรัม)

$B =$ น้ำหนักของแผ่นเซลลูโลสเปียก (กรัม)

$B^{\max} =$ น้ำหนักที่มากที่สุดของแผ่นเซลลูโลสเปียก (กรัม)

3.20 ศึกษาอัตราการซึมผ่านของไอน้ำของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด

ศึกษาอัตราการซึมผ่านของไอน้ำของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปรียบเทียบกับแผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด โดยวัดอัตราการซึมผ่านของไอน้ำผ่านแผ่นเซลลูโลสในหน่วยพื้นที่ต่อหน่วยเวลา (กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน) โดยใช้วิธี ISO 151061 : 2003 (E) Plastic-Film and Sheeting – Determination of Water Vapour Transmission Rate Part I : Humidity Detection sensor method เครื่องมือที่ใช้ทดสอบคือเครื่องวัดอัตราการซึมผ่านไอน้ำ (Water vapor permeation tester รุ่น Lyssy L80-4000) ใช้แผ่นแห้งเซลลูโลสขนาด 15.0×15.0 ตารางเซนติเมตร สภาวะที่ใช้ทดสอบ อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 โดยแผ่นตัวอย่างจะถูกใช้เป็นเยื่อกั้นระหว่าง 2 ช่อง ช่องหนึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 10 ส่วนอีกช่องหนึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 วัดอัตราการเปลี่ยนแปลงของความชื้นระหว่าง 2 ช่อง ที่กั้นด้วยแผ่นตัวอย่างด้วย Humidity Detection sensor

3.21 ศึกษาอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด

ศึกษาอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปรียบเทียบกับแผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด โดยวัดปริมาณของก๊าซออกซิเจนที่ผ่านเข้าออกตลอดทั้งแผ่นทดสอบในหนึ่งหน่วยเวลา ภายใต้สภาวะควบคุม ได้แก่ อุณหภูมิ ความดันของก๊าซออกซิเจนที่ผ่านทั้งสองด้านของแผ่นตัวอย่าง ใช้แผ่นแห้งเซลลูโลสขนาด 15.0×15.0 ตารางเซนติเมตร ทดสอบโดยวิธี ASTM D 3985-02 Oxygen Gas Transmission Rate Through Plastic Film and Sheeting Using a Coulometric Sensor แผ่นตัวอย่างที่ทดสอบอยู่ในสภาวะแห้ง (ความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 1) ทดสอบด้วยเครื่องมือวัดอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน (Oxygen permeation tester รุ่น Illinois 8000) ซึ่งมีช่องสำหรับใส่ชิ้นงาน 2 ช่อง (chamber) แผ่นตัวอย่างจะถูกติดตั้งกั้นระหว่าง 2 ช่อง โดยช่องแรกประกอบด้วยก๊าซไนโตรเจน ช่องที่สองประกอบไปด้วยก๊าซออกซิเจน ก๊าซออกซิเจนจะซึมผ่านแผ่นเซลลูโลสไปยังฝั่งที่มีก๊าซไนโตรเจน วัดอัตราการซึมผ่านของก๊าซด้วยเครื่องเซ็นเซอร์ coulometric ซึ่งจะตรวจจับอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน กับตัวอย่างที่ยึดติดอยู่กับ chamber จากด้านหนึ่งสู่อีกด้านหนึ่ง ทดสอบที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 0

วิธีการทดสอบในข้อ 3.20 และ 3.21 ส่งตัวอย่างแผ่นเซลลูโลสไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการทดสอบบรรจุภัณฑ์ ศูนย์การบรรจุหีบห่อไทย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.22 ศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด

ศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด แผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด และแผ่นแห้งเซลลูโลสที่มีการดูดซับน้ำกลายเป็นแผ่นเปียก โดยศึกษาความต้านทานแรงดึง (Tensile strength) ค่ามอดูลัสของยัง (Young's Modulus) และค่าการยืด ณ จุดขาด (Elongation at break) ด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer) รุ่น TA plus ของ Lloyd Instruments ในการทดสอบ ใช้ load cell ขนาด 1 กิโลนิวตันเมตร ตั้งค่า preload เท่ากับ 0.02 นิวตัน ความเร็วในการดึงแผ่นตัวอย่าง (cross speed) เท่ากับ 5 มิลลิเมตรต่อวินาที ค่า break load drops ร้อยละ 50 ทดสอบ ณ อุณหภูมิห้อง เตรียมตัวอย่างทดสอบโดยตัดเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 20.0×50.0 ตารางมิลลิเมตร โดยมีระยะจับชิ้นงาน (gauge length) เท่ากับ 20.0 มิลลิเมตร ชดเชย 10 แผ่น

วิธีการคำนวณ

3.22.1 ความต้านทานแรงดึง (Tensile strength)

$$\text{ความต้านทานแรงดึง (นิวตันต่อตารางมิลลิเมตร)} = F/A$$

เมื่อ F = แรงดึงสูงสุดก่อนชิ้นงานเกิดการแตกหัก (นิวตัน)

A = พื้นที่หน้าตัดเริ่มต้นของชิ้นงานทดสอบ (ตารางมิลลิเมตร)

= ระยะ gauge length \times ความหนาของแผ่นวัสดุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.22.2 ค่ามอดูลัสของยัง (Young's Modulus)

$$\text{ค่ามอดูลัสของยัง} = \frac{\text{ความเค้นดึง (tensile stress)}}{\text{ความเครียดดึง (tensile strain)}} \quad (1)$$

$$\text{ความเค้นดึง (tensile stress)} = \frac{\text{tensile force (Mg)}}{\text{Area of cross section (A)}} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \text{ความเครียดดึง (tensile strain)} &= \frac{\text{ความยาวที่ยืดออก (extension)}}{\text{ความยาวเริ่มต้น (original length)}} \\ &= \frac{\Delta L}{L} \quad (3) \end{aligned}$$

แทนค่า (2) และ (3) ใน (1) จะได้

$$\text{ค่ามอดูลัสของยัง} = \frac{(Mg/A)}{(\Delta L/L)}$$

3.22.3 ค่าการยืด ณ จุดขาด (Elongation)

$$\text{ค่าการยืด ณ จุดขาด (ร้อยละ)} = \frac{L_t - L_0}{L_0} \times 100$$

เมื่อ L_0 = ระยะเริ่มต้น
 L_t = ระยะที่ยืดจนขาด

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 คุณสมบัติของแผ่นเซลลูโลสที่ผลิตจากเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976

เซลลูโลสที่ผลิตจากเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 โดยใช้อาหารสูตรน้ำมะพร้าว จะเกิดขึ้นในบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงดังภาพ 4.1 (a) ลักษณะเซลลูโลสที่ได้มีสีเหลืองนวล โดยด้านบนของแผ่นจะมีสีขาวขุ่น รวมทั้งมีความเรียบเนียนและเนื้อแน่น ด้านล่างของแผ่นมีเยื่อบางใสอยู่เป็นชั้น จึงทำให้ทางด้านล่างของแผ่นเซลลูโลสที่ได้มีลักษณะ อ่อนนุ่ม และมีสีเหลืองอ่อนเหมือนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังภาพที่ 4.1(b) ทั้งนี้เนื่องจากเซลลูโลสด้านบนเป็นเซลลูโลสที่มีอายุมากกว่าเซลลูโลสที่อยู่ด้านล่าง เซลลูโลสชั้นใหม่จะเกิดทางด้านล่างถัดจากชั้นเก่าที่บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้แผ่นเซลลูโลสหนาขึ้น (Iguchi และคณะ. 2000) โดยมีลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ที่มีลักษณะต่างกันคือ ชั้นบนหรือชั้นผิวหน้าเป็นชั้นที่มีอายุมากที่สุด เส้นใยเรียงตัวอัดแน่นมากที่สุด ชั้นถัดลงมาเป็นชั้นกลาง ซึ่งมีความหนาแน่นของเส้นใยรองลงมา และชั้นสุดท้ายซึ่งเป็นชั้นล่างที่เส้นใยยังไม่อัดตัวแน่น เป็นชั้นที่มีอายุน้อยที่สุด



ภาพที่ 4.1 ลักษณะแผ่นเซลลูโลส (a) ลักษณะการเกิดเซลลูโลส โดยเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในพลาสติกอาหารหมักเป็นเวลา 5 วัน (b) ลักษณะของแผ่นเซลลูโลสที่ผลิตได้

4.2 ผลการศึกษาการเตรียมแผ่นเซลลูโลสให้บริสุทธิ์

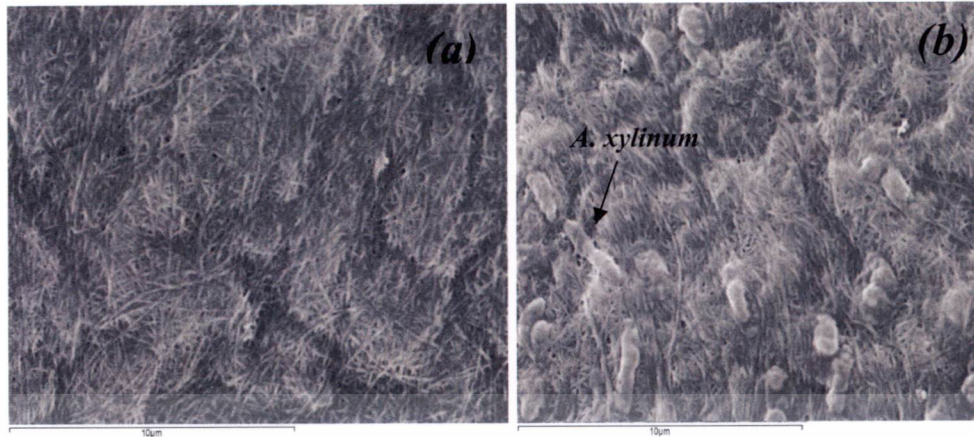
เนื่องจากแผ่นเซลลูโลสที่ได้มีสิ่งเจือปนจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีเซลล์ของ *A. xylinum* TISTR 976 แทรกอยู่ภายในแผ่น ดังรูป 4.2 (b) ดังนั้นจึงต้องเตรียมแผ่นเซลลูโลสให้บริสุทธิ์ โดยศึกษาการเตรียม 3 วิธี วิธีที่หนึ่งคือ การต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ วิธีที่สองคือ การต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และการพอกสี และวิธีสุดท้ายคือ การแช่แผ่นเซลลูโลสในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ลักษณะแผ่นเซลลูโลสหลังจากกระบวนการเตรียม ซึ่งได้เป็นแผ่นเปียก และลักษณะแผ่นเซลลูโลสหลังจากกระบวนการทำแห้งโดยวิธีการ freeze dry ซึ่งจะได้เป็นเอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผ่นแห้ง แสดงดังตารางที่ 4.1 ซึ่งพบว่าการเตรียมแผ่นเซลลูโลส ด้วยวิธีที่หนึ่ง แผ่นเปียกมีสีน้ำตาล เมื่อแผ่นอยู่ในลักษณะแห้ง มีสีคล้ำมากขึ้น เมื่อใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 0.5 เพื่อฟอกสีแผ่นเซลลูโลส (วิธีที่สอง) แผ่นเปียกมีสีขาวใส แผ่นเซลลูโลสแห้งมีความไม่สม่ำเสมอของพื้นผิว บางตำแหน่งมีลักษณะโป่งพอง อาจเนื่องมาจากสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถแตกตัวเป็นหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ (hydroxyl radical) โดยเข้าไปทำลายพันธะ β (-1-4) glycosidic ภายในเส้นใยเซลลูโลส (Guay และคณะ. 2002) ทำให้เส้นใยเซลลูโลสสั้นลง และส่งผลให้มีการพองบวมในบางส่วนของแผ่นเซลลูโลส ส่วนวิธีที่สาม คือการแช่แผ่นเซลลูโลสในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง แล้วต้มในน้ำกลั่นให้เดือดเป็นระยะเวลา 30 นาที เป็นวิธีที่ทำให้ได้แผ่นเซลลูโลสที่มีสีขาวนวล ไม่คล้ำ สภาพแผ่นแห้งมีสีครีม พื้นผิวของแผ่นมีความสม่ำเสมอ เมื่อนำแผ่นเซลลูโลสแห้งที่ได้จากวิธีที่สามไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถกำจัดเซลล์แบคทีเรีย *A. xylinum* TISTR 976 และสิ่งเจือปนต่างๆออกจากแผ่นเซลลูโลสได้ แสดงผลดังภาพที่ 4.2 (a) ซึ่งไม่พบเซลล์แบคทีเรีย *A. xylinum* TISTR 976 แทรกระหว่างเส้นใย แตกต่างจาก แผ่นเซลลูโลสที่ไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งพบเซลล์แบคทีเรียแทรกอยู่ภายในแผ่น ดังภาพที่ 4.2 (b)

ตารางที่ 4.1 ลักษณะของแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการทำแผ่นเซลลูโลสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่างๆ

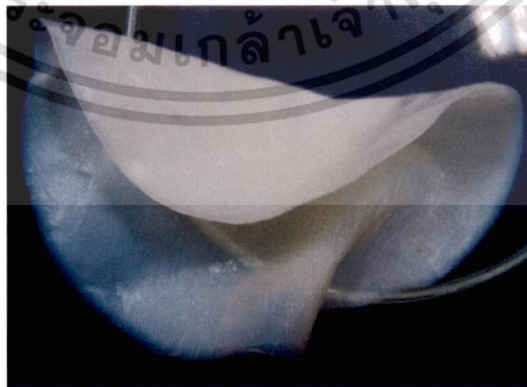
วิธีการทำให้บริสุทธิ์	ลักษณะแผ่นเซลลูโลส	
	แผ่นเปียก	แผ่นแห้ง
วิธีที่ 1	สีน้ำตาลคล้ำ	สีเทา แผ่นย่นสม่ำเสมอทั้งแผ่น
วิธีที่ 2	สีขาวใส	สีขาว แผ่นย่นไม่สม่ำเสมอ บางตำแหน่งแผ่นบวมพอง
วิธีที่ 3	สีเหลืองนวล	สีครีม แผ่นย่นสม่ำเสมอทั้งแผ่น

จากการตรวจสอบลักษณะพื้นฐานของแผ่นแห้งเซลลูโลสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ดังภาพที่ 4.2 ซึ่งเป็นภาพบริเวณผิวหน้าของแผ่นเซลลูโลส สังเกตได้ว่าประกอบด้วยเส้นใยยาวหลายเส้นเกี่ยวพันกันเป็นตาข่าย ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของวัสดุโครงสร้างระดับไมโครเมตร ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ในการอุ้มน้ำของแผ่นเซลลูโลส แผ่นเซลลูโลสนี้มีอัตราส่วนระหว่างความยาวของเส้นใยต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่สูงมาก เนื่องจากเส้นใยเซลลูโลสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยต่ำกว่า 100 นาโนเมตร อัตราส่วนดังกล่าวมีผลต่อคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นเซลลูโลส เช่น ค่าความยืดหยุ่น และค่าความแข็งแรงดึง และมีพื้นที่ผิวมากมาย ทำให้สามารถดูดซับน้ำได้เป็นจำนวนมาก (แผ่นเปียกมีน้ำหนักมากกว่าแผ่นแห้งถึง 200 เท่า) ทำให้แผ่นเซลลูโลสมีคุณสมบัติการยืดหยุ่นที่ดี และแผ่นเปียกมีความแข็งแรงสูง (Czaja และคณะ. 2006)



ภาพที่ 4.2 แผ่นเซลลูโลสแห้งที่ได้จากการผลิตโดยเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 จากห้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope : SEM) (a) แผ่นเซลลูโลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (วิธีที่ 3) ซึ่งสามารถกำจัดเซลล์แบคทีเรียได้ (b) แผ่นเซลลูโลสที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะพบเซลล์ *A. xylinum* TISTR 976 แทรกอยู่ในแผ่น

ดังนั้นจึงคัดเลือกวิธีการเตรียมแผ่นเซลลูโลสให้บริสุทธิ์ วิธีที่สาม คือการแช่แผ่นเซลลูโลสในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสไปต้มในน้ำสะอาดเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างแผ่นเซลลูโลสด้วยน้ำสะอาดจำนวนหลายครั้ง จนแผ่นเซลลูโลสมีค่า pH เป็นกลาง ซึ่งหลังจากขั้นตอนดังกล่าวเซลลูโลสที่ได้จะยังคงมีน้ำเป็นส่วนประกอบเป็นปริมาณมาก จึงต้องมีการกำจัดน้ำออกเพื่อต้องการให้แผ่นเซลลูโลสสามารถดูดซับสารละลายของสารสกัดเข้าไปแทนที่ โดยสามารถจัดน้ำออกจากแผ่นด้วยเครื่องรีดน้ำ ซึ่งเป็นการกดทับลงบนแผ่นด้วยน้ำหนักประมาณ 3 ตัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของแผ่นเซลลูโลสกลายเป็นแผ่นบาง ใส ยังคงมีน้ำอยู่ในแผ่นเล็กน้อยแต่ไม่ซึมออกมา ความหนาเฉลี่ยของแผ่นเซลลูโลสหลังจากการอัดรีดน้ำ เท่ากับ 0.65 มิลลิเมตร แสดงดังภาพที่ 4.3 นำแผ่นเซลลูโลสบรรจุในถุงพลาสติก ทำให้ปลอดเชื้อโดยฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บแผ่นเซลลูโลสไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ร่วมกับสารสกัดจากพืชที่คัดเลือกได้ต่อไป



ภาพที่ 4.3 ลักษณะของแผ่นเซลลูโลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 จากนั้นต้มในน้ำกลั่น 30 นาที รีดน้ำออกด้วยเครื่องอัดรีดน้ำ จะได้แผ่นเซลลูโลสที่มีความหนาเฉลี่ย เท่ากับ 0.65 มิลลิเมตร สำหรับนำมาใช้ร่วมกับสารสกัดจากพืชที่คัดเลือกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการสกัดสารจากไพล

เมื่อนำเหง้าไพลแห้งมาสกัดโดยผ่านขั้นตอนการสกัดเย็นด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ แล้วนำสารสกัดหยาบมาซึ่งน้ำหนัก พบว่าร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้มีค่าตั้งแต่ ร้อยละ 1.67 ถึง ร้อยละ 6.55 โดยสารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซน มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองเข้ม ส่วนสารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเอธิลอะซิเตท มีลักษณะเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นของแข็งเล็กน้อย และสารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเมทานอล มีลักษณะหนืดมากกว่าส่วนอื่นๆ มีสีน้ำตาลดำและเป็นส่วนที่ได้ปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่าสารสกัดหยาบไพลใน ตัวทำละลายเฮกเซนและเอธิลอะซิเตท แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะของสารสกัดหยาบไพล และร้อยละของสารที่สกัดได้น้ำหนักแห้งของพืช

ชนิดของพืช	ชนิดตัวทำละลาย	สีของสารสกัด	ลักษณะ	ร้อยละของสารสกัดหยาบ
ไพล	เฮกเซน	สีเหลืองเข้ม	เหลวใส	2.82
	เอธิลอะซิเตท	สีน้ำตาลเข้ม	เหลวหนืดมีกลิ่น	1.67
	เมทานอล	สีน้ำตาลดำ	เหลวหนืด	6.55

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากไพลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion

จากการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบไพล ที่สกัดได้จากชั้นของตัวทำละลายเฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเมทานอล เปรียบเทียบตัวทำละลายในการเจือจางสารสกัดหยาบด้วย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 และทวิน 80 ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยวิธี disc diffusion ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเบื้องต้น ใช้ความเข้มข้นสารสกัด 500.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบกับเชื้อ *E. coli* TISTR 887 และ *S. aureus* TISTR 118 วัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น หลังการบ่ม 24 ชั่วโมง แสดงผลดังตารางที่ 4.3 สารสกัดหยาบไพลที่สกัดได้จากชั้นตัวทำละลายเอธิลอะซิเตท เจือจางด้วย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 มีผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากไพลที่สกัดได้จากตัวทำละลายชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 เท่ากับ 10.35 ± 0.21 มิลลิเมตร นอกจากนี้สารสกัดหยาบไพลที่สกัดได้จากชั้นตัวทำละลายเอธิลอะซิเตท ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* TISTR 887 ได้เท่ากับ 10.62 ± 0.54 มิลลิเมตร แต่ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติกับสารสกัดจากไพลที่สกัดได้จากตัวทำละลายเฮกเซนที่เจือจางด้วย DMSO และทวิน 80 ซึ่งมีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 10.04 ± 0.21 และ 10.19 ± 0.19 ตามลำดับ แต่บริเวณการยับยั้งนั้นไม่ได้เป็นวงใสชัดเจน ยังคงมีเชื้อเจริญได้แต่จำนวนน้อย อาจเนื่องมาจากสารละลายในส่วนนี้มีลักษณะเป็นน้ำมัน จึงแพร่ออกมายังวงได้ไม่ดี

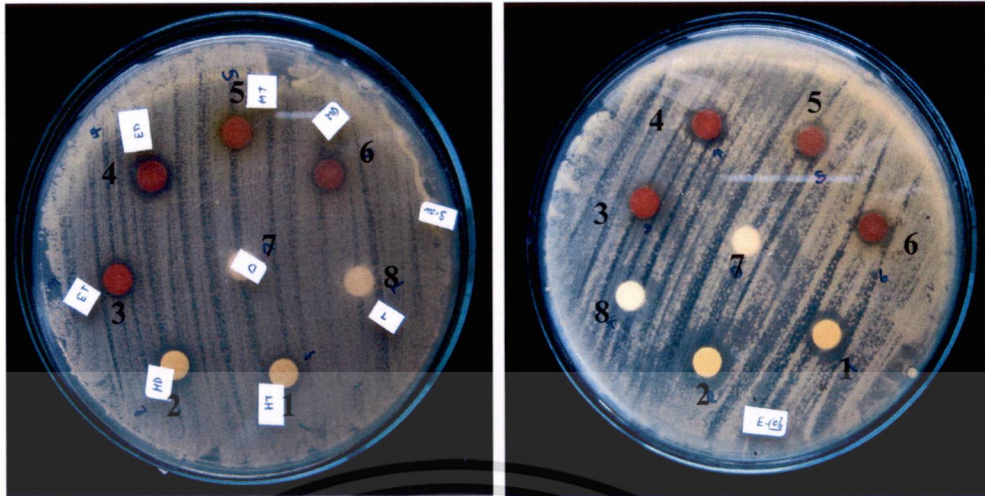
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่งผลให้บริเวณการยับยั้งมีลักษณะดังกล่าว ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 4.4 ฐิติรัตน์ วิวงศ์ศักดิ์ และ วิไลลักษณ์ ต้นตะโยธิน (2552) รายงานว่า สารสกัดจากส่วนเฮกเซน ซึ่งเป็นส่วนของน้ำมันหอมระเหย มีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบได้ แต่ลักษณะไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นยาทาภายนอกโดยตรง เนื่องจากปัญหาด้านการซึมเข้าสู่ผิวหนังจึงมักนำไปพัฒนาในรูปของเจลไฟล จากผลการทดสอบ พบว่าสารสกัดไฟลที่สกัดได้จากตัวทำละลายเอธิลอะซิเตท มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และ *E. coli* TISTR 887 ได้ดี จึงคัดเลือกมาใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.3 เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากไฟลในชั้นของตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ชนิดพืช:สารละลาย เจือจาง	ชนิดตัวทำละลาย สกัด	เส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งแบคทีเรีย (มิลลิเมตร \pm SD.)	
		<i>S. aureus</i> TISTR 118	<i>E. coli</i> TISTR 887
ไฟล:DMSO ร้อยละ10	เฮกเซน	9.77 \pm 0.26 ^b	10.04 \pm 0.21 ^a
	เอธิลอะซิเตท	10.35 \pm 0.21 ^a	10.62 \pm 0.54 ^a
	เมทานอล	8.24 \pm 0.12 ^d	8.79 \pm 0.35 ^b
ไฟล:ทวีน80 ร้อยละ10	เฮกเซน	8.81 \pm 0.29 ^c	10.19 \pm 0.19 ^a
	เอธิลอะซิเตท	8.49 \pm 0.35 ^{cd}	6.73 \pm 0.40 ^c
	เมทานอล	8.75 \pm 0.25 ^c	9.12 \pm 0.20 ^b

หมายเหตุ : แผ่นดิสก์มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6.0 มิลลิเมตร ใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 500.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เท่ากับความเข้มข้นสารสกัด10.0 มิลลิกรัมต่อแผ่นดิสก์) อักษรเหมือนกันในแถวแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพที่ 4.4 แสดงผลการยับยั้งเชื้อของสารสกัดหยาบโพลจากตัวทำละลายสกัดอินทรีย์ต่างๆ โดยวิธี disc diffusion (a) ทดสอบกับ *S. aureus* TISTR 118 และ (b) *E. coli* TISTR 887 ใช้ ปริมาณของสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อแผ่นดิสก์

1. สารสกัดหยาบโพลจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซนเจือจางด้วย ทวิน 80 ร้อยละ 10
2. สารสกัดหยาบโพลจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซนเจือจางด้วย DMSO ร้อยละ 10
3. สารสกัดหยาบโพลจากชั้นตัวทำละลายเอธิลอะซิเตทเจือจางด้วยทวิน 80 ร้อยละ 10
4. สารสกัดหยาบโพลจากชั้นตัวทำละลายเอธิลอะซิเตทเจือจางด้วย DMSO ร้อยละ 10
5. สารสกัดหยาบโพลจากชั้นตัวทำละลายเมทานอลเจือจางด้วย ทวิน 80 ร้อยละ 10
6. สารสกัดหยาบโพลจากชั้นตัวทำละลายเมทานอลเจือจางด้วย DMSO ร้อยละ 10
7. DMSO ร้อยละ 10
8. ทวิน 80 ร้อยละ 10

4.5 ผลการสกัดสารจากเปลือกมังคุด

นำเปลือกมังคุดแห้งมาสกัดโดยผ่านขั้นตอนการสกัดเย็น ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ เมื่อนำมาชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักแห้งของพืชที่ใช้ พบว่าร้อยละของสารสกัดหยาบมีค่า ตั้งแต่ ร้อยละ 0.14 ถึงร้อยละ 14.23 โดยสารสกัดหยาบในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซน มีลักษณะเหลวหนืดสีเหลืองเข้ม มีปริมาณน้อยที่สุด เนื่องจากสารสกัดที่ได้จากส่วนนี้มักเป็นน้ำมันหอมระเหย ซึ่งในเปลือกมังคุดมีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบในปริมาณที่ต่ำ สารสกัดหยาบในส่วนของเอธิลอะซิเตท มีลักษณะเหลวหนืดและมีสีน้ำตาลเข้ม เป็นส่วนที่สกัดได้ปริมาณมากที่สุด ส่วนสารสกัดในส่วนของตัวทำละลายเมทานอล มีลักษณะเหลวหนืดชั้นสีน้ำตาลแดงเข้ม ลักษณะของสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดที่สกัดได้จากชนิดตัวทำละลายต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ลักษณะของสารสกัดหยาบเปลือกมังคุด และร้อยละของสารที่สกัดได้อ่อน้ำหนักแห้งของพืช

ชนิดของพืช	ชนิดตัวทำละลาย	สีของสารสกัด	ลักษณะ	ร้อยละของสารสกัดหยาบ
เปลือกมังคุด	เฮกเซน	สีเหลืองเข้ม	เหลวหนืดใส	0.14
	เอธิลอะซิเตท	สีน้ำตาลเข้ม	เหลวหนืด	14.23
	เมทานอล	สีน้ำตาลแดงเข้ม	เหลวหนืดข้น	10.55

4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากเปลือกมังคุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion

จากการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบเปลือกมังคุดจากชั้นตัวทำละลายเมทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และ *E. coli* TISTR 887 ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซนและเอธิลอะซิเตท อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดจากชั้นตัวทำละลายเมทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* TISTR 118 ได้ดีกว่า *E. coli* TISTR 887 โดยพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นสารสกัด 500.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งเชื้อเท่ากับ 14.88 ± 1.66 และ 10.44 ± 1.57 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.5 ซึ่งการที่สารสกัดเปลือกมังคุดจากชั้นตัวทำละลายเมทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ได้ดีกว่า *E. coli* TISTR 887 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นไขมัน โปรตีน และ lipopolysaccharides (LPS) ซึ่งสารเหล่านี้ช่วยป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งไม่มีสารเหล่านี้ (Feng และคณะ. 2000) สอดคล้องกับงานวิจัยของ อุดมลักษณ์ สุขอัติตะ และคณะ (2549)., Leong และ Shui. (2002) ซึ่งรายงานว่าการสกัดเปลือกมังคุดจากเมทานอล เป็นสารประเภทแซนโทน (Xanthone) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดจากเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบ (Balasubramanian และ Rajagopalan 1988., Saralamp 1996., Harbone และคณะ. 1999) และต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี (Yu และคณะ. 2007., Jung และคณะ. 2006)

ตารางที่ 4.5 เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้งแบคทีเรีย ของสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดจากชั้นของตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ชนิดของพืช	ตัวทำละลาย	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร \pm SD.)	
		<i>S. aureus</i> TISTR 118	<i>E. coli</i> TISTR 887
เปลือกมังคุดแห้ง	เฮกเซน	8.28 \pm 1.18 ^b	7.24 \pm 1.10 ^b
	เอธิลอะซิเตท	7.73 \pm 0.89 ^c	7.10 \pm 0.60 ^b
	เมทานอล	14.88 \pm 1.66 ^a	10.44 \pm 1.57 ^a

หมายเหตุ : แผ่นดิสก์มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6.0 มิลลิเมตร ใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 500.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เท่ากับความเข้มข้นสารสกัด 10.0 มิลลิกรัมต่อแผ่นดิสก์) อักษรเหมือนกันในแถวแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากไพลและเปลือกมังคุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion จึงได้คัดเลือกสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดจากตัวทำละลายเมทานอล และสารสกัดจากไพลที่สกัดจากตัวทำละลายเอธิลอะซิเตท มาศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อร่วมกับแผ่นเซลล์ูโลส

4.7 ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดไพลและเปลือกมังคุด โดยหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ด้วยวิธี Broth dilution

ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และ *E. coli* TISTR 887 ของสารสกัดหยาบไพลจากตัวทำละลายเอธิลอะซิเตท และสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งสารสกัดจากพืชเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* TISTR 118 และ *E. coli* TISTR 887 ได้สูงสุด นำสารสกัดเหล่านี้มาหาค่า MIC โดยวิธี broth dilution ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และ *E. coli* TISTR 887 ใช้สารสกัดความเข้มข้น 200.00 100.00 50.00 25.00 12.50 6.25 3.13 และ 0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบไพลจากตัวทำละลายเอธิลอะซิเตท และสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 118 และ *E. coli* TISTR 887 เท่ากัน คือ 6.25 และ 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ แสดงดังในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และ *E. coli* TISTR 887 ของสารสกัดหยาบโพลจากตัวทำละลายเอธิลอะซิเตท และสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Broth dilution

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ผลการยับยั้งเชื้อ			
	สารสกัดหยาบเปลือกมังคุดจาก ตัวทำละลายเมทานอล		สารสกัดหยาบโพลจากตัวทำ ละลายเอธิลอะซิเตท	
	<i>E. coli</i> TISTR 887	<i>S. aureus</i> TISTR 118	<i>E. coli</i> TISTR 887	<i>S. aureus</i> TISTR 118
	200.00	-	-	-
100.00	-	-	-	-
50.00	-	-	-	-
25.00	-	-	-	-
12.50	-	-	-	-
6.25	+	-	+	-
3.13	+	+	+	+
0.00	+	+	+	+

หมายเหตุ + หมายถึง มีการเจริญของแบคทีเรีย
- หมายถึง ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย

4.8 ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดโพลและเปลือกมังคุดโดยวิธี Disc diffusion

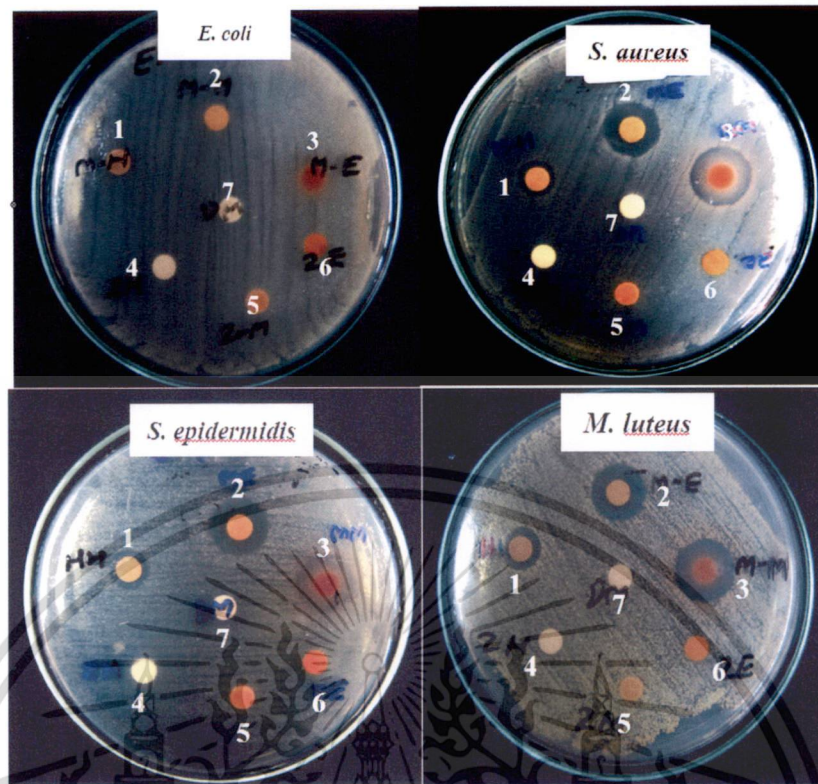
เปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ของสารสกัดหยาบโพลจากตัวทำละลายเอธิลอะซิเตท และสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอล ใช้สารสกัด ความเข้มข้น 50.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำสารสกัดจากส่วนที่สกัดได้จากตัวทำละลายอื่นๆ ที่สกัดได้ในระดับความเข้มข้นเท่ากัน มาเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เจือจางสารสกัดด้วย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 ทดสอบกับเชื้อ *E. coli* TISTR 887 *S. aureus* TISTR 118 *S. epidermidis* TISTR 518 และ *Micrococcus luteus* TISTR 884 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดไพลและเปลือกมังคุดจากตัวทำละลาย 3 ชนิด

ชนิดพืช	ชนิดตัวทำละลาย	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งแบคทีเรีย (มิลลิเมตร \pm SD.)			
		<i>S. aureus</i> TISTR 118	<i>S.</i> <i>epidermidis</i> TISTR 518	<i>M. luteus</i> TISTR 884	<i>E. coli</i> TISTR 887
เปลือกมังคุด	เฮกเซน	9.70 \pm 0.46 ^c	10.42 \pm 0.80 ^c	10.33 \pm 0.34 ^c	6.00
	เอธิลอะซิเตท	14.19 \pm 0.36 ^b	13.73 \pm 0.39 ^b	13.90 \pm 0.36 ^b	6.00
	เมทานอล	15.29 \pm 0.42 ^a	15.13 \pm 0.48 ^a	14.79 \pm 0.68 ^a	6.00
ไพล	เฮกเซน	6.00 ^d	6.00 ^d	6.00 ^d	6.00
	เอธิลอะซิเตท	6.00 ^d	6.00 ^d	6.00 ^d	6.00
	เมทานอล	6.00 ^d	6.00 ^d	6.00 ^d	6.00

หมายเหตุ : แผ่นดิสก์มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6.0 มิลลิเมตร ใช้ปริมาณของสารสกัด 4.0 มิลลิกรัมต่อแผ่นดิสก์ อักษรเหมือนกันในแถวแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สารสกัดหยาบเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 *S. epidermidis* TISTR 518 และ *M. luteus* TISTR 884 ได้สูงกว่าสารสกัดจากส่วนอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้ง เท่ากับ 15.29 \pm 0.42 15.13 \pm 0.48 และ 14.79 \pm 0.68 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่แสดงการยับยั้งการเจริญเชื้อ *E. coli* TISTR 887 สารสกัดหยาบไพลจากตัวทำละลายเอธิลอะซิเตท ไม่แสดงการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ เช่นเดียวกับสารสกัดหยาบไพลจากตัวทำละลายเฮกเซน และเมทานอล ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แสดงดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาดจากไพลและเปลือกมังคุด ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อแผ่นดิสก์

- 1 สารสกัดเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเฮกเซน
- 2 สารสกัดเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเอธิลอะซิเตท
- 3 สารสกัดเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอล
- 4 สารสกัดไพลจากตัวทำละลายเฮกเซน
- 5 สารสกัดไพลจากตัวทำละลายเมทานอล
- 6 สารสกัดไพลจากตัวทำละลายเอธิลอะซิเตท
- 7 DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ชุดควบคุม)

จากผลการทดสอบโดยวิธี disc diffusion พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัด 50.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดเปลือกมังคุดจากเมทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 *S. epidermidis* TISTR 518 และ *M. luteus* TISTR 884 ได้ จึงคัดเลือกสารสกัดเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอล มาศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) ด้วยวิธี broth dilution โดยลดความเข้มข้น จาก 50.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 25.00 12.50 6.25 3.13 1.56 0.78 0.39 0.195 0.097 และ 0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบ แสดงดังตารางที่ 4.8 สารสกัดเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอลมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* TISTR 887 *S. aureus* TISTR 118 *S. epidermidis* TISTR 518 และ *M. luteus* TISTR 884 เท่ากับ 3.13 0.195 0.195 และ 0.195 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่ความเข้มข้นสูงกว่าค่า MIC คือ 12.5 6.25 3.13 1.56 0.78 0.39 และความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับค่า MIC คือ 0.195 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร มาใช้ร่วมกับแผ่นเซลลูโลส

ตารางที่ 4.8 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเหยาบเปลือกมังคุดแห้ง ที่สกัดจากเมทานอล

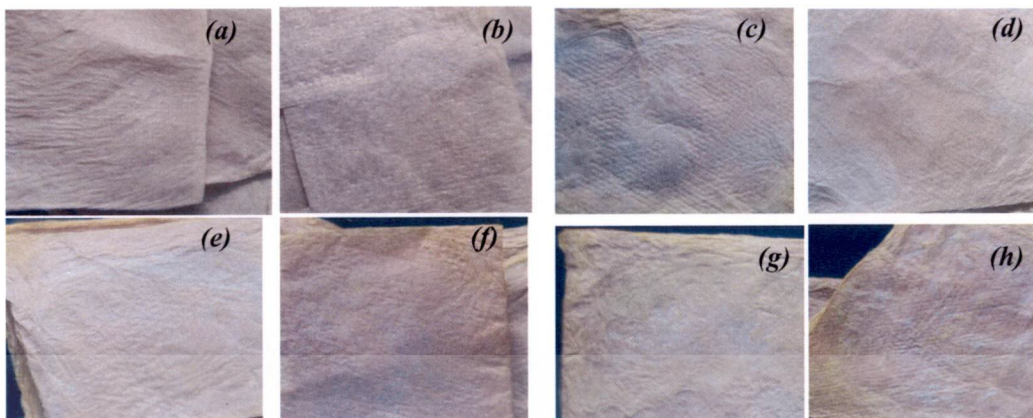
ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ผลการยับยั้งเชื้อ			
	<i>E. coli</i> TISTR 887	<i>S. aureus</i> TISTR 118	<i>S. epidermidis</i> TISTR 518	<i>M. luteus</i> TISTR 884
25.000	-	-	-	-
12.500	-	-	-	-
6.250	-	-	-	-
3.125	-	-	-	-
1.560	+	-	-	-
0.780	+	-	-	-
0.390	+	-	-	-
0.195	+	-	-	-
0.097	+	+	+	+
0	+	+	+	+

หมายเหตุ + หมายถึง มีการเจริญของแบคทีเรีย
- หมายถึง ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย

4.9 ผลการเตรียมแผ่นเซลลูโลสร่วมกับสารสกัดจากเปลือกมังคุด

การเตรียมแผ่นเซลลูโลสร่วมกับสารสกัดจากเปลือกมังคุด โดยทำให้เซลลูโลสอิมตัวด้วย สารสกัด ด้วยการจุ่มแผ่นเซลลูโลสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดจากเมทานอล ความเข้มข้น 12.50 6.25 3.13 1.56 0.78 0.39 และ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นออก และซับน้ำส่วนเกิน ด้วยกระดาษซับ whatman นำแผ่นเซลลูโลสที่ได้ไปทำแห้งโดยวิธี freeze dry แผ่นแห้งเซลลูโลสที่ได้ มีลักษณะย่น และเหนียว แผ่นเซลลูโลสจุ่มใน DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ซึ่งเป็นชุดควบคุม มีสีขาวนวล แสดงดังภาพที่ 4.6 (a) แผ่นเซลลูโลสจุ่มในสารสกัดเปลือกมังคุดจะมีสีเหลือง และมีความไม่สม่ำเสมอของสีเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น แสดงดังภาพที่ 4.6 (b-h) เนื่องจากเมื่อใช้สารสกัดความเข้มข้นสูงจะเกิดการละลายที่ไม่สมบูรณ์ อนุภาคของสารสกัดใน สารละลายจึงมีขนาดใหญ่กว่าอนุภาคของสารสกัดในสารละลายที่มีความเข้มข้นสารสกัดต่ำกว่า ความ สม่ำเสมอของการกระจายตัวของอนุภาคสารสกัดจึงลดลงเมื่อสารละลายมีค่าความเข้มข้นของสาร

สกัดสูงขึ้นที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

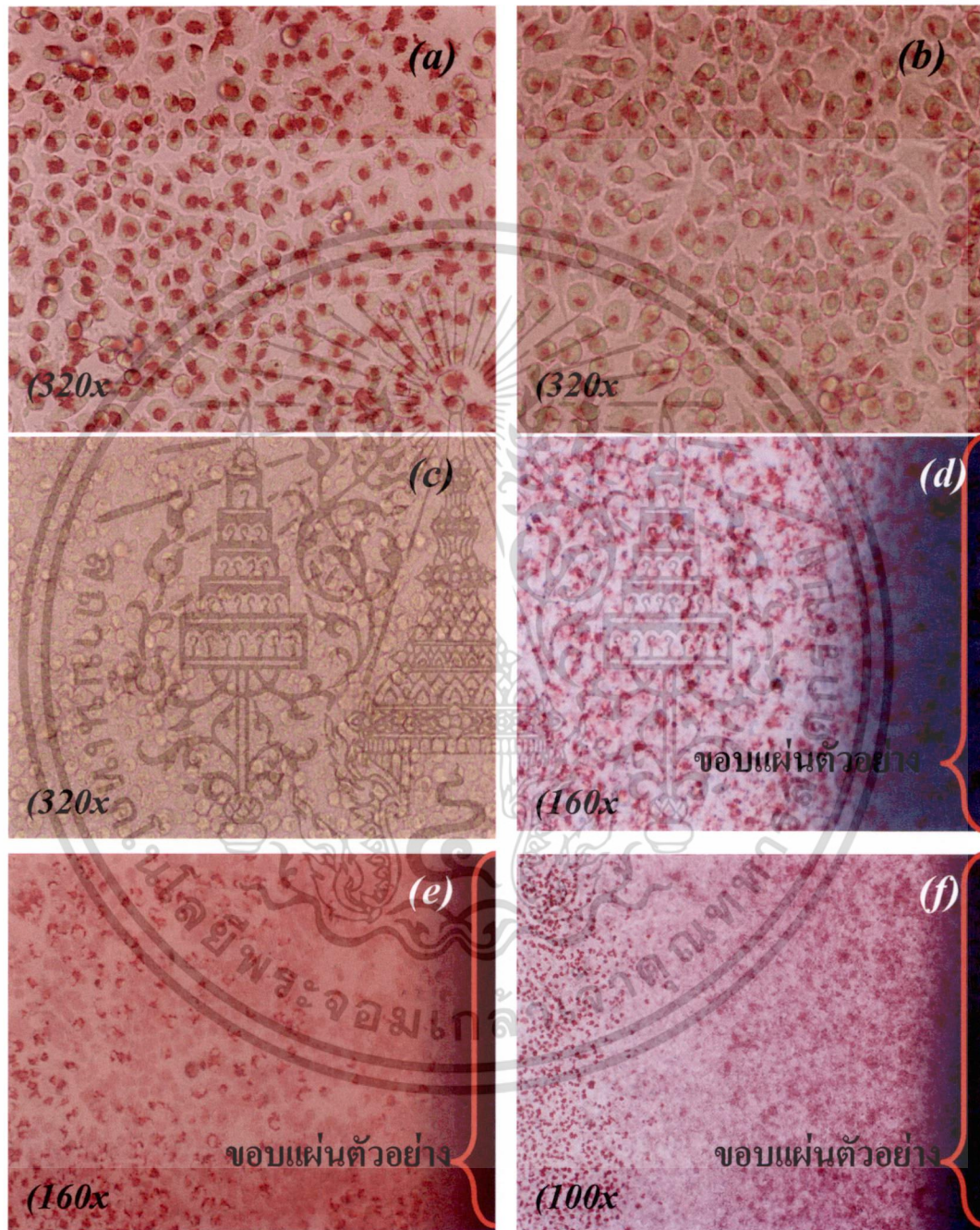


ภาพที่ 4.6 ลักษณะแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดภายหลังการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (a) แผ่นเซลลูโลสจุ่มใน DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 เป็นชุดควบคุม (b) แผ่นเซลลูโลสจุ่มในสารสกัดเปลือกมังคุด 0.19 มก./มล (c) 0.39 มก./มล (d) 0.78 มก./มล (e) 1.56 มก./มล (f) 3.13 มก./มล (g) 6.25 มก./มล และ (h) 12.5 มก./มล

4.10 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 ซึ่งเป็นเซลล์ fibroblast ของหนู โดยวิธี Agar Diffusion ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 6.0×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของสารละลายอาหาร โดยสังเกตการเจริญของเซลล์ L929 บริเวณใต้แผ่นวัสดุ และบริเวณรัศมีโดยรอบแผ่นวัสดุ บนจานเพาะเซลล์ จากการทดสอบพบว่าแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มใน DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 ทั้งบริเวณใต้แผ่นวัสดุและรอบแผ่นวัสดุ ซึ่งเซลล์มีชีวิตจะติดสีแดงของนิวทริลเรด รวมทั้งเซลล์มีรูปร่างปกติ แสดงดังภาพที่ 4.7 (a) เช่นเดียวกับเซลล์ที่ทดสอบด้วยแผ่น high-density polyethylene (HDPE) (negative control) ภาพที่ 4.7 (b) ส่วนลักษณะของเซลล์ที่ตายนั้นจะไม่ติดสีของนิวทริลเรด แสดงดังภาพที่ 4.7 (c) ซึ่งเป็นเซลล์ในงานเพาะเซลล์ที่วางด้วยแผ่น natural rubber containing carbon black (positive control) ส่วนแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดจากตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น ตั้งแต่ 1.56 3.13 6.25 และ 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นทำให้เซลล์ fibroblast ได้รับความเสียหายเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น โดยเซลล์ L929 บริเวณใต้แผ่นวัสดุทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นนั้นตายทั้งหมด บริเวณโดยรอบแผ่นเซลลูโลสที่ใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ แต่ลักษณะเซลล์มีรูปร่างไม่ปกติ แสดงดังภาพที่ 4.7 (d) มีความเป็นพิษระดับ 1 เซลล์ L929 ในงานเพาะที่อยู่บริเวณรอบแผ่นเซลลูโลสที่ใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 3.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นมีรัศมีของเซลล์ตายเฉลี่ยกว้างเท่ากับ 1 มิลลิเมตร ลักษณะเซลล์ที่อยู่รอบแผ่นวัสดุรัศมีกว้างมากกว่า 1 มิลลิเมตร ยังมีชีวิตแต่ลักษณะเซลล์ไม่สมบูรณ์ แสดงดังภาพที่ 4.7 (e) มีความเป็นพิษระดับ 2 ส่วนเซลล์ L929 ที่อยู่ในตำแหน่งใต้แผ่นเซลลูโลสที่ใช้ร่วมกับสารสกัดความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีรัศมีของเซลล์ที่ได้รับความเสียหาย เฉลี่ยเท่ากับ 3.76 มิลลิเมตร แสดงดังภาพที่ 4.7 (f) มีความเป็นพิษระดับ 2 ลักษณะของเซลล์ L929 ที่อยู่นอกรัศมีดังกล่าวมีลักษณะปกติ แสดงดังภาพที่ 4.8 (a) ส่วนแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

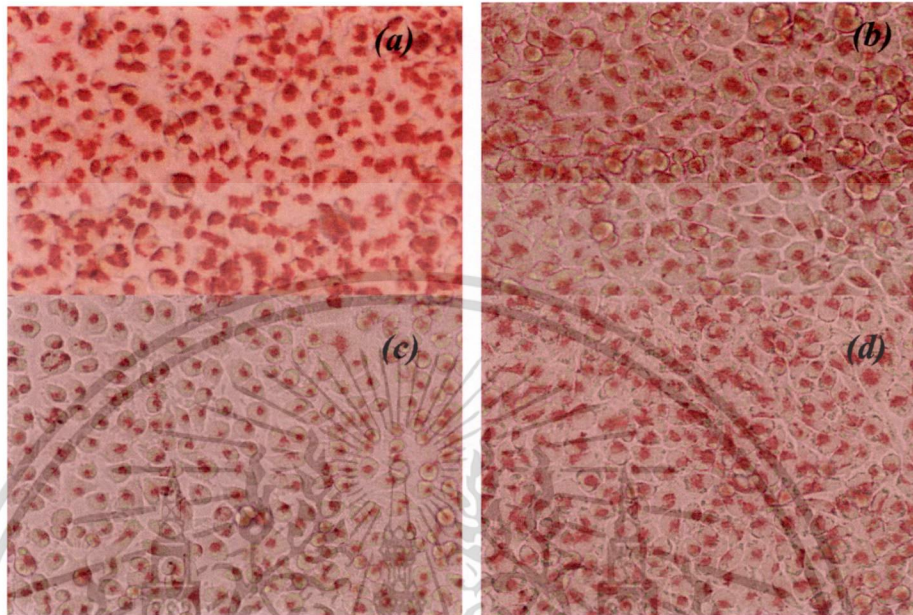
เซลล์ L929 ใต้แผ่นและรัศมีรอบแผ่นตายบริเวณกว้างกว่า 5.0 มิลลิเมตร มีความเป็นพิษระดับ 4 แผ่นเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์ L929 มีการเจริญได้ปกติ และมีลักษณะรูปร่างสมบูรณ์ ทั้งบริเวณใต้แผ่นวัสดุและบริเวณรอบนอกแผ่นวัสดุ แสดงในภาพที่ 4.8 ระดับความเป็นพิษแสดงดังตารางที่ 4.9



ภาพที่ 4.7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์แสดงลักษณะของเซลล์ L929 ในจานเพาะเซลล์ที่ทดสอบด้วยแผ่นวัสดุชนิดต่างๆ (a) เซลล์ที่ทดสอบด้วยแผ่นเซลล์โลสที่จุ่ม DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 (ชุดควบคุม) (b) เซลล์ที่ทดสอบด้วยแผ่น PE (negative control) (c) เซลล์ที่ทดสอบด้วยแผ่น rubber (positive control) (d) เซลล์ที่ทดสอบด้วยแผ่นเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดจากเปลือกมังคุดความเข้มข้น 1.56 มก./

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มล. (e) เซลล์ที่ทดสอบด้วยแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดจากเปลือกมังคุดความเข้มข้น 3.13 มก./มล. (f) เซลล์ที่ทดสอบด้วยแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดจากเปลือกมังคุดความเข้มข้น 6.25 มก./มล.



ภาพที่ 4.8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์แสดงลักษณะของเซลล์ L929 ในจานเพาะเซลล์ ที่ทดสอบด้วยแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดจากเปลือกมังคุด (a) เซลล์บริเวณรอบนอกขอบแผ่นเซลลูโลสที่ใช้ร่วมกับสารสกัดความเข้มข้น 6.25 มก./มล. (160x) และลักษณะเซลล์บริเวณใต้แผ่นเซลลูโลสที่ใช้ร่วมกับสารสกัดเปลือกมังคุด (b) ความเข้มข้น 0.78 มก./มล. (320x) (c) 0.39 มก./มล. (320x) และ (d) 0.19 มก./มล. (320x)

ระดับความเป็นพิษพิจารณาจากการตายของเซลล์ ตามมาตรฐานตามเภสัชตำรับของประเทศสหรัฐอเมริกา และทะเบียนยาหลักแห่งชาติแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (USP-NF) แสดงไว้ในตารางที่ 3.1 ซึ่งผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 ของแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดจากเปลือกมังคุดระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยพิจารณาตามระดับความรุนแรงแสดงดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ระดับปฏิกิริยาระหว่างแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดจากเมทานอล และชุดควบคุมกับเซลล์สัตว์ทดสอบ L929 พิจารณาตาม USP23-NF 18. Copyright 1994. The US Pharmacopcail Convention, Inc. Permission Granted

แผ่นทดสอบ	ระดับปฏิกิริยา
แผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดความเข้มข้น 12.5 มก/มล	4
แผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดความเข้มข้น 6.25 มก/มล	2
แผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดความเข้มข้น 3.13 มก/มล	2
แผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดความเข้มข้น 1.56 มก/มล	1
แผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดความเข้มข้น 0.78 มก/มล	0
แผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดความเข้มข้น 0.39 มก/มล	0
แผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดความเข้มข้น 0.19 มก/มล	0
แผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารละลาย DMSO ร้อยละ 0.02 (control)	0
แผ่น HDPE (negative control)	0
แผ่น natural rubber containing carbon black (positive control)	4

หมายเหตุ ระดับ 0 คือ ไม่มีปฏิกิริยา (None) ต่อการเจริญของเซลล์ L929

ระดับ 1 คือ มีปฏิกิริยาเล็กน้อย (Slight) ต่อการเจริญของเซลล์ L929

ระดับ 2 คือ มีปฏิกิริยาอ่อน (Mild) ต่อการเจริญของเซลล์ L929

ระดับ 3 คือ มีปฏิกิริยาปานกลาง (Moderate) ต่อการเจริญของเซลล์ L929

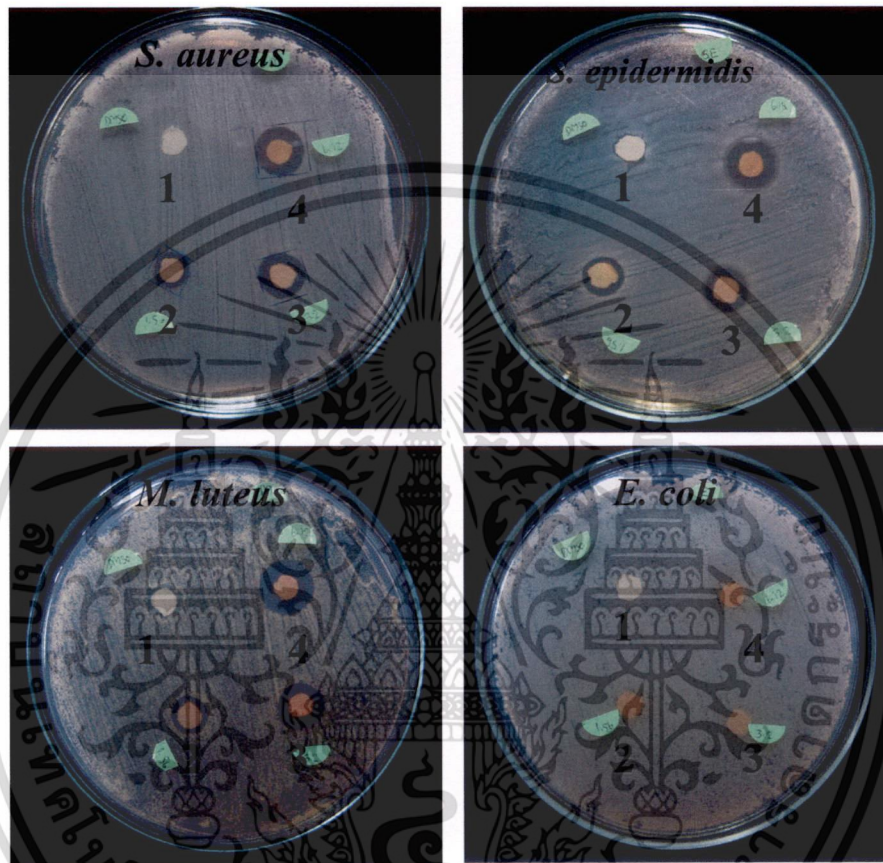
ระดับ 4 คือ มีปฏิกิริยารุนแรง (Severe) ต่อการเจริญของเซลล์ L929

4.11 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด

ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดบนอาหารแข็ง MHA โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดความเข้มข้น 6.25 3.13 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L292 พบว่ามีความเป็นพิษระดับ 2 2 และ 1 ตามลำดับ ซึ่งถือว่ามีความเป็นพิษในระดับต่ำ ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่าแผ่นเซลลูโลสจุ่มในสารสกัดเปลือกมังคุด ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 *S. epidermidis* TISTR 518 และ *M. luteus* TISTR 884 ได้ แสดงดังภาพที่ 4.9 บริเวณเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง แสดงดังตารางที่ 4.10 แผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดจากชั้นตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้สูงกว่าแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด ความเข้มข้น 1.56 และ 3.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

118 *S. epidermidis* TISTR 518 และ *M. luteus* TISTR 884 เท่ากับ 12.16 ± 0.28 11.94 ± 0.04 และ 12.98 ± 1.32 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* TISTR 887 ขณะที่แผ่นเซลลูโลสจุ่มใน DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ซึ่งเป็นชุดควบคุมไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ



ภาพที่ 4.9 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของแผ่นแท่งเซลลูโลส (1) จุ่ม DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 (ชุดควบคุม) (2) จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดความเข้มข้น 1.56 มก./มล. (3) จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดความเข้มข้น 3.13 มก./มล. และ (4) จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดความเข้มข้น 6.25 มก./มล. แผ่นเซลลูโลสแท่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6.0 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งเชื้อของแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดจากตัวทำละลายเมทานอล

จุลินทรีย์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียของแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด 3 ระดับความเข้มข้น (มิลลิเมตร±SD.)		
	6.25 มก./มล.	3.13 มก./มล.	1.56 มก./มล.
<i>S.aureus</i> TISTR 118	12.16 ± 0.28 ^a	10.03 ± 0.86 ^b	8.87 ± 0.68 ^c
<i>S.epidermidis</i> TISTR 518	11.94 ± 0.04 ^a	9.84 ± 0.91 ^b	8.55 ± 0.76 ^c
<i>M. luteus</i> TISTR 884	12.98 ± 1.32 ^a	11.1 ± 0.76 ^b	9.47 ± 0.72 ^c
<i>E. coli</i> TISTR 887	6.00 ± 0.00 ^a	6.00 ± 0.00 ^a	6.00 ± 0.00 ^a

หมายเหตุ: ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นเซลลูโลสเท่ากับ 6.0 มิลลิเมตร อักษรเหมือนกันในแถวแนวนอนเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.12 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดโดยวิธี broth dilution

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว โดยนำแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดความเข้มข้น 6.25 3.13 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแผ่นที่ไม่จุ่มสารสกัด (จุ่ม DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 0.02) โดยตัดเป็นแผ่นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 6.0 มิลลิเมตร จำนวน 1 แผ่น ใส่ในอาหารเหลว ซึ่งมีเซลล์แขวนลอยหนาแน่น 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100.0 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อโดยวัดความขุ่นที่เพิ่มขึ้นในเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียกับชุดควบคุมได้แก่หลอดสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียที่ไม่เติมสารยับยั้งใดๆ ซึ่งมีการเจริญของแบคทีเรีย เท่ากับร้อยละ 100 ผลการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย แสดงดังตารางที่ 4.11 แผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดจากเมทานอลความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้สูงกว่าแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด ความเข้มข้น 3.13 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สอดคล้องกับการทดสอบในอาหารแข็ง แต่การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว พบว่าแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดแสดงผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli* TISTR 887 ได้ โดยมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 *M. luteus* TISTR 884 *S. epidermidis* TISTR 518 และ *E. coli* TISTR 887 ได้ดีตามลำดับ

ตารางที่ 4.11 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของแผ่นแห้งเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด หลังบ่มในสารแขวนลอยเซลล์ 24 ชั่วโมง

หลอดทดลอง	การเจริญของแบคทีเรีย (ร้อยละ)			
	<i>E. coli</i> TISTR 887	<i>S. aureus</i> TISTR 118	<i>S.</i> <i>epidermidis</i> TISTR 518	<i>M. luteus</i> TISTR 884
ไม่เติมสารใดๆ (ชุดควบคุม)	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
จุ่ม DMSO ร้อยละ 0.02	102.28 ^a	105.24 ^a	95.76 ^{ab}	104.83 ^a
จุ่มสารสกัด 1.56 มก/มล.	102.87 ^a	77.14 ^b	78.88 ^{bc}	67.00 ^b
จุ่มสารสกัด 3.13 มก/มล.	81.84 ^b	74.32 ^b	64.75 ^{cd}	55.44 ^b
จุ่มสารสกัด 6.25 มก/มล.	72.60 ^b	36.01 ^c	50.15 ^d	38.53 ^c

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันในแถวแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

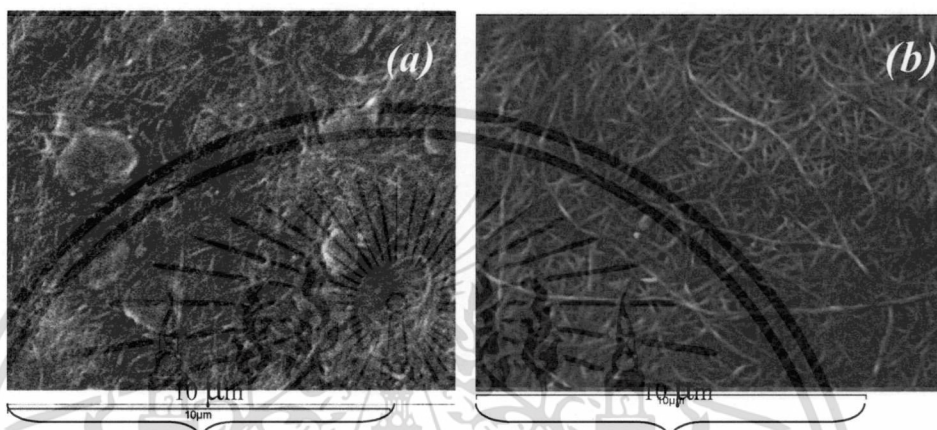
การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อในอาหารเหลว จะพบว่าแผ่นแห้งเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* TISTR 887 ได้ ในขณะที่การทดสอบด้วยอาหารแข็งโดยวิธี disc diffusion แผ่นแห้งเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด ไม่แสดงผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli* TISTR 887 เนื่องจากการทดสอบในอาหารเหลว สารสกัดภายในแผ่นได้ถูกละลายออกมาสู่อาหารเหลว และสัมผัสกับเซลล์แบคทีเรียได้โดยตรง จึงทำให้มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อได้สูงกว่าการทดสอบในอาหารแข็ง การทดสอบในอาหารแข็งนั้น สารสกัดภายในแผ่นสัมผัสกับเซลล์โดยผ่านการแพร่ผ่านอาหารแข็ง ซึ่งสารสกัดอาจมีอัตราการแพร่ที่ไม่เพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อได้ ซึ่งผลการทดสอบสอดคล้องกับค่า MIC ของเชื้อ *E. coli* TISTR 887 ที่ต้องใช้ค่าความเข้มข้นของสารสกัด ในปริมาณที่สูงกว่า MIC ของเชื้อทดสอบชนิดอื่นๆ

จากผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และพิจารณาร่วมกับผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงคัดเลือกแผ่นเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดจากเมทานอล ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้สูงสุด และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ สามารถยอมรับให้ใช้ได้แผ่นวัสดุปิดแผล

4.13 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานของแผ่นแห้งเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด

ศึกษาลักษณะสัณฐานของแผ่นแห้งเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 5000 เท่า แสดงดังภาพที่ 4.10 (a) พบว่าเส้นใยเซลล์โลสของแผ่นเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดมีการสานทับกัน พบอนุภาคของสารสกัดแทรกอยู่ภายในระหว่างเส้นใย ซึ่งทำให้เกิดขนาดของเอกสาร์นี้เป็นเอกสาร์ที่สวมนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสาร์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

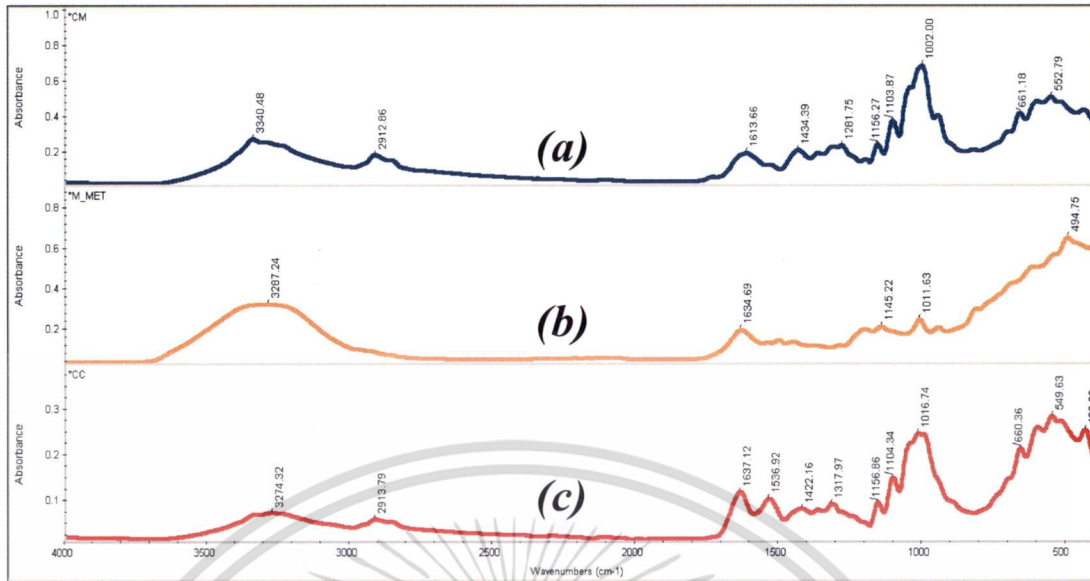
ช่องว่างที่ไม่สม่ำเสมอ และขรุขระ เปรียบเทียบกับแผ่นเซลลูโลสที่ไม่ได้จุ่มสารสกัด ภาพที่ 4.14 (b) ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยสานทับกัน และมีช่องว่างระหว่างเส้นใยที่สม่ำเสมอมากกว่า Honglin และคณะ (2008) ทำการวิจัยโดยเติมคอลลาเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลลูโลส ได้เป็นแผ่นคอมโพสิต (composite) ของเซลลูโลสกับคอลลาเจน ทำให้แผ่นเซลลูโลสมีความพรุน และขรุขระมากกว่าแผ่นเซลลูโลสปกติ ซึ่งส่งผลต่อค่าดูดซับของเหลวและการซึมผ่านของออกซิเจนให้สูงขึ้น ช่วยให้การสมานแผลเกิดขึ้นได้ดี (Palsson และ Bhatia, 2004)



ภาพที่ 4.10 ลักษณะสัณฐานของแผ่นเซลลูโลสแห้งจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (a) แผ่นเซลลูโลสจุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอลความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (b) แผ่นเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด

4.14 ผลการศึกษาเอกลักษณ์ของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

จากการใช้เทคนิค FTIR ในการวิเคราะห์เอกลักษณ์การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอล เปรียบเทียบกับเอกลักษณ์การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด และเอกลักษณ์การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารสกัดเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอล โดยใช้แสงอินฟราเรดช่วงเลขคลื่น 400 ถึง 4,000 cm^{-1} แสดงผลดังภาพที่ 4.11 การดูดกลืนแสงของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด เกิดจุดยอด (peak) ที่มีลักษณะร่วมกัน ระหว่างกราฟค่าการดูดกลืนแสงของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัดกับกราฟค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด เนื่องจากอนุภาคของสารสกัด ได้แทรกอยู่ภายในแผ่นเซลลูโลส สอดคล้องกับลักษณะที่ศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งพบอนุภาคของสารสกัดแทรกอยู่ระหว่างเส้นใยของเซลลูโลส



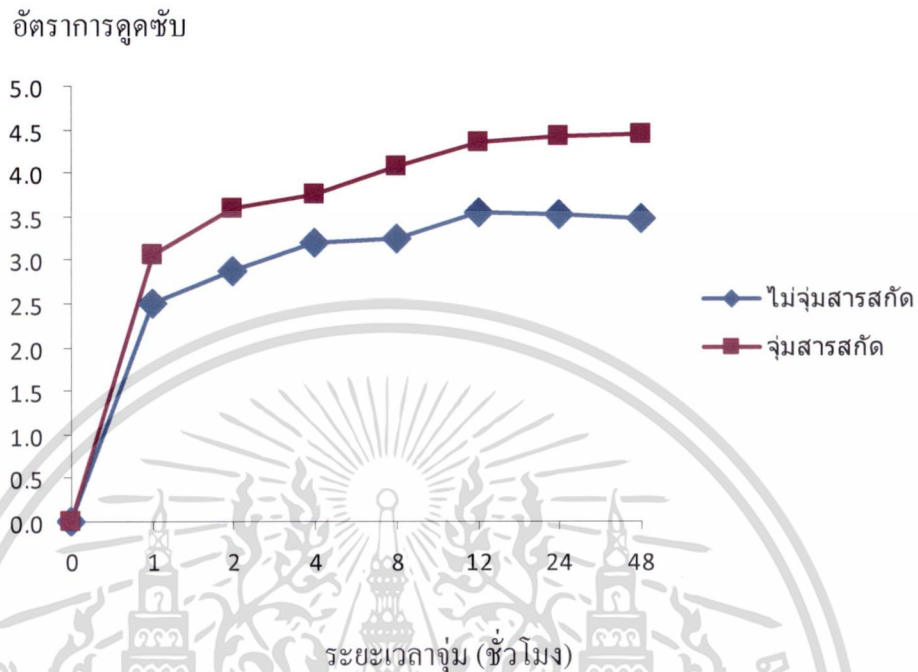
ภาพที่ 4.11 การดูดกลืนแสงของแผ่นเซลลูโลสและสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่สกัดจากตัวทำละลายเมทานอล วิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR ช่วงเลขคลื่น 400-4000 cm^{-1} (a) แผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอล (b) สารสกัดเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอล (c) แผ่นเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด

4.15 ผลการศึกษาอัตราการดูดซับน้ำของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด

จากการศึกษาอัตราการดูดซับน้ำ โดยนำแผ่นแห้งเซลลูโลสมาจุ่มในน้ำปราศจากไอออนที่อุณหภูมิห้อง แล้วบันทึกน้ำหนักของแผ่นเซลลูโลส กระทั่งน้ำหนักคงที่ พบว่าเมื่อแช่แผ่นแห้งเซลลูโลสในน้ำ ในระยะเวลา 1 ชั่วโมง แผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด และแผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด มีการดูดซับน้ำได้อย่างรวดเร็ว โดยมีค่าอัตราการดูดซับน้ำเฉลี่ยเท่ากับ 3.06 และ 2.49 เท่าของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ อัตราการดูดซับน้ำค่อนข้างคงที่ เมื่อระยะเวลาการจุ่มหลังจาก 24 ชั่วโมง เป็นต้นไป กราฟอัตราการดูดซับน้ำของแผ่นเซลลูโลสแห้ง แสดงดังภาพที่ 4.12 โดยแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด และแผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัดมีค่าอัตราการดูดซับน้ำสูงสุดเท่ากับ 4.44 และ 3.54 เท่าของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด มีค่าอัตราการดูดซับน้ำที่สูงกว่าแผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่ได้จุ่มสารสกัด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก แผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดนั้นระหว่างเส้นใยภายในแผ่น มีอนุภาคของสารสกัดเข้าไปแทรกอยู่ และกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ซึ่งเป็นวิธีที่คงสภาพของแผ่นไว้ได้ เมื่อแช่แผ่นแห้งเซลลูโลสในน้ำอนุภาคของสารสกัดจะถูกละลายด้วยน้ำ และหลุดออกมาจากแผ่นเซลลูโลส ทำให้เกิดช่องว่างภายในแผ่นเซลลูโลส น้ำจึงเข้าไปแทนที่ แผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดจึงสามารถดูดซับน้ำไว้ได้มากกว่าแผ่นที่ไม่จุ่มสารสกัดซึ่งมีเส้นใยที่เรียงตัวแน่นสม่ำเสมอทั้งแผ่น และจากการทดสอบความสามารถในการดูดซับน้ำของแผ่นเซลลูโลส จะเห็นได้ว่าแผ่นเซลลูโลสที่เตรียมได้ในลักษณะแห่งนี้ สามารถดูดซับน้ำได้อย่างรวดเร็ว ภายในระยะเวลาที่จุ่มแผ่นแห้งเซลลูโลสในน้ำกลับ 1 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในช่วงระยะ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงอิ่มตัว ลักษณะดังกล่าวอาจส่งผลให้แผ่นปิดแผลสามารถดูดซับของเหลวบริเวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บาดแผลได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งคุณสมบัติการดูดซับน้ำนี้ เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้บาดแผลสามารถฟื้นตัวได้ดีขึ้น (Waring และ Parsons. 2001., Walker และคณะ. 2003)



ภาพที่ 4.12 กราฟอัตราการดูดซับน้ำของแผ่นแห้งเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดและแผ่นแห้งเซลล์โลสที่ไม่จุ่มสารสกัด

4.16 ผลการศึกษาอัตราการซึมผ่านของไอน้ำของแผ่นแห้งเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด

จากการทดสอบอัตราการซึมผ่านของไอน้ำของแผ่นแห้งเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดเปรียบเทียบกับอัตราการซึมผ่านของไอน้ำกับแผ่นแห้งเซลล์โลสที่ไม่จุ่มสารสกัด โดยตัดแผ่นแห้งเซลล์โลส ให้มีขนาด 15×15 ตารางเซนติเมตร โดยใช้วิธี ISO 151061 : 2003 (E) Plastic-Film and Sheeting – Determination of Water Vapor Transmission Rate Part I : Humidity Detection sensor method เครื่องมือที่ใช้ทดสอบคือ Water vapor permeation tester ; Lyssy L80-4000 ณ อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 90 พบว่าแผ่นแห้งเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดมีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำสูงกว่าแผ่นแห้งเซลล์โลสที่ไม่จุ่มสารสกัด โดยแผ่นแห้งเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัด มีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ เท่ากับ 798 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน และแผ่นแห้งเซลล์โลสที่ไม่จุ่มสารสกัดมีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ เท่ากับ 762 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน แสดงผลดังตารางที่ 4.12 ซึ่งค่าอัตราการซึมผ่านของไอน้ำของวัสดุปิดแผล เป็นปัจจัยสำคัญที่ใช้ในการพิจารณาความเหมาะสมต่อชนิด และความรุนแรงของบาดแผล โดยมีค่าอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ ประมาณ 204 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน (Lamke และคณะ. 1977) เมื่อผิวหนังได้รับความเสียหาย อัตราการซึมผ่านของไอน้ำอาจมากถึง 5138 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน (Queen และคณะ. 1987) แผ่นปิดแผลในอุดมคติ ควรมีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ ในช่วง 2000-2500 กรัม เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อตารางเมตรต่อวัน ซึ่งหมายความว่ามีความสัมพันธ์การเป็นเยื่อเลือกผ่าน ในการยอมให้มีการซึมผ่านของไอน้ำเข้าออกได้อย่างเหมาะสม โดยหากมีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำสูงมาก สามารถทำให้บาดแผลเกิดการสูญเสียน้ำ หรือหากมีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำต่ำจะทำให้แผลมีความชื้นสูง ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อได้ง่าย เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจากงานวิจัยของ Wu และคณะ. (1995) ซึ่งแสดงอัตราการซึมผ่านของไอน้ำของวัสดุปิดแผลทางการค้าบางชนิด ดังตารางที่ 4.13 พบว่าแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด มีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ สูงกว่า Bioclusive™ Dermiflex™ และ Ultec™ และมีการป้องกันการสูญเสียน้ำได้ดีกว่า Duoderm™ และ Bioflim™

4.17 ผลการศึกษาอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด

จากการทดสอบอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนโดยวิธี ASTM D 3985-02 Oxygen Gas Transmission Rate Through Plastic Film and Sheeting Using a Coulometric Sensor เครื่องที่ใช้ทดสอบคือ Oxygen permeation tester ; Illinois 8000 ณ อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 0 โดยตัดแผ่นแห้งเซลลูโลสให้มีขนาด 15×15 ตารางเซนติเมตร เปรียบเทียบอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดกับแผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด พบว่าแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด มีอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน เท่ากับ 7,097 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อตารางเมตรต่อวัน ส่วนแผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด มีอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน เท่ากับ 4,957 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อตารางเมตรต่อวัน แสดงผลดังตารางที่ 4.12 ซึ่งแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด มีอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนสูงกว่าแผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการมีอนุภาคของสารสกัดขนาดต่างๆ เข้าไปแทรกอยู่ระหว่างเส้นใยเซลลูโลส มีผลต่อขนาดของช่องว่างภายในแผ่นให้มีขนาดกว้างขึ้น สอดคล้องกับผลการทดสอบค่าการดูดซับน้ำ และการซึมผ่านของไอน้ำ ของแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด นั้นมีค่าสูงกว่าแผ่นเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด ค่าการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนมีผลต่อค่าความเป็นกรดต่างของของเหลวบริเวณบาดแผล และการงอกใหม่ของเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผล ซึ่งแผ่นวัสดุปิดแผลควรมีอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนได้ดี เพื่อสนับสนุนให้บาดแผลมีการฟื้นตัวได้ดีขึ้น (Dubey และคณะ. 2002., Ciechanska. 2004.) เนื่องจากหากบริเวณบาดแผลมีปริมาณออกซิเจนต่ำ คาร์บอนไดออกไซด์สูง จะมีผลให้ค่า pH ของของเหลวบริเวณบาดแผลลดลง ทำให้เกิดการหมัก โดยจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการก๊าซออกซิเจนในการเจริญ และทำให้การสมานบาดแผลเกิดขึ้นช้าลง (Fwu และคณะ. 2002)

ตารางที่ 4.12 ผลอัตราการซึมผ่านไอน้ำและออกซิเจนของแผ่นเซลลูโลส

แผ่นเซลลูโลส	อัตราการซึมผ่านไอน้ำ (กรัม/ตารางเมตร/วัน)	อัตราการซึมผ่านออกซิเจน (ลูกบาศก์เซนติเมตร/ตารางเมตร/ วัน)
ไม่จุ่มสารสกัด	762	4,957
จุ่มสารสกัด	798	7,097

ตารางที่ 4.13 อัตราการซึมผ่านของไอน้ำของแผ่นวัสดุปิดแผลทางการค้าชนิดต่างๆ

ชนิดแผ่นปิด แผล	ชื่อทางการค้า	บริษัทผู้ผลิต	อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ (กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน)
ฟิล์ม	Bioclusive	Johnson & Johnson	394
ไฮโดรคอลลอยด์	Dermiflex	Johnson & Johnson	90
	Duoderm	ConvaTec Ltd	886
	Ultec	Sherwood Med	534
	Bioflim	CliniMed Ltd	2892

ที่มา: Wu และคณะ. (1995)

ความหนาของแผ่นเซลลูโลส ความหนาแน่นของเส้นใย การเรียงตัวของเส้นใย และความเป็นรูพรุน มีบทบาทสำคัญต่อค่าอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ และอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนของแผ่นวัสดุ แผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด มีความหนาเฉลี่ย 244.44 ± 41.26 ไมครอน และแผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด มีความหนาเฉลี่ย 198.00 ± 42.37 ไมครอน แผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดมีความหนามากกว่าแผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด เนื่องจากแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดมีความขรุขระ และลักษณะโป่งพองของเส้นใย จากการที่อนุภาคของสารสกัดเข้าไปแทรกอยู่ภายในมากกว่าแผ่นเซลลูโลสที่ไม่ได้จุ่มสารสกัด ซึ่งเส้นใยมีการเรียงตัวชิดกันปกติ จึงทำให้แผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด มีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ และออกซิเจนสูงกว่าแผ่นเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัดนั่นเอง

4.18 ผลการศึกษาค่าคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด

นำแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดมาวัดค่าความแข็งแรงดึง (Tensile Strength) ค่ามอดูลัสของยัง (Young's Modulus) และค่าการยืด ณ จุดขาด (Elongation at break) เปรียบเทียบกับแผ่นที่ไม่จุ่มสารสกัด แสดงผลดังตารางที่ 4.14 จากผลการทดสอบ พบว่าแผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด มีค่าความแข็งแรงดึง ค่ามอดูลัสของยัง สูงกว่าแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ค่าการยึด ผน จุดขาด มีค่าไม่แตกต่างกัน การที่สารสกัดเข้าไปแทรกอยู่ภายในแผ่นเซลลูโลสมีผลต่อลักษณะทางกายภาพของแผ่นเซลลูโลส ทำให้มีค่าความแข็งแรงลดลง สอดคล้องกับผลการทดสอบอัตราการดูดซับน้ำ และอัตราการซึมผ่านของไอน้ำและก๊าซออกซิเจน ของแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด ซึ่งจะมีค่าสูงกว่าแผ่นเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด ที่มีการเรียงตัวของเส้นใยเป็นระเบียบและหนาแน่นมากกว่า จึงแสดงผลค่าความแข็งแรงดิ่ง และค่ามอดูลัสของยังที่สูงกว่า

เมื่อแผ่นแห้งเซลลูโลสมีการดูดซับน้ำ คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นเซลลูโลสมีการเปลี่ยนแปลงไป โดยมีค่าความแข็งแรงดิ่ง และค่ามอดูลัสของยังลดลง แต่มีค่าการยึด ผน จุดขาดเพิ่มขึ้นมากกว่าแผ่นเซลลูโลสแห้งอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดมีค่าการยึด ผน จุดขาด สูงกว่าแผ่นที่ไม่จุ่มสารสกัด อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สอดคล้องกับผลของการทดสอบอัตราการดูดซับน้ำ และอัตราการซึมผ่านของไอน้ำและก๊าซออกซิเจน ลักษณะของแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด การเรียงตัวของเส้นใยมีลักษณะพองขึ้นสังเกตจากค่าความหนาของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด ซึ่งมีค่ามากกว่าแผ่นแห้งเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด นั่นคือเส้นใยมีการพองตัวออกจากกัน เนื่องจากอนุภาคของสารสกัดเข้าไปแทรกอยู่ภายในทำให้มีลักษณะเป็นโพรง มากกว่าแผ่นเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด เมื่อนำแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด มาดูดซับน้ำอนุภาคของสารสกัดถูกละลายออกมา อนุภาคน้ำจึงเข้าไปแทนที่ แผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดจึงมีอัตราการดูดซับน้ำได้สูงกว่า ความสามารถในการดูดซับน้ำของแผ่นเซลลูโลสส่งผลให้มีค่าความยืดหยุ่นเพิ่มสูงขึ้น (Czaja และคณะ. 2006)

ตารางที่ 4.14 ค่าคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นแห้งเซลลูโลสและแผ่นแห้งเซลลูโลสหลังจากการแช่น้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

แผ่นเซลลูโลส		ความแข็งแรงดิ่ง (N/mm ²)	ค่ามอดูลัสของ ยัง (N/mm ²)	ค่าการยึด ผน จุดขาด
แผ่นแห้ง	จุ่มสารสกัด	13.33 ± 1.95 ^b	272.59 ± 57.45 ^b	2.89 ± 0.63 ^c
	ไม่จุ่มสารสกัด	16.05 ± 3.33 ^a	341.90 ± 81.38 ^a	2.39 ± 0.25 ^c
แผ่นแห้ง แช่น้ำ	จุ่มสารสกัด	8.06 ± 0.95 ^c	26.53 ± 3.54 ^c	10.82 ± 1.92 ^a
	ไม่จุ่มสารสกัด	5.31 ± 0.30 ^d	40.95 ± 5.65 ^c	9.47 ± 0.62 ^b

หมายเหตุ อักษรเหมือนกันในแถวแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดจากเหง้าไพลแห้ง และเปลือกมังคุดแห้ง ที่สกัดด้วยวิธีการสกัดเย็นแบบหมัก (maceration methods) ซึ่งใช้เฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเมทานอล เป็นตัวทำละลาย ได้สารสกัดเหง้าไพล และเปลือกมังคุด อย่างละ 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนของสารสกัดหยาบที่สกัดโดยตัวทำละลายเฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเมทานอล ในส่วนของเหง้าไพลแห้งสารสกัดหยาบที่สกัดโดยตัวทำละลายเฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเมทานอล มีลักษณะเป็นน้ำมัน สี สีเหลือง คัดเป็นร้อยละ 2.82 ของน้ำหนักเหง้าไพลแห้ง สารสกัดในส่วนของเอธิลอะซิเตทเป็นส่วนที่ได้ปริมาณต่ำที่สุด คือร้อยละ 1.67 ของน้ำหนักเหง้าไพลแห้ง มีลักษณะเหลวหนืดสีน้ำตาล และส่วนที่ได้สารสกัดหยาบมากที่สุดคือสารสกัดใน เมทานอล ได้สารสกัดร้อยละ 6.55 ของน้ำหนักเหง้าไพลแห้ง ลักษณะหนืดข้นสีน้ำตาลดำ สำหรับสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดแห้ง สารสกัดส่วนที่ได้ปริมาณมากที่สุดคือ สารสกัดหยาบจากส่วนเอธิลอะซิเตท ร้อยละ 14.23 ของน้ำหนักเปลือกมังคุดแห้ง สารมีลักษณะเหลวสีน้ำตาลเข้ม สารสกัดส่วนเมทานอล ได้ร้อยละ 10.55 ของน้ำหนักเปลือกมังคุดแห้ง สารมีลักษณะหนืดข้นสีน้ำตาลแดง และสารสกัดหยาบจากเฮกเซนมีปริมาณต่ำสุดคือ ร้อยละ 0.14 ของน้ำหนักเปลือกมังคุดแห้ง

ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และ *E. coli* TISTR 887 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มักพบในบริเวณบาดแผลที่ติดเชื้อ ของสารสกัดหยาบที่ได้ โดยวิธี Disc diffusion และ Broth dilution พบว่า สารสกัดหยาบเหง้าไพลจากเอธิลอะซิเตท และสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดจากเมทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทั้งสองได้ดีเท่ากันในอาหารเหลว แต่สารสกัดหยาบเปลือกมังคุดมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้สูงกว่าสารสกัดหยาบจากไพลในการทดสอบบนอาหารแข็ง นอกจากนี้สารสกัดเหง้าไพลในส่วนของเอธิลอะซิเตท เจือจางเป็นสารละลายได้ยาก มีกลิ่นฉุน และมีสีเหลืองติดผิวหนัง ส่วนสารสกัดเปลือกมังคุดในส่วนของเมทานอล เจือจางเป็นสารละลายได้ง่ายกว่า สารละลายที่ได้มีสีเหลืองอ่อน ไม่ติดผิวหนัง กลิ่นไม่ฉุน และมีลักษณะของการแพร่ของสารออกฤทธิ์จากแผ่นดิสก์ได้ดีกว่าสารสกัดจากเหง้าไพลเมื่อทดสอบบนอาหารแข็ง ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงเลือกใช้สารสกัดเปลือกมังคุดจากเมทานอลมาใช้ร่วมกับแผ่นเซลลูโลส ที่ผลิตโดย *A. xylinum* TISTR 976 และทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง

จากการทดสอบค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ร่วมกับเซลลูโลส ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ L929 โดยวิธี Agar diffusion พบว่าสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดแห้งจากเมทานอล ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 *S. epidermidis* TISTR 518 และ *M. luteus* TISTR 884 ได้ แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* TISTR 887 เมื่อทดสอบในอาหารเหลวโดยวิธี Broth dilution พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ได้สูงกว่าเชื้ออื่นๆ และลดการเจริญของเชื้อ *M. luteus* TISTR 884 *S. epidermidis* TISTR 518 และ *E. coli* TISTR 887 ได้ดีตามลำดับ

เมื่อศึกษาลักษณะพื้นฐานของแผ่นวัสดุที่ได้ พบอนุภาคของสารสกัดแทรกและเคลือบบนเส้นใยเซลลูโลส การใช้สารสกัดที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวมีผลให้ประสิทธิภาพการซึมผ่านของไอน้ำและก๊าซออกซิเจนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้แผ่นวัสดุยังมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้สูง ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวเป็นปัจจัยที่สนับสนุนให้บาดแผลมีการฟื้นตัวได้เร็ว คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด เช่น ค่าความแข็งแรงดึง และค่ามอดูลัสของยัง มีค่าต่ำกว่าแผ่นเซลลูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด แต่ค่าการยืด ณ จุดขาด มีค่าไม่แตกต่างกัน เมื่อนำแผ่นแห้งเซลลูโลสมาแช่น้ำ พบว่า ค่าการยืด ณ จุดขาด มีค่าสูงขึ้น นั่นคือแผ่นแห้งเซลลูโลสมีความยืดหยุ่นมากขึ้นเมื่อมีการดูดซับน้ำ

การเตรียมสารสกัดที่ใช้ร่วมกับแผ่นเซลลูโลส มีความสำคัญอย่างมากต่อลักษณะและคุณสมบัติของแผ่นเซลลูโลสที่ได้ ทั้งนี้ควรเตรียมสารสกัดให้มีขนาดอนุภาคขนาดเล็ก เพื่อให้แผ่นเซลลูโลสมีประสิทธิภาพ และลักษณะทางกายภาพ ที่สม่ำเสมอทั่วทั้งแผ่น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- กมลรัตน์ ธนัทประภักดิ์ จันทิมา จารุสิทธิกุลชัย วัชรา โชควิวัฒน์ และปรียวิศร์ ณ อุบล. 2548. “การทดสอบทางชีวภาพสำหรับวัสดุและผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์”. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (เอ็มเทค). สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. หน้า 10-53.
- เชษฐ รัตนอาจารย์. 2548. “ผลของสารสกัดไพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์”. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า 23.
- ฐิติรัตน์ วิวงศ์ศักดิ์ วิไลลักษณ์ ตันตะโยธิน. 2552. “การพัฒนาตำรับยาใช้ภายนอกของสารสกัดไพลด้วยเฮกเซน”. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- มาลิน จุลศิริ. 2532. “ยาต้านจุลชีพความรู้พื้นฐานและการประยุกต์”. สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน.
- พิเชษฐ วิริยจิตรา. 2531. “สารสกัดจากเปลือกมังคุด สูดยอด ปลอดภัยอันตราย”. มติชนรายวัน. 23 ตุลาคม 2531. หน้า 4-5.
- พิชพันธ์ พงษ์สกุล. 2550. “ผลของไคโตซานต่อการผลิตกระดาษจากเซลลูโลสจากแบคทีเรีย”. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า 27.
- ธวัชชัย เชื้อประไพศิลป์. 2536. “ประโยชน์ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในทางการแพทย์”. ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. ครั้งที่ 19.
- ธรวัตร ผดุงการ ธนภร อำนวยกิจ และ ฉัตรชัย วัฒนาภิรมย์สกุล. 2552. “แผ่นแปะต้านเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดเปลือกมังคุด”. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. ครั้งที่ 14. 10-11 กันยายน 2552.
- นุศวดี พจนานุกิจ และสมใจ ขจรชีพพันธ์งาม. 2553. “การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อเกิดสิวของสารสกัดจากพืชสมุนไพร”. ในการประชุมวิชาการทางวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์. ครั้งที่ 8. 22-23 เมษายน 2553.
- เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร เมตตา องค์กรสกุล ลัดดา นิลรัตน์ ประสิทธิ์ ธรวาจิตรกุล ศิริพรรณ บุญชู ธวัชชัย เชื้อประไพศิลป์ และ พิเชษฐ์ วิริยจิตรา. 2537. “ฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกมังคุดต่อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin (MRSA) และ *Enterococcus species*”. วารสารสงขลานครินทร์. 16(4):399-405.
- อุดมลักษณ์ สุขอิตตะ อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์ ประภัสสร รักถาวร สิริพร ศิริวรรณ และ พจมาน พิศเพียงจันทร์. 2549. การสกัดและการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 : สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 529-536.
- อารีรัตน์ ลออปักษา และสุรัตนา อำนวยผล. 2531. “การศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ (ตอนที่ 1)”. ไทยเภสัชสาร. 13(1): 23-35.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Alvarez, O. M., Patel, M., Booker, J. and Markowitz, L. 2004. "Effectiveness of a biocellulose wound dressing for the treatment of chronic venous leg ulcers: results of a single center randomized study involving 24 patients." *Wounds*.16(7):224–33.
- Balasubramanian, K. and Rajagopalan, K. 1988. "Novel xanthenes from *Garcinia mangostana* structures of BR-xanthone-A and BR-xanthone-B". *Phytochemistry*. 27:1552–1554.
- Ciechanska, D. 2004. "Multifunctional bacterial cellulose/chitosan composite materials for medical applications". *Fibers & Textiles in Eastern Europe*. 12:69.
- Chomnawang, M. T., Suvimol, S., Nukoolkarn, V. S. and Gritsanapan, W. 2005. "Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria". *Journal of Ethnopharmacology*. 101(1-3): 330-333.
- Chomnawang, M. T., Suvimol, S., Nukoolkarn, V. S. and Gritsanapan, W. 2007. "Effect of *Garcinia mangostana* on inflammation caused by *Propionibacterium acnes*". *Fitoterapia*. 78: 401-408.
- Chopra, R. N., Nayar, S. L. and Chopra, I. C. 1956. "Glossary of Indian Medicinal Plants". The National Institute of Science Communication and Information Resources, Nueva Delhi, India. p. 123.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P. 1999. "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections". *Science*. 284:1318-1322.
- Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S. and Brown, R. 2006. "Microbial cellulose—the natural power to heal wounds". *Biomaterials*. 27:145–151.
- Czaja, W., Young, DJ., Kawecki, M. and Brown, RM. 2007. "The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications". *Biomacromolecules*. 8:1–12.
- Dubey, V., Saxena, Ch., Singh, L., Ramana, K. and Chauhan, R. 2002. "Pervaporation of binary water–ethanol mixtures through bacterial cellulose membrane". *Sep Purif Technol*. 27:163–171.
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., and Kim, J. O. 2000. "A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*." *Journal of Biomedical Material Research*.52, 662–668.
- Fontana, J. D., De Souza, A. M., Fontana, C. K., Torriani, I. L., Moreschi, J. C., Gallotti, B. J., Souza, S. J., Narcisco, G. P., Bichara, J. A. and Farah, L. F. X. 1990. *Appl. Biochem. Biotech.* 24:253.
- Fontana J. D., Joerke, C. G., Baron, M., Maraschin, M., Ferreira, A. G. and Torriani, I. 1997. "Acetobacter cellulosic biofilms search for new modulators of

- cellulogenesis and native membrane treatments”. *Appl Biochem Biotechnol.* 63–65:327–338.
- Fwu, L. M., Yu, B. W., Shin, S. S., Jen, Y. S., Yaw, B. H., Yi, H. T. and Jong, Y. H. 2002. “Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery”. *Journal of Biomedical Materials Research.* 59 (3) :438–449.
- Garnett, M. and Sturton, S. D. 1932. “*Garcinia Mangostana* in the treatment of amoebic Dysentery”. *Chin. Med. J.:* 969–973.
- George, J., Ramana, K., Sabapathy, Sh., Jagannath, J. and Bawa, A. 2005. “Characterization of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) Biopolymer some thermo-mechanical properties”. *Int J Biol Macromol.* 37:189–194.
- Goelzer, F., Faria-Tischer, P., Vitorino, J., Sierakowski, M. and Tischer, C. 2009. “Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark”. *Mater Sci Eng.* 29:546–551.
- Grzegorzczyn, S. and Ezak, A. 2007. “Kinetics of concentration boundary layers build up in the system consisted of microbial cellulose biomembrane and electrolyte solutions”. *J Memb Sci.* 304:148–155.
- Guay, D. F., Cole, B. J. W., Fort Jr., R. C., Hausman, M. C. and Genco, J. M. 2002. “Mechanisms of oxidative degradation of carbohydrates during oxygen delignification. III. reaction of photochemically generated hydroxyl radicals with 1,5-anhydrocellobitol and cellulose”. 2002. TAPPI Fall Conference and Trade Fair.
- Harbone, J., Baxter, H. and Moss, G. 1999. *Phytochemical dictionary – A Handbook of Bioactive Compounds from Plants.* Taylor & Francis. p. 590.
- Habsah, M., Amran, M. and Mackeen, M. M. 2000. “Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities”. *Journal Ethnopharmacology.* 72: 403-410.
- Hen, L., Yang, L. and Wang, C. 2008. “Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*”. *Food and Chemical Toxicology.* 46(2): 688-693.
- Hestrin, S. and Schramm, M. 1954. “Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: II. Preparation of Freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose”. *Biochem.* 58:345-352.
- Honglin, L., Guangyao, X., Yuan, H., Fang, H., Yulin, W. and Yizao, W. 2008. “Preparation and characterization of a novel COL/BC composite for potential tissue engineering scaffolds”. *Materials Chemistry and Physics.* 110: 193-196.

- Iguchi, M., Yamanaka, S., and Budhiono, A. 2000. "Bacterial cellulose – A masterpiece of nature's arts". *Journal of Materials Science*. 35(2), 261–270.
- Itoh, T., Ohguchi, K., Iinuma, M., Nozawa, Y. and Akao, Y. 2008. "Inhibitory effect of xanthenes isolated from the pericarp of *Garcinia mangostana* L. on rat basophilic leukemia RBL-2H3 cell degranulation". *Bio organic & Medicinal Chemistry*. 16: 4500-4508.
- Jeenapongsa, R., Yoovathaworn, K., Sriwatanakul, K. M., Pongprayoon, U. and Sriwatanakul, K. 2003. "Antiinflammatory activity of (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene from *Zingiber cassumunar* Roxb". *Journal of Ethnopharmacology*. 87 :143–148.
- Jose, P. C., Noemi, C. R., Marisol, O. I., Jazmin, M. and Perez, R. 2008. "Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*)". *Food and Chemical Toxicology*. 46 : 3227–3239.
- Jung, H. A., Su, B. N., Keller, W. J., Mehta, R. G., Kinghorn, D. 2006. "Antioxidant xanthenes from pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen)". *Agric. Food.Chem.* 54: 2077–2082.
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U. and Marsch, S. 2001. "Bacterial synthesized cellulose –artificial blood vessels for microsurgery". *Prog Polym Sci*. 26:1561–603.
- Kosem, N., Han, Y. and Moongkarndi, P. 2007. "Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Garcinia mangostana* Hulls". *Science Asia*. 33: 283-292.
- Lamke, L. O., Nilsson, G. E. and Reithner, H. L. 1977. *Burns*. 3,159.
- Li, Y., Leung, P., Yao, L., Song, Q. W. and Newton, E. 2006. "Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles". *Journal of Hospital Infection*. 62:58–63.
- Leong, L. P., and Shui, G. 2002. "An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets". *Food Chemistry*, 76, 69–75.
- Mahabusarakum, W., Phongpaichit, S., Jansakul, C. and Wiriyaichitra, P. 1983. "Screening of antibacterial activity of chemicals from *Garcinia mangostana*". *Warasan Songkhla Nakkharin*. 5:337-9.
- Mahabusarakam, W., Wiriyaichitra, P. and Taylor, W. 1987. "Chemical constituents of *Garcinia mangostana*". *Nat. Prod.* 50: 474–478.
- Maneerung, T., Tokura, S. and Rujiravanit, R. 2008. "Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing". *Carbohydrate Polymers*. 72: 43–51.

- Masahiro, O., Tomoko, K. and Michio, S. 2004. "New curcuminoid compound as chemokine expression inhibitor, its purification from *Zingiber purpureum*, and its uses as inflammation inhibitors" *Jpn Kokai Tokyo Koho JP* . 21.
- Masuda, T., Jitoe, A. and Mabry, J. T. 1995. "Isolation and structure determination of cassumunarins A, B, and C: New anti-inflammatory antioxidants from a tropical ginger, *Zingiber cassumunar*". *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 72(9):1053-1057.
- Oshima, T., Kondo, K., Ohto, K., Inoue, K. and Baba, Y. 2008. "Preparation of phosphorylated bacterial cellulose as an adsorbent for metal ions". *React Funct Polym*. 68:376-383.
- Pandey, L., Saxena, Ch. and Dubey, V. 2005. "Studies on pervaporative characteristics of bacterial cellulose membrane". *Sep Purif Technol*. 42:213-218.
- Palsson, B. and Bhatia, SN. 2004. *Tissue Engineering*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall. NY.
- Pierce, S. C. 2003. "A Thai Herbal". Findhorn Press, Scotland, UK. p. 118.
- Pinto, M. M., Sousa, M. E. and Nascimento, M. S. 2005. "Xanthone derivatives: new insights in biological activities". *Curr. Med. Chem*. 12: 2517-2538.
- Pitanguy, I., Salgado, F. and Maracaja, P. 1988. "Utilization of the cellulose pellicle biofill as a biological dressing". *Rev Bras Cir*. 78:317-326.
- Pithayanukul, P., Tubprasert, J. and Wuthi-Udomlert, M. 2007. "In vitro antimicrobial activity of *Zingiber cassumunar* (Plai) oil and a 5% Plai oil gel". *Phytother Res*. 21(2):164-169.
- Pongprayoon, U. 1997. "Topical anti-inflammatory activity of the major lipophilic constituents of the rhizome of *Zingiber cassumunar* Part II:Hexane extractives". *Phytomedicine*. 3(4): 323-326.
- Queen, D., Gaylor, J. D., Evans, J. H., Courtney, J. M. and Reid, W. H. 1987. *Biomaterials*. 8 : 367.
- Rebello, C., Almeida, D. A. D., Lima, E. M. Jr. and Dornelas, M. D. P. 1987. "*Biofill a new skin substitute*". our experience. *Rev. Bras. Cir*. 77(6):407-414.
- Ring, D., Nashed, W. and Dow, T. 1986. "Liquid loaded pad for medical applications". US patent No.4588400.
- Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M. 1991. "Cellulose biosynthesis and function in bacteria". *Microbiol Rev*. 55(1):35-58.

- Saibuatong, O. and Phisalaphong, M. 2010. "Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis". *Carbohydrate Polymers*. 79: 455-460.
- Saralamp, P., Chuakul, W., Temsirikkul, R., Clayton, T., 1996. "Medicinal Plants in Thailand". Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Bangkok, Thailand. vol. 1. 9.
- Sen, A. K., Uusvuori, R., Hase, T. A., Benerji, N., Sarkar, K. K. and Mazumder, P. C. 1980. "A xanthone from *Garcinia mangostana*." *Phytochemistry*. 19: 2223-2225.
- Shankaranarayan, D., Gopalakrishnan, C. and Kameswaran, L. 1979. "Pharmacological profile of mangostin and its derivatives". *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 239:257-269.
- Sivasothy, Y., Chong, W. K., Hamid, A., Eldeen, I. M., Sulaiman, S. F. and Awang, K. 2010. "Essential oils of *Zingiber officinale* var. rubrum Theilade and their antibacterial activities". *Food Chemistry*. 124 : 514-517.
- Sutabhaha, B., Dartrakoon, U., Furuya, T. and Nagumo, T. 1997. "The inhibitory activities of mangosteen's pericarb extract on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci*. 30(1): 40-46.
- Svensson, A., Nicklasson, E., Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D., Brittberg, M. and Gatenholm, P. 2005. "Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage." *Biomaterials*. 26:419-431.
- Vandamme, E. J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K. and De Wulf, P. 1998. "Improved production of bacterial cellulose and its application potential" . *Polym Degrad Stabil.* 59:93-99.
- Walker, M., Hobot, J. A., Newman, G. R. and Bowler, P. G. 2003. "Scanning electron microscopic examination of bacterial immobilisation in a carboxymethyl cellulose (AQUACEL) and alginate dressings". *Biomaterials*. 24:883-890.
- Wan, Y. Z., Hong, L., Jia, S. R., Huang, Y., Zhu, Y. and Wang, Y. L. 2006. "Synthesis and characterization of hydroxyapatite-bacterial cellulose nanocomposites". *Compos Sci Technol.* 66:1825-1832.
- Wan, Y. Z., Huang, Y., Yuan, C. D., Raman, S., Zhu, Y. and Jiang, H. J. 2007. "Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications". *Mater Sci Eng C*. 27:855-64.
- Waring, M. J. and Parsons, D. 2001. "Physico-chemical characterization of carboxymethylated spun cellulose fibres". *Biomaterials*. 22: 903-912.
- Watnick, P. and Kolter, R. 2000. "Biofilm, city of microbes". *J Bacteriol.* 182:2675-2679.
- Wu, P., Fisher, AC., Foo, PP., Queen, D. and Gaylor. JDS. 1995. "In vitro assessment of water vapour transmission of synthetic wound dressings". *Biomaterials*;16:171-175.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yu, L., Zhao, M., Yang, B., Zhao, Q. and Jiang, Y. 2007. "Phenolics from hull of *Garcinia mangostana* fruit and their antioxidant activities". *Food Chem.* 104, 176-18.

Cellulose Solutions, LLC. "Dermafill Xylinum Cellulose." [online]. Available : [http: www.mctdermafill.com/ education.html](http://www.mctdermafill.com/education.html). 2008.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้