

จังหวัดสมเด็จกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง
 หอสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเคียว

(Antimicrobial activity of ethanolic extract from Job's Tears)

จัดทำโดย

นางสาว เปรมสุตา

มโนเชียวพินิจ

รหัสนักศึกษา 45040799

นางสาว มุทิตา

ปิยะสนธิ

รหัสนักศึกษา 45040804



T097037

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.ศศิวิมล ชื่นอ้อม อาเหม็ด

น.พ.

ป.7194

8548

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน.....

วัน,เดือน,ปี.....

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเดือย
(Antimicrobial activity of ethanolic extract from Job's Tears)

จัดทำโดย

นางสาวเปรมสุดา มโนเชียวพินิจ รหัสนักศึกษา 45040799
นางสาวมุกิตา ปิยะสนธิ รหัสนักศึกษา 45040804

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

31 / 3 / 49

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(อาจารย์ ศติวิธ ธีรัมย์ วาเนธ .)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นางสาวเปรมสุดา มโนเชิษฐาพิณ และนางสาวมูทิดา ปิยะสนธิ.2548 ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเคียว (Antimicrobial activity of ethanolic extract from Job's Tears)
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.ศศิวิมล ชื่นอิม อาเหม็ด

บทคัดย่อ

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเคียวโดยวิธี Agar diffusion พบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเคียวมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวกและแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียซึ่งได้แก่ *Bacillus cereus*, *B. sterothermophilus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella derby*, *Candida utilis*, *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159, *Yarrowia lipolytica* TISTR 5054 รวมถึงจุลินทรีย์บางชนิดที่เป็นประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมซึ่งได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *Saccharomyces carlbergensis* TISTR 5345 และ *S. cerevisiae* นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนของปริมาณลูกเคียวต่อแอลกอฮอล์ 95% ที่ 50:200 และ 100:200 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์เหล่านี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองนี้สามารถเป็นแนวทางพัฒนาสารสกัดจากพืชเพื่อใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหารจากธรรมชาติได้

นางสาว เปรมสุดา มโนเชิษฐาพิณ
.....
น.ส. มูทิดา ปิยะสนธิ
.....

ลายมือชื่อนักศึกษา

(ดร.ศศิวิมล ชื่นอิม อาเหม็ด)

(ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา)

(วัน/เดือน/ปี)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญาโทนี้ ผู้ศึกษาขอกราบของพระคุณ ดร.ศศิวิมล ชื่นอัม
อาเหม็ด อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของ
โครงการ ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการนี้

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และญาติ ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนกำลังทรัพย์ในการ
ทำงานให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีและขอขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่ให้กำลังใจโดยตลอด

คณะผู้จัดทำ

31 มีนาคม 2549



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1	
บทนำ	1
วัตถุประสงค์การทดลอง	1
บทที่ 2	
วารสารปริทัศน์	2
บทที่ 3	
อุปกรณ์และวิธีทดลอง	9
บทที่ 4	
ผลการทดลอง	14
บทที่ 5	
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	19
เอกสารอ้างอิง	20
ภาคผนวก ก. ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ	21
ภาคผนวก ข. การเตรียมอาหารสำหรับการ Subculture เชื้อจุลินทรีย์	22
ภาคผนวก ค. ตารางเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเชื้อที่ใช้	24
ภาคผนวก ง. ภาพตัวอย่างการเกิดวงใสของการยับยั้งของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ ก.1-3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ของจุลินทรีย์ที่มีการเติมสารสกัดลูกเคียวที่มีสัดส่วนของลูกเคียวต่อตัวทำละลายต่างๆ ที่เวลา 0 , 18 และ 24 ชั่วโมง	24
ตาราง ก.4-17 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเคียว 50g และ 100g ต่อตัวทำละลาย 200 มิลลิลิตรของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	27
ตารางก.18-19 เปรียบเทียบความแตกต่างของขนาดวงใสของการยับยั้ง ระหว่างแบคทีเรียและยีสต์ที่สัดส่วนของปริมาณสารสกัดลูกเคียวต่อ ปริมาตรตัวทำละลายต่างๆ	41



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเคียว	12
ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์	12
ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์	13
ภาพที่ 3.4 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดโดยการติดตามค่าความขุ่น	13
ภาพที่ 4.1-4.3 การเจริญของเชื้อยีสต์ในอาหารเหลวที่มีการเติมสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเคียว และแอลกอฮอล์ 80% เปรียบเทียบกับน้ำกลั่นของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ	16
ภาพภาคผนวก ง. การเกิดวงใสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	
ภาพที่ ง. 1 <i>Bacillus cereus</i>	43
ภาพที่ ง. 2 <i>Bacillus sterothermophilus</i>	43
ภาพที่ ง. 3 <i>Bacillus subtilis</i>	43
ภาพที่ ง. 4 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	44
ภาพที่ ง. 5 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	44
ภาพที่ ง. 6 <i>Staphylococcus aureus</i>	44
ภาพที่ ง. 7 <i>Escherichia coli</i>	45
ภาพที่ ง. 8 <i>Salmonella derby</i>	45
ภาพที่ ง. 9 <i>Candida utilis</i>	45
ภาพที่ ง. 10 <i>Pichia sp.</i>	46
ภาพที่ ง. 11 <i>Rhodotorula glutinis</i> TISTR5159	46
ภาพที่ ง. 12 <i>Saccharomyces carlbergensis</i> TISTR5345	46
ภาพที่ ง. 13 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
ภาพที่ ง. 14 <i>Yarrowia lipolytica</i>	47

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเคียว	12
ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์	12
ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์	13
ภาพที่ 3.4 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดโดยการติดตามค่าความขุ่น	13
ภาพที่ 4.1-4.3 การเจริญของเชื้อยีสต์ในอาหารเหลวที่มีการเติมสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเคียว และแอลกอฮอล์ 80% เปรียบเทียบกับน้ำกลั่นของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ	16
ภาพภาคผนวก ง. การเกิดวงใสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	
ภาพที่ ง. 1 <i>Bacillus cereus</i>	43
ภาพที่ ง. 2 <i>Bacillus sterothermophilus</i>	43
ภาพที่ ง. 3 <i>Bacillus subtilis</i>	43
ภาพที่ ง. 4 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	44
ภาพที่ ง. 5 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	44
ภาพที่ ง. 6 <i>Staphylococcus aureus</i>	44
ภาพที่ ง. 7 <i>Escherichia coli</i>	45
ภาพที่ ง. 8 <i>Salmonella derby</i>	45
ภาพที่ ง. 9 <i>Candida utilis</i>	45
ภาพที่ ง. 10 <i>Pichia sp.</i>	46
ภาพที่ ง. 11 <i>Rhodotorula glutinis</i> TISTR5159	46
ภาพที่ ง. 12 <i>Saccharomyces carlbergensis</i> TISTR5345	46
ภาพที่ ง. 13 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
ภาพที่ ง. 14 <i>Yarrowia lipolytica</i>	47

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันมีการใช้สารต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial Agent) กันมากซึ่งส่วนใหญ่จะนำเข้าจากต่างประเทศทำให้มีราคาแพง ในขณะที่ประเทศไทยมีสมุนไพรมากมายและได้มีการค้นพบว่าสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ได้ ซึ่งทำให้สามารถใช้สารสกัดจากสมุนไพรทดแทนการใช้สารต้านจุลินทรีย์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะทำการศึกษาหาสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อนำมาพัฒนาเป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้กันในประเทศไทยต่อไป

โดยในการศึกษารั้วนี้จะนำสารสกัดที่ได้จากลูกเคียวซึ่งเป็นธัญพืชที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพทั้งในทางด้านโภชนาการและเภสัชวิทยา มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 14 ชนิด โดยจำแนกเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 6 ชนิด คือ *Bacillus cereus*, *B. sterothermophilus*, *B. subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *Staphylococcus aureus* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Salmonella derby* และเชื้อยีสต์ 6 ชนิด คือ *Candida utilis*, *Pichia sp.*, *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159, *Saccharomyces carlbergensis* TISTR 5345, *S. cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* TISTR 5054 โดยจะทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี agar diffusion และเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดที่มีสัดส่วนของปริมาณลูกเคียวต่อปริมาตรของตัวทำละลายไม่เท่ากัน

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของปริมาณลูกเคียวต่อปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้สกัด
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเคียว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาสารต้านจุลินทรีย์จากลูกเคียวเพื่อทดแทนสารปฏิชีวนะหรือวัตถุกันเสียในอาหารได้

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

ลูกเดือย (Job's Tear Grass) (http://www.doa.go.th/pl_data/02_LOCAL/oard3/duay/body.html)

ชื่อวิทยาศาสตร์ Coix lachryma-jobi Linn

Family : GRAMINEAE

เป็นพืชพื้นเมืองทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และในประเทศไทยถือเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศ มีการเพาะปลูกมากในภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ ลูกเดือยมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว มีสารอาหารสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารอาหารจำพวกโปรตีน และยังพบสารที่มีองค์ประกอบเป็นกรดอะมิโน รวมถึงวิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ เช่น วิตามินบี 1, บี 2 ,วิตามินอี, แคลเซียม, ฟอสฟอรัส เป็นต้น จากการค้นคว้าและวิจัยยังพบว่า มีสารหลายตัวที่มีสรรพคุณช่วยในการรักษาเกี่ยวกับโรคภูมิคุ้มกัน และยับยั้งสารส่งเสริมการก่อมะเร็ง ลดคลอเลสเตอรอลในเลือด

ชื่ออื่น มะเดย (เหนือ)

ต้น ออกเป็นช่อ ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ต่างช่อ ดอก แต่อยู่ต้นเดียวกัน

ใบ เป็นใบแคบและยาว ปลายใบแหลม ขอบใบขนาน

ดอก เป็นไม้ล้มลุก อายุเพียงหนึ่งปี ลำต้นแตกกิ่งก้านเล็กน้อย เป็นพืชอยู่ในวงศ์เดียวกับ ข้าว อ้อย ข้าวโพด ลำต้นคล้ายข้าวโพดแต่มีขนาดเล็กกว่า

ผล รูปร่างกลมยาว หัวท้ายเล็กลง เปลือกแข็งมาก เนื้อน้อย พอแก่จัดมีสีเทาเงิน ใช้เป็นอาหาร

เมล็ด คัดหรือหนึ่งรับประทานแทนข้าว ทำขนมเปียกลูกเดือย ใส่น้ำผึ้ง น้ำเต้าหู้ ทำแป้ง ทำน้ำลูกเดือย

คุณค่าทางโภชนาการ เมล็ดเดือยมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีส่วนประกอบทางเคมีดังนี้ คือ

- น้ำ 10.8 เปอร์เซ็นต์
- โปรตีน 13.6 เปอร์เซ็นต์
- ไขมัน 6.1 เปอร์เซ็นต์
- แป้ง 58.5 เปอร์เซ็นต์
- เยื่อใย 8.4 เปอร์เซ็นต์
- จี๊เจ้า 2.6 เปอร์เซ็นต์
- เดือยมีโปรตีนและไขมันสูงกว่าข้าวและข้าวโพด
- ในเมล็ดเดือยยังมีแร่ธาตุอื่นๆ เช่น ฟอสฟอรัส โพแทสเซียมและแคลเซียม เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบทางเคมีของแป้งเคี้ยว 100 กรัม ประกอบด้วย (http://www.doa.go.th/pl_data/02_LOCAL/oard3/duay/body.html)

- พลังงาน 380.0 แคลอรี
- น้ำ 11.2 กรัม
- โปรตีน 15.4 กรัม (Glutamic acid Leucine Tyrosine Arginine Histidine Lysine)
- ไขมัน 6.2 กรัม (Myristic acid Palmitic acid)
- คาร์โบไฮเดรต 65.3 กรัม
- ไฟเบอร์ 0.8 กรัม
- เถ้า 1.9 กรัม
- แคลเซียม 25.0 มิลลิกรัม
- ฟอสฟอรัส 435.0 มิลลิกรัม
- เหล็ก 5.0 กรัม
- thiamine 0.28 มิลลิกรัม
- Riboflavin 0.19 มิลลิกรัม
- niacin 4.30 มิลลิกรัม

สาระสำคัญและผลงานวิจัยทางเภสัชวิทยาของลูกเคี้ยว (http://www.doa.go.th/pl_data/02_LOCAL/oard3/duay/body.html)

โคอิกโซล (Coixol) มีฤทธิ์คล้ายอาการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ และป้องกันการชัก ลดความดันโลหิตได้ชั่วคราวลดน้ำตาลในเลือด และลดไข้ นักวิจัยชาวญี่ปุ่น พบว่ารากเคี้ยวก็มีสารโคอิกโซลและพบว่ารากเคี้ยวมีฤทธิ์แก้ปวดและขับปัสสาวะ

โคอิกซิโนไลด์ (Coixenolide) จากการศึกษาวิจัยพบว่ามีฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเนื้องอก (antineoplastic) ช่วยยับยั้งการเกิดมะเร็ง น้ำมันเคี้ยว (Coix oil) มีประมาณ 5.9-9.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วยสารสำคัญคือ กรดโคอิก (Coix acid) และกรดพาลมิติก (Palmitic acid)

น้ำมันจากลูกเคี้ยว มีฤทธิ์กระตุ้นศูนย์การหายใจ ลดความอ่อนเปลี้ยของร่างกาย ลดความดันโลหิตและขับปัสสาวะ

สรรพคุณในตำรายาจีน ในตำรายาจีนจะใช้ลูกเคี้ยวบดผสมข้าว ต้มเป็นข้าวต้มรับประทานทุกวันเพื่อบำรุงกำลัง หล่อลื่นกระเพาะอาหารและลำไส้ แก้บวม น้ำ ปวดข้อเรื้อรัง แก้ไข้ แก้ท้องเสีย แก้เหน็บชา ชักกระตุก แก้ฝีหลายหัวในลำไส้ แก่สตรีตกขาวมาก กว่า ปกติ ทั้งยังเชื่อว่าการรับประทานลูกเคี้ยวต้มน้ำตาลทุกวันสามารถที่จะแก้ร้อนในได้

สรรพคุณในตำรายาไทย แก้ปวดเข่า ปวดข้อ ไขข้ออักเสบ บำรุงกำลัง ไขข้อ บำรุงม้าม และดับ แก้ไข้ แก้ท้องเสีย เหน็บชา ยับยั้งการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหาร มะเร็งมดลูก แก่ชักกระตุก ปวดอ่อนแอ ไอเป็นเลือด ตกขาว ป้องกันการเกิดฝีที่ลำไส้ หูด ร้อนในกระหายน้ำ แก้ทางเดินหายใจหรือ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางเดินปัสสาวะอักเสบ ขับเสมหะ ช่วยย่อยอาหาร บำรุงเส้นผมและผิวหนัง ทำให้ผิวพรรณสวยงาม

ลูกเดือยยังมีสรรพคุณในการรักษาโรคหูดที่มันจะเป็นเรื่องจริง โดยมีการทดลองในคนไข้ 23 ราย โดยให้คนไข้รับประทานลูกเดือย 60 กรัมคัมกับข้าวรับประทานวันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันจนหาย หลังจากกินลูกเดือยติดต่อกัน 7-16 วัน ได้ผลหายขาด 11 ราย อาการดีขึ้น 8 ราย ไม่ได้ผล 6 ราย ซึ่งอาจเป็นเพราะสารจากลูกเดือยมีฤทธิ์ทำให้เลือดมาเลี้ยงที่ผิวหนังดีขึ้น(http://www.kalathai.com/abstract/view_news.php?article_id=139)

ฤทธิ์ยับยั้งสารส่งเสริมการก่อมะเร็ง (http://www.swu.ac.th/royal/book3/b3c3t2_1.html)

สารที่ได้จากการสกัดลูกเดือยด้วยเมธานอลและ α -monolinolein ซึ่งแยกมาจากสารสกัดเมธานอลมีผลยับยั้งการกระตุ้นของสารที่ส่งเสริมการก่อมะเร็ง (tumor promoter) เช่น 12-o-tetradeca-noylphorbol-3 (TPA) และมีผลยับยั้งการเกิดมะเร็งในหนูถีบจักร (ICR mice) ซึ่งใช้ methylbenz-anthracene เป็นสารเริ่มก่อมะเร็ง (tumor inhibitor) และ TPA เป็นสารส่งเสริมการก่อมะเร็ง

ฤทธิ์เป็นพืชต่อเซลล์ (http://www.swu.ac.th/royal/book3/b3c3t2_1.html)

การศึกษาความเป็นพืชต่อเมล็ดเลือดขาวของคน โดยทดสอบกับสารสกัดด้วยน้ำร้อนของ pericarps , เปลือกหุ้มเมล็ด , astringen seed coat ของลูกเดือย และลูกเดือย พบว่าสารสกัดเฉพาะจากเปลือกหุ้มเมล็ดเท่านั้นที่เป็นพืชต่อเมล็ดเลือดขาว

นอกจากนี้ลูกเดือยยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆที่น่าสนใจ ได้แก่ ด้านเชื้อแบคทีเรีย รา ยีสต์ เร่งการงอกของเส้นผม เร่งการสร้างผิวหนังและเพิ่มการไหลเวียนโลหิต ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มกันและทำให้เรือดเตรียมโตคือคล้ายเกาะกลุ่ม ทำให้อุจจาระกลุ่ม ด้านการอักเสบ ลดคลอเลสเตอรอลในเลือด ลดความดันโลหิต ลดอุณหภูมิร่างกาย แก้ปวดและขับปัสสาวะ เหนียวน้ำให้เกิดการตกไข่ ด้านเอนไซม์ amylase

คุณสมบัติที่ใช้รักษาโรคของลูกเดือย (<http://158.108.70.5/kusbotanic/sara/vegetable1/23duey.html>)

1. รักษาโรคบวมน้ำ
2. เป็นยาขับปัสสาวะเป็นสียเหลืองในเด็กและปัสสาวะนั้นมีกลิ่นฉุน ปัสสาวะติดขัดในทารก
3. โรคแน่นหน้าอก
4. ปวดเส้นประสาท
5. ระงับอาการไอ
6. รักษาอาการกล้ามเนื้อตึง
7. รักษาไส้ในทารก
8. โรคผิวหนัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของลูกเต๋อย (สุมาลีและจุฑามาศ ,2542)

วิธี Agar diffusion อาศัยหลักการแพร่โดยสารที่ต้องการตรวจสอบจะแพร่จากจุดเริ่มต้นออกไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์จะเป็นสัดส่วนกับระยะทางในการแพร่ ดังนั้นในความเข้มข้นหนึ่งจะพบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ ผลที่เกิดขึ้นคือการปรากฏเป็นโซนใส (Inhibition zone) หลังจากบ่มครบเวลาที่กำหนด ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า ความกว้างของโซนใสจะบอกถึงความสามารถของสารต้านจุลินทรีย์ว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้มากน้อยเพียงใดและผลที่ได้จากการทดสอบนี้สามารถนำไปเป็นแนวทางในการเลือกสารสกัดสมุนไพรที่จะนำไปพัฒนาเพื่อผลิตเป็นสารต้านจุลินทรีย์โดยอาจเลือกจากสมุนไพรที่สามารถให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มาก แต่ถ้าไม่เกิดโซนหรือโซนมีขนาดเล็กกว่ากำหนดจะถือว่าเชื้อดื้อยา (resistance) หรือก็คือสารนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์น้อย หรือไม่มีฤทธิ์เลย ซึ่งขนาดของโซนใสจะขึ้นกับ physico-chemical properties ของสารแต่ละตัวซึ่งมีผลให้อัตราการซึมผ่านวุ้น (diffusion rate) ต่างกัน

การเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพร มีขั้นตอนต่างๆดังนี้

- 1.การเตรียมตัวอย่างพืช (Plant material preparation)
- 2.การสกัด (Extraction)
- 3.การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentration)
- หากต้องการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์จะมีขั้นตอนต่อไปคือ
- 4.การแยกส่วนประกอบ (Seperation)
- 5.การตรวจสอบเอกลักษณ์ (Identification)

1.การเตรียมตัวอย่างพืช (Plant material preparation)

การเตรียมตัวอย่างพืชนับเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญซึ่งต้องคำนึงถึงสิ่งที่มีผลต่อความแตกต่างของสารสำคัญในพืชได้แก่

- 1.1.การตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้อง
- 1.2. ไม่มีพืชอื่นปน เพราะจะทำให้ได้สารแปลกปลอม
- 1.3. ไม่มีโรคพืช

1.4.ความแตกต่างของสารสำคัญในพืช ในการเก็บพืชแต่ละครั้งเพื่อนำมาสกัดสารสำคัญอาจแตกต่างกันทั้งปริมาณและชนิด ซึ่งเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่นความแตกต่างเนื่องจากสายพันธุ์ แหล่งปลูก เป็นต้น

1.5.ผลของการเก็บรักษาและการเตรียมพืชในการทำพืชให้แห้งบางครั้งจะทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรเสียไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก่อนเริ่มการสกัดสารสำคัญของพืช ถ้าไม่นำพืชสดนำมาสกัดโดยตรงอาจทำให้สมุนไพรแห้งก่อนที่จะนำมาสกัดเพื่อความสะดวกและช่วยลดปริมาณของตัวทำละลายซึ่งต้องใช้สกัดในขั้นตอนต่อไป ขั้นตอนนี้อาจทำได้โดยการทิ้งให้พืชแห้งในอากาศ หรือให้ความร้อนจากพลังงานอื่นๆ เช่น ตู้อบไฟฟ้า ก็ได้ จากนั้นจึงทำการแตกย่อยเนื้อเยื่อเพื่อทำให้การสกัดสารสำคัญจากพืชได้ผลดีขึ้น ซึ่งอาจอาศัยการบดในกรณีที่พืชแห้ง หรือหั่นถ้าเป็นพืชสดก็ได้

การทำสมุนไพรให้แห้งโดยทั่วไปทำให้การสกัดได้ผลดี เมื่อสามารถสกัดสารจากพืชสดโดยการนำเอาพืชสดมาต้มกับแอลกอฮอล์เพื่อฆ่าเอนไซม์เสียก่อน เป็นการป้องกันไม่ให้สารเคมีในพืชเกิดการเปลี่ยนแปลง จากนั้นจึงนำไปทำการสกัด แต่วิธีการเหล่านี้ไม่สะดวกและไม่เหมาะสมกับงานในลักษณะอุตสาหกรรม จึงจำเป็นต้องนำตัวอย่างพืชสดมาทำให้แห้งเสียก่อน

2. การสกัดสารสำคัญจากพืช (สุมาลีและจุฑามาศ, 2542)

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดต่างกันวิธีเหล่านั้นได้แก่

2.1. Maceration

เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือ โถ เป็นต้น ทิ้งไว้ 3 วันหมั่นเขย่าหรือคนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆรินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (Mare) ให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง การสกัดนี้จะสกัดให้หมด (exhausted) อาจจำเป็นต้องสกัดซ้ำหลายๆครั้ง วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อนแต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2.2. Percolation

เป็นวิธีสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Percolator นำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงเพื่อให้พองตัวเต็มที่ แล้วค่อยๆบรรจุผงยาที่ละเอียดลงใน Percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพรประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออกโดยคอยเติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนการสกัดสมบูรณ์ บีบกากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกับแล้วนำไปกรอง

2.3. การสกัดด้วย Soxhlet Extractor

เป็นวิธีการสกัดอย่างต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในขวดรูปชมพู่ระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาใน thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้

2.4. Liquid-liquid Extraction เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

แยกสารเป็นอีกสารหนึ่งซึ่งมีคุณสมบัติต่างกัน โดยนำสารที่ต้องการแยกมาใส่ในภาชนะแยก แล้วนำตัวทำละลายที่ละลายสารที่ต้องการแยกมาใส่ในภาชนะแยก แล้วนำตัวทำละลายที่ละลายสารที่ต้องการแยกมาใส่ในภาชนะแยก แล้วนำตัวทำละลายที่ละลายสารที่ต้องการแยกมาใส่ในภาชนะแยก

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Extractant lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร
- Raffinate lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดหนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

2.5. Extraction by thermomicrodistillation

เป็นการสกัดสารโดยใช้เครื่องมือ Thermomicro Analysis and Separation (TAS oven) เป็นการสกัดสารขนาดน้อยมากๆ

การเลือกใช้ตัวทำละลายในการสกัดจะได้ผลดีหรือไม่อยู่ที่การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม

ตัวทำละลายที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่เราต้องการสกัดได้ดีพอ
2. ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป
3. ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด
4. ไม่เป็นพิษ
5. ราคาพอสมควร

ในการเลือกใช้ตัวทำละลายอาศัยหลักเกณฑ์ต่อไปนี้ เช่น

- สารละลายตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน
- ละลายสารที่ต้องการออกมาให้มากที่สุด ในขณะที่ละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด (มี Selectivity ดีกว่า)

ตัวทำละลายที่ใช้กันมาก ได้แก่

1. คลอโรฟอร์ม เป็นตัวทำละลายที่ดี แต่มี Selectivity น้อย เกิด emulsion ง่าย ถ้าสกัดสารที่เป็นด่างแก่อาจสลายตัวให้กรดเกลือ
2. อีเธอร์ มีความสามารถในการละลายน้อยกว่าคลอโรฟอร์ม แต่มี Selectivity ดีกว่า ข้อเสียคือระเหยง่าย ระเบิดง่าย เกิดออกไซด์ง่ายและดูดซับน้ำมาก
3. เฮกเซน เหมาะสำหรับพวกสารไม่มีขั้ว มักใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับกำจัดไขมันจากสมุนไพร ข้อดีคือราคาถูก
4. แอลกอฮอล์ ที่นิยมใช้กันมากคือ เมธานอล และ เอทานอล

การสกัดอย่างเป็นขั้นตอนอาจทำได้หลายแบบคือ

- การสกัดโดยเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย โดยเริ่มจากตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วไปถึงตัวทำละลายที่มีขั้ว
- การสกัดโดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นกรดและด่างของสาร อาจทำโดยสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วแยกกลุ่มโดย partition กับกรดและด่าง หรืออาจใช้ Ion exchange chromatography

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การสกัดสารแต่ละกลุ่มที่ใช้มากทางยา จะมีวิธีสกัดเฉพาะสารแต่ละกลุ่ม ซึ่งมีคุณสมบัติทางเคมีที่ต่างกัน

3.การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentration) (สุมาลีและจุฑามาศ ,2542)

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักมีปริมาณมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนไม่สะดวก และไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อน ซึ่งอาจทำได้หลายวิธีคือ

3.1.Free evaporation คือการระเหยแห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือ hot plate

3.2.Distillation in vacuo เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ vacuum pump เครื่องมือนี้เรียกว่า Rotary evaporator ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ distillation flask , condenser และ receiving flask

3.3.การแช่แข็ง (Freezing) ถ้าเป็นสารสกัดด้วยน้ำใช้ lyophilizer หรือ freeze dryer แต่ถ้าเป็นตัวทำละลายอื่น เฉพาะตัวทำละลายเท่านั้นที่แข็ง ซึ่งเราแยกจาก concentrated extract โดยการ centrifuge

3.4.Ultrafiltration เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้เมมเบรน

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

ชนิดจุลินทรีย์	ชื่อเชื้อจุลินทรีย์
แบคทีเรียแกรมบวก	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus sterothermophilus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>
แบคทีเรียแกรมลบ	<i>Salmonella derby</i>
ยีสต์	<i>Candida utilis</i> <i>Pichia sp.</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> TISTR 5159 <i>Saccharomyces carlbergensis</i> TISTR 5345 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Nutrient broth (NB)
- Nutrient Agar (NA)
- Yeast extract malt extract broth (YM Broth)
- Yeast extract malt extract agar (YM Agar)
- Deman rogasa and sharp medium broth (MRS Broth)
- Deman rogasa and sharp medium agar (MRS Agar)
- Deman rogasa and sharp medium -IM Broth (MRS-IM)
- Deman rogasa and sharp medium -IM Agar (MRS-IM)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารเคมี

- โซเดียมคลอไรด์ 0.8%
- เอธิลแอลกอฮอล์ 70%, 80% และ 95%

3.4. เครื่องแก้วปราศจากเชื้อ

- ขวดรูปชมพู่ 500 มิลลิลิตร
- ปิเปต 1,10 ml
- หลอดทดลอง 18 x 150 มิลลิลิตร พร้อมจุกพลาสติก
- จานเพาะเชื้อ
- บีกเกอร์ 300 , 600 มิลลิลิตร

3.5 อุปกรณ์

- หลอดเอพเพนดรอฟ
- แท่งแก้วคน
- paper disc ฆ่าเชื้อ
- ลูบเจียเชื้อ
- แหนบ
- ลูกยางใหญ่
- ไมโครปิเปตขนาด 0 – 20 ไมโครลิตรและทิปฆ่าเชื้อ
- เครื่องผสม (วอร์เท็กซ์มิกเซอร์)
- ไม้บรรทัด
- ไฟแชค
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- สำลี
- ปากกาเขียนแก้ว
- ตะแกรง
- ซ้อนตักสาร
- ตะกร้าพลาสติก
- เครื่องชั่งสารยี่ห้อ Mettler รุ่น PE 3000
- ตู้บ่มเชื้อยี่ห้อ Heraeus
- เครื่อง Autoclave
- ตู้อบลมร้อน
- เครื่องระเหยสุญญากาศ ยี่ห้อ Buchi รุ่น R-114

เอกสารนี้เป็น **กระดานกรองเบอร์ 1, 4** การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ชุดเครื่องกรองสูญญากาศ
- กิวเวตแก้ว
- เครื่องปั่นไฟฟ้า
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การเตรียมสารสกัดจากลูกเห็บ

นำลูกเห็บบดละเอียด 50 กรัมและ 100 กรัม แช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ 95% ปริมาณ 200 ml. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 170 rpm เป็นเวลา 3 วัน นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นกรองซ้ำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เอาแต่ส่วนใสนำไปทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator จนเหลือปริมาตรของสารสกัดประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรสารที่กรองได้บรรจุใส่ในหลอดเอพเพนดรอฟและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

3.6.2 การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

นำจุลินทรีย์มาเลี้ยงในอาหารเหลวในหลอดทดลอง โดยเชื้อแบคทีเรียจะเลี้ยงใน NB ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อยีสต์เลี้ยงใน YM ที่อุณหภูมิ 30 – 33 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง แบคทีเรียแลคติกเลี้ยงใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ให้ได้ปริมาณของเชื้อ 10^7 - 10^8 cfu/ml เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อไว้สำหรับทำการทดสอบให้มีความหนาประมาณ 2 – 3 มิลลิเมตร วางบนพื้นเรียบ ร่อนอาหารแห้งตัว

3.6.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเห็บ

3.6.3.1 วิธี Agar diffusion

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารแข็งโดยใช้วิธี Spread plate จากนั้นใช้แผ่นก๊อปที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหนีบ paper disc วางลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วหยดสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเห็บปริมาณ 15 ไมโครลิตร ลงบน paper disc ใช้สารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ 80% เป็นการทดลองควบคุม จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อโดยเชื้อแบคทีเรียบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อยีสต์บ่มที่อุณหภูมิ 30 -33 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง แบคทีเรียแลคติกบ่มที่อุณหภูมิ 37 – 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง

3.6.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยการติดตามค่าความขุ่น

ปีเปตซ์สเฟนชันของเชื้อจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลวอยู่ 9 มิลลิลิตร จากนั้นปีเปตสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเห็บ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดความขุ่น ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ที่เวลา 0 , 18 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้น้ำกลั่นและเอธิลแอลกอฮอล์ 80% เป็นการทดลองควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



****สำหรับการทดลองควบคุมใช้เอธานอล 80% แทนสารสกัด****

รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Agar diffusion



****สำหรับการทดลองควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัด****

รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดโดยการติดตามค่าความขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดลูกเคียบโดยวิธี Agar diffusion

จากการทดลองสกัดสารจากลูกเคียบโดยใช้เอธิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นตัวทำละลายโดยแปรสัดส่วนของปริมาณลูกเคียบต่อปริมาตรตัวทำละลายเท่ากับ 50 : 200 และ 100 : 200 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปทำให้เข้มข้นจากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ แล้ววัดระยะการเกิดวงใสซึ่งแสดงผลการทดสอบในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบและระยะการเกิดวงใสของการยับยั้ง (Clear zone)

เชื้อจุลินทรีย์	ปริมาณเชื้อ จุลินทรีย์ (cfu/ml)	ระยะการเกิดวงใสของการยับยั้ง (mm)		
		แอลกอฮอล์ 80%	ลูกเคียบ (g) : Ethanol (ml)	
			50:200	100:200
<i>B. cereus</i>	1.38×10^8	0	4.16 ± 1.13	4.62 ± 1.14
<i>B. sterothermophilus</i>	1.82×10^8	0	3.57 ± 1.27	3.75 ± 0.83
<i>B. subtilis</i>	1.84×10^8	0	3.39 ± 0.53^b	5.12 ± 1.75^a
<i>L. acidophilus</i>	1.61×10^8	0	3.74 ± 1.19^a	2.17 ± 1.17^b
<i>L. bulgaricus</i>	1.41×10^8	0	4.43 ± 1.42	4.00 ± 1.56
<i>S. aureus</i>	1.76×10^8	0	3.55 ± 0.94	3.81 ± 0.80
<i>E coli</i>	1.77×10^8	0	3.37 ± 0.59	$2.88 \pm 1.3.3$
<i>S. derby</i>	9.06×10^7	0	3.83 ± 1.07	2.63 ± 1.16
<i>C. utilis</i>	9.48×10^7	0	4.43 ± 1.24	5.47 ± 2.74
<i>Pichia sp.</i>	1.69×10^8	0	4.42 ± 1.11	5.31 ± 1.21
<i>R. glutinis</i> TISTR5159	2.20×10^8	0	5.42 ± 1.17	4.62 ± 1.14
<i>S. carlbergensis</i> TISTR5345	2.67×10^8	0	3.52 ± 1.12	1.98 ± 1.40
<i>S. cerevisiae</i>	1.06×10^8	0	3.52 ± 0.75	3.37 ± 0.65
<i>Y. lipolytica</i>	2.58×10^8	0	4.88 ± 0.70	3.61 ± 1.27

หมายเหตุ : ตัวอักษร a และ b หมายความว่ามีความแตกต่างของระยะวงใสที่เกิดจากการใช้สารสกัดที่มีสัดส่วนของปริมาณลูกเคียบต่อปริมาณตัวทำละลายไม่เท่ากันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

:ไม่ได้มีตัวอักษรหมายความว่าไม่มีความแตกต่างของระยะวงใสที่เกิดจากการใช้สารสกัดที่มีสัดส่วนของปริมาณลูกเคียบต่อตัวทำละลายไม่เท่ากันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

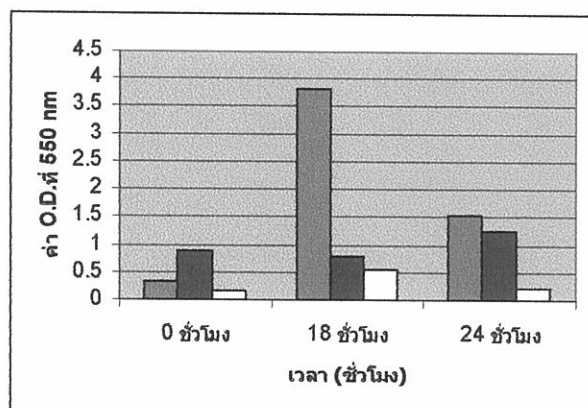
จากผลการทดลองเมื่อเพิ่มสัดส่วนของปริมาณลูกเห็บต่อปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้สกัดจาก 50: 200 เป็น 100 : 200 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเห็บให้ขนาดของวงใสของการยับยั้งระหว่างแบคทีเรียและยีสต์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการสังเกตพบว่าเมื่อนำสารสกัดไประเหยแห้ง สารสกัดที่เหลืออยู่มีลักษณะคล้ายน้ำมัน จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารประกอบในลูกเห็บที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์น่าจะอยู่ในสารที่มีลักษณะคล้ายน้ำมันดังกล่าว

จากการทดสอบด้วยแอลกอฮอล์ 80% ซึ่งเป็นการทดลองควบคุมพบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ได้แสดงว่าปริมาณแอลกอฮอล์ที่เหลืออยู่ในสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเห็บนั้น ไม่มีผลต่อการเกิดวงใสของการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบจึงสามารถสรุปได้ว่า วงใสที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลมาจากฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเห็บ

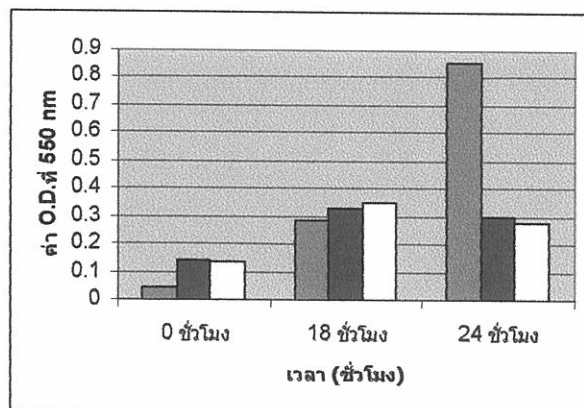
4.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเห็บต่อการเจริญของจุลินทรีย์ใน

อาหารเหลว

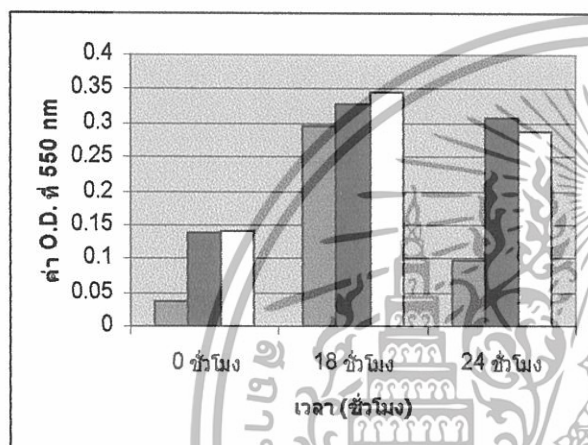
จากการติดตามการเจริญโดยการวัดค่าความขุ่นของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใส่สารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเห็บที่เวลา 0 , 18 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้ น้ำกลั่นและแอลกอฮอล์ 80% เป็นการทดลองควบคุมพบว่า ค่าความขุ่นของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใส่สารสกัดแอลกอฮอล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับกรณีที่เติมน้ำกลั่นและแอลกอฮอล์ (รูปที่ 4.2 และ 4.3) แสดงว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเห็บไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวได้แต่กลับเป็นการส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งนี้เนื่องจากในสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเห็บอาจมีสารอาหารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ เช่น วิตามินและแร่ธาตุต่างๆ นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งด้วยวิธี Agar diffusion นั้นปริมาณสารสกัดที่สัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์นั้นมีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับการเติมลงในอาหารเหลวซึ่งทำให้สารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเห็บมีความเข้มข้นไม่เพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์



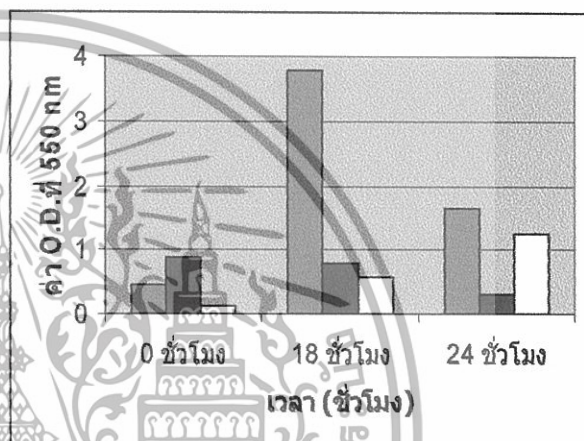
(ก)



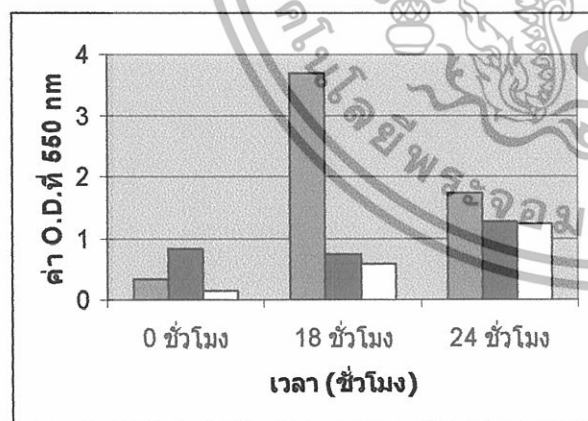
(ข)



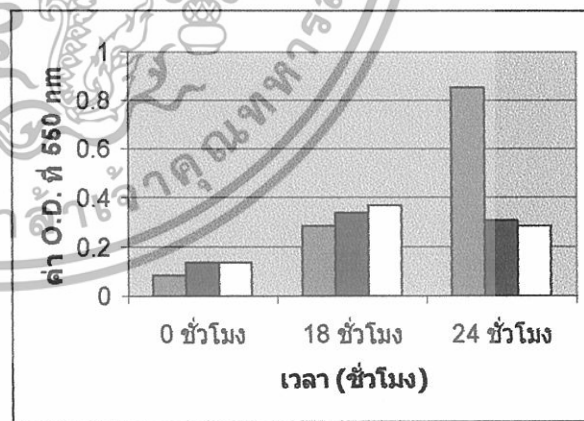
(ค)



(ง)



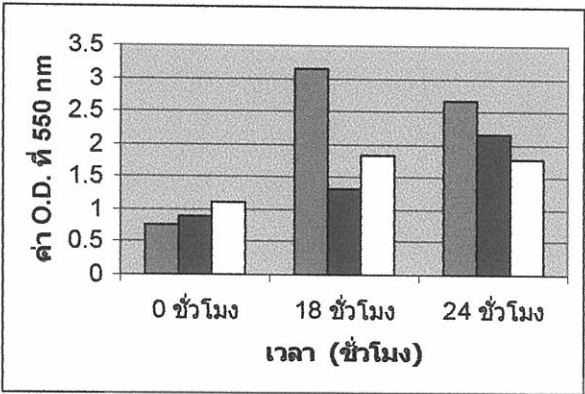
(จ)



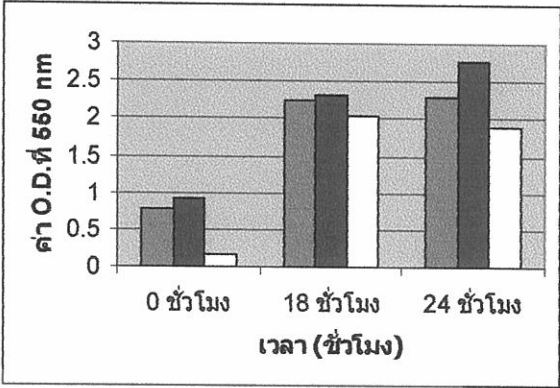
(ฉ)

รูปที่ 4.2 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลวที่มีการเติมสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเคี้ยว (■) เปรียบเทียบกับ น้ำกลั่น (■) และแอลกอฮอล์ 80% (□) ของ *B. cereus* (ก) ; *B. stercophilus* (ข) ; *B. subtilis* (ค) ; *L. acidophilus* (ง) ; *L. bulgaricus* (จ) ; *S. aureus* (ฉ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



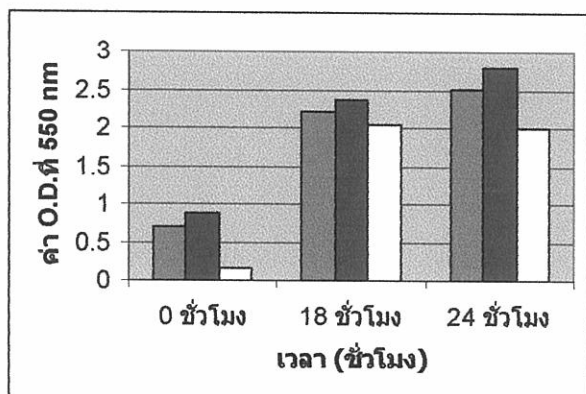
(ก)



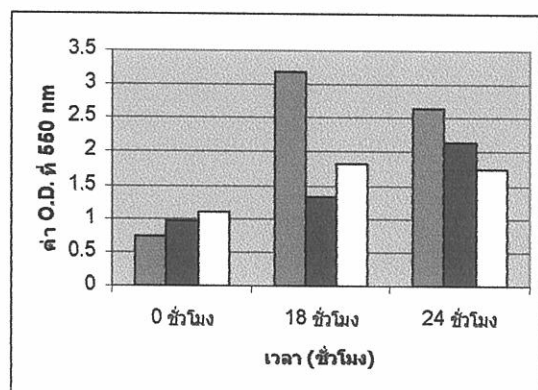
(ข)

รูปที่ 4.2 การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลวที่มีการเติมสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเคือช (■) เปรียบเทียบกับ น้ำกลั่น (■) และแอลกอฮอล์ 80% (□) ของ *E. coli* (ก) ; *S. derby* (ข)

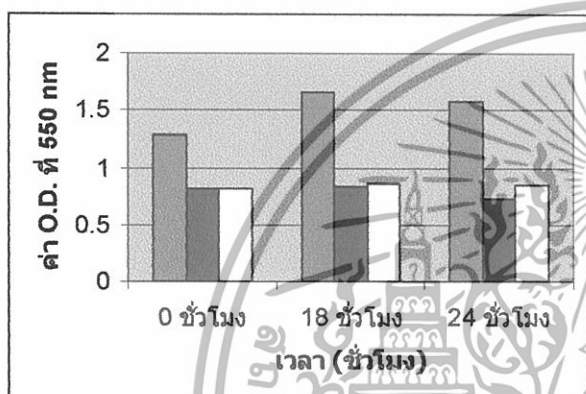




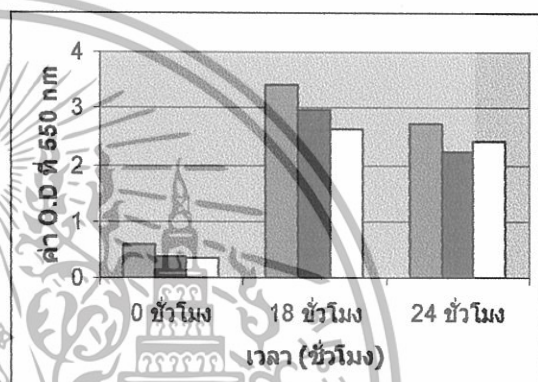
(ข)



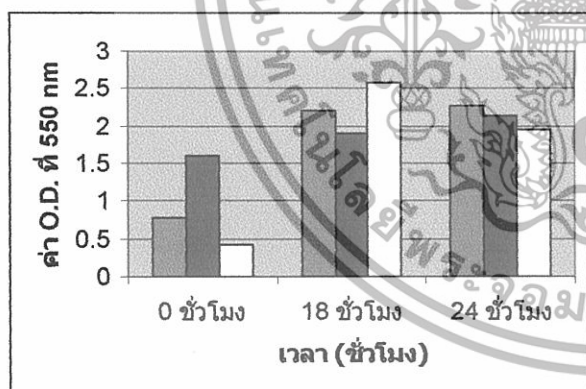
(ค)



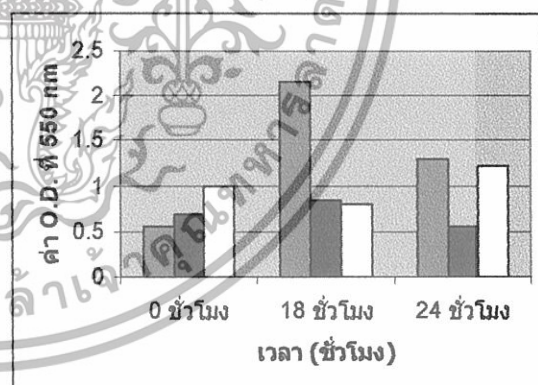
(ง)



(จ)



(ฉ)



(ช)

รูปที่ 4.3 การเจริญของเชื้อยีสต์ในอาหารเหลวที่มีการเติมสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเคียว (■) เปรียบเทียบกับ น้ำกลั่น (■) และแอลกอฮอล์ 80% (□) ของ *C. utilis* (ข) ; *Pichia sp.* (ค) ; *R. glutinis* (ง) ; *S. carlbergnesis* (จ) ; *S. cerevisiae* (ฉ) ; *Y. lipolytica* (ช)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 จากผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดลูกเดี๋ยด้วยวิธี Agar diffusion พบว่าสารสกัดจากลูกเดี๋ยที่มีสัดส่วนของปริมาณลูกเดี๋ยต่อปริมาณตัวทำละลายเท่ากับ 50 : 200 และ 100 : 200 สามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมดที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *B. cereus*, *B. sterothermophilus*, *B. subtilis*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. derby*, *C. utilis*, *Pichia sp.*, *R. glutinis* TISTR 5159, *S. carlsbergensis* TISTR 5345, *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* TISTR 5054

5.2 การทดสอบความแตกต่างของระยะวงใสของการยับยั้งที่เกิดจากการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเดี๋ยที่ได้จากการใช้สัดส่วนของปริมาณลูกเดี๋ยต่อปริมาตรของตัวทำละลายเท่ากับ 50 : 200 และ 100 : 200 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรพบว่าระยะการเกิดวงใสของการยับยั้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงควรเลือกใช้สัดส่วน 50:200 ซึ่งให้ผลของวงใสไม่ต่างไปจากสัดส่วน 100:200

5.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวพบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จากลูกเดี๋ยไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ อาจเนื่องจากปริมาณสารที่ใช้ในการยับยั้งไม่เพียงพอ

ข้อเสนอแนะ

ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดลูกเดี๋ยในอาหารเหลวควรใช้วิธีการตรวจนับเชื้อแทนวิธีการวัดค่าความขุ่น ณ เวลาต่างๆ โดยเฉพาะในระยะแรกของการทดสอบ เพื่อที่จะทำให้ทราบจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่แน่นอนในแต่ละช่วงเวลา

เอกสารอ้างอิง

สุมาลี นันทวุฒิกุล และ จุฬามาศ พักประไพ .2542. การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัด
พืชสมุนไพร.โครงการปริญญาโทพนธ์ ปริญญาเกษตรศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ฐานความรู้ด้านพืช กรมวิชาการเกษตร.[http://www.doa.go.th/pl_data/02_LOCAL/oard3/duay](http://www.doa.go.th/pl_data/02_LOCAL/oard3/duay/body.html)
/body.html (accessed10/3/2006).

ลูกเดือย รัญพืชเพื่อสุขภาพ. http://www.kalathai.com/abstract/view_news.php?article_id=139
(accessed28/4/2006)

ลูกเดือย. <http://158.108.70.5/kusbotanic/sara/vegetable1/23ducy.html> (accessed19/3/2006)

สมุนไพรรักษาโรคมะเร็งกับงานวิจัย.http://www.swu.ac.th/royal/book3/b3c3t2_1.html(accessed
20/1/2006)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Agar	15 g
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	1000 ml

2. Yeast extract malt extract agar (YM)

Yeast extract	3 g
Glucose	10 g
Malt extract	3 g
Peptone	5 g
Agar	10 g
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	1000 ml

3. Deman rogasa and sharp medium agar (MRS)

MRS Broth	1.8342 oz
Agar	15 g
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	1000 ml

4. Deman rogasa and sharp medium-IM Agar (MRS-IM)

Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
Tween80	1 g
Di-Potassium Hydrogen phosphate	2.6 g
Sodium acetate.3H ₂ O	5 g
Ammonium Hydrogen citrate	2 g
Manganese(II)-sulphate.H ₂ O	0.05 g
Magnesium sulphate,7H ₂ O	0.2 g
Agar	13 g
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้	1000 ml

เอกสารนี้**ก่อนที่จะนำไปใช้ ต้องมีการเดิมสารละลาย maltose 20% ด้วย** อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ภาคผนวก ข.

การเตรียมอาหารสำหรับการ Subculture เชื้อจุลินทรีย์

- แบคทีเรีย : ใช้ NA

เตรียมโดย ชั่งส่วนประกอบตามสูตร ละลายในน้ำจนได้สารละลายใส หลังจากนั้นปิเปต ใส่ หลอดทดลองหลอดละ 6 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุก นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยความร้อนโดยหม้อนึ่งไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

- ยีสต์ : ใช้ YM Agar

เตรียมโดยการชั่งส่วนประกอบตามสูตร ละลายในน้ำจนได้สารละลายใส หลังจากนั้นนำ สารละลายที่เตรียมได้มาปิเปต ใส่ หลอดทดลองหลอดละ 6 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุก นำไปทำให้ปราศจาก เชื้อด้วยความร้อนโดยหม้อนึ่งไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

- *Lactobacillus acidophilus* ใช้ : MRS-IM Agar

เตรียมโดยการชั่งส่วนประกอบตามสูตร ละลายในน้ำจนได้สารละลายใส หลังจากนั้นนำ สารละลายที่เตรียมได้มาปิเปต ใส่ หลอดทดลองหลอดละ 6 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุก นำไปทำให้ปราศจาก เชื้อด้วยความร้อนโดยหม้อนึ่งไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

- *Lactobacillus bulgaricus* ใช้ : MRS Agar

เตรียมโดยการชั่ง MRS broth ละลายน้ำจนได้สารละลายใส หลังจากนั้นนำ สารละลายที่ใสจึง เติม Agar ปิเปต ใส่ หลอดทดลอง หลอดละ 6 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุก นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยความ ร้อนโดยหม้อนึ่งไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

****หลังจากทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว นำไปวางบนพื้นเยือกทำมุมประมาณ 30 องศาทิ้งไว้จน แข็งตัว เก็บใส่ถุงพลาสติก เก็บเข้าห้องเย็น พร้อมนำมาใช้ได้ทันที****

การเตรียมอาหารสำหรับการทดสอบการเกิดโซนใส

เตรียมโดยใช้วิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารสำหรับการ Subculture เชื้อจุลินทรีย์แต่เปลี่ยน ภาชนะบรรจุเป็นขวดแก้วที่มีฝาปิดมิดชิดแทนการใช้ test tub จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วย ความร้อนโดยหม้อนึ่งไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

การเตรียมอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

เตรียมโดยใช้วิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารสำหรับการ Subculture เชื้อจุลินทรีย์แต่ไม่ต้อง ใส่วุ้น จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้มาปิเปตใส่หลอดทดลองหลอดละ 6 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกนำไป ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยความร้อนโดยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหารสำหรับการติดตามค่าความขุ่น

เตรียมโดยใช้วิธีเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารสำหรับการเตรียมอาหารเหลวสำหรับเพาะเชื้อจุลินทรีย์แล้วเปิดใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตรปิดด้วยจุกนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยความร้อนโดยหม้อนึ่งไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

การเตรียมวัสดุอุปกรณ์ปราศจากเชื้อ

- เครื่องแก้วทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบและ paper disc ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยความร้อนโดยอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

- อาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ปราศจากเชื้อด้วยความร้อนด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

**** ต้องใช้ Aseptic technique เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ ****

การเตรียม 80% เอธิลแอลกอฮอล์

เตรียมโดยเจือจาง 95% เอธิลแอลกอฮอล์ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมสารเคมีและตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลอง

- 0.8% Sodium chloride : ชั่ง Sodium chloride 8 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตรนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยความร้อนด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

- Sterile water : นำน้ำกลั่นไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยความร้อนด้วยเครื่อง หม้อนึ่งไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

- 20% Maltose : ชั่ง Maltose 20 กรัมละลายในน้ำกรอง 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยความร้อนด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

ภาคผนวก ก.

ตารางที่ ก.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ของจุลินทรีย์ที่มีการเติมสารสกัดจากเห็ดที่มีสัดส่วนของเห็ดต่อตัวทำละลายเท่ากับ 50.:200 ในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 18 และ 24 ชั่วโมง

เชื้อจุลินทรีย์	ค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 550 nm		
	0 ชม.	18 ชม.	24 ชม.
<i>B. cereus</i>	0.327 ± 0.007	3.818 ± 0.020	1.549 ± 0.03
<i>B. sterothermophilus</i>	0.045 ± 0.000	0.288 ± 0.002	0.853 ± 0.013
<i>B. subtilis</i>	0.036 ± 0.002	0.297 ± 0.009	0.097 ± 0.006
<i>L. acidophilus</i>	0.449 ± 0.004	3.799 ± 0.095	1.648 ± 0.042
<i>L. bulgaricus</i>	0.326 ± 0.007	3.704 ± 0.020	1.710 ± 0.037
<i>S. aureus</i>	0.087 ± 0.004	0.285 ± 0.005	0.851 ± 0.025
<i>E coli</i>	0.748 ± 0.039	3.153 ± 0.031	2.658 ± 0.019
<i>S. derby</i>	0.777 ± 0.007	2.241 ± 0.030	2.283 ± 0.037
<i>C. utilis</i>	0.704 ± 0.011	2.214 ± 0.035	2.152 ± 0.040
<i>Pichia sp.</i>	0.734 ± 0.198	3.193 ± 0.075	2.650 ± 0.134
<i>R. glutinis</i> TISTR5159	1.284 ± 0.007	1.656 ± 0.030	1.582 ± 0.024
<i>S. carlbergensis</i> TISTR5345	0.579 ± 0.002	3.420 ± 0.271	2.736 ± 0.066
<i>S. cerevisiae</i>	0.764 ± 0.004	2.214 ± 0.022	2.281 ± 0.043
<i>Y. lipolytica</i>	0.560 ± 0.064	2.160 ± 0.069	1.307 ± 0.015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ของจุลินทรีย์ที่มีการเติมแอลกอฮอล์ 80% ในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ที่เวลา 0,18 และ 24 ชั่วโมง

เชื้อจุลินทรีย์	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 550 nm		
	0 ชม.	18 ชม.	24 ชม.
<i>B. cereus</i>	0.157 ± 0.001	0.564 ± 0.023	0.233 ± 0.006
<i>B. sterothermophilus</i>	0.137 ± 0.001	0.347 ± 0.008	0.279 ± 0.008
<i>B. subtilis</i>	0.141 ± 0.001	0.346 ± 0.004	0.289 ± 0.001
<i>L. acidophilus</i>	0.116 ± 0.002	0.585 ± 0.006	1.253 ± 0.088
<i>L. bulgaricus</i>	0.158 ± 0.001	0.572 ± 0.000	1.225 ± 0.014
<i>S. aureus</i>	0.137 ± 0.008	0.366 ± 0.003	0.282 ± 0.002
<i>E coli</i>	1.095 ± 0.007	1.830 ± 0.028	1.785 ± 0.035
<i>S. derby</i>	0.171 ± 0.001	2.040 ± 0.007	1.883 ± 0.032
<i>C. utilis</i>	0.156 ± 0.032	2.053 ± 0.018	1.998 ± 0.442
<i>Pichia sp.</i>	1.098 ± 0.018	1.835 ± 0.085	1.755 ± 0.028
<i>R. glutinis</i> TISTR5159	0.825 ± 0.021	0.865 ± 0.014	0.850 ± 0.000
<i>S. carlbergensis</i> TISTR5345	0.334 ± 0.042	2.638 ± 0.004	2.423 ± 0.018
<i>S. cerevisiae</i>	0.421 ± 0.003	2.568 ± 0.180	1.948 ± 0.088
<i>Y. lipolytica</i>	0.998 ± 0.004	0.808 ± 0.025	1.230 ± 0.021

ตารางที่ค.3แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ของจุลินทรีย์ที่มีการเติมน้ำกลั่น
ในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 ,18 และ 24 ชั่วโมง

เชื้อจุลินทรีย์	ค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 550 nm		
	0 ชม.	18 ชม.	24 ชม.
<i>B. cereus</i>	0.879 ± 0.007	0.777 ± 0.012	1.257 ± 0.025
<i>B. sterothophilus</i>	0.141 ± 0.000	0.333 ± 0.001	0.301 ± 0.001
<i>B. subtilis</i>	0.137 ± 0.002	0.329 ± 0.003	0.307 ± 0.004
<i>L. acidophilus</i>	0.886 ± 0.004	0.780 ± 0.004	0.219 ± 0.007
<i>L. bulgaricus</i>	0.834 ± 0.007	0.729 ± 0.001	1.259 ± 0.014
<i>S. aureus</i>	0.138 ± 0.004	0.337 ± 0.003	0.307 ± 0.004
<i>E coli</i>	0.877 ± 0.039	1.314 ± 0.028	2.167 ± 0.011
<i>S. derby</i>	0.920 ± 0.007	2.322 ± 0.039	2.752 ± 0.053
<i>C. utilis</i>	0.893 ± 0.011	2.373 ± 0.028	2.798 ± 0.124
<i>Pichia sp.</i>	0.960 ± 0.198	1.331 ± 0.039	2.138 ± 0.018
<i>R. glutinis</i> TISTR5159	0.820 ± 0.007	0.836 ± 0.053	0.723 ± 0.025
<i>S. carlbergensis</i> TISTR5345	0.385 ± 0.002	2.963 ± 0.332	2.220 ± 0.035
<i>S. cerevisiae</i>	1.603 ± 0.004	1.898 ± 0.127	2.123 ± 0.060
<i>Y. lipolytica</i>	0.685 ± 0.064	0.848 ± 0.007	0.560 ± 0.007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ก.4 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเคือย 50 กรัม และ 100 กรัม ต่อตัวทำลาย 200 มิลลิตรของ *Bacillus cereus*

<i>Bacillus cereus</i>	ระยะ clear zone (mm)	
	ลูกเคือย 50g:alcohol 200 ml	ลูกเคือย 100g:alcohol 200 ml
	5.75	4.00
	3.00	3.50
	3.00	4.00
	5.00	6.60
	3.60	5.30
	4.60	4.30
mean	4.16	4.62
control	-	-
SD	1.13	1.14

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
50 g	6.00	24.95	4.16	1.29
100 g	6.00	27.70	4.62	1.30

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.63	1.00	0.63	0.49	0.50	4.96
Within Groups	12.94	10.00	1.29			
Total	13.57	11.00				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค.5 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเค็ย 50 กรัมและ 100 กรัมต่อตัวทำละลาย 200 มิลลิลิตรของ *Bacilus sterothermophilus*

<i>Bacilus sterothermophilus</i>	ระยะ clear zone (mm)	
	ลูกเค็ย 50g:alcohol 200 ml	ลูกเค็ย 100g:alcohol 200 ml
	5.00	4.00
	3.60	4.30
	4.00	4.00
	1.60	4.60
	2.60	3.30
	4.60	2.30
mean	3.57	3.75
control	-	-
SD	1.27	0.83

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
50g	6.00	21.40	3.57	1.62
100g	6.00	22.50	3.75	0.69

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.10	1.00	0.10	0.09	0.77	4.96
Within Groups	11.57	10.00	1.16			
Total	11.67	11.00				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค.6 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเคี้ยว 50 กรัมและ 100 กรัมต่อตัวทำละลาย 200 มิลลิลิตรของ *Bacillus subtilis*

<i>Bacillus subtilis</i>	ระยะ clear zone (mm)	
	ลูกเคี้ยว 50g:alcohol 200 ml	ลูกเคี้ยว 100g:alcohol 200 ml
	3.00	2.60
	3.00	8.00
	3.00	5.30
	4.30	5.25
	3.75	4.30
	3.30	5.25
mean	3.39	5.12
control	-	-
SD	0.53	1.75

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
50g	6.00	20.35	3.39	0.28		
100g	6.00	30.70	5.12	3.08		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	8.93	1.00	8.93	5.31	0.04	4.96
Within Groups	16.81	10.00	1.68			
Total	25.73	11.00				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางก.7 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเคี้ยว 50 กรัมและ 100 กรัมต่อตัวทำละลาย 200 มิลลิลิตรของ *Lactobacillus acidophilus*

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ระยะ clear zone (mm)	
	ลูกเคี้ยว 50g:alcohol 200 ml	ลูกเคี้ยว 100g:alcohol 200 ml
	5.25	2.00
	2.00	2.00
	4.30	3.00
	4.60	4.00
	3.30	1.00
	3.00	1.00
mean	3.74	2.17
control	-	-
SD	1.19	1.17

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
50g	6.00	22.45	3.74	1.42
100g	6.00	13.00	2.17	1.37

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	7.44	1.00	7.44	5.34	0.04	4.96
Within Groups	13.94	10.00	1.39			
Total	21.38	11.00				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค.8 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเคี้ยว 50 กรัมและ 100 กรัมต่อตัวทำละลาย 200 มิลลิลิตรของ *Lactobacillus bulgaricus*

<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	ระยะ clear zone (mm)	
	ลูกเคี้ยว 50g:alcohol 200 ml	ลูกเคี้ยว 100g:alcohol 200 ml
	4.00	5.00
	7.00	4.60
	3.00	3.20
	5.00	6.30
	4.00	2.30
	3.60	2.60
mean	4.43	4.00
control	-	-
SD	1.42	1.56

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
50g	6.00	26.60	4.43	2.01
100g	6.00	24.00	4.00	2.43

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.56	1.00	0.56	0.25	0.63	4.96
Within Groups	22.17	10.00	2.22			
Total	22.74	11.00				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค.9 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเคี้ยว 50 กรัมและ 100 กรัมต่อตัวทำละลาย 200 มิลลิลิตรของ *Staphylococcus aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>	ระยะ clear zone (mm)	
	ลูกเคี้ยว 50g:alcohol 200 ml	ลูกเคี้ยว 100g:alcohol 200 ml
	5.25	4.60
	4.00	3.25
	3.30	3.00
	2.75	4.50
	3.00	4.50
	3.00	3.00
mean	3.55	3.81
control	-	-
SD	0.94	0.80

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
50g	6.00	21.30	3.55	0.88
100g	6.00	22.85	3.81	0.64

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.20	1.00	0.20	0.26	0.62	4.96
Within Groups	7.60	10.00	0.76			
Total	7.80	11.00				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค.10 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเคี้ยว 50 กรัมและ 100 กรัมต่อตัวทำละลาย 200

มิลลิลิตรของ *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>	ระยะ clear zone (mm)	
	ลูกเคี้ยว 50g:alcohol 200 ml	ลูกเคี้ยว 100g:alcohol 200 ml
	4.00	2.60
	3.00	1.60
	3.00	4.75
	3.60	2.00
	4.00	2.00
	2.60	4.30
mean	3.37	2.88
control	-	-
SD	0.59	1.33

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
50g	6.00	20.20	3.37	0.34
100g	6.00	17.25	2.88	1.76

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.73	1.00	0.73	0.69	0.43	4.96
Within Groups	10.49	10.00	1.05			
Total	11.22	11.00				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค.11 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเดียว 50 กรัมและ 100 กรัมต่อตัวทำละลาย 200 มิลลิลิตรของ *Salmonella derby*

<i>Salmonella derby</i>	ระยะ clear zone (mm)	
	ลูกเดียว 50g:alcohol 200 ml	ลูกเดียว 100g:alcohol 200 ml
	5.60	1.60
	3.60	4.60
	2.30	2.00
	4.00	1.60
	4.00	3.00
	3.50	3.00
mean	3.83	2.63
control	-	-
SD	1.07	1.16

Anova: Single Factor

SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
50g	6.00	23.00	3.83	1.14
100g	6.00	15.80	2.63	1.33

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	4.32	1.00	4.32	3.49	0.09	4.96
Within Groups	12.37	10.00	1.24			
Total	16.69	11.00				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค.12 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเคี้ยว 50 กรัมและ 100 กรัมต่อตัวทำละลาย 200 มิลลิลิตรของ *Candida utilis*

<i>Candida utilis</i>	ระยะ clear zone (mm)	
	ลูกเคี้ยว 50g:alcohol 200 ml	ลูกเคี้ยว 100g:alcohol 200 ml
	5.00	3.00
	5.00	2.00
	5.30	4.00
	5.00	8.00
	2.00	7.60
	4.30	8.00
mean	4.43	5.43
control	-	-
SD	1.24	2.74

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
50g	6.00	26.60	4.43	1.53
100g	6.00	32.60	5.43	7.53

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	3.00	1.00	3.00	0.66	0.43	4.96
Within Groups	45.29	10.00	4.53			
Total	48.29	11.00				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค.13 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเคี้ยว 50 กรัมและ 100 กรัมต่อตัวทำละลาย 200

มิลลิลิตรของ *Pichia* sp.

<i>Pichia</i> sp.	ระยะ clear zone (mm)	
	ลูกเคี้ยว 50g:alcohol 200 ml	ลูกเคี้ยว 100g:alcohol 200 ml
	5.50	4.60
	6.00	4.30
	4.00	5.25
	3.00	5.50
	4.00	4.60
	4.00	7.60
mean	4.42	5.31
control	-	-
SD	1.11	1.21

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
50g	6.00	26.50	4.42	1.24
100g	6.00	31.85	5.31	1.46

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	2.39	1.00	2.39	1.76	0.21	4.96
Within Groups	13.52	10.00	1.35			
Total	15.91	11.00				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค.14 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเค็ย 50 กรัมและ 100 กรัมต่อตัวทำละลาย 200

มีลลิตรของ *Rhodotorula glutinis*TISTR5159

<i>Rhodotorula glutinis</i> TISTR5159	ระยะ clear zone (mm)	
	ลูกเค็ย 50g:alcohol 200 ml	ลูกเค็ย 100g:alcohol 200 ml
	7.00	6.00
	6.30	4.60
	4.30	3.60
	6.00	6.00
	4.30	4.00
	4.60	3.50
mean	5.42	4.62
control	-	-
SD	1.17	1.14

Anova: Single Factor

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
50g	6.00	32.50	5.42	1.36		
100g	6.00	27.70	4.62	1.30		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	1.92	1.00	1.92	1.45	0.26	4.96
Within Groups	13.28	10.00	1.33			
Total	15.20	11.00				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค.15 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเคี้ยว 50 กรัมและ 100 กรัมต่อตัวทำละลาย 200

มิลลิลิตรของ *Saccharomyces carlbergensis* TISTR5345

<i>Saccharomyces carlbergensis</i> TISTR5345	ระยะ clear zone (mm)	
	ลูกเคี้ยว 50g:alcohol 200 ml	ลูกเคี้ยว 100g:alcohol 200 ml
	2.00 3.75 3.75 2.60 3.75 5.25	1.00 2.30 1.00 2.00 4.60 1.00
mean	3.52	1.98
control	-	-
SD	1.12	1.40

Anova: Single Factor

SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
50g	6.00	21.10	3.52	1.26
100g	6.00	11.90	1.98	1.97

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	7.05	1.00	7.05	4.37	0.06	4.96
Within Groups	16.16	10.00	1.62			
Total	23.21	11.00				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค.16 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเคี้ยว 50 กรัมและ 100 กรัมต่อตัวทำละลาย 200

มิลลิลิตรของ *Saccharomyces cerevisiae*

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ระยะ clear zone (mm)	
	ลูกเคี้ยว 50g:alcohol 200 ml	ลูกเคี้ยว 100g:alcohol 200 ml
	5.00	4.00
	3.50	3.60
	3.30	2.30
	3.00	3.30
	3.00	3.00
	3.30	4.00
mean	3.52	3.37
control	-	-
SD	0.75	0.65

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
50g	6.00	21.10	3.52	0.57
100g	6.00	20.20	3.37	0.43

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.07	1.00	0.07	0.14	0.72	4.96
Within Groups	4.96	10.00	0.50			
Total	5.03	11.00				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางก.17 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณลูกเคี้ยว 50 กรัมและ 100 กรัมต่อตัวทำละลาย 200

มิลลิลิตรของ *Yarrowia lipolytica*

<i>Yarrowia lipolytica</i>	ระยะ clear zone (mm)	
	ลูกเคี้ยว 50g:alcohol 200 ml	ลูกเคี้ยว 100g:alcohol 200 ml
	5.25	4.25
	5.60	4.60
	4.00	2.60
	4.30	2.60
	5.60	2.30
	4.50	5.30
mean control	4.88	3.61
SD	-	-
	0.70	1.27

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
50g	6.00	29.25	4.88	0.49
100g	6.00	21.65	3.61	1.60

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	4.81	1.00	4.81	4.61	0.06	4.96
Within Groups	10.43	10.00	1.04			
Total	15.24	11.00				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค.18 เปรียบเทียบความแตกต่างของขนาดวงไสของการยับยั้งระหว่างแบคทีเรียและยีสต์ที่
สัดส่วนของปริมาณสารสกัดลูกเคียวต่อปริมาตรตัวทำละลาย 50 : 200 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ขนาดวงไสของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
แบคทีเรีย	ยีสต์
4.16	4.43
3.57	4.42
3.39	5.42
3.74	3.52
4.43	3.52
3.55	4.88
3.37	
3.83	

Anova: Single Factor

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
แบคทีเรีย	8.00	30.04	3.76	0.14		
ยีสต์	6.00	26.19	4.37	0.56		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	1.28	1.00	1.28	4.03	0.07	4.75
Within Groups	3.80	12.00	0.32			
Total	5.07	13.00				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค.19 เปรียบเทียบความแตกต่างของขนาดวงไสของการขั้วขั้วระหว่างแบคทีเรียและยีสต์ที่
สัดส่วนของปริมาณสารสกัดถูกเคี้ยวต่อปริมาตรตัวทำละลาย 100 : 200 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ระยะวงไสของการขั้วขั้ว(มิลลิเมตร)	
แบคทีเรีย	ยีสต์
4.62	5.47
3.75	5.31
5.12	4.62
2.17	1.98
4.00	3.37
3.81	3.61
2.88	
2.63	

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
แบคทีเรีย	8.00	28.98	3.62	1.01
ยีสต์	6.00	24.36	4.06	1.77

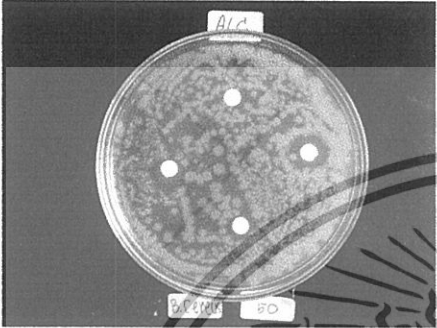
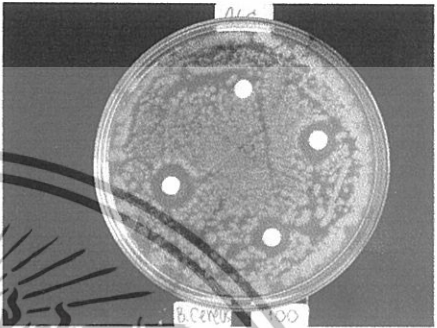
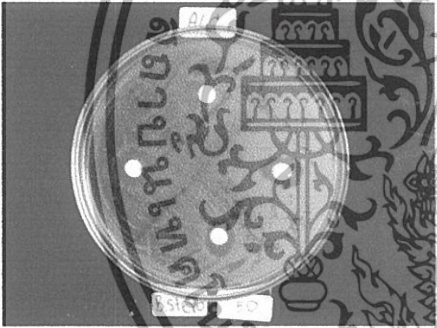
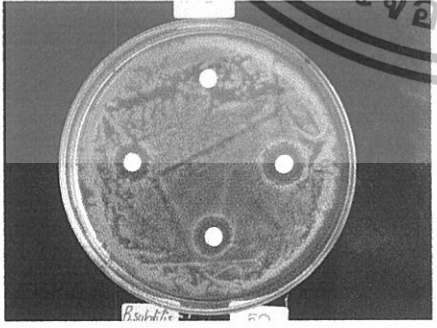
ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.66	1.00	0.66	0.49	0.50	4.75
Within Groups	15.95	12.00	1.33			
Total	16.60	13.00				

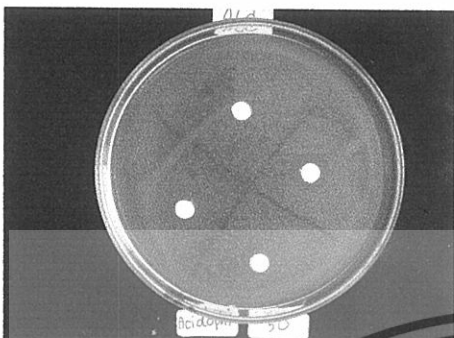
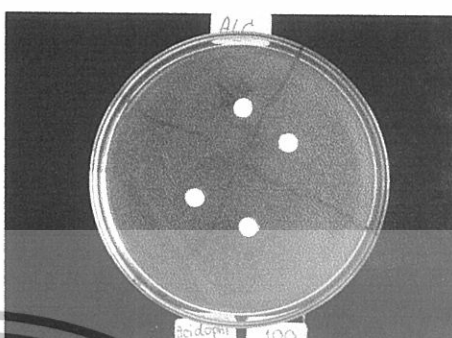
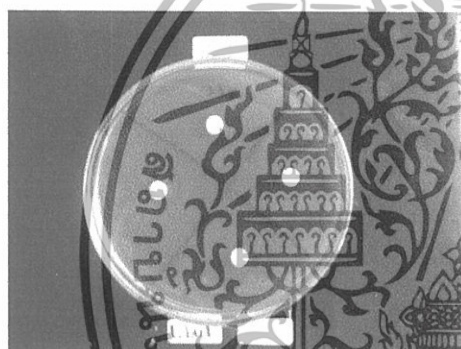
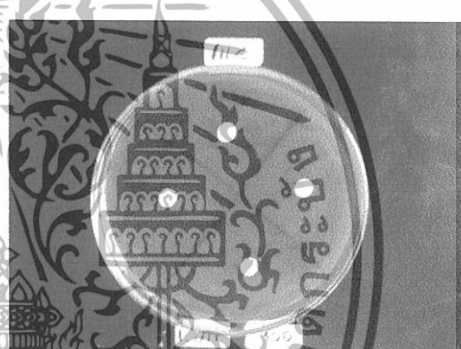
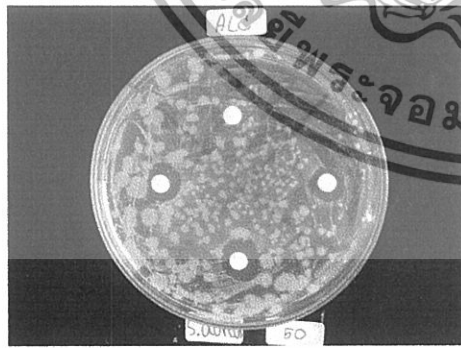
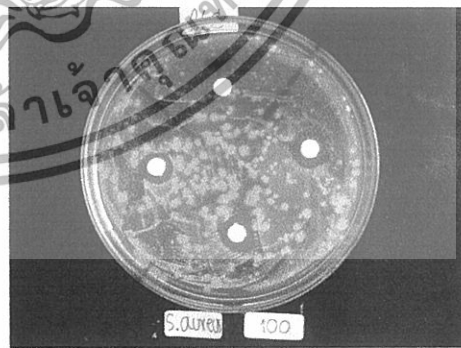
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

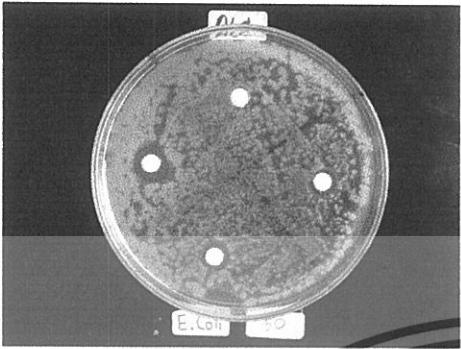
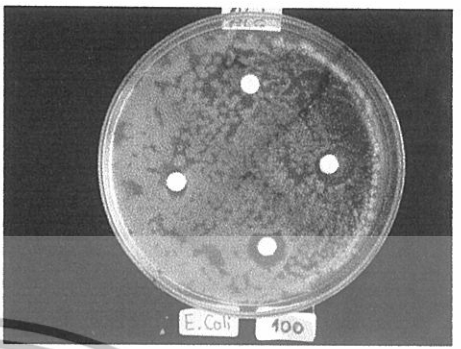
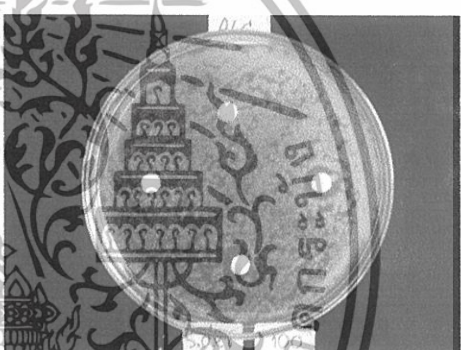
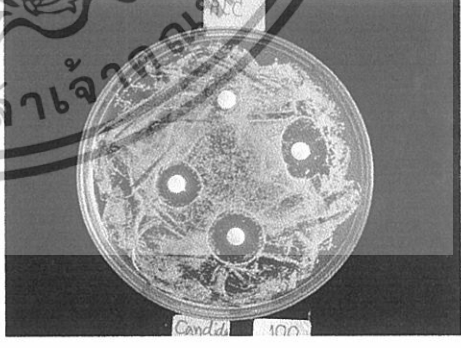
ภาพตัวอย่างการเกิดวงใส ของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

ลูกเต๋อย 50 กรัม: แอลกอฮอล์ 200 มิลลิลิตร	ลูกเต๋อย 100 กรัม: แอลกอฮอล์ 200 มิลลิลิตร
ภาพที่ ง. 1 <i>Bacillus cereus</i>	
	
ภาพที่ ง. 2 <i>Bacillus sterothermophilus</i>	
	
ภาพที่ ง. 3 <i>Bacillus subtilis</i>	
	

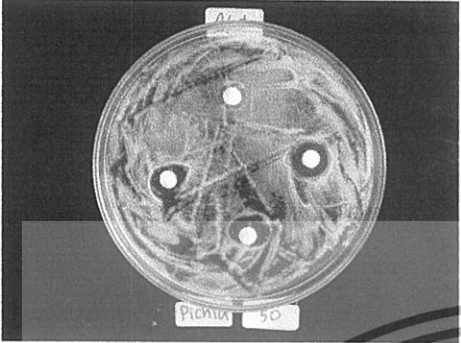
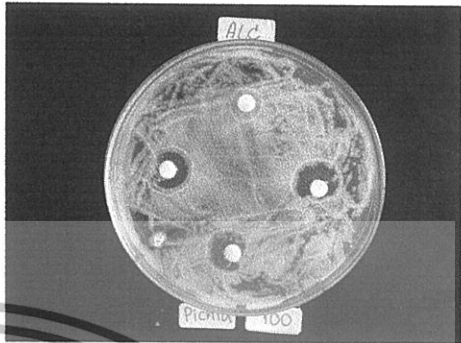
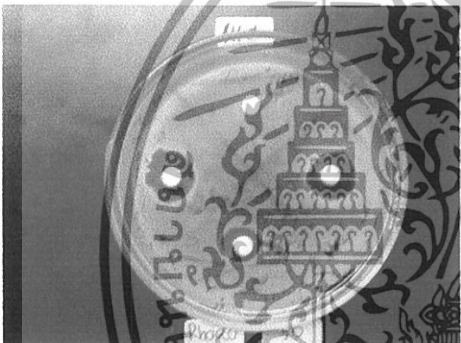
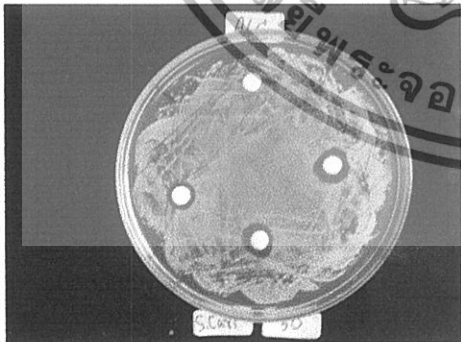
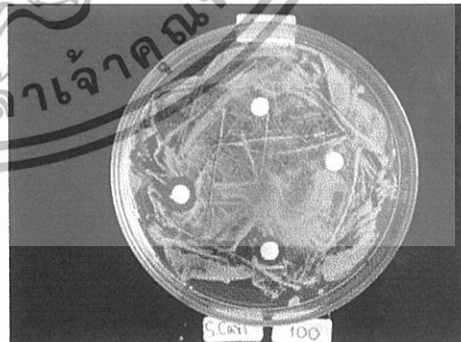
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกเดียว 50 กรัม: แอลกอฮอล์ 200 มิลลิลิตร		ลูกเดียว 100 กรัม: แอลกอฮอล์ 200 มิลลิลิตร	
ภาพที่ ง. 4 <i>Lactobacillus acidophilus</i>			
			
ภาพที่ ง.5 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>			
			
ภาพที่ ง. 6 <i>Staphylococcus aureus</i>			
			

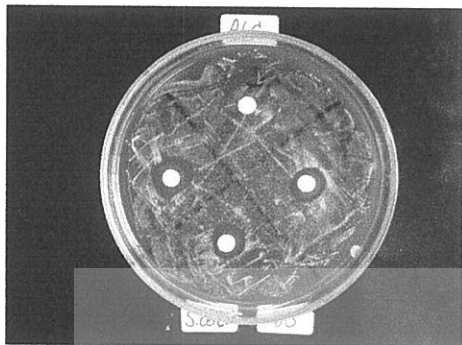
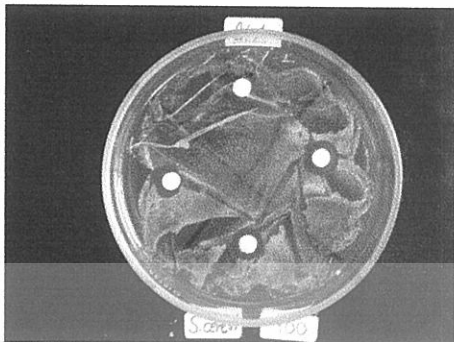
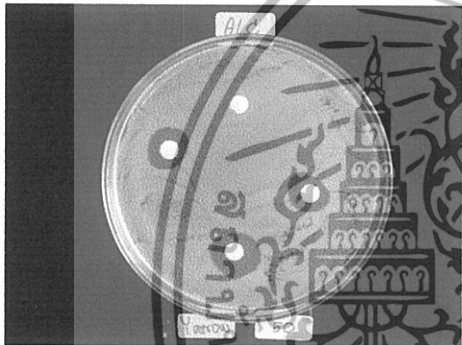
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกเค็ย 50 กรัม: แอลกอฮอล์ 200 มิลลิลิตร	ลูกเค็ย 100 กรัม: แอลกอฮอล์ 200 มิลลิลิตร
ภาพที่ ง. 7 <i>Escherichia coli</i>	
	
ภาพที่ ง. 8 <i>Salmonella derby</i>	
	
ภาพที่ ง. 9 <i>Candida utilis</i>	
	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกเค็ย 50 กรัม: แอลกอฮอล์ 200 มิลลิตร	ลูกเค็ย 100 กรัม: แอลกอฮอล์ 200 มิลลิตร
ภาพที่ ง.10 <i>Pichia</i> sp.	
	
ภาพที่ ง.11 <i>Rhodotorula glutinis</i> TISTR5159	
	
ภาพที่ ง.12 <i>Saccharomyces carlbergensis</i> TISTR5345	
	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกเต๋อย 50 กรัม: แอลกอฮอล์ 200 มิลลิลิตร		ลูกเต๋อย 100 กรัม: แอลกอฮอล์ 200 มิลลิลิตร	
ภาพที่ ง. 13 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
			
ภาพที่ ง. 14 <i>Yarrowia lipolytica</i>			
			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้