ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่ทำให้ชุ่มด้วยสารสกัดจากไพลและเปลือกมังคุดเพื่อเป็นแผ่นวัสดุปิดแผลต้านเชื้อจุลินทรีย์

Activity of Bacterial Cellulose Impregnated with Phlai and Mangosteen Peel Extracts for Use as Antimicrobial Wound Dressing

จุฑามาศ สวนแก้ว[1] ดวงใจ โอชัยกุล[1] และ วนิดา จันทร์วิกูล[2]

Chuthamat Suawkaew[1] Duangjai Ochaikul[1] Wanida Janvikul[3]

[1] สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

[2] ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ จ.ปทุมธานี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแผ่นเซลลูโลสที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ดูดซับสารสกัดจากไพลและเปลือกมังคุด เพื่อใช้เป็นวัสดุปิดแผล ไพลและเปลือกมังคุดได้นำมาศึกษาโดยสกัดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดและผ่านการทำแห้งโดยวิธี freeze driedนั้น ทดสอบกับเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococus aureus* ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าแผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีบริเวณในการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* และ *E. coli* เท่ากับ 3.0 มิลลิเมตร และ 1.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนแผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดจากไพลในทุกๆ ตัวทำละลาย ไม่แสดงบริเวณในการยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิด ในการทดสอบด้วยวิธี broth dilution พบว่า แผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ได้ร้อยละ 100 และร้อยละ 47 ตามลำดับ

คำสำคัญ : ฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ เซลลูโลสจากแบคทีเรีย เปลือกมังคุด ไพล วัสดุปิดแผล

Abstract

Objective of this research was to study antimicrobial activity of bacterial cellulose, which were impregnated with Phlai and mangosteen peel for the use as wound dressing. Phlai and mangosteen peel were extracted using maceration with hexane, ethyl acetate and methanol. Antimicrobial activities of the freeze-dried bacterial cellulose which had been impregnated with crude extract were investigated

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

against *Escherichia coli* and *Staphylococus aureus* by disc diffusion method. Cellulose impregnated with crude extract of mangosteen peel with methanol 12.5 mg/ml showed inhibition zones of *S. aureus* and *E. coli* at 3.0 and 1.5 mm, respectively. Cellulose impregnated with phlai crude extract gave no inhibition. In the broth microdilution method, the results showed that there was 100% and 47% reduction in viable *S. aureus* and *E. coli* respectively with bacterial cellulose impregnated with mangosteen pell methanol extract.

Keywords : antimicrobial activity, bacterial cellulose, mangosteen peel, Phlai, wound dressing

1. บทนำ

โดยปกติร่างกายของคนเราสามารถสร้างผิวหนังใหม่ทดแทนผิวหนังเก่าที่หลุดลอกอยู่ตลอดเวลา แต่เมื่อผิวหนังถูกทำลาย เช่นจากไฟไหม้น้ำร้อนลวก หรือบาดแผลที่มีลักษณะเรื้อรัง จนผิวหนังชั้นในหรือชั้นหนังแท้ได้รับความเสียหาย ร่างกายจะไม่สามารถสร้างผิวหนังใหม่ขึ้นมาทดแทนได้อีก ซึ่งก่อให้เกิดความเจ็บปวดแก่ผู้ป่วย แนวทางที่ใช้ในการรักษาหรือช่วยบรรเทาอาการเจ็บปวด คือ การหาวัสดุมาปิดบริเวณบาดแผล เพื่อทำหน้าที่เสมือนผิวหนังชั่วคราว ปัจจุบันได้มีการใช้วิธีนำเนื้อเยื่อผิวหนังของผู้ป่วย แยกเป็นเซลล์เดี่ยว นำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เพื่อขยายขนาด แล้วนำมาปลูกถ่ายทดแทนให้แก่ผู้ป่วย ซึ่งต้องใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นการหาวัสดุปิดบาดแผลเพื่อทำหน้าที่เป็นผิวหนังชั่วคราว จึงยังคงมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง โดยวัสดุดังกล่าวนอกจากต้องมีคุณสมบัติในการป้องกันการสูญเสียน้ำ และป้องกันการติดเชื้อแล้ว ยังควรมีคุณสมบัติในการเร่งการรักษาบาดแผลให้สร้างเนื้อเยื่อใหม่ได้เร็วขึ้น และร่างกายต้องไม่มีปฏิกิริยาต่อต้านต่อวัสดุนี้ เซลลูโลสจากแบคทีเรียเป็นวัสดุทางชีวภาพที่มีการวิจัยกันมาก เนื่องจากคุณสมบัติของเซลลูโลสจากแบคทีเรีย มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวัสดุปิดแผลหลายประการ เช่น ไม่เกิดปฏิกิริยาการต่อต้านในสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) สามารถยึดเกาะกับบาดแผลได้แนบสนิท และป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ไม่ให้เข้าสู่บาดแผล [1-2] กำจัดของเสียของบาดแผล รักษาความชื้น ป้องกันการสูญเสียน้ำ ช่วยให้ความอบอุ่นแก่บาดแผลซึ่งเอื้อต่อการฟื้นตัวของบาดแผล [3-4] แต่ทั้งนี้เพื่อให้ได้แผ่นวัสดุปิดแผลที่มีประโยชน์ทางการรักษาสูงสุด แผ่นเซลลูโลสจากแบคทีเรียลจึงยังคงต้องได้รับการพัฒนาคุณสมบัติเพื่อให้เหมาะสมต่อการใช้งานมากขึ้น ได้แก่ ความสามารถในการยับยั้งหรือลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์บริเวณบาดแผล ลดการอักเสบ เพื่อให้บาดแผลฟื้นตัวได้อย่างรวดเร็วได้

งานวิจัยนี้ จึงได้นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากสมุนไพรไทยมาใช้ร่วมกับแผ่นเซลลูโลส สมุนไพรที่นำมาศึกษาได้แก่ ไพล และเปลือกมังคุด ซึ่งมีการวิจัยที่รายงานถึงความสามารถใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การลดการอักเสบ และยับยั้งเชื้อ *Staphylococus aureus* และ *Escherichia coli* [5-8] ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มักพบบริเวณผิวหนังและก่อให้เกิดการอักเสบของบาดแผลได้

2. วิธีการทดลอง

2.1 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976, *Escherichia coli*, *Staphylococus aureus* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

2.2 สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย

เหง้าไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb) และเปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.)

2.3 การหมักเซลลูโลส

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ประกอบด้วย น้ำมะพร้าว 1000 มิลลิลิตร น้ำตาลทราย ร้อยละ 5.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) กรดอะซิติก ร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที นำเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 จำนวน 1 โคโลนีจากอาหารแข็ง Glucose Ethanol Yeast extract (GEY) ลงในอาหารน้ำมะพร้าว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตเซลลูโลส จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหารน้ำมะพร้าว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน (หรือให้มีความหนาเฉลี่ย 5.0 มิลลิเมตร) ในสภาวะนิ่ง นำแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการหมักมาทำให้บริสุทธิ์ โดยต้มให้เดือดในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (2 ครั้ง) แล้วต้มด้วยสารละลายกรดอะซิติก ร้อยละ1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดจนน้ำสุดท้ายมีค่า pH เป็นกลาง เก็บแผ่นเซลลูโลสที่ได้ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดการใช้งาน [9]

2.4 การสกัดสารจากไพล

นำเหง้าของไพลล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไพลที่หั่นแล้วอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำไพลที่อบแล้วมาชั่งน้ำหนักให้ได้ 2 กิโลกรัม แช่ด้วยสารอินทรีย์ 3 ลำดับ ลำดับแรกแช่ในตัวทำละลาย เฮกเซน ปริมาตร 6 ลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำสารที่สกัดได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน เรียกสารส่วนนี้ว่าสารสกัดหยาบไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซน ต่อมานำกากไพลที่สกัดด้วยเฮกเซนแล้วนั้น แช่ในสารอินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับต่อมาคือ ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และลำดับสุดท้ายคือ ตัวทำละลายเมทานอล โดยทำทุกขั้นตอนเหมือนวิธีสกัดสารในตัวทำละลายเฮกเซน จนได้สารสกัดหยาบ ในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และสารสกัดหยาบในชั้นของตัวทำละลายเมทานอล ตามลำดับ [10]

2.5 การสกัดสารจากเปลือกมังคุด

นำเปลือกมังคุดสดมาล้างให้สะอาด จากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักให้ได้ 2 กิโลกรัม จากนั้นแช่ด้วยสารอินทรีย์ 3 ลำดับ ทำวิธีการสกัดเช่นเดียวกับการสกัดไพล

2.6 การเตรียมเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ที่ใช้ทดสอบ

นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย หนึ่งโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 0.9 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มล. นำมาปรับเทียบความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland standard No.0.5 จะได้เซลล์แขวนลอยที่มีความหนาแน่นประมาณ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางต่อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ให้มีเซลล์แขวนลอย ที่มีความหนาแน่นประมาณ 1.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.7 ทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของสารสกัดสมุนไพรโดยวิธี Disc diffusion

นำสารสกัดในแต่ละชั้นของตัวทำละลายมาละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้สารสกัดมีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมอาหารแข็ง MHA ในจานเพาะเชื้อ ใช้ไม้พันสำลีชุบเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย ที่มีความหนาแน่นประมาณ 1.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาป้ายให้ทั่วอาหารแข็ง MHA วางแผ่นดิสก์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ที่หยดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ชุดควบคุมได้แก่ แผ่นดิสก์ที่หยดสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) บนอาหาร นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองเชื้อละ 3 ซ้ำ

2.8 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัด โดยหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) โดยวิธี Broth dilution

นำสารสกัดจากไพลและเปลือกมังคุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* ซึ่งทำให้เกิดวงใสเมื่อทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion มาหาค่า MIC โดยวิธี Broth dilution การเตรียมเชื้อแบคทีเรียให้มีเซลล์แขวนลอย ความหนาแน่นประมาณ 1.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำ Microtiter plate แบบ 96 หลุม มาเติมอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารสกัดในชั้นตัวทำละลายที่คัดเลือกได้จากวิธี Disc diffusion โดยเตรียมความเจือจางของสารสกัดในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า จากความเข้มข้นเริ่มต้น 200 เป็น 100, 50, 12.5, 6.25, 3.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุมคือ DMSO ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปหยดลงหลุมหลุมละ 45 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เชื้อแบคทีเรียลงไปในหลุม หลุมละ 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiter plate บันทึกความขุ่นของของเหลวในแต่ละหลุม จากนั้นนำ Microtiter plate ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าความขุ่นของของเหลวอีกครั้งหนึ่ง จากนั้น นำผลมาเปรียบเทียบค่าความขุ่นระหว่างก่อนบ่มเชื้อ กับหลังบ่มเชื้อ สารสกัดที่ระดับความเข้มข้นซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ จะมีค่าความขุ่นของของเหลวหลังบ่มต่ำกว่าหรือเท่ากับค่าความขุ่นของของเหลวก่อนบ่ม โดยระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้จะนำมาบันทึกเป็นค่า MIC [11]

2.9 การเตรียมแผ่นเซลลูโลสที่อิ่มตัวด้วยสารสกัด

เตรียมสารสกัดจากไพลและเปลือกมังคุดให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC ที่ทดสอบได้ จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสที่ผ่านการรีดน้ำ ด้วยเครื่องอัดรีดน้ำให้มีความหนาเฉลี่ย 0.5 มิลลิเมตร แผ่นตัดเป็นแผ่นวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.0 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วจุ่มแผ่นเซลลูโลสลงในสารสกัดเป็นเวลา 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 ชั่วโมง และจุ่มในสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นชุดควบคุม จากนั้นนำไปแช่แข็งในเครื่อง deep freeze 6 ชั่วโมง แล้วระเหิดแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer 24 ชั่วโมง จะได้แผ่นเซลลูโลสที่อิ่มตัวด้วยสารสกัดในลักษณะแห้ง

2.10 เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดไพลและสารสกัดเปลือกมังคุดโดยวิธี Disc diffusion

เตรียมอาหารแข็ง MHA ในจานเพาะเชื้อ ใช้ไม้พันสำลี ชุบสารแขวนลอยแบคทีเรีย ความหนาแน่นประมาณ 1.0 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ป้ายให้ทั่วอาหารแข็ง MHA นำแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดไพล สารสกัดเปลือกมังคุด และสารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงบนอาหารที่ป้ายเชื้อ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองเชื้อละ 10 ซ้ำ

2.11 เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดไพลและสารสกัดเปลือกมังคุดโดยวิธี Broth dilution

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ซึ่งมีเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียความหนาแน่น 1x10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในหลอดเลี้ยงเชื้อปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร ใส่แผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดจากไพล แผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดจากเปลือกมังคุด และแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มในสารละลาย DMSO ความเข้มข้น ร้อยละ 10 ในหลอดอาหาร หลอดละ 5 แผ่น เพาะเลี้ยงในสภาวะแบบเขย่า ด้วยตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองเชื้อละ 3 ซ้ำ หลังจากนั้นทำการเจือจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์แขวนลอย ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 0.9 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ได้ความเจือจางที่ 10^{-4},10^{-5}และ 10^{-6} ดูดสารแขวนลอยเชื้อที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร MHA ในจานเพาะเชื้อ แล้วเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ จึงตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น คำนวณร้อยละของจำนวนแบคทีเรียที่ลดลง จากสมการ [12]

$$\text{จำนวนแบคทีเรียที่ลดลง (ร้อยละ)} = \frac{(\text{จำนวนโคโลนีที่ 0 ชั่วโมง} - \text{จำนวนโคโลนีที่ 24 ชั่วโมง})}{\text{จำนวนโคโลนีที่ 0 ชั่วโมง}} \times 100$$

3. ผลการทดลอง

3.1 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ *E. coli* และ *S. aureus* ของสารสกัดจากไพลและเปลือกมังคุดโดยวิธี Disc diffusion

สารสกัดจากไพลในส่วนเอทิลอะซิเตท มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ดีกว่าสารสกัดไพลในตัวทำละลายเฮกเซนและเมทานอลอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) สารสกัดจากเปลือกมังคุดในส่วนเมทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีกว่าสารสกัดในตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิลอะซิเตทอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ของบริเวณยับยั้ง *E. coli* และ *S. aureus* แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ค่าเฉลี่ยบริเวณการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยสารสกัดหยาบจากไพลและเปลือกมังคุด ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี disc diffusion

สมุนไพร	สารสกัด	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (mm±SD)	
		S.aureus	*E.coli*
ไพล	Hexane	7.40 ± 0.60^{c}	7.2 ± 0.50^{c}
	Ethyl acetate	$10. \pm 0.15^{b}$	10.3 ± 0.23^{b}
	Methanol	8.60 ± 0.14^{c}	ไม่ยับยั้ง ^{d}
เปลือกมังคุด	Hexane	8.28 ± 1.18^{c}	7.24 ± 1.10^{c}
	Ethyl acetate	7.73 ± 0.89^{c}	7.10 ± 0.60^{c}
	Methanol	14.88 ± 3.66^{a}	12.44 ± 1.57^{a}

^{abc} อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

การหาค่า MIC ของสารสกัดไพลจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และสารสกัดเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอลในการการยับยั้งเชื้อ ผลปรากฏว่าสารสกัดไพลจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายเมทานอลมีค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* เท่ากันคือ 12.50 และ MIC ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* เท่ากันคือ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *S. aureus* ของสารสกัดหยาบสมุนไพร

สารสกัดหยาบสมุนไพร	MIC (mg/ml)	
	E. coli	*S. aureus*
ไพล	12.50	6.25
เปลือกมังคุด	12.50	6.25

3.2 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ *E. coli* และ *S. aureus* ของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดไพลและจุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด

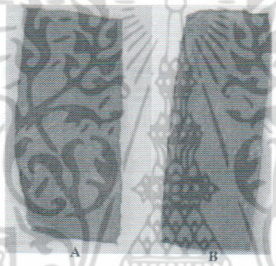
แผ่นเซลลูโลสที่จุ่มในสารสกัดไพลที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และจุ่มในสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยเมทานอลความเข้มข้น 6.25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงผลการยับยั้งมากที่สุด แม้ระยะเวลาสัมผัสสารสกัดมากขึ้นบริเวณการยับยั้งกลับไม่เพิ่มขึ้น เท่ากับว่าแผ่นเซลลูโลสอิ่มตัวด้วยสารสกัด แผ่นเซลลูโลสแห้งมีลักษณะดังรูปที่ 3.1 เมื่อนำแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มในสารสกัดไพลที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 6.25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* โดยวิธี disc diffusion พบว่าแผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยเมทานอลเข้มข้น 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีบริเวณการยับยั้ง *E. coli* เท่ากับ 1.5 มิลลิเมตร และบริเวณการยับยั้ง *S. aureus* เท่ากับ 3.0 มิลลิเมตร แผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยเมทานอล เข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดไพลที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 6.25 และ 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่แสดงบริเวณการยับยั้ง เช่นเดียวกับแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารละลาย DMSO ร้อยละ 10 ที่เป็นชุดควบคุม

เมื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดไพลที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธี Broth dilution พบว่าภายหลังการบ่มเชื้อ 24 ชั่วโมง จำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ในหลอดอาหารที่มีแผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดไพล ลดลง 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งสองเชื้อ สำหรับหลอดอาหารที่มีแผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด จำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ลดลง 47 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่แผ่นเซลลูโลสที่จุ่มในสารละลาย DMSO ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น แสดงดังตารางที่ 3.3 สารสกัดจากเปลือกมังคุดสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีกว่า *E. coli* เนื่องจาก *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ผนังเซลล์มีชั้นไขมัน โปรตีน และ lipopolysaccharides (LPS) ซึ่งสารเหล่านี้ช่วยป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งไม่มีสารเหล่านี้ [13]

จากผลการทดลอง ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดไพลจากเอทิลอะซิเตท โดยสังเกตบริเวณการยับยั้งนั้น ไม่พบว่ามีบริเวณยับยั้งเกิดขึ้นอย่างชัดเจน อาจเนื่องมาจากสารออกฤทธิ์ในสารสกัดถูกยึดหรือสร้างพันธะกับโครงสร้างภายในของเซลลูโลส จึงทำให้การแพร่ของสารสกัดออกมาสู่ภายนอกเป็นไปได้ยาก ในขณะที่เมื่อทดสอบด้วยวิธี Broth dilution มีผลการยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดได้ ร้อยละ100 เพราะวิธีดังกล่าวมีน้ำเป็นตัวกลางและทดลองในสภาวะเขย่า ทำให้การแพร่ของสารสกัดออกมาสู่ภายนอกได้มากขึ้น โดยโมเลกุลของน้ำเข้าไปแทนที่สารสกัด ที่ถูกยึดไว้ภายในแผ่นเซลลูโลส ทำให้สารออกฤทธิ์ของสารสกัดไพลหลุดออกมาจากแผ่นเซลลูโลส และสัมผัสกับเซลล์จุลินทรีย์จึงเกิดการยับยั้งได้



รูปที่ 3.1 แผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดสมุนไพร (A) ไพล (B) เปลือกมังคุด

ตารางที่ 3.3 จำนวนโคโลนีที่นับได้ของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus*. (CFU/ml) ที่ได้สัมผัสกับแผ่นแห้งเซลลูโลสจุ่มสารสกัดหยาบสมุนไพร ความเข้มข้น 12.5 mg/ml ที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง

เวลาสัมผัส (ชม.)	*E. coli* (CFU/ml)			*S. aureus* (CFU/ml)		
	จุ่มสารสกัดไพล	จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด	จุ่ม DMSO 10%	จุ่มสารสกัดไพล	จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุด	จุ่มDMSO 10%
0	1.10×10^{6}	1.10×10^{6}	1.10×10^{6}	1.30×10^{6}	1.30×10^{6}	1.30×10^{6}
24	0	5.83×10^{5}	2.42×10^{7}	0	0	5.41×10^{6}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สรุปผลการทดลอง

สารสกัดจากไพลในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และสารสกัดจากเปลือกมังคุดในตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดี เมื่อนำแผ่นเซลลูโลสมาจุ่มสารสกัดจากไพลในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และสารสกัดจากเปลือกมังคุดในตัวทำละลายเมทานอล แผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดจากเปลือกมังคุดในตัวทำละลายเมทานอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีกว่าแผ่นเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัดจากไพลในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท โดยยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีกว่า *E. coli* ซึ่งมักพบการปนเปื้อนแบคทีเรียทั้งสองชนิดในบาดแผล แผ่นเซลลูโลสที่ได้ยังต้องมีการศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ ต่อไป เช่น ความสามารถในการดูดซับของเหลว ความสามารถในการซึมผ่านของ ไอน้ำ และออกซิเจน ความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง เป็นต้น เพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงคุณสมบัติให้เหมาะสมต่อการนำมาใช้งานจริงในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สัญญารับทุนเลขที่ TGIST 01-51-059 และขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารอ้างอิง

[1] 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.

[2] 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.

[3] Waring, M.J. and Parsons, D. 2001. Physico-chemical characterization of carboxymethylated spun cellulose fibres. Biomaterials., 22, 903–912.

[4] 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[5] Mahabusarakum, W., Phongpaichit, S., Jansakul, C. and Wiriyachitra, P. 1983. Screening of antibacterial activity of chemicals from *Garcinia mangostana*. Warasan Songkhla Nakkharin., 5, 337-339.

[6] Iinuma, M., Tosa, H., Tanaka, T., Asai, F., Kobayashi, Y., Shimano, R. and Miyauchi, K.I. 1996. Antibacterial activity of xanthones from guttiferaeous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Pharm. Pharmacol., 48, 861–865.

[7] Alzoreky, N.S. and Nakahara, K. 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. International Journal of Food Microbiology., 80, 223-230.

[8] Sakagami, Y., Iinuma, M., Piyasena, K.G.N.P. and Dharmaratne, H.R.W. 2005. Antibacterial activity of a-mangostin against vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) and synergism with antibiotics. Phytomedicine., 12, 203-208.

[9] Maneerung, T., Tokura, S. and Rujiravanit, R. 2008. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. Carbohydrate Polymers, 72, 43–51.

[10] เชฎฐ รัตนาจารย์. 2548. ผลของสารสกัดไพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

[11] มาลิน จุลศิริ. 2532 ยาต้านจุลชีพความรู้พื้นฐานและการประยุกต์. สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน.

[12] 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.

[13] 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้