



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง

ฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*
ที่คัดแยกจากน้ำดื่มบรรจุขวด

Antimicrobial Activity of Thai Medicinal Plant Extracts Against *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Drinking Water

นามผู้วิจัย

นางสาวชุตินันท์ คงสรินทร์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์พัชรี สุนทรนนท์, ปร.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณา มาลาพันธ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา ลีสุข, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

สิงห์สีธง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*
ที่คัดแยกจากน้ำดื่มบรรจุขวด

Antimicrobial Activity of Thai Medicinal Plant Extracts Against *Pseudomonas aeruginosa*
Isolated from Drinking Water

โดย

นางสาวชุดินันท์ คงสรินทร์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดินันท์ คงสินทร์ 2557: ฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่คัดแยกจากน้ำดื่มบรรจุขวด ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์พัชรี สุนทรนนท์, ปร.ด. 97 หน้า

การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ที่ปนเปื้อนในน้ำดื่มบรรจุขวดจากร้านค้าและร้านสะดวกซื้อในพื้นที่กรุงเทพฯ และนนทบุรี โดยกำหนดการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 2 เดือนเป็นเวลา 1 ปี จำนวน 50 ยี่ห้อ รวมทั้งสิ้น 300 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของ *Pseudomonas* จาก 113 ตัวอย่าง (คิดเป็น 37.5 %) แยกเชื้อได้ 115 isolates โดยทุก isolates จะตรวจยืนยันบนอาหารจำเพาะและทดสอบลักษณะทางชีวเคมีที่สำคัญบางประการ พบว่าทั้ง 115 isolates ที่ให้ผลการทดสอบเข้าลักษณะของ *P. aeruginosa* ทุกประการที่ทำการทดสอบ เลือกเชื้อจำนวน 5 isolates เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา โดยทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด พบว่าเชื้อตัวแทนทั้ง 5 isolates ไวต่อยา Chloramphenicol, Carbenicillin, Gentamicin, Kanamycin และ Piperacillin และคือต่อยา Amikacin, Erythromycin, Streptomycin, Polymyxin B และ Tetracycline

การทดลองใช้สมุนไพรไทย 8 ชนิด คือ กระเจี๊ยบ ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ตะไคร้ บัวบก ใพลี ฟ้ายะลวย และลูกยอ ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งตัวแทนเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 5 isolates ที่แยกได้จากน้ำดื่ม โดยใช้เฮกเซน, แอลกอฮอล์ 95% และน้ำร้อน เป็นตัวทำละลายในการสกัด และทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่ได้ด้วยวิธี agar well diffusion ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจากใบบัวบกและลูกยอที่สกัดด้วย แอลกอฮอล์ 95% มีวงยับยั้ง (inhibition zone) ขนาด 13.0 - 15.2 มม. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ (MIC) เท่ากันคือ 512 mg/ml และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (MBC) คือ 512 และ 1,024 mg/ml ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วย แอลกอฮอล์ 95% และน้ำร้อนมี inhibition zone ขนาด 13.7 - 15.2 มม. และ 20.1 - 22.5 มม. ตามลำดับ ค่า MIC คือ 512 และ 256 mg/ml ตามลำดับ และค่า MBC เท่ากันคือ 512 mg/ml และสารสกัดหยาบจากกระเจี๊ยบที่สกัดด้วย แอลกอฮอล์ 95% โดยมี inhibition zone ขนาด 20.5 - 23.5 มม. ค่า MIC และค่า MBC คือ 256 และ 512 mg/ml ตามลำดับ จากผลการทดลองสามารถประเมินได้ว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบและฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากน้ำดื่ม ได้ดีกว่าสมุนไพรอื่นๆ ที่นำมาทดลอง อาจจะสามารถพัฒนาไปสู่การใช้เป็นยาทางเลือกอีกชนิดหนึ่งเพื่อรักษาโรคติดเชื้อจาก *P. aeruginosa* ได้

Chutinun Khongsarin 2014: Antimicrobial Activity of Thai Medicinal Plant Extracts Against *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Drinking Water. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Associate Professor, Patcharee Sunthornandh, Ph.D. 97 pages.

The isolation and detection of *Pseudomonas aeruginosa* were carried out from 300 samples of drinking water. All samples were collected from various places in Bangkok and Nonthaburi areas every two months for one year. *Pseudomonas* were obtained from 113 drinking water samples (37.5 %) and 115 isolates were detected. All isolates were confirmed with selective medium and biochemical test. Drug sensitivity test was determined by using 10 antibiotics such as amikacin, carbenicillin, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, kanamycin, piperacillin, streptomycin, polymyxin B and tetracycline. The result revealed that 5 representative of isolated *Pseudomonas* were sensitive to chloramphenicol, carbenicillin, gentamicin, kanamycin, and piperacillin and were resistant to amikacin, erythromycin, streptomycin, polymyxin B, and tetracycline. Eight Thai medicinal plants; Kariyat (*Andrographis paniculata*), Asiatic Pennywort (*Centella asiatica*), Turmeric (*Curcuma longa*), Zedoary (*Curcuma zedoaria*), Lemongrass (*Cymbopogon citrates*), Roselle (*Hibiscus sabdariffa*), Noni (*Morinda citrifolia*) and Phai (*Zingiber montanum*) were used for screening the antimicrobial activity against the 5 representative of isolated *Pseudomonas*. Hexane, 95% alcohol and hot water were used as the solvent for extraction of Thai medicinal plants and screening test of the crude extracts was done by agar well diffusion method. The crude extracts of Asiatic Pennywort and Noni with 95% alcohol showed the antimicrobial activity against all 5 representative of isolated *Pseudomonas* which inhibition zone was about 13.0 -15.2 mm., MIC was 512 mg/ml of both medicinal plants, MBC of crude extracts from Asiatic Pennywort and Noni were 512 mg/ml and 1024 mg/ml, respectively. The crude extracts of Kariyat with 95% alcohol and hot water showed the antimicrobial activity against all 5 representative of isolated *Pseudomonas* which inhibition zone was about 13.7-15.2 mm. and 20.1-22.5 mm. respectively. The MIC and MBC were determined and the result of the crude extracts from Kariyat with hot water were 256 mg/ml and 512 mg/ml, respectively. The MIC and MBC of the crude extracts from Kariyat with 95% alcohol were 512 mg/ml and 512 mg/ml, respectively. And the crude extracts from Roselle were showed inhibition zone about 20.5-23.5 mm. and the MIC and MBC were 256 mg/ml and 512 mg/ml, respectively. From these results, it might be concluded that some Thai medicinal plants especially Roselle and Kariyat should be used as drug of choice to inhibit *Pseudomonas aeruginosa* which caused many kinds of disease in human.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ พัทรี สุนทรนนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้ความรู้ ความช่วยเหลือ แนะนำ แก้ไขปัญหาวิทยานิพนธ์ สนับสนุนเงินวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณ มาลาพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนในจัดซื้อตัวอย่างน้ำดื่ม อุปกรณ์ และอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปต่างๆ ในการทำงานวิจัย ประกอบการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่ข้าพเจ้า อันนำไปสู่กระบวนการความคิด วางแผน แก้ไขในการวิจัยให้สำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบคุณบุคลากรเจ้าหน้าที่ และเพื่อนๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน รวมทั้งบุคคลที่ไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ ในระหว่างการศึกษาวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อเชณณรงค์ คุณแม่อารีย์ คงสินทร์ ที่เป็นผู้ส่งเสริมสนับสนุนทุนทรัพย์จนสำเร็จการศึกษา และเป็นที่พึ่งทางจิตใจ ขอขอบคุณญาติพี่น้องทุกท่านที่เป็นกำลังใจให้เสมอ

ชุตินันท์ คงสินทร์

กรกฎาคม 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	42
อุปกรณ์	42
วิธีการ	42
ผลและวิจารณ์	52
สรุปผลการทดลอง	69
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	70
ภาคผนวก	77
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	78
ภาคผนวก ข ข้อมูลการทดลอง	84
ภาคผนวก ค ภาพจากการทดลอง	91
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	97

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดง Pseudomonas บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน	5
2	ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ 10 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง	47
3	แสดงประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ 10 ชนิดต่อตัวแทนเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ที่แยกได้จำนวน 5 isolates	61
4	แสดงขนาด inhibition zone ของสารสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำลายแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1024 mg/ml ต่อตัวแทนเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ทั้ง 5 isolates	65
5	แสดงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ทั้ง 5 isolates	67
ตารางผนวกที่		
ข1	แสดงจำนวนโคโลนีที่เข้าลักษณะของ <i>P. aeruginosa</i> จากตัวอย่างน้ำในแต่ละช่วงระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง	85
ข2	ผลการตรวจพบเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> จากตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวด 50 ยี่ห้อ	86
ข3	แสดงความกว้างของ inhibition zone (มิลลิเมตร) ของ <i>P. aeruginosa</i> ที่แยกได้ตัวแทน 5 isolates เปรียบเทียบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 10 ชนิดกับ standard inhibition zone ตามวิธีของ Kirby-Bauer	90

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ดอกกระเจี๊ยบ	19
2	เหง้าขมิ้นชัน	20
3	เหง้าขมิ้นอ้อย	25
4	ลำต้นตะไคร้	27
5	บัวบก	28
6	ไพล	30
7	ฟ้าทะลายโจร	32
8	ลูกยอ	33
9	ผลการดัดสีแกรมลบ รูปร่างแท่ง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	55
10	แสดง typical colony แบบที่ 1 (A) บนแผ่นกรองที่วางบนอาหาร Pseudomonas Agar และ (B) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร King B medium	55
11	แสดง typical colony แบบที่ 2 (A) บนแผ่นกรองที่วางบนอาหาร Pseudomonas Agar และ (B) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร King B medium	56
12	แสดง typical colony แบบที่ 3 (A) บนแผ่นกรองที่วางบนอาหาร Pseudomonas Agar และ (B) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร King B medium	56
13	แสดงผลการทดสอบ oxidase บนแผ่นกระดาษกรองที่เคลือบสารทดสอบ	56
14	แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาลในสภาพ Oxidative-Fermentative	57
15	แสดงผลการทดสอบความไวของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ที่แยกได้ ต่อยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่

หน้า

ก1	แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> 5 isolates สารสกัดหยาบด้วย แอลกอฮอล์ 95% จากกระเจี๊ยบ	92
ก2	แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> 5 isolates สารสกัดหยาบด้วย แอลกอฮอล์ 95% จากใบบัวบก	93
ก3	แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> 5 isolates สารสกัดหยาบด้วยน้ำร้อนจากฟ้าทะลายโจร	94
ก4	แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> 5 isolates สารสกัดหยาบด้วย แอลกอฮอล์ 95% จากฟ้าทะลายโจร	95
ก5	แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> 5 isolates สารสกัดหยาบด้วย แอลกอฮอล์ 95% จากขมิ้น	96

ฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่คัดแยกจากน้ำดื่มบรรจุขวด

Antimicrobial Activity of Thai Medicinal Plant Extracts Against *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Drinking Water

คำนำ

“น้ำ” เป็นสิ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตอย่างยิ่ง ร่างกายคนเรานั้นมีน้ำเป็นองค์ประกอบมากกว่า 70% อวัยวะทุกส่วนในร่างกายของคนเราประกอบไปด้วยเซลล์ ของเหลวในร่างกายก็เป็นสิ่งแวดล้อมของเซลล์ต่างๆ บ่งชี้ได้ว่าของเหลวภายในและภายนอกเซลล์ที่มีสุขภาพดี คือ โมเลกุลของน้ำ ที่จะเป็นตัวช่วยชำระล้างของเสียออกไปจากร่างกายและช่วยสร้างความชุ่มชื้น ส่งผลให้เกิดความยืดหยุ่นกับเซลล์ในร่างกาย ลักษณะของน้ำดื่มที่ดีเหมาะแก่การบริโภคจึงควรเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำบริโภค คือ ต้องสะอาดปราศจากสารปนเปื้อนทางเคมีและสารอินทรีย์ต่างๆ เช่น โลหะหนัก และสารเคมีอื่นๆ รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโทษกับร่างกาย (ราชกิจจานุเบกษา, 2549) โดยในปัจจุบันน้ำดื่มบรรจุขวดมีวางขายตามท้องตลาดมากมายหลายยี่ห้อ ซึ่งมาตรฐานการผลิตก็มีความแตกต่างกันไป จึงมักพบรายงานการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ต่างๆ เกินกว่าที่มาตรฐานกำหนด (Kenzie *et al.*, 1994) และในบางผลิตภัณฑ์ยังพบแบคทีเรียก่อโรคสำคัญ (นงลักษณ์, 2544) เช่น *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* (ณรงค์เดช, 2556; ลิทธิธร, 2556) และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสสำคัญสาเหตุของโรคปอดอักเสบและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคถ้าเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ (Giamarellou and Antonidou, 2001) ก็จะเป็นอันตรายมากขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้ต้องไม่พบเลยในน้ำสำหรับการบริโภค

ดังนั้น การทดสอบทางจุลชีววิทยาของน้ำดื่ม เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง ที่จะต้องกระทำอย่างสม่ำเสมอทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่า น้ำดื่มสามารถนำไปใช้บริโภคหรือดื่มได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ โดยทั่วไปน้ำที่นำมาใช้บริโภค เช่น น้ำประปา หรือแม้กระทั่งน้ำดื่มบรรจุขวด มักผลิตมาจากแหล่งน้ำผิวดิน (surface water) ซึ่งมีแบคทีเรียในธรรมชาติอาศัยอยู่ เช่น *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Spirillum* และ *Bacillus* เป็นต้น (Kilb *et al.*, 2003; Servais *et al.*, 1992) สำหรับน้ำดื่มจะต้องปราศจากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับ

ทางเดินอาหาร การตรวจสอบคุณภาพของน้ำดื่มซึ่งต้องทำเป็นประจำ ส่วนใหญ่ไม่นิยมตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคโดยตรง ทั้งนี้เพราะต้องใช้เทคนิคและวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยาก โดยทั่วไปจะใช้วิธีการตรวจหาแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มและฟีคัล โคลิฟอร์ม เช่น *Escherichia coli* แบคทีเรียกลุ่มนี้มักพบเป็นประจำในทางเดินอาหารของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแต่อาจจะไม่พบในดินและน้ำ ดังนั้นการตรวจพบแบคทีเรียดังกล่าวนี้ในน้ำดื่มก็จะแสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ (Rogers *et al.*, 1994) แต่อย่างไรก็ตามมาตรฐานของน้ำดื่มกำหนดให้ตรวจหาเชื้อก่อโรค เช่น *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* รวมทั้ง *Clostridium perfringens* ด้วย (ราชกิจจานุเบกษา, 2552) แม้ว่าตามมาตรฐานของน้ำดื่มยังไม่มีข้อกำหนดที่แน่นอนว่าต้องตรวจเชื้อ *P. aeruginosa* แต่เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีความสำคัญเป็นเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสและมีรายงานการก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial infection) อยู่เป็นประจำและเชื้อชนิดนี้มักตรวจพบได้ทั้งในน้ำ ดิน และสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไป อีกทั้งยังเป็นเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดมาก (multidrug resistance) (นงลักษณ์, 2544) เนื่องจากมีรายงานตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *P. aeruginosa* ในน้ำดื่มบรรจุขวด (Kilb *et al.*, 2003; Servais *et al.*, 1992) ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะทดลองตรวจหาเชื้อนี้ในน้ำบรรจุขวดพร้อมดื่มที่มีขายตามท้องตลาดจำนวนมากมายหลายยี่ห้อ ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความมั่นใจและความปลอดภัยของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาการนำสารสกัดจากสมุนไพรมาทำการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ที่คัดแยกได้จากน้ำดื่มบรรจุขวดโดย isolates ที่ทำการศึกษาคือเชื้อปฏิชีวนะหลายชนิดในการวิจัยนี้ด้วย เพื่อเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *P. aeruginosa*

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจหาแบคทีเรียก่อโรค *Pseudomonas aeruginosa* จากตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวด
2. เพื่อศึกษาแนวโน้มน้ำการดื้อยาปฏิชีวนะของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากน้ำดื่มบรรจุขวด
3. เพื่อศึกษาวิธีการสกัด สารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทย 8 ชนิด คือกระเจี๊ยบ ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ตะไคร้ บัวบก ใพล ฟ้าทะลายโจร และลูกข่อย ด้วยตัวทำละลายต่างกัน 3 ชนิด คือ แอลกอฮอล์ 95% เฮกเซน และน้ำร้อน
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบสมุนไพรทั้ง 8 ชนิด ในการยับยั้ง *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากน้ำดื่มบรรจุขวด
5. เพื่อตรวจหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารสกัดหยาบที่ให้ผลมีฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* จากการศึกษาในข้อ 4

การตรวจเอกสาร

1. *Pseudomonas aeruginosa*

เชื้อ *Pseudomonas* จัดอยู่ในตระกูลชูโดโมนาดาซีอี (Pseudomonadaceae) เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน ติดสีแกรมลบ เจริญได้ดีในที่ที่มีอากาศ (obligate aerobes) บางชนิดสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ดำรงชีวิตอย่างอิสระอยู่ในที่ชื้น (Fick and Hata, 1989) บางชนิดเป็นเชื้อก่อโรคพืชแมลงและสัตว์ มีเพียงไม่กี่ชนิดที่ก่อโรคกับคน *Pseudomonas* มักเป็นเชื้อฉวยโอกาส (Opportunist) ทำให้เกิดโรคในคนไข้ที่ภูมิคุ้มกันผิดปกติ และเกิดอาการรุนแรงในคนที่มีแผลไฟไหม้ และคนที่สวนปัสสาวะ (Pier *et al.*, 2005) โรคที่เกิดขึ้นในคนพบว่า เกิดจาก *P. cepacia*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa* และ *P. stutzeri* แต่เชื้อที่พบว่าทำให้เกิดโรคกับคนมากที่สุด คือ *P. aeruginosa* แสดงชนิดของ *Pseudomonas* ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคนไว้ในตารางที่ 1 *P. aeruginosa* มีลักษณะเป็นรูปท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อยมีขนาดประมาณ 0.5 - 1.0 x 1.5 - 5.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ด้วยโพลาร์แฟลกเจลลา (Polar flagella) ผนังเซลล์ประกอบด้วยไลโปโพลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide, LPS) ที่มีโครงสร้างคล้ายของแบคทีเรียในตระกูลเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae) แต่มีสารเคมีบางหมู่ต่างกัน ส่วนของสายโพลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide side chain) ที่ยื่นออกมาจากเมมเบรนชั้นนอกเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับความจำเพาะทางซีโรโลยีและความไว (Susceptible) ต่อสารแบคทีริโอซินหรือไพโอซิน (bacteriocin หรือ pyocin) และแบคทีริโอฟาจ *P. aeruginosa* ยังมีชั้นเยื่อเมือก (Slime layer) ที่ประกอบด้วยโพลิแซ็กคาไรด์ (Davies *et al.*, 1998)

ตารางที่ 1 แสดง Pseudomonads บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน

เชื้อ	เจริญที่ 42°C	เกิดโรคแบบ	ดื้อยาอะมิโนไกลโคไซด์ ^a
<i>P. aeruginosa</i>	+	ฉวยโอกาส	5 - 20%
<i>P. fluorescens</i>	-	ฉวยโอกาส	ไม่ค่อยเกิด
<i>P. putida</i>	-	ฉวยโอกาส	ไม่ค่อยเกิด
<i>P. mallei</i>	-	Glanders	-
<i>P. pseudomallei</i>	-	Melioidosis	90%
<i>P. cepacia</i>	V	ฉวยโอกาส	90%
<i>P. alcaligenes</i>	V	ฉวยโอกาส	90%
<i>P. stutzeri</i>	V	ฉวยโอกาส	90%
<i>P. maltophilia</i>	V	ฉวยโอกาส	90%
<i>P. putrefaciens</i>	V	ฉวยโอกาส	90%
<i>P. acidovorans</i>	V	ฉวยโอกาส	90%

หมายเหตุ V = ไม่แน่นอน; + = มากกว่า 90%; - = น้อยกว่า 10%

^a ดื้อยาอะมิโนไกลโคไซด์ หมายถึง ยาเจนตาไมซิน โทบราไมซิน อะมิกาซิน เป็นต้น

ที่มา: รุ่งรัศมี (2552)

1.1 การเจริญและเมแทบอลิซึม

P. aeruginosa ดำรงชีวิตแบบใช้ออกซิเจน สามารถเจริญและได้พลังงานโดยใช้แหล่งของไนโตรเจนและคาร์บอนจากสารอาหาร เช่น แอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ ในการเจริญจึงไม่ต้องการสารอาหารซับซ้อน สามารถมีชีวิตและเพิ่มจำนวนในช่วงอุณหภูมิกว้าง ตั้งแต่ 20 - 42 องศาเซลเซียส ในสภาพแวดล้อมต่างๆ รวมทั้งในสภาพที่มีเกลือสูงๆ ได้ เชื้อสามารถได้พลังงานจากกระบวนการออกซิเดทีฟและสร้างไซโทโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase) (Gaby and Free, 1953)

P. aeruginosa สามารถเจริญได้ในอาหารธรรมดาที่ใช้แยกเชื้อ ถึงแม้จะไม่เร็วเท่าแบคทีเรียในตระกูลเอนเทอโรแบคทีเรียซิงอี เมื่อบ่มเชื้อไว้ค้างคืนจะเจริญ มักให้รงควัตถุสีเหลืองอมเขียวโคโลนีขนาดใหญ่และแพร่กระจาย ลักษณะโคโลนีเป็นมันเงาสีโลหะ (Metallic sheen) เมื่อเลี้ยงในอาหารผสมเลือดอาจเกิดการย่อยเม็ดเลือดแดง เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวจะจับกันเป็นแผ่นที่ผิวหน้าอาหาร (Pellicle) ซึ่งแสดงว่าเชื้อชอบออกซิเจน (Gaby, 1955)

1.2 การจัดจำแนกเชื้อ

P. aeruginosa เป็นเชื้อชนิดหนึ่งที่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส เคลื่อนที่ได้และไม่เฟอร์เมนต์น้ำตาลแลคโทสเมื่อเลี้ยงใน MacConkey agar มักสร้างรงควัตถุ Pyocyanin ที่มีสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งจะละลายออกมาในอาหารแข็ง หลายสายพันธุ์สามารถสร้างสีเขียวฟลูออเรสเซนต์ที่มีชื่อว่า Pyoverdine บางสายพันธุ์สามารถสร้างสีแดงเข้มของ Pyorubin หรือสีดำของ Pyomelanin เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* จะพบโคโลนีหลายแบบ โดยเชื้อที่มาจากโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันจะมีลักษณะทางชีวเคมีและแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ต่างกัน และมีความไวของยาปฏิชีวนะแตกต่างกันด้วย อย่างไรก็ตาม ลักษณะโคโลนีที่ต่างกันยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นสายพันธุ์ของเชื้อที่แตกต่างกันหรือเป็น Variant ของสายพันธุ์เดียวกัน (อรอนงค์, 2555) ความสามารถในการสร้างไฟโอไซยานินและการเจริญที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นลักษณะที่ใช้แยก *P. aeruginosa* ออกจากสปีชีส์อื่น (Gaby and Hadley, 1959)

1.3 โครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรค

โครงสร้างต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรค ซึ่งจะเป็นปัจจัยร่วมกันที่ส่งผลให้เชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรค มีดังนี้ (นงลักษณ์, 2544)

1.3.1 สารเมือก (Slime layer)

เป็นโพลิแซ็กคาไรด์ที่จะทำให้โคโลนีนั้นเป็นเมือกเยิ้ม ซึ่งสารเมือกนี้จะช่วยให้เชื้อเกาะติดกันและติดกับผิวเซลล์ โดยเฉพาะคนไข้ที่เป็นโรคทางเดินหายใจเรื้อรัง และนอกจากนี้ยังช่วยป้องกันเชื้อจากกระบวนการฟาโกไซโทซิสของโฮสต์อีกด้วย

1.3.2 พิลหรือฟิมเบรีย (Pili หรือ Fimbriae)

จะเป็นส่วนที่คล้ายเส้นขนเล็กๆ ที่ยื่นออกมาจากผิวเซลล์ เพื่อที่จะจับกับเยื่อผิวทางเดินหายใจ

1.3.3 เอนโดทอกซิน (Endotoxin)

เอนโดทอกซินจะเป็นลิโปโพลีแซ็กคาไรด์อยู่ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ และจะเป็นแอนติเจนที่สำคัญอีกด้วย ส่วนลิพิดจะเป็นองค์ประกอบของเอนโดทอกซินที่เกี่ยวกับความเป็นพิษ แต่ความเป็นพิษของเชื้อ *P. aeruginosa* นั้นจะมีน้อยกว่าแบคทีเรียในตระกูลเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีอยู่ประมาณ 10 เท่า

1.3.4 อีลาสเทส (Elastase)

เป็นเอนไซม์ที่จะทำลายอีลาสติกไฟเบอร์ที่ผนังหลอดเลือด ซึ่งจะทำให้เกิดเลือดออกและเชื้อแพร่กระจายออกไปอีกด้วย

1.3.5 เอกโซทอกซินเอ (Exotoxin A)

เป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อรุนแรง จะขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ยูคาริโอต ทอกซินนี้จะทำให้เซลล์ตายและมีความเป็นพิษแต่น้อยกว่าสารพิษของเชื้อโรคคอตีบ

1.3.6 โปรตีเอส (Proteases)

เป็นเอนไซม์ที่ถูกขับออกนอกเซลล์ จะย่อยสลายเนื้อเยื่อของโฮสต์และทำลายอิมมูโนโกลบูลินและคอมพลีเมนต์ นอกจากนี้ยังจะช่วยให้เชื้อมุกรุกและแพร่กระจายออกไปสู่เซลล์อื่น

1.3.7 เอกโซทอกซิน เอส (Exotoxin S)

เป็นสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน จะต่างกับเอกโซทอกซิน เอ ตรงที่ทนความร้อนได้ จะพบในบางสายพันธุ์ของ *P. aeruginosa*

1.3.8 ฟอสโฟลิเพส ซี (Phospholipase C)

จะย่อยสลายไขมันและเลซิทีนเพื่อที่จะให้ปล่อยฟอสโฟริลโคลินออกมา ช่วยทำลายเนื้อเยื่อ (นงลักษณ์, 2544)

1.4 โรคติดเชื้อที่เกิดจาก *P. aeruginosa*

1.4.1 การติดเชื้อที่แผลไฟไหม้

เมื่อมีการรวมตัวของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่บริเวณแผลไฟไหม้จะเกิดการทำลายของผนังหลอดเลือดและจะเกิดการตายของเนื้อเยื่อ จนทำให้เชื้อนั้นสามารถเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดตรงบริเวณผิวหนังที่ไหม้นั้นจะมีความชุ่มชื้นและจะไม่มีนิวโทรฟิลป้องกันการบุกรุกของเชื้อจึงทำให้เกิดการติดเชื้อของ *P. aeruginosa* ได้ง่ายอีกด้วย

1.4.2 การติดเชื้อที่ปอด (Pulmonary infection)

การติดเชื้อ *P. aeruginosa* บริเวณทางเดินหายใจส่วนล่างจะมีตั้งแต่หลอดคอและหลอดลม ปอดอักเสบจนถึงปอดอักเสบอย่างรุนแรง ซึ่งการติดเชื้อจะพบในคนไข้ที่เป็นโรคปอดเรื้อรังและผู้ที่มีนิวโทรฟิลน้อยกว่าปกติ ในการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ปอดนั้นจะมีลักษณะการติดเชื้อในโรงพยาบาลและที่ทำให้เกิดโรคปอดบวมได้ 4 ทาง ดังนี้

ก. การใช้เครื่องช่วยหายใจรูปแบบต่างๆ การใส่ท่อช่วยหายใจ (Intubation) การเจาะคอ ซึ่งอุปกรณ์เหล่านี้จะกดระบบภูมิคุ้มกันโรคของทางเดินหายใจส่วนต้น หากไม่มีการระมัดระวังในการดูแลคนไข้จะทำให้เชื้อเข้าถึงปอดได้ง่าย ซึ่งการพบเชื่อนั้นจะพบในน้ำที่ใส่ให้ความชื้นภายในเครื่องช่วยหายใจ

ข. การแพร่กระจายทางกระแสเลือดในร่างกายของผู้ป่วยจะมีการติดเชื้อที่ใดที่หนึ่ง เมื่อเชื้อลามเข้าสู่กระแสเลือดจะมีปอดเป็นอวัยวะสุดท้ายของการติดเชื้อทางกระแสเลือด ซึ่งจะได้รับการติดเชื้อเสมอ

ค. การสำลักอาหารภายในปากหรือจากกระเพาะอาหารเข้าสู่ปอดนั้นผู้ป่วยจะไม่ค่อยรู้สึกตัว

ง. การหายใจละอองอากาศที่มีเชื้อเข้าไปทำให้เชื้อแพร่กระจายและสามารถติดต่อได้ง่าย

1.4.3 การติดเชื้อที่หู (Ear infection)

สำหรับคนที่ชอบเล่นน้ำมักจะเกิดการติดเชื้อ *P. aeruginosa* จะส่งผลทำให้หูชั้นนอกอักเสบ และการติดเชื้อนั้นสามารถจะลุกลามเข้าไปในเนื้อเยื่อชั้นใน ทำให้เกิดอันตรายได้ จึงจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะและการผ่าตัดในการรักษา

1.4.4 การติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteremia)

เยื่อหัวใจอักเสบ (Endocarditis) จากการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในกระแสเลือดนั้นจะไม่แตกต่างกันเลยจากการติดเชื้อแกรมลบชนิดอื่นถึงจะมีอัตราการตายสูงกว่า เนื่องจากความรุนแรงของเชื้อและเนื่องจากเชื้อจะเกิดการติดเชื้อในคนไข้ที่มีภูมิคุ้มกันผิดปกติ (Immunocompromised)

1.4.5 การติดเชื้อที่อวัยวะอื่นๆ

นอกจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว *P. aeruginosa* ยังจะเกี่ยวข้องกับอวัยวะอื่นอีกด้วย เช่น ระบบประสาทส่วนกลาง ทางเดินอาหาร ตา ทางเดินปัสสาวะ ระบบกล้ามเนื้อและกระดูก การติดเชื้อ *Pseudomonas* นั้น คนไข้จะไม่มีกลไกการติดเชื้อและเชื้อจะอยู่ในแหล่งที่ชื้นๆ เช่น การเกิดบาดแผลบริเวณผิวหนัง การสูญเสียเชื้อประจำถิ่นเนื่องจากเกิดภาวะนิ่วโทรฟิลน้อยหรือเนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะ การติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในท่อปัสสาวะนั้นจะพบในคนไข้ที่ใช้สายสวนหลอดปัสสาวะเป็นส่วนใหญ่ การติดเชื้อ *P. aeruginosa* ทางผิวหนังจะมีลักษณะ 4 แบบ ดังนี้

ก. Vesicles และ bullae อาจจะมีขนาดเล็กๆ รวมกันเป็นกลุ่มหรืออาจเป็นเพียงกลุ่มเดียวพบได้ทั่วไปตามร่างกาย ซึ่งจะกลายเป็น hemorrhagic bleb และมี erythema รอบๆ ในทารก ซึ่ง lesion จะเหมือน erythema multiforme คล้ายกับถูกยุงกัดหรือถูกแมลงกัด

ข. Ecthyma gangrenosum มีลักษณะบวมแดง ค่อนข้างแข็ง ต่อมาจะกลายเป็นเนื้อตาย จะไม่มีอาการเจ็บปวดเนื่องจากมี scar สีดำคลุมอยู่ ซึ่งอาจจะเกิดหลังจาก vesicles และ bullae ก็ได้

ค. Macular หรือ maculopapular lesion เป็น macule จะพบได้ตามส่วนต่างๆ ของร่างกายโดยเฉพาะบริเวณแขนและขา ซึ่งมีขนาดเล็ก รูปไข่สีแดง

ง. Gangrenous cellulitis เป็น superficial necrotic ulcer จะมีขอบเขตชัดเจน คล้าย decubitus ulcer บางครั้ง cellulitis ตรงกลางจะเป็นเนื้อตาย ซึ่งจะพบบริเวณใกล้กับทวารหนัก หรือบริเวณสะโพกจะเป็น perianal abscess หรือ perirectal จะไม่พบ lesion หากไม่มีการตรวจเช็กร่างกายอย่างละเอียด

1.5 กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *P. aeruginosa*

เชื้อ *P. aeruginosa* มีรายงานดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดด้วยกัน เช่น ดื้อต่อยา Ampicillin, Cefalotin, Carbenicillin, Penicillin, Piperacillin, Streptomycin และ Tetracycline (Markou *et al*, 2008) กลไกการดื้อยาด้านจุลชีพหลายชนิดในเชื้อ *P. aeruginosa* มีความหลากหลาย อาจเกิดจากการดื้อยาโดยธรรมชาติ (intrinsic resistance) จนไปถึงการได้รับยีนดื้อยาผ่านทาง Genetic mobile element (Livermore, 2002) โดย Plasmid, Conjugative transposons และ Integron จะเป็นโครงสร้างที่สำคัญสำหรับช่วยในการเคลื่อนย้ายและแพร่กระจายของยีนดื้อยา (Stokes and Hall, 1989) โดยมีโครงสร้างของเชื้อหรือปัจจัยส่งเสริมการดื้อยาปฏิชีวนะหรือสารต้านจุลชีพได้หลายรูปแบบ เช่น การสร้างเมือกหรือ Slime ขึ้นเพื่อเป็นด่านป้องกันการซึมผ่านของยาปฏิชีวนะเข้าสู่เซลล์ (Bonfinglio, 2001; Livermore, 2002; Okamoto *et al.*, 2001) และป้องกันการถูกจับกินโดยเม็ดเลือดขาว การมีพลาสมิดที่มียีนควบคุมการดื้อยาหรือการกลายพันธุ์ (Livermore, 2002) ทำให้ผนังเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงจนทำให้ยาบางชนิดผ่านเข้าสู่เซลล์ไม่ได้ การสร้างเอนไซม์ทำลายยา (Senda *et al.*, 1996) เปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่ยาจะไปออกฤทธิ์ เกิดภาวะ Up-regulation ของ Efflux system ซึ่งจะทำให้เชื้อแบคทีเรียขับยาออกนอกเซลล์ทำให้ยาออกฤทธิ์ได้

ไม่เต็มที่ (Giamarellou, 2001; Hirakata, *et al.*, 2005) ตัวอย่างกลไกการดื้อยาในยาบางกลุ่มของ *P. aeruginosa* เช่น

กลไกการดื้อยาในกลุ่ม Aminoglycosides มีหลายกลไก โดยพบว่า กลไกการดื้อที่พบได้บ่อยที่สุด คือ การเปลี่ยนแปลงเอ็นไซม์ที่ทำลายยา โดยยีนของเชื้อที่สร้างเอ็นไซม์ดังกล่าวมักพบอยู่บน Plasmid และ Transposons ซึ่งทำให้เกิดการดื้อยาได้สูง อีกกลไกหนึ่งคือการลดการ Uptake หรือลด Cellular permeability ของยาโดยกลไกนี้มักทำให้เกิด Cross-reactivity แก่ยาทุกตัวในกลุ่ม Aminoglycosides และทำให้เกิดการดื้อยาได้ในระดับปานกลาง นอกจากนี้ ยังมีกลไกการเปลี่ยนแปลงที่ Ribosome binding site ซึ่งจะทำให้เชื้อดื้อต่อยา Streptomycin, Gentamicin และ Amikacin (Poole, 2005)

การดื้อยาในกลุ่ม Polymyxin มีรายงานการเกิด Mutation resistance ของเชื้อแบคทีเรียต่อยาชนิดนี้น้อยมาก เคยมีรายงานว่า MIC ของยา Polymyxins เท่ากับ 128 - 256 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเชื้อ *P. aeruginosa* 2-3 isolates ในผู้ป่วยโรค cystic fibrosis ที่ได้รับยา polymyxin รูปแบบพ่นติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ซึ่งกลไกการดื้อยาดังกล่าวยังไม่ชัดเจน แต่อาจเกี่ยวข้องกับ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน (Livermore, 2002)

1.6 การวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ (Diagnosis)

Pseudomonas เลี้ยงได้ง่ายในอาหารธรรมดา เช่น blood agar หรือ MacConkey agar และเป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโตด้วย การจำแนกเชื้อโดยการดูจากลักษณะวิทยาของโคโลนี เช่น ขนาด สี กลิ่น และความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง รวมทั้งทดสอบสมบัติทางชีวเคมี เช่น การสร้างเอ็นไซม์ออกซิเดส (Gaby and Free, 1953) *P. aeruginosa* เจริญได้เร็วและให้โคโลนีมีลักษณะแบน มีขอบโคโลนีกระจายออกไป ใ้ห้รังควันตุลสีเขียว (ซึ่งเกิดจากสีฟ้าของไพโอไซยานินและสีเหลืองของฟลูออเรสซิน) และกลิ่นคล้ายอู่น (Fick and Hata, 1989) การจำแนกเชื้อที่เฉพาะเจาะจงอาศัยการทดสอบทางชีวเคมี ความไวต่อยาปฏิชีวนะ ความไวต่อแบคทีริโอฟาจ การสร้างไพโอไซยานิน การแยกชิโรไทป์ รวมทั้งข้อมูลทางด้านโมเลกุลของ DNA หรือ rRNA

การวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างเลือด แผลไฟไหม้ และอื่นๆ มาเพาะเชื้อ ในอาหาร Mueller-Hinton agar ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของเชื้อนำมาเลี้ยงในอาหารคัดเลือก เช่น cetrimide agar เชื้อที่แยกได้นำมาศึกษาการสร้างรงควัตถุไฟโอไซยานินที่มีสีฟ้า ศึกษาจากการ ย้อมสีแกรม ปฏิกริยาออกซิเดสและการเคลื่อนที่ ตัวอย่างจากเสมหะของคนไข้ที่เป็นโรคปอดเรื้อรัง (cystic fibrosis) นำมาเพาะใน MacConkey agar การบ่มเชื้อที่ 35 - 37 องศาเซลเซียสใช้เวลา 2 - 3 วัน (Gilligan *et al*, 2006) มีวิธีจำแนกเชื้อโดยใช้ disk ที่มีสาร phenanthroline และ C-390 (PC disk) นำ PC disk วางบนอาหาร Muller-Hinton agar เพื่อตรวจสอบความไวของเชื้อต่อ PC disk หลังจากบ่มไว้ 24 ชั่วโมงที่ 35 องศาเซลเซียส เชื้อที่แยกได้ทุกชนิดที่เป็นแกรมลบ รูปท่อนและ สร้างเอนไซม์ออกซิเดส ยกเว้น *P. aeruginosa* จะถูกยับยั้งด้วย PC disk การจำแนกเชื้อเบื้องต้นโดยวิธีทดสอบอื่นๆ (Campbell *et al*, 1988)

2. มาตรฐานการผลิตน้ำดื่มบรรจุขวด

ปัจจุบันน้ำดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทกำลังเป็นที่นิยมของผู้บริโภคโดยส่วนใหญ่ เนื่องจากการมีวิธีการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก จึงทำให้ธุรกิจการผลิตน้ำดื่มในภาชนะที่ปิดสนิท ขยายตัวอย่างรวดเร็ว มีผู้ประกอบการธุรกิจผลิตน้ำดื่มออกมาจำหน่ายมากมายในท้องตลาด เมื่อเป็นธุรกิจที่มีการขยายตัวสูง และมีการแข่งขันทางการตลาดกันมาก จึงมักพบปัญหา เช่น น้ำดื่ม บางยี่ห้อไม่ได้คุณภาพตามมาตรฐานน้ำดื่ม ไม่สามารถควบคุมการผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพพอ จนอาจกลายเป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรคต่างๆ ได้ในระบบการแจกจ่ายน้ำ โดยจุลินทรีย์สามารถ สร้างโคโลนีอยู่ได้ในทุกพื้นผิววัสดุที่สัมผัสกับน้ำ (Kilb *et al.*, 2003; Servais *et al.*, 1992) อาจเนื่องจากพลาสติกหรืออีลาสโตเมอร์ (Elastomers) บางชนิดในระบบแจกจ่ายน้ำทำมาจากวัสดุที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ จึงอาจกลายเป็นอาหารให้จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญ (Keevil, 2002; Kilb *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 1994) จุลินทรีย์ประมาณ 95% อาศัยอยู่กันเป็นกลุ่มหรือ biofilm ยึดเกาะอยู่บนผิวของท่อน้ำ และมีเพียง 5% ที่ปรากฏอยู่ในน้ำและอาจเพิ่มจำนวนขึ้น ภายหลังได้ (Flemming *et al.*, 2002) อันจะส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพของผู้บริโภค และเป็นอันตราย อย่างยิ่งหากพบการปนเปื้อนของเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคและเป็นกลุ่มที่พบการดื้อยาปฏิชีวนะ (Wingender and Flemming, 2004)

เพื่อให้ผู้ประกอบการนำไปปฏิบัติได้อย่างถูกต้องและผู้บริโภคทราบถึงกระบวนการผลิต น้ำดื่ม และเลือกซื้อน้ำดื่มได้อย่างปลอดภัย จึงควรทราบและศึกษารายละเอียดของกฎหมาย ข้อบังคับเบื้องต้นเกี่ยวกับน้ำดื่มบรรจุขวด

2.1 การควบคุมการผลิตน้ำดื่มบรรจุขวดตามกฎหมาย (ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม, 2549; ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2552)

น้ำดื่มในภาชนะที่ปิดสนิท เป็นผลิตภัณฑ์ที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนดให้เป็นอาหารควบคุมเฉพาะ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 61 (พ.ศ. 2524) และแก้ไขเพิ่มเติม ฉบับที่ 135 (พ.ศ. 2534) ซึ่งผู้ผลิตต้องขออนุญาตผลิต ขออนุญาตจำหน่ายอาหารและขออนุญาตใช้ฉลากให้ถูกต้อง

2.1.1 การขออนุญาตผลิตน้ำดื่มในภาชนะที่ปิดสนิท

ในการขออนุญาตผลิตน้ำดื่มฯ นั้น ผู้ผลิตจะต้องได้รับการพิจารณา ก่อนกรอกในขั้นต้นว่า ผลิตภัณฑ์นั้นมีความปลอดภัยและมีคุณภาพหรือมาตรฐานตรงตามที่กฎหมายกำหนดจะกล่าวต่อไป โดยแบ่งเขตการขออนุญาตไว้ดังนี้ กรณีผู้ผลิตที่อยู่ในเขต กรุงเทพฯ จะต้องมายื่นขออนุญาตจาก สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข โดยผู้ผลิตจะต้องนำผลิตภัณฑ์มาขอขึ้นทะเบียนตำรับอาหาร หรือขออนุญาตใช้ฉลากอาหาร แล้วแต่กรณี คือ ถ้าผู้ผลิตมีสถานที่ผลิตเข้าข่ายเป็นโรงงาน กล่าวคือ มีการใช้เครื่องจักรที่มีกำลังรวมตั้งแต่ 2 แรงม้า หรือเทียบเท่า 2 แรงม้าขึ้นไป หรือมีคนงาน 7 คนขึ้นไป ต้องมาขออนุญาตผลิตอาหาร และขอขึ้นทะเบียนตำรับอาหารให้ถูกต้องหากผู้ผลิตมีสถานที่ผลิตไม่เข้าข่ายเป็นโรงงาน ไม่ต้องขออนุญาตผลิต และขอขึ้นทะเบียนตำรับอาหารตามที่กฎหมายกำหนดไว้ แต่จะต้องผลิตน้ำให้มีคุณภาพหรือมาตรฐานตามที่กำหนดไว้ในประกาศฯ และจะต้องขออนุญาตการใช้ฉลากก่อน เมื่อได้รับอนุญาตแล้วจึงจะนำไปติดแสดงที่ภาชนะบรรจุและนำออกจำหน่ายได้ ส่วนผู้ผลิตที่อยู่ในต่างจังหวัด ก็ให้ดำเนินการเหมือนผู้ผลิตที่อยู่ในเขตกรุงเทพฯ แต่ให้ยื่นขออนุญาตได้ที่สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดที่สถานที่ผลิตนั้นตั้งอยู่

คุณภาพหรือมาตรฐานของน้ำดื่มในภาชนะที่ปิดสนิทเมื่อผู้ผลิตได้รับอนุญาตให้ผลิตน้ำดื่มแล้ว ก็ต้องปฏิบัติตามประกาศฯ ซึ่งได้กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของน้ำที่ผลิตไว้ดังนี้

ก. คุณภาพทางฟิสิกส์ ได้แก่ สี กลิ่น ความขุ่น และค่าความเป็นกรด - ด่าง โดยจะต้องไม่มีสี ไม่มีกลิ่น แต่ไม่รวมถึงกลิ่นคลอรีน ความขุ่นต้องไม่เกิน 5.0 ซิลิกาสะเทิล และค่าความเป็นกรด - ด่าง ต้องอยู่ระหว่าง 6.5 ถึง 8.5

ข. คุณสมบัติทางเคมี กำหนดปริมาณสารทั้งหมด (Total solid) ไม่เกิน 500.0 มิลลิกรัมต่อน้ำบริโภค 1 ลิตร โดยปริมาณของสารต่างๆ เช่น ความกระด้างทั้งหมด ค่าแวนเป็นแคลเซียมคาร์บอเนตไม่เกิน 100.0 มิลลิกรัมต่อน้ำบริโภค 1 ลิตร คลอไรด์ แคลเมียม ไนเตรท ฟีนอล ซัลเฟต โครเมียม ฟลูออไรด์ เป็นต้น จะมีได้ในปริมาณตามที่กำหนดไว้ในประกาศฯ

ค. คุณสมบัติทางจุลินทรีย์ จะต้องไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และต้องไม่พบแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* ส่วนแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์ม ให้มีได้ไม่เกิน 1.1 ต่อน้ำบริโภค 100 มิลลิลิตร โดยวิธีเอ็มพีเอ็น (Most Probable number)

ง. ขั้นตอนการผลิตน้ำดื่มในภาชนะที่ปิดสนิท การผลิตน้ำดื่มฯ ให้มีคุณภาพหรือมาตรฐาน น้ำที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ต้องได้จากแหล่งที่เหมาะสม มีอุปกรณ์การผลิตที่เหมาะสม มีการบำรุงรักษาที่ดี มีกระบวนการผลิตที่ถูกต้อง รวมถึงมีการสุขาภิบาลที่ดี ทั้งอาคารสถานที่ อุปกรณ์ ภาชนะบรรจุ และคนงาน กรรมวิธีการผลิตน้ำ โดยทั่วไปจะนำน้ำจากแหล่งน้ำที่เหมาะสม เช่น น้ำประปา แม่น้ำ ลำคลอง น้ำบาดาล เป็นต้น มาปรับคุณภาพของน้ำดังต่อไปนี้

1) การเติมอากาศ (Aeration) เป็นกระบวนการซึ่งทำให้น้ำสัมผัสกับอากาศเพื่อลดความเข้มข้นของก๊าซ และสารบางชนิดที่ระเหยได้ โดยการทำให้น้ำเป็นแผ่นฟิล์มหรือทำเป็นน้ำตก ทำเป็นเครื่องกีดขวางให้น้ำไหลผ่าน หรือพ่นน้ำให้สัมผัสกับอากาศ

2) การตกตะกอนด้วยสารเคมี (Coagulation) โดยการเติมสารเคมีบางชนิดลงในน้ำ เพื่อให้สารที่มีอนุภาคเล็กๆ รวมตัวกันเป็นอนุภาคใหญ่และมีน้ำหนักง่ายต่อการกำจัดโดยการตกตะกอน (Sedimentation) หรือการกรอง (Filtration)

3) การตกตะกอนโดยวิธีธรรมชาติ เพื่อลดปริมาณสารพวก Settleable materials ในน้ำให้ตกลงสู่ก้นถังโดยแรงดึงดูดของโลก

4) การกรอง (Filtration) เป็นวิธีการที่สำคัญอย่างหนึ่งในการปรับคุณภาพน้ำ สารกรองกรวดทราย มักใช้กรองน้ำประปาหรือน้ำบาดาล เพื่อขจัดสิ่งเจือปนทางฟิสิกส์ เช่น ตะกอน และดินทราย โดยให้น้ำไหลผ่านถังกรองทรายที่มีชั้นของกรวดทรายเรียงตามขนาดที่พบเหมาะสมในถัง สารกรองผงถ่าน มีลักษณะคล้ายถ่านบดละเอียดสีดำ ภายในมีรูพรุนคดเคี้ยวไปมา พองน้ำนี้ได้รับการผ่านกระบวนการใช้ความร้อนสูง และลดความดันมาเป็นพิเศษ มีคุณสมบัติ

ในการดูดสี กลิ่นคลอรีน ก๊าซ ใ้กรอง ที่นิยมใช้มี 2 ชนิด คือ ใ้กรองเซรามิก ทำจากเซรามิกที่มีรูพรุนละเอียดมีประสิทธิภาพในการกรองสิ่งเจือปนที่มีขนาดเล็กมากได้ดี ใ้กรองแอนทราไซค์ และแมงกานีส โดยแมงกานีสจะใช้กำจัดสนิม ธาตุเหล็ก ตะกั่ว กำมะถัน สังกะสีในน้ำ ส่วนแอนทราไซค์จะใช้กำจัดสนิมเหล็ก ตะกั่ว และความขุ่นได้

5) สารกรองเรซิน เป็นสารสังเคราะห์ที่สามารถกรองน้ำดื่มที่มีความกระด้างให้เป็นน้ำอ่อนได้ โดยเรซินสามารถกำจัดแคลเซียมและแมกนีเซียมด้วยการแลกเปลี่ยนไอออน เพื่อกำจัดเหล็กและแมงกานีส รวมทั้งสิ่งสกปรกทั้งหลายในน้ำได้

6) การฆ่าเชื้อ (Disinfection) ซึ่งมีหลายวิธี เช่น ใช้ความร้อน การกรอง การใช้แสงอัลตราไวโอเลต การใช้สารเคมี เป็นต้น การใช้ใ้กรองแบคทีเรีย (Bacterial filter) เป็นใ้กรองเซรามิกที่ผสมด้วยธาตุเงิน มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ การใช้ความร้อนจากแสงอาทิตย์ (Solar energy application) เป็นวิธีการที่พัฒนาขึ้น โดยใช้หลักการประหยัดพลังงาน โดยนำพลังงานความร้อนที่มีอยู่ตามธรรมชาติมาใช้ การใช้แสงอัลตราไวโอเลต โดยใช้หลอดแก้วใสทำด้วยควอทซ์ หรือ High silica glass ซึ่งสามารถให้แสงที่มีช่วงคลื่นที่ทำลายจุลินทรีย์ได้ ภายในเวลาที่พอเหมาะ การฆ่าเชื้อโดยใช้สารคลอรีน นอกจากคลอรีนจะฆ่าเชื้อโรคในน้ำแล้ว ยังช่วยเร่งปฏิกิริยาในการตกตะกอนของสารเคมีในน้ำด้วย สารที่นิยมใช้ เช่น สารประกอบประเภทไฮโปคลอไรท์ เป็นต้น เมื่อผ่านกระบวนการดังกล่าวข้างต้นแล้ว ก็จะเก็บน้ำไว้ที่ถังพักน้ำก่อน แล้วจึงนำมาบรรจุภาชนะเพื่อจำหน่ายต่อไป

โดยกระบวนการฆ่าเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพในระบบน้ำดื่มบรรจุขวด ตามมาตรฐานอุตสาหกรรม ควรประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ การกรองด้วยระบบ Reverse Osmosis (R.O.) เป็นระบบฟอกน้ำและสกัดสารละลายที่ไม่พึงประสงค์ออก เช่น เกลือ โลหะหนัก และสารที่ก่อเกิดมะเร็งออกจากน้ำ โดยใช้ใ้กรองเมมเบรน ที่มีความละเอียดถึง 0.0001 ไมครอน โดยผ่านการทำงานของเครื่องปั๊มแรงดันสูง การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยแสง Ultraviolet ซึ่งเป็นกระบวนการต่อจาก R.O. โดยน้ำจะถูกส่งผ่านหลอดฉายแสง UV เพื่อฆ่าเชื้อโรค ซึ่งอาจมีการปนเปื้อนมาในน้ำดื่มในระหว่างรอการบรรจุ และการเติมโอโซน (Ozone) ซึ่งเป็นการฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ที่อาจมีหลงเหลืออยู่ในน้ำก่อนขบวนการบรรจุ (คุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรคได้ดีกว่าคลอรีน 3,125 เท่า) โดยไม่ก่อให้เกิดสารตกค้าง ที่เป็นอันตราย แล้วจะยังคงมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรคต่อเนื่อง จนกระทั่งเสร็จสิ้นขบวนการบรรจุและผนึกฝา จึงทำให้น้ำมีคุณสมบัติของน้ำกลุ่ม

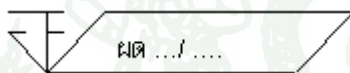
โมเลกุลเล็ก สามารถซึมผ่านเซลล์ได้ง่าย โดยก๊าซโอโซนที่หลงเหลืออยู่ในขวด จะแปรสภาพเป็น ก๊าซออกซิเจนที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ และยังช่วยทำให้รสชาติของน้ำชาวน้ำดื่มยิ่งขึ้น

2.1.2 การแสดงฉลากของน้ำดื่มในภาชนะที่ปิดสนิท

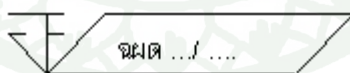
การแสดงฉลากน้ำดื่มบรรจุขวด จะต้องเป็นไปตามประกาศกระทรวง สาธารณสุข ฉบับที่ 68 (พ.ศ. 2525) เรื่อง ฉลาก โดยต้องแสดงข้อความเป็นภาษาไทย ดังนี้

ก. ชื่ออาหาร เช่น น้ำดื่ม... หรือน้ำบริโภคน้ำ... หรือชื่ออาหารทางการค้า โดยมีคำว่า "น้ำบริโภคน้ำ" กำกับอยู่

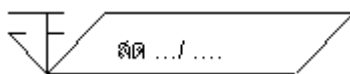
ข. เลขที่ทะเบียนคำรับอาหาร หรือเลขที่อนุญาตให้ฉลาก แล้วแต่กรณี โดยแสดงตามแบบที่ อย. กำหนดไว้คือ



สำหรับน้ำบริโภคน้ำที่ผลิตในประเทศ โดยสถานที่ผลิตเข้าข่ายโรงงาน คือ มีคนงานตั้งแต่ 7 คนขึ้นไป หรือมีเครื่องจักรตั้งแต่ 5 แรงม้าขึ้นไป



สำหรับน้ำบริโภคน้ำที่ผลิตหรือแบ่งบรรจุจากสถานที่ผลิตที่ไม่เข้าข่ายโรงงาน เป็นการขออนุญาตให้ฉลาก



สำหรับน้ำบริโภคน้ำที่นำเข้ามาเพื่อจำหน่าย และถ้าเป็นการผลิตในต่างจังหวัด ก็จะมีชื่อของจังหวัดนั้นๆ นำหน้า ผลิต. หรือ ผลิต.

ก. ชื่อและที่ตั้งของผู้ผลิต หรือผู้แบ่งบรรจุเพื่อจำหน่าย ในกรณีอาหารที่ผลิตในประเทศอาจแสดงชื่อสำนักงานใหญ่ได้ ถ้าเป็นอาหารนำเข้า ก็แสดงชื่อประเทศของผู้ผลิตด้วย

ข. ปริมาตรสุทธิของอาหารเป็นระบบเมตริก เช่น ปริมาตรสุทธิ 75 ซม.³ หรือ ปริมาตรสุทธิ 1 ลิตร เป็นต้น

2.2 การเลือกซื้อน้ำดื่มในภาชนะที่ปิดสนิท

ในการเลือกซื้อน้ำดื่มฯ ถึงแม้ว่าจะมีเครื่องหมาย อย. ก็ตาม อาจมีการปลอมแปลงขึ้นมาได้ จึงควรสังเกตและพิจารณาให้ดี โดยมีข้อสังเกตดังนี้

2.2.1 ลักษณะของภาชนะบรรจุต้องสะอาด ไม่ร่วนซึม หรือมีรอยสกปรก ถ้าบรรจุในภาชนะที่เป็นพลาสติก ภาชนะต้องสะอาด ไม่มีการปนเปื้อน ฝาปิดต้องสนิทและมีพลาสติกรัดอีกชั้นหนึ่ง หรือถ้าเป็นขวดแก้ว ก็ต้องสะอาด ฝาปิดสนิทเช่นกัน ฝาที่ปิดผนึกหากเป็นชนิดขวดจะต้องไม่มีร่องรอยว่ามีการเปิดใช้และหากเป็นชนิดถังต้องมีห่วงพลาสติกผนึกครอบฝาทันกับปากถัง

2.2.2 ตรวจสอบฉลากให้ดูว่ามีรายละเอียดครบถ้วนหรือไม่ ได้แก่ ชื่อน้ำดื่ม เลขทะเบียนตำรับหรือเลขที่อนุญาตให้ใช้ฉลาก ซึ่งจะแสดงในกรอบเครื่องหมาย อย.

2.2.3 สภาพของน้ำหรือลักษณะของน้ำ ต้องใสสะอาด ไม่มีตะกอน ไม่มีสิ่งเจือปนอื่นๆ ไม่มีสี กลิ่น หรือรสที่ผิดปกติ ควรเลือกซื้อจากผู้ผลิตที่เชื่อถือได้ มีที่อยู่แน่นอน มีการเก็บรักษาที่ดี ไม่วางปะปนกับผลิตภัณฑ์วัตถุอันตราย

2.2.4 การเลือกซื้อน้ำชนิดถัง ควรตรวจสอบให้ดูว่าฉลากที่ถัง กับพลาสติกที่รัดปากถัง เป็นของผู้ผลิตเดียวกันหรือไม่ เพราะผู้ผลิตบางรายจะเก็บถังของผู้ผลิตรายอื่นมาบรรจุน้ำของตน

2.2.5 ไม่ควรซื้อตามคำโฆษณา หรือคำกล่าวอ้าง เช่น มีแร่ธาตุครบตามที่ร่างกายต้องการ เป็นต้น

3. สมุนไพร

ปัจจุบันพืชสมุนไพรมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ เมื่อใช้เป็นเวลานานจะทำให้เกิดการสะสมของสารพิษ และเชื้อก่อโรคสามารถปรับตัวทำให้เกิดการดื้อยา การที่เชื้อโรคมิมีการพัฒนาสายพันธุ์เพื่อการอยู่รอดตลอดเวลา ก่อให้เกิดความรุนแรงและการดื้อยามากขึ้นเป็นลำดับ ยาที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ที่สามารถต้านการดื้อยาและรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ มักมีราคาแพงเพราะต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้น ด้วยความอุดมสมบูรณ์และความหลากหลายทางชีวภาพของพืชในประเทศไทย ภูมิปัญญาในการนำพืชสมุนไพรมาใช้เป็นยาตั้งแต่สมัยโบราณ และความก้าวหน้าด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงมีผู้นำสารสกัดสมุนไพรมาประยุกต์ใช้ในการแพทย์มากขึ้น เพราะหาได้ตามธรรมชาติทั่วไป มีผลข้างเคียงต่อร่างกายของผู้ใช้น้อยและราคาค่อนข้างถูก สามารถนำมาใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบันที่มีราคาแพงอีกทั้งยาที่ได้จากพืชสมุนไพรนี้อาจช่วยแก้ปัญหาเรื่องการดื้อยาของเชื้อก่อโรคได้ ตัวอย่างเช่น การศึกษาการยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acne* ด้วยสารสกัดจาก rose (*Rosa damascene* Mill.) duzhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) และ yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) ซึ่งนอกจากจะยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคแล้วยังมีผลต่อการหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบให้มีปริมาณที่น้อยลงได้อีกด้วย (Tsai et al., 2010) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษา การยับยั้งการเจริญของ *S. epidermidis* ด้วยสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยหลายชนิด เช่น กระชาย เทพทาโร เนียมหูเสือ ผักชีฝรั่ง ผักไผ่ ส้มโอ เสม็ดขาว มหาหงส์ ละมุด และไม้หอมอินเดีย (กนกวรรณ และ กัญญา, 2552) และการศึกษาการยับยั้ง *S. aureus* ด้วยสาร vernolide และ vernodalol ที่สกัดได้จากใบของต้น bitter (*Vernonia amygdalina* Delile.) รากของต้นไผ่แมกซิกัน (Erasto et al., 2006)

สมุนไพรพื้นบ้านมีการนำมาใช้ประโยชน์มากมายหลายด้าน ได้แก่ อาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอางค์ และที่สำคัญคือการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคอันเป็นภูมิปัญญาดั้งเดิมของคนไทยที่นิยมใช้กันมาช้านาน งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่คัดแยกมาจากน้ำคั้นบรรจุขวด โดยทดลองใช้สมุนไพรพื้นบ้าน 8 ชนิด คือ กระเจี๊ยบ ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ตะไคร้ บัวบก พลู ฟ้าทะลายโจร และลูกยอ

3.1 กระเจี๊ยบ



ภาพที่ 1 ดอกกระเจี๊ยบ

ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน (2537)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Hibiscus sabdariffa*

ชื่อวงศ์: Malvaceae

ชื่อสามัญ: Roselle, Red Sorrel, Jamaica Sorrel

ชื่อท้องถิ่น: กระเจี๊ยบ กระเจี๊ยบเปรี้ยว ผักเก็งเค็ง ส้มเก็งเค็ง ส้มตะเลงเครง ส้มปู้ ส้มพอ

3.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กระเจี๊ยบแดง เป็นพืชสมุนไพรที่เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ลำต้นและกิ่งก้านมีสีม่วงแดง ใบมีหลายแบบด้วยกัน ขอบใบเรียบ สีของดอกเป็นสีชมพู ตรงกลางดอกมีสีเข้มมากกว่า ขอบนอกของกลีบ กลีบรองดอกและกลีบเลี้ยงก็จะเจริญเติบโตขึ้นอีกเกิดเป็นสีม่วงแดงเข้มหุ้มเมล็ดเอาไว้ภายใน

3.1.2 ส่วนที่นำมาทำการสกัด

ดอกกระเจี๊ยบแห้ง

3.1.3 สารสำคัญ

สารสำคัญที่พบ คือ สารกลุ่ม flavonoid ชื่อ cysanthemin, delphinidin-3-O-sambubioside, myricetin, hibiscitrin, gossypitrin, กลุ่ม phenylpropanoid ชื่อ orthocoumaric acid, paracoumaric acid, ferulic acid

3.1.4 สรรพคุณ (คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา บัญชียาหลักแห่งชาติ, 2542)

รสเปรี้ยวของดอกกระเจียบทำให้ชุ่มคอ ช่วยย่อยอาหาร หล่อลื่นลำไส้ แก้อาการขัดเบา เป็นยาขับเสมหะ นอกจากนี้ยังสามารถลดไขมันในเลือดได้อีกด้วย และสารสกัดจากกระเจียบยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งระดับและมะเร็งต่อมลูกหมาก ฤทธิ์ขับปัสสาวะ ลดความดันโลหิต ลดไขมันในเลือด ลดน้ำตาลในเลือด และมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อในช่องปาก

3.2 ขมิ้นชัน



ภาพที่ 2 เหง้าขมิ้นชัน

ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน (2537)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Curcuma longa*

ชื่อวงศ์: Zingiberaceae

ชื่อสามัญ: Turmeric

ชื่อท้องถิ่น: ขมิ้นแกง, ขมิ้นชัน, ขมิ้นหยอก, ขมิ้นหัว, ขี้มัน, ตายอ, สะขอ, หมิ่น

3.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ขมิ้น (Turmeric) เป็นพืชล้มลุกในวงศ์ขิง มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีเหง้าอยู่ใต้ดิน เนื้อในของเหง้าเป็นสีเหลือง มีกลิ่น หอมเฉพาะตัว มีสีเหลืองเข้ม จนสีแสดงจัด ขมิ้นเป็นไม้ล้มลุก อายุหลายปี สูง 30 - 90 ซม. เหง้าใต้ดินรูปไข่มีแขนงรูปทรงกระบอกแตกออก ด้านข้าง 2 ด้าน ตรงกันข้ามเนื้อในเหง้าสีเหลืองส้ม มีกลิ่นเฉพาะ ใบเดี่ยว แทงออกมาเหง้าเรียงเป็น วงซ้อนทับกันรูปใบหอก กว้าง 12 - 15 ซม. ยาว 30 - 40 ซม. ดอกช่อแทงออกจากเหง้า แทรกขึ้นมา ระหว่างก้านใบ รูปทรงกระบอก กลีบดอกสีเหลืองอ่อน ใบประดับสีเขียวอ่อนหรือสีนวล บานครั้ง ละ 3 - 4 ดอก

3.2.2 ส่วนที่นำมาทำการสกัด

เหง้าขมิ้นชันสด

3.2.3 สารสำคัญ

เหง้าขมิ้นชันมีสารประกอบสำคัญ เป็นน้ำมันหอมระเหย มีสารหลายชนิด คือ Tumerone, Zingiberene, Borneol เป็นต้น (สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน, 2537) และในเหง้ายังมีสารสีเหลืองส้มที่ทำให้ขมิ้นมีสีที่เรียกว่าสารกลุ่ม curcuminoid ซึ่งมี โครงสร้างเป็น diferuloylmethane และประกอบด้วยสารหลัก 3 ชนิด คือ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin (Fetrow *et al*, 1999) (ในบางบทความเมื่อ กล่าวถึง curcumin จะหมายถึงสาร 3 ชนิดนี้รวมกัน)

3.2.4 สรรพคุณ (คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา บัญชียาหลักแห่งชาติ, 2542)

ก. ด้านการเกิดแผลและสมานแผลในกระเพาะอาหาร

ขมิ้นชันมีสรรพคุณในการสมานแผล ช่วยให้แผลหายเร็วขึ้น โดยเร่ง การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อที่เป็นแผล น้ำมันหอมระเหยของขมิ้นชัน นอกจากช่วยรักษาแผลใน กระเพาะอาหารแล้ว ยังช่วยป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร โดยการกระตุ้น mucin มาเคลือบกระเพาะอาหารและยับยั้งการหลั่งน้ำย่อยชนิดต่างๆ ได้

ข. ลดการอักเสบ

มีผลการทดลองว่า ผงแห้ง น้ำคั้นและสารสกัดชนิดต่างๆ มีฤทธิ์ในการลดการอักเสบในร่างกายทุกชนิด และสารสำคัญในการออกฤทธิ์ลดการอักเสบ คือ สารที่มีชื่อว่า curcumin และเมื่อนำไปเทียบกับยาแผนปัจจุบันที่ช่วยบรรเทาการอักเสบที่มีชื่อว่า ฟินิลบิวทาโซน (ยาบรรเทาอาการอักเสบที่ข้อ เช่น รูมาตอยด์ เป็นต้น) พบว่า มีฤทธิ์ใกล้เคียงกันในการรักษาอาการอักเสบแบบเฉียบพลัน แต่จะมีฤทธิ์เพียงครั้งเดียวในการรักษาอาการอักเสบแบบเรื้อรัง

มีการทดลองทางคลินิกในผู้ป่วยที่มีปัญหากระดูกและข้ออักเสบเรื้อรัง จำนวน 42 คน โดยใช้สมุนไพรที่มีส่วนประกอบของเหง้าขมิ้นพบว่า การได้รับสมุนไพรดังกล่าวสามารถลดความเจ็บปวดที่รุนแรงได้

ค. ด้านการแพ้

ขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการต้านการแพ้ โดยการออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งของสาร histamine ของร่างกายเมื่อมีอาการแพ้

ง. ลดการบีบตัวของลำไส้

จากการทดลองทางคลินิกกับคนไข้จำนวน 440 คน อายุเฉลี่ย 48.5 ปี โดยการให้ทานขมิ้นชันทุกวัน วันละ 162 มิลลิกรัม พบว่า ขมิ้นชันมีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ และยังช่วยในการขับลมและแก้อาเจียนด้วย

จ. ลดอาการแน่นจุกเสียด

มีการทดลองในผู้ป่วยโรคท้องอืดท้องเฟ้อในโรงพยาบาล 6 แห่ง จำนวน 160 คน โดยรับประทานครั้งละ 2 แคปซูลวันละ 4 ครั้ง พบว่าได้ผลดีกว่ายาขับลมและผู้ป่วยพอใจ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยของขมิ้นเป็นสารออกฤทธิ์ในการขับลม

ฉ. ขับน้ำดี

ไขมันชั้นสามารถออกฤทธิ์เพิ่มการขับและกระตุ้นการสร้างน้ำดีได้ ซึ่งน้ำดีเป็นสารสำคัญในกระบวนการช่วยย่อยและดูดซึมอาหารของร่างกาย

ช. รักษาอาการท้องเสีย

ตามตำรายาพื้นบ้านของไทย มีการใช้ไขมันรักษาอาการท้องเสีย โดยนำผงไขมันชั้นผสมน้ำผึ้งปั้นเป็นขี้ผึ้งกลอนรับประทานหลังอาหารและก่อนนอน ครั้งละ 3 - 5 เม็ด วันละ 3 เวลา และในประเทศอินโดนีเซียก็มีการใช้ไขมันในการรักษาอาการอุจจาระร่วงเช่นกัน และไขมันชั้นขนาด 1000 มก./ครั้ง/วัน มีผลทำให้อาการท้องร่วงในลูกสุกรระยะดูคนแม่หายไป

ซ. ด้านแบคทีเรีย

ทั้งสารสกัดไขมันชั้น น้ำมันหอมระเหย สาร curcumin และอนุพันธ์ มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรียที่ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร แบคทีเรียที่ทำให้เกิดเยื่อหุ้มปอดอักเสบ แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคท้องเสีย แบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง

ฌ. ต้านยีสต์และเชื้อรา

ทั้งสารสกัดไขมันชั้น น้ำมันหอมระเหย สาร curcumin และอนุพันธ์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่ายีสต์, เชื้อราชนิดต่างๆ เช่น เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง อย่างเช่น โรคกลาก ยีสต์ที่มีชื่อว่า *Candida albicans* ซึ่งเป็นเชื้อโรคฉวยโอกาสของผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น เบาหวาน เอดส์ เป็นต้น

ญ. ต้านปรสิต

สารสกัดจากไขมันสามารถที่จะฆ่าเชื้ออะมีบา ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคบิดมีตัวได้

ฉ. ป้องกันตับอักเสบ

ขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการป้องกันตับอักเสบ จากการทดลองในหนูขาว พบว่า ขมิ้นชันสามารถป้องกันตับถูกทำลายจากการใช้ยาพาราเซตามอล จากการทดลองในหนูขาว พบว่า สาร curcumin จากขมิ้นสามารถป้องกันตับจากการถูกทำลายด้วยเอทานอล โดยเอทานอลจะทำให้ตับทำงานหนัก และทำให้การทำหน้าที่และระดับของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แต่หลังจากที่หนูขาวได้รับสารสกัดขมิ้นชันร่วมกับการรับเอทานอลแล้ว ตับทำงานน้อยลง รวมถึงการทำหน้าที่และระดับของเอนไซม์ในตับลดลง (เอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่ทานได้ซึ่งหลักก็เป็นเอทานอลแบบหนึ่ง)

ญ. ด้านการกลายพันธุ์ (ด้านมะเร็ง)

ขมิ้นชันมีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ ด้านสารก่อมะเร็งที่มีบทบาทสำคัญในโรคที่เกี่ยวข้องกับเบาหวาน และโรคที่เกิดจากการเสื่อมของร่างกาย

ฐ. ด้านความเป็นพิษต่อยีน

ขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการป้องกันความเสียหายของ DNA และด้านความเป็นพิษต่อยีน

ฑ. มีสรรพคุณสมานแผล

ผงขมิ้นที่นำมาผสมกับน้ำแล้วทาลงบนแผล พบว่า ช่วยเร่งให้แผลที่ไม่ติดเชื้อของกระต่ายและหนูขาวหายได้ 23.3 และ 24.2% ตามลำดับ และสามารถเร่งให้แผลติดเชื้อของหนูขาวหายได้ 26.2% การทดลองทางคลินิก โดยทายาสมุนไพรซึ่งมีขมิ้นเป็นส่วนประกอบที่ผิวหนัง พบว่า มีฤทธิ์ในการสร้างเซลล์ผิวขึ้นใหม่ มีผู้ทดลองใช้สาร curcumin จากขมิ้นในการรักษาแผลหลังผ่าตัด 40 ราย พบว่า ให้ผลการรักษาได้เหมือนฟีนิลบิวทาโซน การทดลองใช้ขมิ้นหรือยาปฏิชีวนะในการรักษาแผลพุพองในผู้ป่วย 60 ราย โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่ใช้ขมิ้น และกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ แล้วติดตามดูแผลพุพองหลังการรักษา 21 วัน พบว่า ผู้ป่วยทุกรายหายจากโรค และไม่พบภาวะแทรกซ้อนหรือข้อแตกต่างระหว่างการใช้ขมิ้นและยาปฏิชีวนะ มีการนำสารสกัดของขมิ้น มาพัฒนาตำรับเป็นครีมป้ายปาก แล้วทำการทดลองเพื่อสังเกตฤทธิ์ใน

การสมานแผล โดยทำการทดลองในอาสาสมัคร 30 คน พบว่า ครีมป้ายปากที่มีสารสกัดขมิ้นชัน 1% มีผลทำให้แผลในปากหายภายใน 1 สัปดาห์

ค. ขมิ้นชันกับฤทธิ์ antioxidant

สาร curcuminoid ในขมิ้นชันเป็น antioxidant ที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ และสามารถจับกับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นแล้ว (Fetrow and Avira, 1999) เคยมีผู้ทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด lipid oxidation ในเซลล์ตับหนูระหว่าง curcuminoid กับวิตามินอี พบว่า curcuminoid สามารถป้องกันการเกิด lipid peroxidation ได้ดีกว่าวิตามินอีถึง 8 เท่า นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ antioxidant ในโปรตีนชื่อ Tumescin ที่สกัดได้จากสารสกัดด้วยน้ำของขมิ้นชันอีกด้วย

3.3 ขมิ้นอ้อย



ภาพที่ 3 เหง้าขมิ้นอ้อย

ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน (2537)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Curcuma zedoaria*

ชื่อวงศ์: Zingiberaceae

ชื่อสามัญ: Zedoary, Luya-Luyahan

ชื่อท้องถิ่น: ขมิ้นชัน, ขมิ้นเหลือง, ขมิ้นเจดีย์, ว่านเหลือง, ละเมียด, สากกะเบือ

3.3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ขมิ้นอ้อย เป็นไม้ล้มลุกสูง 50 - 70 ซม. ลักษณะคล้ายขมิ้นชัน แต่ต้นสูงกว่า ขนาดเหง้าและใบใหญ่กว่า โดยเหง้าใต้ดินจะโผล่ขึ้นมาเหนือดินเล็กน้อย มีเนื้อในสีเหลืองอมส้ม กลีบดอกสีนวล มีกลิ่นหอม

3.3.2 ส่วนที่นำมาทำการสกัด

เหง้าขมิ้นอ้อยสด

3.3.3 สรรพคุณ

ก. รักษาอาการท้องร่วง ท้องเดิน (ที่ไม่ใช่บิด หรืออหิวาตกโรค) โดยใช้หัวขมิ้นอ้อยสดๆ ประมาณ 2 แว่น มาบดผสมกับน้ำปูนใส กินแก้ท้องร่วงได้

ข. รักษาแผลโดยนำขมิ้นอ้อยไปหุงในน้ำมันมะพร้าวแล้วนำมาใส่แผล จะช่วยให้แผลหายเร็ว เนื่องจากหัวขมิ้นอ้อยเป็นยาฝาดสมานด้วย

ค. รักษาฝี ถ้าเป็นฝีหัวเดือนให้นำใบโศมาเผาไฟให้ไหม้ แล้วนำหัวขมิ้นอ้อยมาตำด้วยกันแล้วใช้น้ำเป็นกระสายยาโดยสามารถใช้รักษาได้ทั้งการกินและทาหรือพอก

ง. บำรุงผิว โดยการนำขมิ้นอ้อย กระชาก พริกไทย หัวเห็ดหอม มาทุบรวมกันแล้วคองด้วยน้ำผึ้ง รับประทานก่อนนอนทุกคืน จะช่วยให้ผิวสวย

3.4 ตะไคร้



ภาพที่ 4 ลำต้นตะไคร้

ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน (2537)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Cymbopogon citratus*

ชื่อวงศ์: Poaceae (Gramineae)

ชื่อสามัญ: Lemon Grass, Lapine

ชื่อท้องถิ่น: ตะไคร้, ไคร, คาหอม, หัวตะไคร้, หัวสิงโต, ตะไคร้แกง

3.4.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุก มีอายุได้หลายปี ชอบดินร่วนซุย ปลูกได้ตลอดปี ใบสีเขียวยาว แหลม ดอกฟูสีขาว หัวโตขึ้นจากดินเป็นกอๆ กลิ่นหอมฉุนค่อนข้างร้อน

3.4.2 ส่วนที่นำมาทำการสกัด

ลำต้นแก่หรือเหง้า

3.4.3 สารสำคัญ

พบสาร citral 80% นอกจากนี้ยังพบ geranial, nerol, geraniol, myrcene, limonene, eugenol, linalool, menthol, nerolidol, camphor, farnesol, citronellol, citronellal และ farnesol

3.4.4 สรรพคุณ

แก้อาการท้องอืดท้องเฟ้อ ขับปัสสาวะ แก้ไข้ ขับประจำเดือน นอกจากนี้ยังฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา ลดความดันโลหิต ลดอัตราการเต้นของหัวใจ กดประสาทส่วนกลาง ระงับอาการปวด ลดอุณหภูมิของร่างกาย ขับพยาธิไส้เดือน ต้านออกซิเดชัน กระตุ้นระบบประสาท ผาคสมาน ขับลม บรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อและอาการปวดจากลำไส้อักเสบ เป็นสารฆ่าแมลง

3.5 บัวบก



ภาพที่ 5 ใบบัวบก

ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน (2537)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Centelia asiatica*

ชื่อวงศ์: Umbelliferae

ชื่อสามัญ: Asiatic pennywort, Indian pennywort

ชื่อท้องถิ่น: ผักหนอก, ผักแว่น

3.5.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุก ลำต้นไหลทอดเลื้อยไปตามดินที่ชื้นและ ขึ้นง่าย มีรากฝอยออกตามข้อ ใบเป็นใบเดี่ยว ปลายใบกลม โคนใบเว้า ขอบใบหยัก แผ่นใบสีเขียวมีขนเล็กน้อย ก้านใบยาว ออกดอกเป็นช่อสีม่วงอมแดง

3.5.2 ส่วนที่นำมาทำการสกัด

ใบสด

3.5.3 สารสำคัญ

สารสกัดจากใบบวบกประกอบด้วย madecassoside asiatic acid, asiaticoside, centelloside, centellic acid brahminoside, brahmie acid

3.5.4 สรรพคุณ

ใช้ทั้งต้นแก้ไข้ใน ยาบำรุงร่างกาย บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย เมื่อยล้า รักษาโรคผิวหนัง รักษาแผลสด สมานแผล

3.6 ไพล



ภาพที่ 6 เหง้าไพล

ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน (2537)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Zingiber cassumunar*

ชื่อวงศ์: Zingiberaceae

ชื่อสามัญ: Phai, Cassumunar

ชื่อท้องถิ่น: ปูเลย, พันเลย

3.6.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุก ลงหัวเป็นแง่ง ติดต่อกันคล้ายพวงขิง ใบสีเขียวเล็กยาวเรียวแหลม มีดอกโตกลม โดยมีดอกเล็กๆ แซงออกตามเกี๊ยว และจะออกดอกในฤดูฝน

3.6.2 ส่วนที่นำมาทำการสกัด

เหง้าสด

3.6.3 สารสำคัญ

มีสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบ เช่น sabinene, caryophyllene, cineol, alpha-pinene, beta-pinene, myrcene, terpinene, limonene, p-cymene, terpinolene, eugenol, farnesol, alflabene, 3,4 dimethoxy benzaldehyde, 4-(4-hydroxyl-1-butenyl)-veratrole, naphthoquinone derivative, vanillin, vanillic acid, veratric acid, sitosterol, สารสีเหลือง curcumin, cassumunarins A, B, C สารที่ลดการอักเสบ คือ (1)(E)-4(3',4'-dimethylphenyl) but-3-ene

3.6.4 สรรพคุณ

เหง้า ขับโลหิตร้ายทั้งหลายให้ตกเสีย ขับระดูสตรี แก้ฟกช้ำ เคล็ดบวม ขับลมในลำไส้ ขับระดู ไส้แมลง แก้จุกเสียด รักษาโรคเหน็บชา แก้ปวดท้อง บิดเป็นมูกเลือด ช่วยสมานแผล สมานลำไส้ แก้ลำไส้อักเสบ แก้มูกติกระดูขาว ขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้ปวดท้อง แก้ท้องผูก แก้อาเจียน แก้ปวดฟัน เป็นยารักษาหิด แก้เคล็ดขัดยอก ข้อมเท้าแพลง แก้โรคผิวหนัง แก้ฝี ทาเคลือบแผลป้องกันการติดเชื้อ ดูดหนอง สมานแผล แก้ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ เป็นยาชาเฉพาะที่ ใช้ป้องกันเจ็บปวด และใช้ดมน้ำอาบหลังคลอด รักษาอาการปวดเมื่อย เคล็ดขัดยอก ฟกช้ำ ลดอาการอักเสบ บวม เส้นตึง เมื่อยขบ เหน็บชา และลดอาการปวด มีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่ สมานแผล หรือดมน้ำสมุนไพรอาบ เป็นส่วนประกอบในยาประคบ อนุวัตบัว บำรุงผิวพรรณ ราก แก้โรคอันบังเกิดแต่โลหิตอันออกทางปากและจมูก ขับโลหิต แก้อาเจียนเป็นโลหิต แก้ปวดท้อง ช่วยทำให้ประจำเดือนมาปกติ แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้ท้องผูก แก้โรคผิวหนัง แก้เคล็ดขัดยอก

3.7 ฟ้ายะลวยใจ



ภาพที่ 7 ใบฟ้ายะลวยใจ

ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน (2537)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Andrographis paniculata*

ชื่อวงศ์: Acanthaceae

ชื่อสามัญ: Kariyat, The Creat

ชื่อท้องถิ่น: หญ้าก้านงู น้ำลายพังพอน ฟ้ายาง เขยตายยายคลุม สามสิบดี เมฆทะลาย (ยะลา) ฟ้ายะท้อน

3.7.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุก สูง 30 - 70 ซม. ทุกส่วนมีรสขม ใบเดี่ยว แผ่นใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ช่อดอกออกที่ปลายกิ่งและซอกใบ ดอกย่อย กลีบดอกมีสีขาว โคนกลีบติดกัน ผลเป็นฝักเมื่อแก่เป็นสีน้ำตาล แตกได้ ภายในมีเมล็ดจำนวนมาก

3.7.2 ส่วนที่นำมาทำการสกัด

ทั้งลำต้นและใบ

3.7.3 สารสำคัญ

ใบฟ้าทะลายโจร มีสารเคมีประกอบอยู่หลายประเภท แต่ที่เป็นสาระสำคัญในการออกฤทธิ์ คือ สารกลุ่ม Lactone คือ สารแอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) และ สารนีโอแอนโดรกราโฟไลด์ (neo-andrographolide)

3.7.4 สรรพคุณ

แก้ไข้ต่างๆ ไป เช่น ไข้หวัด ไข้หวัดใหญ่ ระวังอาการอักเสบ พวกไอ เจ็บคอ คออักเสบ ต่อมทอนซิล หลอดลมอักเสบ ขับเสมหะ รักษาโรคฝีที่ผิวหนัง รักษาการติดเชื้อที่ทำให้ปวดท้อง ท้องเสีย บิด และแก้กระเพาะลำไส้อักเสบ

3.8 ขอ



ภาพที่ 8 ลูกขอ

ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน (2537)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Morinda citrifolia*

ชื่อวงศ์: Rubiaceae

ชื่อสามัญ: Noni, Indian mulberry, Noni Indian mulberry

ชื่อท้องถิ่น: มะตาเสือ ขอ แยะใหญ่

3.8.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้พุ่มขนาดเล็ก ทรงพุ่มแน่นทึบ แตกกิ่งก้านจำนวนมาก ใบขอมีขนาดใหญ่ รูปใบหรีดและเส้นใบลึก ใบมีสีเขียวเข้มมันวาว ขอบใบเรียบ ดอกสีขาว ผลเป็นผลรวม กลิ่นฉุนเมื่อสุก บางครั้งจึงมีผู้เรียกชื่อผลขอมในภาษาอังกฤษ ซึ่งหมายถึง ลูกเนยแข็งหรือลูกอ้วก (cheese fruit หรือ vomit fruit) ผลขอมคล้ายรูปไข่ และเหมือนมีตาขอบผล

3.8.2 ส่วนที่นำมาทำการสกัด

ผล

3.8.3 สารสำคัญ

ผลขอมมีสารเคมี Asperuloside, caproic acid, caprylic acid และ glucose

3.8.4 สรรพคุณ

แก้ไอเจ็บ ขับลม บำรุงธาตุ โดยใช้ผลขอมที่ไม่สุกหรือดิบเกินไป หั่นปิ้งไฟพอเหลือง ต้มเอาน้ำ ใช้ร่วมกับยาแก้คลื่นไส้อาเจียนที่ไม่รุนแรง หรือนำผลดิบหรือผลห้ามสดประมาณ 2 กำมือ ผานเป็นชิ้นบางๆ ย่างหรือคั่วไฟอ่อนๆ ให้เหลืองกรอบต้มหรือชงน้ำดื่ม เอาน้ำที่ได้จิบทีละน้อย และบ่อยครั้ง ชาวฟิลิปปินส์ ใช้ผลเป็นยาขับระดูผลดิบมีคุณสมบัติในการรักษาโรคเหงือก

4. การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพร

การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพร สามารถแบ่งได้เป็น 6 วิธีการ (พิมพร, 2547; กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2537) ดังนี้

4.1 มาเชอเรนซ์ (Maceration)

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด กระทำโดยการหมักพืชสมุนไพรกับตัวทำละลายที่เหมาะสมในภาชนะปิด เช่น ขวดรูปชมพู่ ขวดปากกว้าง หรือ โถ เป็นต้น เขย่าหรือตั้งทิ้งไว้ตามระยะเวลาที่ต้องการ เช่น 3, 5 หรือ 7 วัน เป็นต้น (ประสาทร และคณะ, 2551; กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2537) เนื้อเยื่อสมุนไพรอ่อนนุ่มและตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในสมุนไพรออกมาได้ เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงค่อยๆ รินเอาสารสกัดออกจากกาก (Marc) โดยพยายามบีบเอาสารออกมาให้มากที่สุด แล้วนำไปกรองแยกกากสมุนไพรที่เหลืออยู่ออกจากตัวทำละลาย การสกัดนี้จะสกัดให้หมด (Exhausted) อาจจำเป็นต้องสกัดหลายๆ ครั้ง (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2537) ข้อดีของวิธีนี้ คือ สารสกัดจะไม่ถูกความร้อนทำให้โอกาสในการสลายตัวของสารสกัดลดลง แต่ข้อเสีย คือ สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก (พิมพร, 2547)

4.2 เพอร์โคเลชัน (Percolation)

เป็นกระบวนการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรแบบต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า เพอร์โคเรชัน (Percolation) หลักการ คือ การปล่อยให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพรอย่างช้าๆ พร้อมกับละลายเอาองค์ประกอบออกจากสมุนไพร วิธีการ คือ นำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลาย โดยทำการเติมตัวทำละลายลงไปเหนือสมุนไพร 3 ถึง 5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออกมาโดยคอยเติมตัวทำละลายอย่างต่อเนื่องอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนสารสกัดสมบูรณ์ บีบกากสารสกัดออกแล้วนำไปกรอง (พิมพร, 2547; ประสาทรและคณะ, 2551)

4.3 การสกัดโดยใช้เครื่อง Soxhlet extractor

การสกัดโดยวิธีนี้เป็นกระบวนการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรในทำนองเดียวกับเพอร์โคเลชัน แต่ต้องใช้ความร้อนเข้าช่วยและใช้ซอกซ์เลตเอกซ์แทรกเตอร์ (Soxhlet extractor) ซึ่งเป็นระบบปิด และใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำเมื่อได้รับความร้อนตัวทำละลายใน

พลาสติกจะระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นลงในทิมเบิล (Thimble) ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน Extracting chamber สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลลงไปในพลาสติก โดยพลาสติกนี้ได้รับความร้อนจากฮีทติงแมนเทิล (Heating mantle) หรือหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไป ทั้งสารสกัดเอาไว้ในพลาสติก ตัวทำละลายเมื่อกระทบ Condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดใหม่ เวียนไปจนกระทั่งสารสกัดสมบูรณ์ วิธีการแบบนี้ไม่เหมาะสมกับสารสกัดสมุนไพรที่มีสารระเหยง่ายเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงเหมาะกับการสกัดสารที่มีองค์ประกอบทนความร้อน และใช้ตัวทำละลายน้อยไม่สิ้นเปลือง (พิมพร, 2547; ประสาทพรและคณะ, 2551)

4.4 การสกัดโดยวิธี Thermomicrodistillation

เป็นการสกัดโดยใช้ Thermomicro analysis and separation oven (TAS oven) ซึ่งเป็นการสกัดสารที่มีจำนวนน้อยมากๆ (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2537)

4.5 การสกัดโดยระบบ liquid-liquid extraction

เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2537) ดังนี้

4.5.1 Extractant lighter เป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัดเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

4.5.2 Raffinate lighter เป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัดหนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

4.6 การสกัดน้ำมันหอมระเหย (Extraction of volatile oil)

การสกัดน้ำมันหอมระเหย มีหลายวิธี โดยสามารถเลือกใช้ตามความเหมาะสมของพืชที่ใช้

4.6.1 การกลั่น (Distillation) มี 4 วิธีการ คือ

ก. การกลั่นโดยใช้น้ำ (Water distillation) วิธีการนี้นำมาใช้กับพืชแห้งซึ่งไม่ถูกทำลายได้ง่ายเมื่อถูกต้ม เพราะพืชสมุนไพรจะแช่อยู่ในน้ำเดือดตลอดระยะเวลาการกลั่น นิยมใช้กลั่นน้ำมันจากเปลือกไม้ (พิมพร, 2547)

ข. การกลั่นโดยใช้ไอน้ำ (Steam distillation) วิธีการนี้มักใช้กับพืชสดทำได้โดยการนำพืชสดมาวางบนตะแกรง หรือ Wire basket (Grid) แล้วผ่านไอน้ำเข้าไปโดยตรง โดยไม่ต้องมีการหมักพืชด้วยน้ำก่อน เพราะพืชสดยังคงมีความชื้นอยู่ Oil droplet ที่สกัดได้จะนำมาผ่าน Condensing chamber และต้องพยายามหลีกเลี่ยงการเกิด Hydrolysis และ Decomposition โดยให้ Diffusion rate ของไอน้ำและน้ำที่จะผ่าน Membrane ของพืชสูงเพื่อป้องกัน Hydrolysis และ Decomposition หรือเกิดก็เกิดน้อย วิธีการนี้ถือว่าเป็นวิธีที่ทำให้รวดเร็ว สะดวก และเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าวิธีอื่น (สุนียพร, 2546; พิมพร, 2547)

ค. การกลั่นโดยใช้น้ำและไอน้ำ (Water and steam distillation) วิธีการนี้ใช้ได้กับพืชสดและพืชแห้ง ซึ่งอาจถูกทำลายได้ง่ายเมื่อถูกต้ม ทำได้โดยการเติมน้ำให้ท่วมผ่านไอน้ำเข้าไปถูกสมุนไพร ส่วนที่กลั่นได้ หรือ Condensed distillate จะประกอบไปด้วยน้ำกลั่นและน้ำมันที่จะผ่าน ต่อมาทำการแยกน้ำมันออกมา การกลั่นวิธีนี้สะดวกที่สุดและมักใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตน้ำมันหอมระเหยในทางการค้า (สุนียพร, 2546; พิมพร, 2547)

ง. การกลั่นแบบทำลาย (Destructive distillation) วิธีการนี้เป็นกระบวนการเตรียมน้ำมันหอมระเหยของพืชตระกูลสน (Pinaceae) โดยการเอาเนื้อไม้หรือเรซิน (Resin) มาให้ความร้อนในที่อับอากาศ เพื่อให้เกิดการสลายตัว ส่วนประกอบที่เป็นสารระเหยจะออกมาในรูปน้ำมันเหนียว (Tarry liquid) ซึ่งประกอบไปด้วย น้ำมันสน (Pine tar) และน้ำมันจุนิเปอร์ (Juniper tar) น้ำมันเหนียวที่ได้มีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของเนื้อไม้ น้ำมันพวกนี้เป็นน้ำมันแบบยาหม้อ เรียกว่า “Empyreumatic oil” (สุนียพร, 2546)

4.6.2 การบีบหรือการอัด (Expresion) วิธีการนี้ใช้กับน้ำมันหอมระเหยที่ใช้วิธีการกลั่นไม่ได้ เนื่องจากถูกทำลายได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน การบีบที่นิยมก็คือ วิธีเอคคิวเอล (Ecuelle method) ซึ่งใช้กับน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม โดยเอาผลหรือเปลือกวางบนรางที่มีเข็มแหลมอยู่ แล้วกดทับลงไปจะทำให้เข็มไปแทงต่อมน้ำมันให้แตกออก น้ำมันก็จะหยดลงบนรางรองน้ำมัน (พิมพร, 2547) แต่น้ำมันหอมระเหยที่ได้จะมีปริมาณน้อยและไม่บริสุทธิ์

4.6.3 วิธีเอนฟอยเรจ (Enfleurage) เป็นวิธีที่สามารถเก็บความหอมได้ดี ในอดีตใช้ในอุตสาหกรรมน้ำหอม วิธีการนี้จะใช้ไขมัน (Fat) หรือน้ำมันระเหยยาก (Fixed oil) ชนิดที่ไม่มีกลิ่นมาแป้นเป็นฟิล์มบางๆ บนกระจก ซึ่งจะเป็นสารดูดซับ (Absorber) นำกลีบดอกไม้มาโปรยลงบนแผ่นฟิล์มนี้ ตั้งทิ้งไว้หลายๆ ชั่วโมง ทำการเก็บกลีบดอกไม้ ออกแล้วโปรยชุดใหม่ลงไปแทน ทำเช่นนี้เรื่อยไปจนตัวดูดซับ ดูดซับน้ำมันหอมระเหยมากพอ จึงเอาตัวดูดซับมาสกัดเอาน้ำมันระเหยออกด้วยแอลกอฮอล์ (พิมพร, 2547)

4.6.4 การสกัดด้วยน้ำมันสัตว์ (Extraction by animal fat) วิธีนี้คล้ายคลึงกับวิธีเอนฟอยเรจ แต่ใช้น้ำมันที่ใช้จะเป็นลักษณะเหลว และใช้เวลานานเนื่องจากต้องแช่พืชสมุนไพรไว้ในน้ำมันหลายวัน เพื่อให้ไขมันดูดเอากลิ่นออกมา

4.6.5 การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว วิธีการนี้ทำโดยการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวที่ความดันสูงผ่านพืชสมุนไพร ซึ่งวิธีนี้จะมีต้นทุนการผลิตที่สูง แต่จะได้ น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณภาพดี และมีความบริสุทธิ์สูง

4.6.6 วิธีสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (Extraction with solvent) วิธีการนี้ตัวทำละลายที่นิยมใช้มากที่สุด คือ ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) หรืออาจใช้ตัวทำละลายอื่นๆ เช่น อะซิโตน (Acetone) และแอลกอฮอล์ (Alcohol) เป็นต้น วิธีการนี้จะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการกลั่นที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง ทำให้องค์ประกอบทางเคมีเกิดการเปลี่ยนแปลง และมีกลิ่นที่ผิดไปจากธรรมชาติจึงนำวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายนี้มาใช้ในทางอุตสาหกรรม แต่ต้นทุนการผลิตจะสูงกว่าวิธีการกลั่น (สุนิยาพร, 2546; พิมพร, 2547)

5. ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดพืชสมุนไพร

ตัวทำละลายที่มักใช้ในการสกัดพืชสมุนไพรนั้นมีหลายชนิด การเลือกใช้ตัวทำละลายต่อองค์ประกอบของสารสำคัญในพืชก็มีความจำเป็น เนื่องจากตัวทำละลายแต่ละชนิดจะมีลักษณะความมีขั้วที่แตกต่างกันไป ก็ย่อมส่งผลให้องค์ประกอบที่สกัดออกมาได้แตกต่างกันไปด้วย (รัตน, 2547; อุไรวรรณ และคณะ, 2549)

ในการเลือกคุณสมบัติของตัวทำละลายที่ดี ต้องสามารถละลายสารที่ต้องการได้พอดี ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด มีความคงตัวดีและหาง่าย ราคาเหมาะสม และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (ชัยญรัตน์ และ พิมพ์, 2543; รัตน, 2547; กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2537)

5.1 น้ำ (Water)

จัดเป็นตัวทำละลายที่ดี หาง่ายและราคาถูก การใช้น้ำเพียงอย่างเดียวเป็นตัวทำละลายในการสกัดพืชสมุนไพรอาจจะส่งผลเสีย นั่นคือ ละลายองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออกมามากได้ และอาจเกิดการบูดเสียของสารสกัด นอกจากนี้การทำให้สารสกัดเข้มข้นขึ้น อาจทำได้ยากเพราะต้องใช้อุณหภูมิสูงในการไล่น้ำออก จึงส่งผลต่อการเสถียรภาพของสารที่สำคัญ (พิมพ์, 2547)

5.2 แอลกอฮอล์ (Alcohol)

จัดเป็นตัวทำละลายที่มีดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ เนื่องจากมีข้อดี คือ มีความจำเพาะ (Selective) ในการละลายมากกว่าน้ำ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สามารถทำลายเอนไซม์ในพืชได้ การทำให้สารสกัดเข้มข้นจะระเหยได้ง่าย แต่แอลกอฮอล์ก็มีข้อเสีย คือ ราคาแพงกว่าน้ำ (พิมพ์, 2547) ที่นิยมใช้มาก คือ เมทานอล และ เอทานอล (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2537)

5.3 คลอโรฟอร์ม (Chloroform)

จัดเป็นตัวทำละลายที่ดีแต่มีความจำเพาะน้อย เกิด emulsion ง่าย ถ้าใช้สกัดสารซึ่งเป็นด่างอาจสลายให้กรดเกลือ (พิมพ์, 2547; กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2537)

5.4 อีเทอร์ (Ether)

จัดเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับพวกสารที่ไม่มีขั้ว มักใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับกำจัดไขมันจากสมุนไพร โดยมีข้อดี คือ ราคาถูก (พิมพร, 2547; อุไรวรรณ และคณะ, 2549)

5.5 เฮกเซน (Hexane)

จัดเป็นตัวทำละลายที่มีอำนาจในการละลายน้อยกว่าคลอโรฟอร์ม แต่มีความจำเพาะดีกว่า แต่มีข้อเสีย คือ ระเหยง่าย ระบิดง่าย เกิดออกไซด์ (Oxide) ง่าย และดูดน้ำได้มาก (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2537)

6. การทำให้สารสกัดสมุนไพรเข้มข้น

เมื่อได้ทำการสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่มีความเหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้จะมีปริมาณมากและเจือจาง ทำให้แยกส่วนหรือองค์ประกอบได้ไม่สะดวก และไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นก่อนด้วยวิธีการต่างๆ (ธัญญรัตน์ และ พิมพิน, 2543; รัตนา, 2547; อุไรวรรณ และคณะ, 2549) โดยกรรมวิธีต่างๆ

6.1 การระเหย (Free evaporation)

คือ การระเหยแห้งหรือเป็นการนำตัวทำละลายออกจากสารสกัด ทำได้โดยใช้ความร้อนจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) หรือ แผ่นความร้อน (Hot plate) หรืออาจใช้การเป่าอากาศร้อนลงไปบนสารสกัดด้วยเพื่อระเหยได้เร็วขึ้น วิธีการนี้อาจส่งผลให้องค์ประกอบภายในเซลล์สลายตัวได้ เนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไป (พิมพร, 2547) โดยเฉพาะถ้าหากใช้สารละลายอินทรีย์ (Organic solvent) ในการสกัด การระเหยโดยใช้ความร้อนโดยตรงบนแผ่นความร้อน อาจเกิดอันตรายได้ง่าย นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญ เมื่อใช้ความร้อน (พิมพร, 2547; กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, ม.ป.ป.)

6.2 การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (Distillation in vacuo)

คือ วิธีการระเหยแห้งเพื่อให้ตัวทำละลายออกจากสารสกัดโดยกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศ โดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump) ซึ่งเครื่องมือนี้ เรียกว่า Rotary evaporator ประกอบไปด้วย 3 ส่วน คือ ภาชนะบรรจุสารหรือภาชนะควบแน่นไอสารละลาย (Condenser) ภาชนะบรรจุสารสกัดที่จะกลั่น (Distillation flask) และภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่น (Receiving flask) สารสกัดที่บรรจุอยู่ภายในภาชนะจะแช่อยู่ในหม้ออ่างไอน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้และจะหมุน (Rotate) ตลอดเวลาทำงาน เพื่อให้ภาชนะบรรจุสารสกัดได้รับความร้อนกระจายอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ และจะต่อเข้ากับส่วนควบแน่นซึ่งมีระบบทำความเย็นหล่ออยู่ตลอดเวลา ตัวทำละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุควบแน่นที่บริเวณคอนเดนเซอร์จะหยดลงมาในภาชนะรองรับตัวทำละลายหลังการกลั่น โดยสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (พิมพร, 2547; อุไรวรรณ และคณะ, 2549)

6.3 การทำให้แห้ง (drying)

เป็นวิธีการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากสารสกัดจนแห้ง ได้สารสกัดออกมาในสภาพของของแข็งหรือกึ่งของแข็ง มีหลายวิธีการ เช่น การแช่แข็งโดยใช้ความเย็น (lyophilizer หรือ freeze dry) หรือการใช้ความร้อน (sprey dryer) (พิมพร, 2547))

6.4 อัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration)

เป็นวิธีการที่ทำให้สารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายที่เป็นน้ำให้เข้มข้นโดยใช้เมมเบรน (Membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5000 (พิมพร, 2547)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวด

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำดื่มบรรจุขวด 50 ยี่ห้อจำนวน 300 ตัวอย่าง

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 2.1 Pseudomonas Agar (Base) และ Pseudomonas CN selective supplement
- 2.2 King B medium
- 2.3 Mueller-Hinton agar
- 2.4 Tryptic soy broth
- 2.5 Tryptic soy agar

3. สมุนไพรและสารเคมี

- 3.1 กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa*)
- 3.2 ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*)
- 3.3 ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*)
- 3.4 ตะไคร้ (*Cymbopogon citrates*)
- 3.5 บัวบก (*Centella asiatica*)
- 3.6 ฟ้าล (Zingiber montanum)
- 3.7 ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*)
- 3.8 ลูกยอ (*Morinda citrifolia*)
- 3.9 ยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด Amikacin, Chloramphenicol, Carbenicillin, Gentamycin, Erythromycin, Kanamycin, Piperacillin, Streptomycin, Polymyxin B และ Tetracycline
- 3.10 แอลกอฮอล์ 95%
- 3.11 เฮกเซน

4. วัสดุ อุปกรณ์และครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการวิจัย

- 4.1 ตู้เย็นเชื้อ
- 4.2 ไมโครเวฟ
- 4.3 autoclave
- 4.4 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง
- 4.5 ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส
- 4.6 ตู้อบ
- 4.7 Vacuum pump
- 4.8 Side arm flask
- 4.9 กรวยกรอง
- 4.10 ที่หนีบ (แคลมป์)
- 4.11 แผ่นเมมเบรน ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร
- 4.12 แผ่นทดสอบ oxidase test
- 4.13 กล้องจุลทรรศน์
- 4.14 UV lamp
- 4.15 Aluminum foil

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวด

เก็บตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวดทั้งชนิดขวดใสและขวดขุ่น จากร้านค้าและร้านสะดวกซื้อต่างๆ ในพื้นที่กรุงเทพฯ และนนทบุรี โดยกำหนดการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 2 เดือน เป็นเวลา 1 ปี จำนวน 50 ยี่ห้อ รวมทั้งสิ้น 300 ตัวอย่าง

2. วิธีการตรวจวิเคราะห์ *P. aeruginosa* จากตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวดโดยวิธีการกรองด้วยแผ่นเยื่อกรอง (Membrane filtration)

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *P. aeruginosa* ในน้ำดื่มบรรจุขวด มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1 ขั้นตอนการเตรียมอุปกรณ์

2.1.1 ทำการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ชุดกรองโดยห่อด้วย Aluminum foil แล้วนำเข้า Autoclave โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.1.2 นำออกจาก Autoclave แล้วอบในตู้ Hot air oven อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

2.1.3 เมื่อจะทำการกรองให้นำส่วนต่างๆ ของเครื่องกรองมาประกอบกันด้วยวิธีปลอดเชื้อ

2.2 ขั้นตอนการกรอง

2.2.1 นำแผ่นเยื่อกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร วางแผ่นเยื่อกรองลงบนกรวยกรองด้วยวิธีปลอดเชื้อ หนีบกรวยกรองและกระบอกแก้วด้วยแคลมป์

2.2.2 ต่อชุดกรองน้ำเข้ากับ Vacuum pump จากนั้นเทตัวอย่างน้ำปริมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในกระบอกแก้ว เปิดเครื่อง Vacuum pump สารละลายจะถูกดูดลงมาในฟลาสก์

2.2.3 เมื่อสารละลายถูกดูดลงมาจนหมดแล้ว ปิด Vacuum pump ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ลงไฟ แล้วคีบแผ่นเยื่อกรองมาวางบนอาหาร Pseudomonas CN selective agar (ภาคผนวก ก1) ที่เตรียมใส่จานให้แข็งไว้แล้ว

2.2.4 นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแผ่นกรองไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.2.5 ตรวจสอบการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* บนแผ่นกรองโดยสังเกตลักษณะโคโลนีสีเขียวอมเหลืองหรือสีเขียว เมื่อนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตปรากฏการเรืองแสงสีเขียว

2.2.6 นำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *P. aeruginosa* มา restreak อีกครั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดจำเพาะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อบนแผ่นเยื่อกรอง เลือกเฉพาะโคโลนีเดี่ยวเก็บไว้เพื่อทดสอบต่อไป

3. การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *P. aeruginosa*

ตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่มีสีเขียวอมเหลือง และเรืองแสงสีเขียวภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และตรวจสอบลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของเชื้อที่แยกได้ โดยการย้อมแกรม แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

4. การทดสอบลักษณะทางชีวเคมีเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *P. aeruginosa*

ทำการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีที่สำคัญบางประการที่บ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ *P. aeruginosa*

4.1 ทดสอบการสร้าง Soluble pigment บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดจำเพาะ King B medium (ภาคผนวก ก4)

4.1.1 นำเชื้อที่เก็บไว้บนอาหารผิวเอียงมา Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ King B medium

4.1.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.1.3 สังเกตดูลักษณะโคโลนีบนอาหาร โดยจะมีสีเหลืองหรือเหลืองอมเขียวเนื่องจากเชื้อสร้างรงควัตถุไพโอไซยานินและเรืองแสงอัลตราไวโอเลต

4.2 ทดสอบการสร้างเอนไซม์ oxidase

การตรวจการสร้างเอนไซม์ Cytochrome oxidase ใช้สารทดสอบที่ปกติไม่มีสีซึ่งจะมีสีเมื่อถูกออกซิไดซ์ สารทดสอบที่ใช้ คือ Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride สารทดสอบปกติไม่มีสี แต่จะมีสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มเกิดขึ้นเมื่อถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ออกซิเดสจะสามารถออกซิไดซ์สารทดสอบเหล่านี้ ทำให้เห็นเป็นสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้ม

ในการทดสอบใช้แผ่นทดสอบที่เคลือบด้วย Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (Merck)

ในการทดสอบนี้จะใช้แผ่นทดสอบออกซิเดสสำเร็จรูปเป็นแผ่นกระดาษที่เคลือบด้วยสารทดสอบไว้แล้ว ใช้ชุบเปียกเช็ดแล้วนำมาขีดลงบนแผ่นทดสอบออกซิเดส จากนั้นสังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้าเกิดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มภายในเวลา 10-20 วินาที ให้ผลเป็นบวก ส่วนผลลบคือไม่เกิดการเปลี่ยนสี

4.3 ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

ทดสอบโดยเพาะเชื้อในอาหาร TSB (Tryptic soy broth) (ภาคผนวก ค3) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูว่าสามารถเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสได้หรือไม่ และตรวจผลโดยเปรียบเทียบความขุ่นกับหลอดอาหาร TSB ที่ไม่ได้เพาะเชื้อลงไป ถ้าอาหารขุ่นแสดงว่าผลเป็นบวก คือเชื้อสามารถเจริญได้ที่ 42 องศาเซลเซียส

4.4 การทดสอบการใช้น้ำตาลในสภาพ Oxidative-Fermentative

เป็นการทดสอบการใช้น้ำตาลในสภาพ Oxidative และ Fermentative ซึ่งการใช้ น้ำตาลของเชื้อ *Pseudomonas* จะเกิดขึ้นในสภาพ Oxidative

ทำการทดสอบโดยเพาะเชื้อในอาหาร O-F medium ซึ่งเป็น Semi-solid เตรียมอยู่ในสภาพ Deep tube มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและมี Brom thymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ เพาะเชื้อแบบ Stab inoculation 2 หลอด หลอดหนึ่งปิดทับผิวบนอาหารด้วยพาราฟินเหลว อีกหลอดหนึ่งไม่ปิดทับด้วยพาราฟินเหลว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 - 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5. การทดสอบความไวของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากน้ำดื่ม ต่อยาปฏิชีวนะบางชนิดด้วยวิธี disc agar diffusion ตามแบบ Kirby-Bauer method

การทดสอบ Sensitivity ด้วยวิธี Disc agar diffusion เป็นวิธีการทดสอบเพื่อดูความไวของ เชื้อบริสุทธิ์ต่อยาปฏิชีวนะหรือต่อยาชนิดอื่นที่บรรจุอยู่บนแผ่นกระดาษวงกลมขนาดเล็ก (Disc) เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 - 8 มิลลิเมตร โดยจะตรวจดูบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญซึ่งจะ

เกิดขึ้นโดยรอบแผ่นยา (Inhibition zone) แล้ววัดความกว้างนำไปเปรียบเทียบกับความกว้างมาตรฐานของยาแต่ละชนิดที่กำหนดไว้แล้ว วิธีการทำ Disc agar diffusion แบบของ Kirby-Bauer เป็นวิธีมาตรฐานวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันมากโดยเฉพาะทางด้านการทดสอบเกี่ยวกับแบคทีเรียทางการแพทย์ โดยมีวิธีการดังนี้

5.1 Antimicrobial discs

แผ่นยาที่ใช้ทดสอบเป็นแผ่นยามาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน แผ่นยาที่ยังไม่เปิดใช้ควรเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส และเมื่อจะทดสอบควรนำออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อน เพื่อให้แผ่นยามีอุณหภูมิเท่ากับสภาพแวดล้อม เมื่อใช้แผ่นยาแต่ละชนิดเสร็จแล้วควรเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ 10 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ (ความเข้มข้นของยาต่อ disc)

Antibiotic agents	Disc potency
Chloramphenicol (C)	30 mcg ¹
Carbenicillin (CAR)	100 mcg
Gentamycin (GN)	10 mcg
Kanamycin (K)	30 mcg
Piperacillin (PRL)	100 mcg
Amikacin (AK)	100 mcg
Erythromycin (E)	15 mcg
Streptomycin (STR)	10 mcg
Polymyxin B (PB)	300 U ²
Tetracycline (T)	30 mcg

หมายเหตุ ¹ mcg = microgram

² U = Unit

5.2 วิธีการทดสอบ

เลือกเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 5 isolates ที่ได้จากการคัดแยกจากน้ำดื่มบรรจุขวด ยี่ห้อที่ตรวจพบทุกครั้งที่ของการเก็บตัวอย่าง โดยผ่านการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมียืนยันว่าเป็นเชื้อ *P. aeruginosa* มาใช้เป็นตัวแทนในการทดสอบต่อไป

5.2.1 เชื้อเชื้อบริสุทธิ์ 2 - 3 loop จากหลอดอาหารผิวเอียงที่บ่มเชื้อไว้ 18 - 24 ชั่วโมงใส่ลงในหลอดอาหาร Brain heart infusion หรือใช้ Tryptic soy broth ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอด นำไปบ่มเชื้อในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 ชั่วโมง

5.2.2 เจือจางแบคทีเรียในข้อ 5.2.1 โดยใช้ น้ำเกลือ 0.85% ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ ความขุ่นมาตรฐานของ McFarland No. 0.5 (เตรียมจาก 1% BaCl₂ ปริมาตร 0.5 มล. และ 1% H₂SO₄ ปริมาตร 99.5 มล.)

5.2.3 เตรียมจานอาหาร Mueller Hinton agar ซึ่งเทอาหารให้แข็งตัวไว้ล่วงหน้า แล้ว ถ้าผิวหนังมีน้ำให้นำไปอบผิวหนังอาหารให้แห้งประมาณ 30 นาที ก่อนเพาะเชื้อ การเพาะเชื้อ ใช้ไม้พันสำลี (Cotton swab) ที่อบฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในหลอดเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมในข้อ 5.2.2 ถ้าชุ่มเกินไปให้แตะและหมุนไม้ตรงสำลากับข้างหลอดแก้วเสียก่อนแล้วจึงนำไปป้ายบนผิวหนังอาหารโดยป้ายเป็น 3 ระบายให้ทั่วผิวหนังอาหาร

5.2.4 ปลอ่ยทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ผิวหนังที่มีเชื้อแบคทีเรีย ก่อนข้างแห้งเสียก่อน แล้วจึงใช้ปากกิปๆ แผ่นขาวางบนผิวหนังอาหาร ใช้ปากกิปกดแผ่นเบาๆ ให้ติดแนบกับผิวหนังอาหาร (ปากกิปต้องผ่านการฆ่าเชื้อโดยจุ่มแอลกอฮอล์แล้วเผาไฟเสียก่อนใช้งาน) เสร็จแล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

5.2.5 อ่านผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone หน่วยเป็นมิลลิเมตร แปลผลเทียบกับตารางมาตรฐานของ NCCLS (2006) ดังแสดงในตารางผนวกที่ ข1

6. การสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายได้แก่ 95% แอลกอฮอล์ เฮกเซน และน้ำร้อน

6.1 การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร

สมุนไพรที่ใช้ในการทดลองคือ กระเจี๊ยบแดง ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ตะไคร้ บัวบก พลู ฟ้าทะลายโจร และ ขอบ นำตัวอย่างสดมาล้างทำความสะอาด หั่นให้มีขนาดเล็ก และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.2 ขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบ (Crude extract)

6.2.1 การสกัดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย โดยการชั่งสมุนไพรทั้ง 8 ตัวอย่าง จำนวน 100 กรัม เติมน้ำปริมาตร 500 มิลลิเมตร ยกขึ้นตั้งไฟ รอนจนเดือดจับเวลา 10 นาที ยกลงแล้วทิ้งให้เย็นจึงกรองด้วยผ้าขาวบาง เก็บสารสกัด หลังจากนั้นนำกากไปต้มต่อตามวิธีการเดิมซ้ำอีก 2 ครั้ง เก็บสารสกัดทั้ง 3 ครั้งที่ได้มารวมกัน นำสารสกัดไประเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหย ระบบสุญญากาศ (Rotary evaporation) ที่อุณหภูมิ 40 - 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำระเหยออกจะได้สารที่มีลักษณะข้นเหนียว สารที่ได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) และเก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาทดสอบ

6.2.2 การสกัดโดยใช้แอลกอฮอล์ 95% เป็นตัวทำละลาย โดยการชั่งสมุนไพรทั้ง 8 ตัวอย่าง จำนวน 100 กรัม ใส่ในพลาสติกแล้วเติมน้ำแอลกอฮอล์ 95% 500 มิลลิตร ปิดปากพลาสติกด้วย parafilm แล้วนำไปแช่ด้วยเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 7 วัน นำมากรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 4 เพื่อแยกส่วนตัวอย่างพืชออก ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยวิธีการเดิมเก็บสารสกัดทั้ง 3 ครั้งที่ได้มารวมกันนำสารสกัดไประเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (rotary evaporation) ที่อุณหภูมิ 40 - 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำตัวทำละลายระเหยออกแล้วจะได้สารที่มีลักษณะข้นเหนียว สารที่ได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) และเก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาทดสอบ

6.2.3 การสกัดโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย โดยการชั่งสมุนไพรทั้ง 8 ตัวอย่าง จำนวน 100 กรัม ใส่ในพลาสติกแล้วเติมน้ำเฮกเซน 500 มิลลิเมตร ปิดปากพลาสติกด้วย parafilm วางทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน นำมากรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 4 เพื่อแยกส่วนตัวอย่างพืชออก ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยวิธีการเดิมเก็บสารสกัดทั้ง 3 ครั้งที่ได้มารวมกันนำสารสกัดไประเหย

ให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (rotary evaporation) ที่อุณหภูมิ 40 - 50 องศาเซลเซียส หลังจากตัวทำละลายระเหยออกแล้วจะได้สารที่มีลักษณะข้นเหนียว สารที่ได้เป็น สารสกัดหยาบ (crude extract) และเก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาทดสอบ

7. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ของสารสกัดหยาบสมุนไพรที่เตรียมได้จากข้อ 6 ด้วยวิธี agar well diffusion

7.1 การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดที่จะทดสอบที่ปริมาณเริ่มต้น 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32, 64, 128, 256, 512 และ 1,024 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยนำสารสกัดหยาบมาละลายด้วย 10% DMSO (Dimethyl sulfoxide) หลังจากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นเยื่อกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร

7.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

ตัวแทนเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 5 isolates ที่คัดแยกมาจากน้ำดื่มบรรจุขวด

7.3 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย

เชื้อเชื้อ *P. aeruginosa* อายุ 18 - 24 ชั่วโมง ลงในหลอดอาหาร Tryptic soy broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 3 - 5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ ความขุ่นมาตรฐาน McFarland standard No. 0.5 แล้วปิเปตเชื้อมา 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดอาหาร Mueller Hinton agar ปริมาตร 10 มิลลิลิตร อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เชื้อกระจายทั่วอาหารแล้วเททับลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton agar ที่เททิ้งไว้ให้แข็งก่อนหน้า แล้วร่อนอาหารที่ผสมเชื้อแข็ง จากนั้นใช้ที่เจาะที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะอาหารให้แต่ละหลุมห่างกันพอสมควร แล้วหยอดสารสกัดที่เตรียมความเข้มข้นระดับต่างๆ ลงในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร โดยมียาคลอแรมฟินิคอลเป็น positive control 1 หลุม และ 10% DMSO เป็น negative control อีก 1 หลุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเวอร์เนียร หน่วยเป็นมิลลิเมตร ทำการทดลองสองซ้ำ (Bauer *et al.*, 1996)

8. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากสมุนไพรที่ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC and Minimal bactericidal concentration, MBC)

เลือกสารสกัดหยาบที่มีผลการยับยั้งเชื้อได้ดีจากการทำ agar well diffusion มาใช้ในการทดสอบหาค่า MIC และ MBC

8.1 การทดสอบหาค่า MIC แบบ Macrobrotth dilution

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งเชื้อที่ทดสอบโดยดัดแปลงตามวิธีการของ CLSI (2006) เตรียมสารสกัดที่สกัดได้แต่ละตัวทำละลาย นำมาละลายใน 10% DMSO ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 1,024 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นเยื่อกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร ลงในหลอดปลอดเชื้อ จากนั้นเจือจางให้สารสกัดมีปริมาณลดลง 2 เท่า ด้วย 10% DMSO จนเหลือความเข้มข้นสุดท้าย 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อเชื้อ *P. aeruginosa* อายุ 18 - 24 ชั่วโมง ลงในหลอดอาหาร Tryptic soy broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 3 - 6 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้ความขุ่นมาตรฐานของ McFarland standard No. 0.5 จากนั้นปิเปตเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในสารสกัดที่ได้ทำการเจือจางหลอดละ 2 เท่าไว้ และใช้ 10% DMSO ผสมกับเชื้อเป็นชุดควบคุมลบ (negative control) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดหลอดแรกที่ไม่พบการเจริญของเชื้อหลังการบ่มจะเป็นค่า MIC

8.2 การทดสอบหาค่า MBC

การหาค่า MBC ทำโดยปิเปตสารสกัดและเชื้อจากหลอด MIC ที่ให้ผลไม่พบการเจริญปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร Mueller Hinton agar แล้ว spread ให้เชื้อกระจายทั่วอาหารด้วย sprader จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยดูจานอาหารแรกที่มีความเข้มข้นที่ไม่มีเชื้อเจริญคือค่า MBC

ผลและวิจารณ์

1. ผลการแยกเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จากตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวด

ผลจากการทดลองสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวดจากแหล่งต่างๆ ช่วงระยะเวลาเดือนกรกฎาคม 2554 ถึง สิงหาคม 2555 ในพื้นที่เขตกรุงเทพฯ และนนทบุรี โดยกำหนดการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 2 เดือน เป็นเวลา 1 ปี จำนวน 50 ยี่ห้อ 300 ตัวอย่าง ตรวจสอบเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยวิธีการกรองผ่านแผ่นเยื่อกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร แล้ววางบนอาหาร Selective medium จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ในตัวอย่างน้ำดื่มที่มีเชื้อ *P. aeruginosa* จะพบโคโลนีสีเหลืองอมเขียวและสีเขียวเจริญขึ้นบนแผ่นเยื่อกรองและเมื่อนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะเห็นการเรืองแสงสีเขียว

จากตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวดจำนวน 300 ตัวอย่าง ตรวจสอบ Typical colony ที่เข้าลักษณะของ *P. aeruginosa* จำนวน 113 ตัวอย่าง คิดเป็น 37.6% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด โดยเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดมีจำนวน 115 isolates จะนำไปตรวจลักษณะที่สำคัญเพื่อยืนยันว่าเป็น *P. aeruginosa* ต่อไป จากตารางแสดงผลการแยกเชื้อ *P. aeruginosa* ในตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวด 50 ยี่ห้อดังแสดงในตารางผนวกที่ ข1 พบว่า ในช่วงเดือนมกราคม - กุมภาพันธ์ 2555 มีการตรวจพบเชื้อที่มีโคโลนีสีเหลืองอมเขียวและสีเขียวมากที่สุดถึง 33 isolates และในช่วงเดือนมีนาคม - เมษายน 2555 ตรวจพบเชื่อน้อยที่สุดเพียง 8 isolates

ตัวอย่างน้ำดื่มที่นำมาทำการตรวจสอบและพบการปนเปื้อนเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 50 ยี่ห้อพบว่า ตัวอย่างน้ำดื่ม 17 ยี่ห้อผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยแสง UV เพียงอย่างเดียว ในขณะที่ตัวอย่างน้ำดื่ม 7 ยี่ห้อมีการกรองด้วยระบบ R.O. และฆ่าเชื้อด้วยแสง UV และอีก 26 ยี่ห้อที่มีกระบวนการฆ่าเชื้อครบทั้ง 3 กระบวนการ คือ ฆ่าเชื้อด้วยแสง UV กรองด้วยระบบ R.O. และการเติมโอโซน (Ozone) แต่เมื่อพิจารณาผลการตรวจพบเชื้อ *P. aeruginosa* จากตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวดทั้ง 50 ยี่ห้อ ดังแสดงในตารางผนวกที่ ข2 พบว่า น้ำที่มีกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยแสง UV เพียงอย่างเดียว พบปริมาณเชื้อและความถี่ในการตรวจพบมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถตัดสินได้อย่างแน่ชัดว่าการตรวจพบเชื้อ *P. aeruginosa* จากตัวอย่างน้ำทั้ง 50 ยี่ห้อดังกล่าวมาจากกระบวนการผลิตที่ไม่สะอาดพอที่จะฆ่าเชื้อได้เป็นส่วนมาก หรืออาจมาจากตัวบรรจุภัณฑ์ที่ปนเปื้อนเชื้อตั้งแต่แรก ตลอดจนกระบวนการเก็บน้ำของร้านค้าแต่ละแห่ง เหล่านี้ล้วนเป็นข้อสังเกตของการปนเปื้อนเชื้อ *P. aeruginosa* ที่น่าสนใจ

จากผลการแยกเชื้อ *P. aeruginosa* จากตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวด พบว่า สอดคล้องกับการศึกษาที่มีการตรวจพบเชื้อ *P. aeruginosa* จากตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวดพร้อมดื่มที่มีขายทั่วไปตามท้องตลาด ดังเช่นรายงานวิจัยของรุ่งรัมย์ (2552) ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางจุลชีววิทยาจากแหล่งน้ำประปา พบว่า มีการปนเปื้อนเชื้อ *P. aeruginosa* มากถึง 56% จากตัวอย่างน้ำ 50 ตัวอย่าง ซึ่งคาดว่า การปนเปื้อนอาจเกิดมาจากหลายสาเหตุ เช่น ระบบท่อน้ำการจัดส่งเกิดปัญหาหรือรั่ว หรืออาจเกิดจากปริมาณคลอรีนที่ใช้ อาจไม่เพียงพอต่อการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ และจากรายงานของ Geldreich (1996) ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยเสี่ยงการปนเปื้อนจุลินทรีย์และไบโอฟิล์มในระบบการจำหน่ายน้ำดื่ม ซึ่งพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonad* และส่วนใหญ่พบว่าเป็นเชื้อ *P. aeruginosa* รวมทั้งการศึกษาของ Warburton (1992) ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณการปนเปื้อนจุลินทรีย์ของน้ำดื่มบรรจุขวด ที่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *P. aeruginosa* แม้ในน้ำจะมีสารอาหารที่น้อยมากแต่ก็พบว่า เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานกว่า 2 เดือน นอกจากนี้ ยังมีรายงานของ Rosenberg (2003) ที่ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์คุณภาพจุลินทรีย์ในน้ำแร่บรรจุขวดในประเทศอังกฤษ ซึ่งพบการปนเปื้อนแบคทีเรียหลายกลุ่มรวมทั้ง *P. aeruginosa* ที่มักพบในขั้นตอนกระบวนการบรรจุขวด ถึงแม้จะพบในระดับต่ำแต่ก็ไม่ควรพบเชื้อก่อโรคในขวดน้ำดื่ม

2. ผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการย้อมสีแบบแกรม เชื้อจากโคโลนีสีเขียวและโคโลนีเหลืองอมเขียว ทั้ง 115 isolates พบว่าเชื้อมีรูปร่างท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ตัวอย่างลักษณะของเชื้อจากโคโลนีที่แยกได้จาก 1 isolate ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000x

3. ผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีในการยืนยันว่าเป็นเชื้อ *P. aeruginosa*

3.1 ทดสอบการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร selective medium

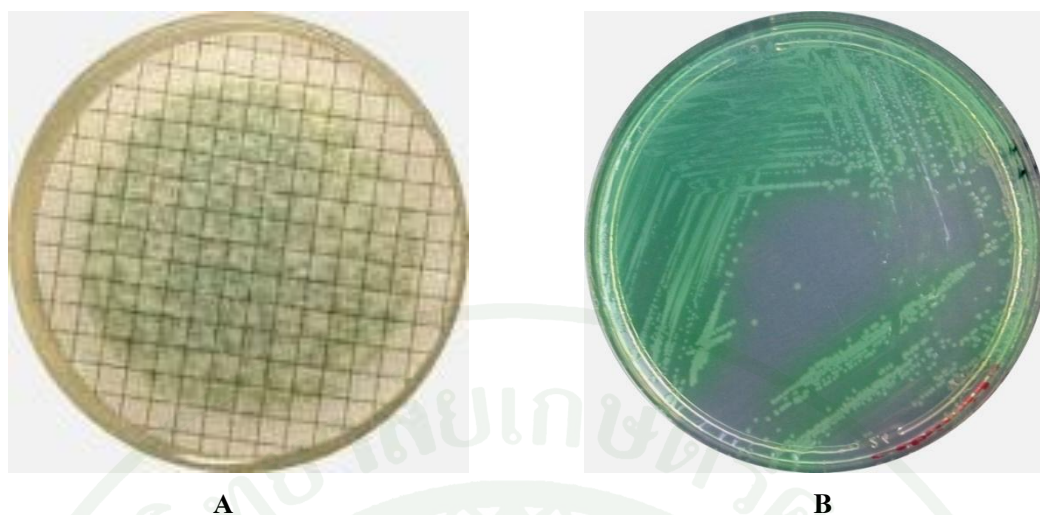
เมื่อนำเอาเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างมาทำการทดสอบต่อ โดย streak เชื้อลงบนอาหาร selective medium คือ Pseudomonas Agar และ King B medium พบว่ามีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันอยู่ 3 แบบ คือ

3.1.1 โคโลนีเข้ม สีเขียว เปลี่ยนสีอาหาร Pseudomonas Agar จากไม่มีสีเป็นสีเขียว (ภาพที่ 10) เมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะเรืองแสงสีเขียว เมื่อ streak บนอาหาร King B medium โคโลนีจะมีสีเขียว และไม่สร้าง soluble pigment บน NA slant

3.1.2 โคโลนีเข้ม สีเหลืองอมเขียว เมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะเรืองแสง และเมื่อ streak บนอาหาร King B medium โคโลนีจะมีสีเหลืองหรือสีเหลืองอมเขียว (ภาพที่ 11) และไม่สร้าง soluble pigment บน NA slant

3.1.3 โคโลนีเข้ม สีขาวออกเหลือง เมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะเรืองแสงเพียงเล็กน้อย เมื่อ streak บนอาหาร King B medium โคโลนีจะมีสีเหลือง (ภาพที่ 12) และไม่สร้าง soluble pigment บน NA slant

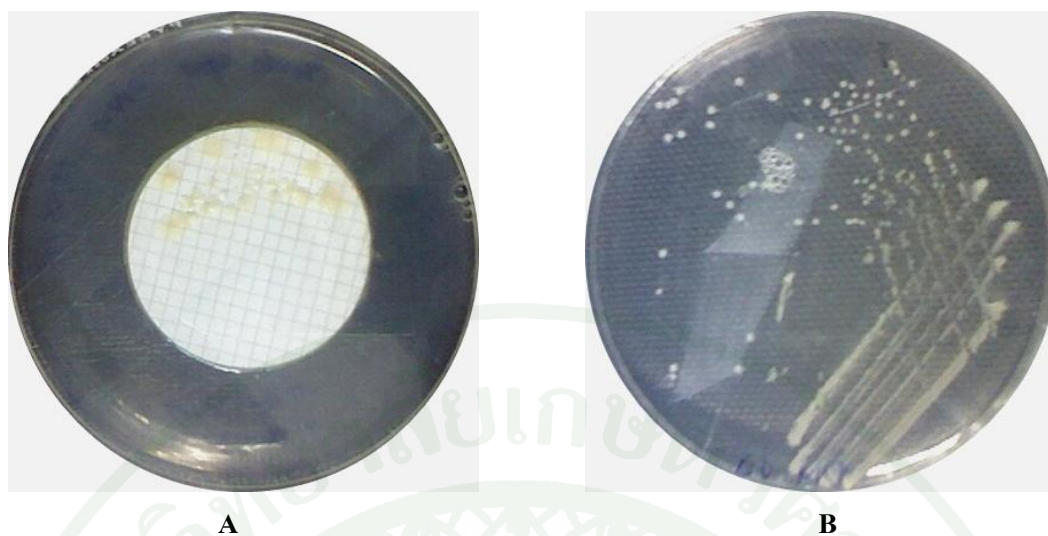
นอกจากนี้ ยังพบการเจริญของเชื้อที่มีโคโลนีสีเหลืองเข้ม และสีขาวครีม แต่ไม่พบการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจึงไม่จัดโคโลนี 2 แบบนี้เป็นลักษณะ typical colony ของ *P. aeruginosa*



ภาพที่ 10 แสดง typical colony แบบที่ 1 (A) บนแผ่นกรองที่วางบนอาหาร Pseudomonas Agar และ (B) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร King B medium



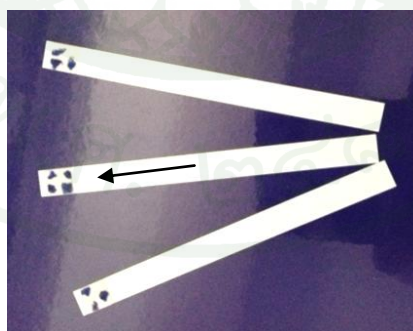
ภาพที่ 11 แสดง typical colony แบบที่ 2 (A) บนแผ่นกรองที่วางบนอาหาร Pseudomonas Agar และ (B) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร King B medium



ภาพที่ 12 แสดง typical colony แบบที่ 3 (A) บนแผ่นกรองที่วางบนอาหาร Pseudomonas Agar และ (B) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร King B medium

3.2 ทดสอบ oxidase test

ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ Cytochrome oxidase ของเชื้อที่แยกได้ทั้ง 115 isolates โดยการเขี่ยเชื้อมาขีดลงแผ่นทดสอบที่เคลือบด้วยสาร Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (Merck) พบว่าเชื้อทั้ง 115 isolates ที่ให้ผลบวกคือ เปลี่ยนสีแผ่นทดสอบเป็นสีม่วงหรือน้ำเงินภายในระยะเวลา 10 - 20 นาที ดังแสดงในภาพที่ 13



ภาพที่ 13 แสดงผลการทดสอบ oxidase บนแผ่นกระดาษกรองที่เคลือบสารทดสอบ

3.3 ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

ผลการทดสอบโดยเพาะเชื้อทั้ง 115 isolates ลงในหลอดอาหาร TSB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเปรียบเทียบกับความขุ่นกับหลอดอาหาร TSB ที่ไม่ได้เพาะเชื้อลงไป พบว่าเชื้อจากหลอดโคโลนีสีเหลืองและสีเขียวอมเหลืองจำนวนทั้ง 115 isolates ให้ผลบวก คือเชื้อสามารถเจริญได้ที่ 42 องศาเซลเซียส

3.4 การทดสอบการใช้น้ำตาลในสภาพ Oxidative-Fermentative

ผลการทดสอบการใช้น้ำตาลในสภาพ oxidative และ fermentative ซึ่งการใช้น้ำตาลของเชื้อ *Pseudomonas* จะเกิดขึ้นในสภาพ oxidative พบว่า เชื้อจากหลอดโคโลนีสีเหลืองและสีเขียวอมเหลืองทั้ง 115 isolates ให้ผลบวก คือเชื้อสามารถใช้น้ำตาลในสภาพ oxidative คือ จะเกิดการเปลี่ยนสีอาหารในหลอดที่ไม่ได้ปิดด้วยพาราฟินเหลว ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาลในสภาพ Oxidative-Fermentative โดยหลอด A คือ หลอดอาหาร O-F medium ที่ไม่ได้ปิดทับด้วยพาราฟินเหลว หลอด B ปิดทับด้วยพาราฟินเหลว และหลอด C คือ Control

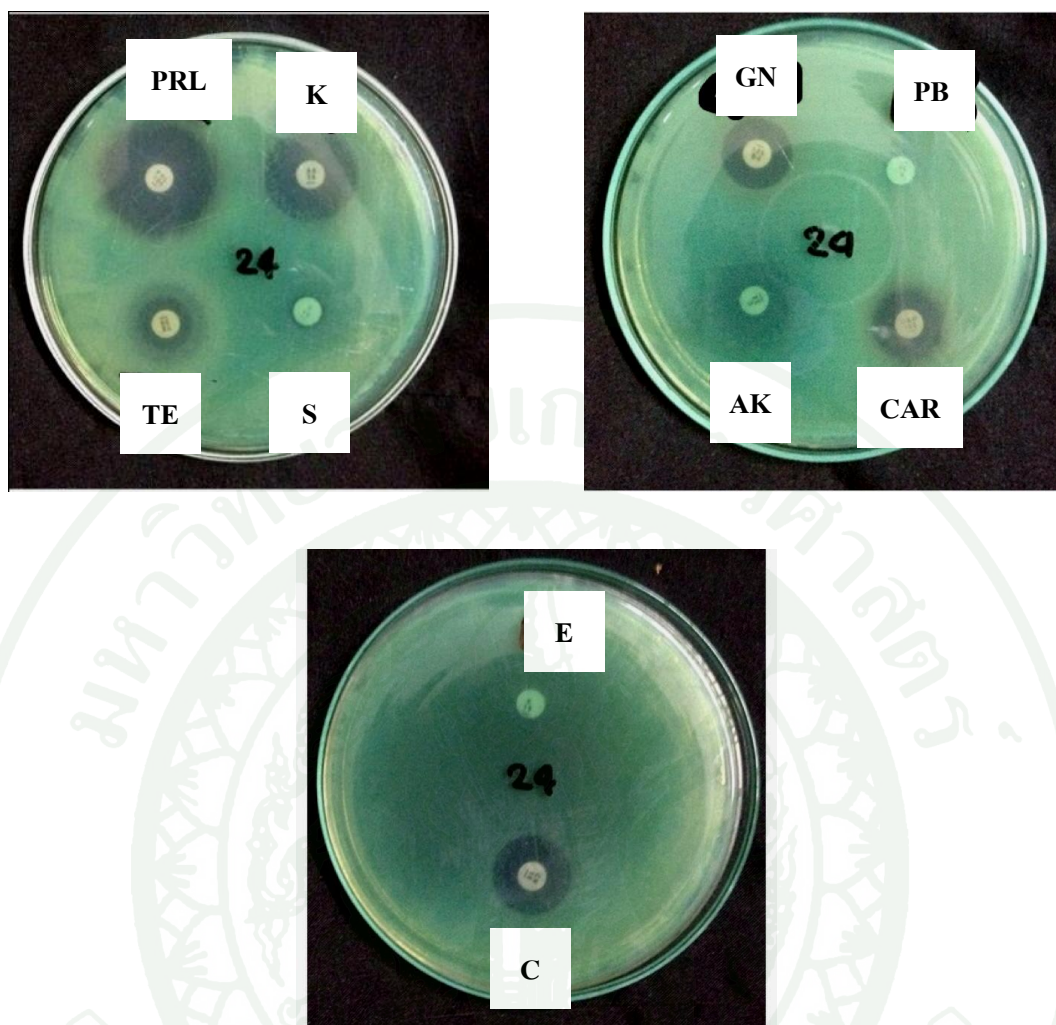
จากผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีในการยืนยันเชื้อที่คัดแยกได้จากน้ำดื่มบรรจุขวดพบว่า ทั้ง 115 isolates ให้ผลการทดสอบที่เหมือนกัน คือ สามารถเจริญบนอาหาร Pseudomonas Agar และ King B medium ซึ่งเป็น selective media ในการตรวจแยกเชื้อและดูการสร้าง soluble pigment รวมทั้งตรวจดูการเรืองแสงของเชื้อ *P. aeruginosa* นอกจากนี้ ยังพบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ oxidase ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และความสามารถในการใช้น้ำตาลในสภาพ Oxidative-Fermentative ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากน้ำดื่มบรรจุขวดทั้ง 115 isolates คือ เชื้อ *P. aeruginosa* (Gaby and Hadley, 1959)

4. ผลการทดสอบความไวของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากน้ำดื่ม ต่อยาปฏิชีวนะบางชนิดด้วยวิธี disc agar diffusion ตามแบบ Kirby-Bauer method

หลังจากทำการทดสอบและยืนยันลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อที่คัดแยกได้จากน้ำดื่มบรรจุขวดพบว่า ได้เชื้อที่เป็น *P. aeruginosa* ทั้ง 115 isolates โดยจากการเลือกเชื้อจำนวน 5 isolates เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการทดสอบเพื่อดูแนวโน้มในการดื้อยาปฏิชีวนะบางชนิด โดยคัดเลือกยาที่มีฤทธิ์การยับยั้งที่แตกต่างกัน เช่น กลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เช่น ยา Chloramphenicol, Tetracycline, Gentamicin, Amikacin และ Erythromycin กลุ่มรบกวนการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์เช่น ยา Polymyxins B กลุ่มยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ เช่น ยา Piperacillin เป็นต้น

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะที่บรรจุอยู่บนแผ่นกระดาษวงกลมขนาดเล็ก (disc) เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร โดยจะตรวจดูบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญซึ่งจะเกิดขึ้นโดยรอบแผ่นยา (inhibition zone) (ภาพที่ 15) แล้ววัดความกว้าง นำไปเปรียบเทียบกับความกว้างมาตรฐานของยาแต่ละชนิดที่กำหนดไว้ให้ (ตารางผนวก ข3) โดยการทำ disc agar diffusion ตามวิธีของ Kirby-Bauer พบว่า เชื้อตัวแทนทั้ง 5 isolates มีแนวโน้มความไวต่อยาปฏิชีวนะที่คล้ายกัน คือ ไวต่อยา Carbenicillin, Gentamicin, Chloramphenicol, Kanamycin และ Piperacillin คือต่อยา Tetracycline, Erythromycin, Amikacin, Streptomycin และ Polymyxin B โดยแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อตัวแทนทั้ง 5 isolates ด้วยขนาด inhibition zone สรุปผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 10 ชนิดไว้ดังตารางที่ 3

จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อตัวแทนทั้ง 5 isolates พบว่า มีรูปแบบการดื้อและไวต่อยาที่คล้ายคลึงกับ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิด multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRPA) โดยมักพบเชื้อดื้อต่อยา Ceftazidime, Cefepime, Ticarcillin, Tetracycline, Erythromycin, Amikacin, Streptomycin, Piperacillin และ Polymyxin B (Giamarellou, 2001; Livermore, 2002) ซึ่งสอดคล้องรายงานการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของ Markou และคณะ (2008) ที่พบว่า *P. aeruginosa* ก็มีรูปแบบการดื้อยาดังกล่าว เป็นที่น่าสังเกตว่า ผลจากการทดลองครั้งนี้ พบว่า เชื้อตัวแทนทั้ง 5 isolates ที่แยกได้จากน้ำคั้นนี้กลับไวต่อยา Piperacillin ซึ่งเป็นยาที่มีรายงานการดื้อยาของเชื้อ *P. aeruginosa* เหตุผลอาจเนื่องมาจากเชื้อตัวแทนทั้ง 5 isolates ไม่ได้เป็นสายพันธุ์ดื้อยาปฏิชีวนะที่มีความรุนแรงเท่ากับกลุ่ม MDRPA ยา Piperacillin จึงยังคงมีประสิทธิภาพทำลายเอนไซม์ lactamase ของเชื้อได้อยู่



ภาพที่ 15 แสดงผลการทดสอบความไวของตัวแทนเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้ 1 isolate ต่อยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด

หมายเหตุ Carbenicillin (CAR) 100 mcg., Gentamicin (GN) 10 mcg., Tetracycline (TE) 30 mcg., Chloramphenicol (C) 30 mcg., Polymyxin B (PB) 300 U., Kanamycin (K) 30 mcg., Piperacillin (PRL) 100 mcg., Erythromycin (E) 15 mcg., Amikacin (AK) 30 mcg., Streptomycin (STR) 10 mcg.

ตารางที่ 3 แสดงประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ 10 ชนิดต่อตัวแทนเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จำนวน 5 isolates

<i>Pseudomonas</i> isolates No.	CAR	C	GN	K	PRL	E	PB	AK	T	STR
1	18.0 (S)	20.1 (S)	17.8 (S)	20.0 (S)	25.0 (S)	0 (R)	0 (R)	8.2 (R)	6.5 (R)	6.8 (R)
2	20.0 (S)	18.7 (S)	16.5 (S)	22.4 (S)	20.3 (S)	0 (R)	0 (R)	8.0 (R)	6.9 (R)	7.3 (R)
3	18.5 (S)	19.5 (S)	20.0 (S)	21.5 (S)	21.4 (S)	0 (R)	0 (R)	12.4 (R)	7.5 (R)	7.0 (R)
4	21.2 (S)	22.4 (S)	17.5 (S)	20.4 (S)	22.8 (S)	0 (R)	0 (R)	9.5 (R)	7.5 (R)	8.2 (R)
5	21.3 (S)	21.3 (S)	18.2 (S)	22.4 (S)	23.4 (S)	0 (R)	0 (R)	8.0 (R)	8.4 (R)	7.3 (R)

หมายเหตุ Carbenicillin (CAR) 100 mcg., Chloramphenicol (C) 30 mcg., Gentamicin (GN) 10 mcg., Tetracycline (TE) 30 mcg., Polymyxin B (PB) 300 U., Kanamycin (K) 30 mcg., Piperacillin (PRL) 100 mcg., Erythromycin (E) 15 mcg., Amikacin (AK) 30 mcg., Streptomycin (STR) 10 mcg., Resistant (R), Sensitive (S)

5. ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ของสารสกัดหยาบสมุนไพรด้วยวิธี Agar well diffusion

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ที่คัดแยกได้จากน้ำดื่มบรรจุขวดของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรทั้ง 8 ชนิด คือ กระเจี๊ยบ ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ตะไคร้ ใพล ลูกยอ บัวบก และฟ้าทะลายโจร ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำร้อน, แอลกอฮอล์ 95% และเฮกเซน โดยใช้วิธี Agar well diffusion และพิจารณาความสามารถในการยับยั้งเชื้อจากขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น (Inhibition zone)

จากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ที่คัดแยกได้จากน้ำดื่มบรรจุขวดโดยใช้ตัวแทนเชื้อจำนวน 5 isolates โดยมี Positive control คือ ยา Chloramphenicol และ Negative control คือ 10% DMSO ที่ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ โดยสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ทั้ง 5 isolates มี 5 ชนิด ได้แก่ สารสกัดหยาบด้วยน้ำร้อนของฟ้าทะลายโจร และสารสกัดหยาบด้วยแอลกอฮอล์ 95% ของฟ้าทะลายโจร ยอ บัวบก และกระเจี๊ยบแดง พบว่าที่ความเข้มข้น 1,024 มิลลิกรัม/มิลลิตร ของสารสกัดหยาบทั้ง 5 ชนิดแสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อได้ใกล้เคียงกับ Positive control คือ ยา Chloramphenicol ดังแสดงในตารางที่ 4

โดยความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 5 isolates ของสารสกัดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1,024 มิลลิกรัม/มิลลิตร เป็นดังนี้ สารสกัดหยาบด้วยน้ำร้อนจากฟ้าทะลายโจร สามารถยับยั้งเชื้อได้โดยค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น คือ 20.8, 20.2, 21.8, 20.0 และ 20.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบด้วยแอลกอฮอล์ 95% จากฟ้าทะลายโจรโดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส คือ 15.2, 15.3, 13.7, 14.0 และ 13.7 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบด้วยแอลกอฮอล์ 95% จากบัวบกโดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส คือ 15.2, 15.3, 13.7, 14.0 และ 13.1 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบด้วยแอลกอฮอล์ 95% จากลูกยอโดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส คือ 13.0, 13.7, 13.7, 14.0 และ 13.1 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดหยาบแอลกอฮอล์ 95% จากกระเจี๊ยบมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส คือ 20.2, 20.7, 21.2, 22.3 และ 20.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาจากผลการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 5 isolates พบว่า สารสกัดหยาบด้วยแอลกอฮอล์ 95% จากฟ้าทะลายโจรและกระเจี๊ยบ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าสมุนไพรอื่นที่นำมาทดสอบ เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อได้โดยค่าของ Inhibition zone ที่เกิดขึ้นยังมี

ความใกล้เคียงกับ Positive control โดยมีรายงานเกี่ยวกับการยับยั้งของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดในเชื้ออื่น เช่น รายงานการวิจัยของณรงค์เดช (2556) พบว่า สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% จากกระเจี๊ยบสามารถยับยั้ง *S. aureus* ที่แยกได้จากน้ำดื่มด้วยความเข้มข้นเพียง 128 mg/ml โดยในกระเจี๊ยบแดงพบว่า มีสารออกฤทธิ์สำคัญในการยับยั้งจุลินทรีย์ คือ สารกลุ่ม flavonoid ชื่อ cysanthemin, delphinidin-3-O-sambubioside, myricetin, hibiscitrin, gossypitrin, กลุ่ม phenylpropanoid ชื่อ orthocoumaric acid paracoumaric acid, ferulic acid และจากรายงานของ Putiyanun (2003) พบว่า ฟาโทะลายโจรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงชนิดต่างๆ และโรคที่เกี่ยวกับทางเดินหายใจ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Vibrio cholerae* ด้วยความเข้มข้นต่ำๆ พบว่า ฟาโทะลายโจรมีสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม Lactone คือ สารแอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) และสารนีโอแอนโดรกราโฟไลด์ (neo-andrographolide) (คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา บัญชียาหลักแห่งชาติ, 2542)

จากงานวิจัยอื่นๆ พบว่า สารสกัดสมุนไพรส่วนใหญ่มิฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ โดยใช้ปริมาณของสารสกัดน้อยกว่าในการทดสอบกับเชื้อ *P. aeruginosa* เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกไม่มี outer membrane จึงทำให้สารสกัดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Parekh and Chanda, 2007) สำหรับความไวของเชื้อต่อสารสกัดนั้นพบว่า แบคทีเรียแกรมบวกจะไวต่อสารสกัดกว่าแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวกมีโครงสร้างผนังเซลล์เป็นเปปติโดไกลแคน 90 เปอร์เซ็นต์ และกรดไทโคอิก ซึ่งผนังเซลล์นี้ไม่มีประสิทธิภาพเลือกผ่านเข้าออกของสาร (Schleffer and Kandler, 1972) ด้วยคุณสมบัติของโครงสร้างนี้ส่งผลให้ไวต่อการยับยั้งด้วยสารสกัดได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีโครงสร้างผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่าเชื้อชนิดอื่น โดยมีเปปติโดไกลแคน 5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ แต่มีองค์ประกอบของไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ซึ่งเพิ่มความแข็งแรงให้เซลล์ และยังพบว่ามีช่องพอริน (porin) ซึ่งไม่ยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ผ่านเข้าออก (Tortora *et al.*, 2001; Matu and Staden, 2003)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าตัวทำละลายสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด คือ น้ำร้อน เฮกเซน และแอลกอฮอล์ 95% มีความสามารถในการละลายองค์ประกอบของสมุนไพรแต่ละชนิดออกมาได้แตกต่างกัน โดยมีทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์หรือสารสำคัญ และไม่มีฤทธิ์หรือสารน้อย โดยคุณสมบัติดังกล่าวเรียกว่า ความมีขั้ว (polarity) (รัตน, 2547; อุไรวรรณ และคณะ, 2549) โดยพบว่า สารสกัดสมุนไพรจากแอลกอฮอล์ 95% ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วแม้จะต่ำกว่าน้ำ แต่ก็สามารถละลายสารออกฤทธิ์จากสมุนไพรกลุ่มนี้ได้หลายชนิด และให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ใกล้เคียงกับ Positive control ซึ่งแตกต่างกับเฮกเซนซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว โดยพบว่า สารสกัดหยาบที่ได้

จะมีองค์ประกอบของสารเหนียวมากกว่า จึงไม่ให้เกิดการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 5 isolates ส่วนสารสกัดด้วยเฮกเซนและน้ำร้อนซึ่งพบว่า ไม่ค่อยมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อ อาจเนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่น ในพืชสมุนไพรอาจไม่มีสารยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย วิธีการสกัดสารออกจากสมุนไพรไม่เหมาะสม หรือน้ำร้อนที่ใช้เป็นตัวทำละลายไม่สามารถละลายสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียออกมา



ตารางที่ 4 แสดงขนาด inhibition zone ของสารสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1,024 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 5 isolates

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	ขนาดของ inhibition zone (มิลลิเมตร) ของ <i>P. aeruginosa</i> isolates ทั้ง 5 isolates						
		1	2	3	4	5	C	10%DMSO
กระเจียบ	น้ำร้อน	NI	NI	NI	NI	NI	20.1	NI
	แอลกอฮอล์ 95%	20.2	20.7	21.2	22.3	20.5	21.3	NI
	เฮกเซน	NI	NI	NI	NI	NI	22.5	NI
ขมิ้นชัน	น้ำร้อน	NI	NI	NI	NI	NI	20.4	NI
	แอลกอฮอล์ 95%	NI	NI	NI	NI	NI	19.3	NI
	เฮกเซน	NI	NI	NI	NI	NI	20.1	NI
ขมิ้นอ้อย	น้ำร้อน	NI	NI	NI	NI	NI	20.2	NI
	แอลกอฮอล์ 95%	NI	NI	NI	NI	NI	20.1	NI
	เฮกเซน	NI	NI	NI	NI	NI	20.4	NI
ตะไคร้	น้ำร้อน	NI	NI	NI	NI	NI	18.6	NI
	แอลกอฮอล์ 95%	NI	NI	NI	NI	NI	19.4	NI
	เฮกเซน	NI	NI	NI	NI	NI	19.3	NI

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สมุนไพร	ตัวทำละลาย	ขนาดของ inhibition zone (มิลลิเมตร) ของ <i>P. aeruginosa</i> isolates ทั้ง 5 isolates						
		1	2	3	4	5	C	10%DMSO
ไพล	น้ำร้อน	NI	NI	NI	NI	NI	21.4	NI
	แอลกอฮอล์ 95%	NI	NI	NI	NI	NI	21.1	NI
	เฮกเซน	NI	NI	NI	NI	NI	22.0	NI
บัวบก	น้ำร้อน	NI	NI	NI	NI	NI	20.2	NI
	แอลกอฮอล์ 95%	15.2	15.3	13.7	14.0	13.1	21.3	NI
	เฮกเซน	NI	NI	NI	NI	NI	19.5	NI
ลูกข่อย	น้ำร้อน	NI	NI	NI	NI	NI	22.4	NI
	แอลกอฮอล์ 95%	13.0	13.7	13.7	14.0	13.1	20.8	NI
	เฮกเซน	NI	NI	NI	NI	NI	19.2	NI
ฟ้าทะลายโจร	น้ำร้อน	20.8	20.2	21.8	20.0	20.0	22.0	NI
	แอลกอฮอล์ 95%	15.2	15.3	13.7	14.0	13.7	18.8	NI
	เฮกเซน	NI	NI	NI	NI	NI	20.0	NI

หมายเหตุ NI คือ No inhibition zone, C คือ ยา Chloramphenicol (Positive control), 10% DMSO คือ 10% Dimethyl Sulfoxide (Negative control)

6. ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากสมุนไพรที่ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC and Minimal bactericidal concentration, MBC)

ภายหลังการนำสารสกัดจากสมุนไพรด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดมาทำการทดสอบฤทธิ์และประสิทธิภาพเบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ที่คัดแยกได้จากน้ำคั้นบรรจุขวด โดยวิธี agar well diffusion แล้วได้คัดเลือกเฉพาะสารสกัดที่มีฤทธิ์และประสิทธิภาพยับยั้ง *P. aeruginosa* ทั้ง 5 isolates มาทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี Broth dilution assay และนำหลอดที่ไม่มีการเจริญทุกหลอดจากการ MIC มาใช้ในการหาค่า MBC พบค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบจากกระเจี๊ยบ ใบบัวบก ฟ้าทะลายโจร และยอดด้วยแอลกอฮอล์ และสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรด้วยน้ำร้อนดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบสมุนไพรในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 5 isolates

สารสกัดสมุนไพร	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
สารสกัดหยาบจากกระเจี๊ยบด้วยแอลกอฮอล์ 95%	256	512
สารสกัดหยาบจากใบบัวบกด้วยแอลกอฮอล์ 95%	512	512
สารสกัดหยาบจากยอดด้วยแอลกอฮอล์ 95%	512	1,024
สารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรด้วยแอลกอฮอล์ 95%	512	512
สารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรด้วยน้ำร้อน	256	512

หมายเหตุ mg/ml คือ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาจาก ค่า MIC และ MBC จะเห็นได้ว่า เชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 5 isolates มีความไวต่อสารสกัดหยาบจากกระเจี๊ยบที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% และสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วยน้ำร้อนโดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากัน คือ 256 และ 512 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำขนาดของ Inhibition zone มาพิจารณาพบว่า สารสกัดหยาบจากกระเจี๊ยบที่สกัดด้วย แอลกอฮอล์ 95% และสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วยน้ำร้อนมีขนาด Inhibition zone ที่ใกล้เคียงกับ Positive control จึงอาจสรุปได้ว่า สารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้

นอกจากนี้ ยังมีรายงานการทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพรพื้นบ้านต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus faecium* ที่แยกได้จากอาหารของสัตว์ (2556) ที่พบว่า สารสกัดหยาบจากกระเจี๊ยบที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% สามารถยับยั้งเชื้อแกรมบวกทั้ง 2 ชนิดได้ โดยมีค่า MIC และ MBC ต่อ *E. faecalis* คือ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร MIC และ MBC ต่อ *E. faecium* คือ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เช่นกัน และจากรายงานการทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพรพื้นบ้านต่อเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่แยกได้จากน้ำคั้น พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อได้เช่นกัน โดยมีค่า MIC และ MBC คือ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ณรงค์เดช, 2556) ซึ่งแสดงว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบมีฤทธิ์เป็น Broad spectrum คือสามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ



สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองครั้งนี้ พบว่า มีการปนเปื้อนของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในผลิตภัณฑ์น้ำดื่มบรรจุขวดที่วางจำหน่ายในท้องตลาด โดยตรวจพบเชื้อใน 113 ตัวอย่าง จาก 300 ตัวอย่าง คิดเป็น 37.5 % และแยกเชื้อได้จำนวน 115 isolates เชื้อที่พบยังมีรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะที่คล้ายกับเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ดื้อยาโดยทั่วไป และจากผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของสารสกัดสมุนไพร 8 ชนิด คือ กระเจี๊ยบแดง ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ตะไคร้ บัวบก ไพล ฟ้าทะลายโจร และ ขอ ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำร้อน เฮกเซน และแอลกอฮอล์ 95% จากการศึกษาด้วยวิธีการ agar well diffusion พบว่า สารสกัดหยาบจากกระเจี๊ยบที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% และ สารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วยน้ำร้อนสามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีกว่า สารสกัดจากสมุนไพรชนิดอื่นๆ สารสกัดหยาบจากกระเจี๊ยบที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% มี inhibition zone ขนาด 20.5 - 23.5 มม. ค่า MIC และค่า MBC คือ 256 และ 512 mg/ml ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบจากฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วยน้ำร้อนมี inhibition zone ขนาด 20.8 - 22.0 มม. ค่า MIC และค่า MBC คือ 256 และ 512 mg/ml ตามลำดับ จากผลการศึกษาดังกล่าวจึงอาจจะใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในอนาคตได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กนกรัตน์ ศิริพานิชกร. 2541. โรคติดเชื้อ. พิมพ์ครั้งที่ 2. โฮลิสติกพับลิชชิง, กรุงเทพฯ.

กนกวรรณ เวธน์ภาคิน และกัญญา มัชฌิมาวิวัฒน์. 2552. การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อก่อให้เกิดสิวของ
น้ำมันหอมระเหยจากพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.

กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. 2537. สารสกัดจากสมุนไพร. กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.

กิริติญา เอี่ยมถาวร และยิ่งมณี ตระกูลพั้ว. 2555. การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคใน
ระบบทางเดินอาหารและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโพรพอลิส นมผึ้ง และฟ้าทะลายโจร.
น. 112-119. ใน การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานระดับชาติ (The 4th Annual
Northeast Pharmacy Research Conference of 2012). มหาวิทยาลัยขอนแก่น,
ขอนแก่น.

คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. 2543. บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2542 (บัญชียาจากสมุนไพร).
โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ. 16-23.

ณรงค์เดช ศรีแสง. 2556. การทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพรพื้นบ้านต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้น้ำ. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธัญญรัตน์ ทวีนุต และพิมพ์ฉิม อินเจริญ. 2543. ผลของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยสมุนไพรต่อ
การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2544. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แห่ง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรบัส. โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮาส์, กรุงเทพฯ.

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พัทย์ กาญจนตร และสาธิต พรตระกูลพัฒน์. 2551. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ, น. 91-101. ใน **ประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มข. ครั้งที่ 9 “สัตวแพทย์ทางเลือกวันนี้”**. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ. 2547. **สுகนธบำบัด**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ราชกิจจานุเบกษา. 2549. ฉบับกฤษฎีกาเล่ม 123 ตอนที่ 64 ก., 174.

ราชกิจจานุเบกษา. 2552. ฉบับกฤษฎีกาเล่ม 126 ตอนพิเศษ 41 ง., 19.

รุ่งรัมย์ บุญยเสถียรกิจ. 2552. การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางจุลชีววิทยา: การตรวจเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รุ่งเรือง กิจผาติ. การเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน. 2537. ยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพฯ.

สิทธิธร ศรีสุกฤษฎ์. 2556. การทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพรพื้นบ้านต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus faecium* ที่แยกได้จากอาหาร. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุนิษพรอ พรหมดวง. 2546. การอบแห้งตะไคร้ด้วยไ้มความร้อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

อรอนงค์ พริ้งสุทธกะ. 2555. จุลชีววิทยาทางการแพทย์: แบคทีเรียก่อโรค. จริยสุนิทวงศ์การพิมพ์, กรุงเทพฯ.

อุไรวรรณ คิลกฤษณานันท์, อุดมลักษณ์ สุขอิตตะ, สุภนิตา บัวบาน, ประภัสสร รักถาวร, นิชากร เจริญกรุง, สิริพร ศิริวรรณ และพจมาน พิจเพียงจันทร์. 2549. การสกัดแยกสารและน้ำมันหอมระเหยจากพืชชั้นพื้นฐาน. พิมพ์ครั้งที่ 2. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris and M. Turck. 1996. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am. J. Clin. Pathol.** 45: 493-496.

Bonfiglio, G. 2001. Is levofloxacin as active as ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemotherapy.** 47: 239-242.

Campbell, M.E., S.W. Farmer, and D.P. Speert. 1988. New selective medium for *Pseudomonas aeruginosa* with phenanthroline and 9-chloro-9-[4-(diethylamino)phenyl]-9,10-dihydro-10-phenylacridine hydrochloride (C-390). **J. Clin. Microbiol.** 26: 1910-1912.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** 7th ed. Villanova, PA: NCCLS, Approved standard. M7-A7.

Cross, A.S., J.C. Sadoff, B.H. Iglewski and P.A. Sakol. 1980. Evidence for the role of toxin A in the pathogenesis of infections with *Pseudomonas aeruginosa* in humans. **J. Infect. Dis.** 142: 538.

Davies, D.G., M. R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton and E.P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **IJBS.** 280: 295-298.

Erasto, P., D.S. Grierson and A.J. Afolayan. 2006. Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia amygdalina*. **J. Ethnopharmacol.** 106: 117-120.

- Fick, R.B. and J.S. Hata. 1989. Pathogenetic mechanisms in lung disease caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Chest**. 95: 206S-213S.
- Flemming, H.C., S.L. Percival and J.T. Walker. 2002. Contamination potential of biofilms in water distribution systems. **Water Sci. Technol.: Water Supply**. 2: 271-280.
- Gaby, W.L. 1946. A study of the dissociative behavior of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.** 51: 217-234.
- _____. 1955. Taxonomic problems relating to the identification of species within the genus *Pseudomonas*. **Int. Bull. Bacteriol. Nomen. Taxon.** 5: 153-160.
- _____. 1957. Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.** 74: 356.
- _____ and C. Hadley. 1959. Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.** 74: 356.
- _____ and E. Free. 1953. Occurrence and identification of non-pigmented strains of *Pseudomonas aeruginosa* in the clinical laboratory. **J. Bacteriol.** 65: 746.
- Geldreich, E.E. 1996. **Microbial quality of water supply in distribution systems**. Lewis Publishers, Florida.
- Giamarellou, H. and A. Antoniadou. 2001. Antipseudomonal antibiotics. **Med Clin North Am** 85: 19-42.
- Gilligan, P.H., D.L. Kiska and M.D. Appleman. 2006. p. 36. Cystic fibrosis microbiology, *In* Appleman MD, ed. **Cumitech 43 Cystic fibrosis microbiology**. Washington DC

- Hirakata, Y, J. Matsuda, S. Kawakami, Y. Miyazawa, Y. Ono, N. Nakazakin, M. Inoue and S. Kohno. 2005. Regional variation in the prevalence of extended spectrum β -lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific Region (SENTRY 1998-2002). **Diagn Microbiol Infect Dis.** 52: 323-329.
- Keevil, C.W. 2002. Pathogens in environmental biofilms. pp. 2339-2356. In Bitton, G, ed. **Encyclopedia of environmental microbiology**, 4. John Wiley & Sons, New York.
- Kenzie, M., W.R., N.J. Hoxie, M.E. Proctor, M.S. Gradus, K.A. Blair, D.E. Peterson, J.J. Kazmierczak, D.G. Addiss, K.R. Fox, J.B. Rose and J.P. Davis. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infections transmitted through the public water supply. **N. Engl. J. Med.** 331(3): 161-167.
- Kilb, B., B. Lange, G. Schaule, H.-C. Flemming and J. Wingender. 2003. Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. **Int. J. Hyg. Environ. Health.** 206: 563-573.
- Livermore, DM. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare. **Clin. Infect. Dis.** 34, 634-640.
- Markou N., Markantonis S.L., Dimitrakis E., Panidis D., Boutzouka E., Karatzas S. 2008. Colistin serum concentrations after intravenous administration in critically ill patients with serious multidrug-resistant, gram-negative bacilli infections: A prospective, open-label, uncontrolled study. **Clin Ther.** 30:143-51.
- Matu, E.N. and J. van Staden. 2003. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. **J. Ethnopharmacol.** 87: 35-41.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. M100-S13 (M2). Disk Diffusion Supplemental Table, NCCLS, Wayne Pa.

- Okamoto, K., N. Gotoh, and T. Nishino. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. **Antimicrob. Agents Chemother.** 45:1964-1971.
- Parekh, J. and S. Chanda. 2007. Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plant. **Afr. J. Biomed. Res.** 10: 175-181.
- Pier, G.B., F. Coleman, M. Grout, M. Franklin, and D.E. Ohman. 2005. Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. **Infect Immun.** 69: 1895-1901.
- Poole, K. 2005. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.**; 49: 479-87.
- Rogers, J., A.B. Dowsett, P.J. Dennis, J.V. Lee and C.W. Keevil. 1994. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. **J. Appl. Microbiol.** 1585-1592.
- Rosenberg, M., A. Leibovitz, G. Plotnikov, B. Habot and R. Segal. 2003. Pathogenic colonization of the oral flora in frail elderly patients fed by naso-gastric tube or percutaneous entero-gastric tube. **J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci.** 58: 52-5.
- Schleffer, K.H. and O. Kandler. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. **Bacteriol. Rev.** 36: 407-477.
- Senda, K., Y. Arakawa, S. Ichiyama, K. Nakashim, H. Ito, S. Ohsuka, K. Shimokata, N. Kato and M.J. Ohta. 1996. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. **Clin. Microbiol.** 34: 2909-2913.

Servais, P., G. Billen, P. Laurent, Y. Le vi and G. Randon. 1992. Studies of BDOC and bacterial dynamics on the drinking water distribution system of the Northern Parisian suburbs. **Revue des Sciences de l'Eau**. 5: 69-89.

Stokes, H.W. and R.M. Hall. 1989. A novel family of potentially mobile DNA element encoding site specific gene-integrations functions: integron. **Mol. Microbiol.** 3: 1669-1683.

Tortora, G., R.B. Funke and L.C. Case. 2001. **Microbiology: An Introduction**. Addison-Wesley Longman, Inc., New York.

Tsai, T., T. Tsai, W. Wu, J.T. Tseng and P.J. Tsai. 2010. *In vitro* antimicrobial and anti-inflammatory effects of herbs against *Propionibacterium acnes*. **Food Chem.** 119: 964-968.

Warburton, D.W., K.L. Dodds, R. Burke, M.A. Johnston, P.J. Laffey. 1992. A review of the microbiological quality of bottled water sold in Canada between 1981 and 1989. **Can. J. Microbiol.** 38: 12-19.

Wingender, J. and H.-C. Flemming. 2004. Contamination potential of drinking water distribution network biofilms. **Water Sci. Technol.** 49:11-12.





1. Pseudomonas Agar (Base) และ Pseudomonas CN selective supplement

1.1 ส่วนประกอบของอาหาร Pseudomonas CN selective supplement

Gelatin peptone	16	กรัม/ลิตร
Casein hydrolysate	10	กรัม/ลิตร
Potassium sulfate anhydrous	10	กรัม/ลิตร
Magnesium chloride anhydrous	1.4	กรัม/ลิตร
Agar	1.1	กรัม/ลิตร

1.2 วิธีการเตรียม

1. ละลายอาหาร 24.2 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกลีเซอริน 5 มิลลิลิตร และให้ความร้อนจนอาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
3. รอให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นใส่ Pseudomonas CN selective supplement ที่เตรียมไว้ลงไป
4. ผสมให้เข้ากันกับ base culture แล้วเทพอลต
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง

1.3 วิธีการเตรียม Pseudomonas CN selective supplement

เตรียม 50 : 50 ของน้ำสะอาดกับเอทานอล ใน 1 vial ผสมให้เข้ากันระวังอย่าให้เกิดฟอง จากนั้นใส่ 2 มิลลิลิตรลงใน agar base ในสภาวะปลอดเชื้อ

2. Tryptic soy agar

2.1 ส่วนประกอบของอาหาร Tryptic soy agar

Peptone from casein	15	กรัม
Peptone from soymeal	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.3 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส		

2.2 วิธีการเตรียม

1. ชั่งอาหารตามสัดส่วนใส่ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนเดือดหรือใช้ไมโครเวฟ คนจนอาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. บรรจุลงหลอดทดลอง หลอดละ 4 - 5 มิลลิลิตร
3. นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
4. นำหลอดอาหารมาเลี้ยง ร่อนอาหารแข็งตัว

3. Tryptic soy broth

3.1 ส่วนประกอบของอาหาร Tryptic soy broth

Peptone from casein	17	กรัม
Peptone from soymeal	3	กรัม
D(+)glucose	2.5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
di-potassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH สุดท้ายเป็น 7.3 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.2 วิธีการเตรียม

1. ชั่งอาหารตามสัดส่วนใส่ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
2. นำไปต้มจนเดือดหรือใช้ไมโครเวฟ คนจนอาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. บรรจุลงหลอดทดลอง หลอดละ 4-5 มิลลิลิตร
4. นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Mueller-Hinton agar

4.1 ส่วนประกอบของอาหาร Mueller Hinton agar

Meat infusion	2	กรัม
Casein hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	13	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

4.2 วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Mueller Hinton agar 34 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
2. นำไปต้มจนเดือดหรือใช้ไมโครเวฟ คนจนอาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
4. ร่อนอนุภาคมิลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเทในจานอาหารเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อประมาณ 12-15 มิลลิลิตรต่อจาน รอให้อาหารแข็งและผิวหน้าอาหารแห้งจึงนำไปใช้

5. King B medium

5.1 ส่วนประกอบของอาหาร King B medium

Proteose peptone	20	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.5	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5	กรัม
Glycerol	15	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

5.2 วิธีการเตรียม

1. ละลาย 38 กรัมของอาหารลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นเติมกลีเซอรอล 10 มิลลิลิตร
2. นำไปต้มจนเดือดหรือใช้ไมโครเวฟ คนจนอาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
4. ร่อนจนอุณหภูมิลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเทในจานอาหารเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อประมาณ 12-15 มิลลิลิตรต่อจาน รอให้อาหารแข็งและผิวหน้าอาหารแห้งจึงนำไปใช้



ตารางผนวกที่ ข1 แสดงจำนวนลักษณะโคโลนีที่ตรวจพบของเชื้อ *P. aeruginosa* จากตัวอย่างน้ำ
ในแต่ละช่วงระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง

ช่วงระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง (ก.ค. 54 - ส.ค. 55)	จำนวนของลักษณะโคโลนีที่พบบนแผ่นกรอง (CFU/100 มิลลิลิตร)		
	เย็มเขียว	เย็มเขียวอมเหลือง	เย็มขาวอมเหลือง
1. ก.ค. - ส.ค.	11	5	6
2. ก.ย. - ต.ค.	6	4	2
3. ม.ค. - ก.พ.	14	12	7
4. มี.ค. - เม.ย.	3	2	3
5. พ.ค. - มิ.ย.	7	7	6
6. ก.ค. - ส.ค.	9	7	7

ตารางผนวกที่ ๒ ผลการตรวจพบเชื้อ *P. aeruginosa* จากตัวอย่างน้ำดื่มบรรจุขวด 50 ยี่ห้อ

ลำดับที่	ยี่ห้อน้ำดื่มบรรจุขวด	วิธีการฆ่าเชื้อ	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6
			ก.ค. - ธ.ค. 2554	ก.ย. - ต.ค. 2554	ม.ค. - ก.พ. 2555	มี.ค. - เม.ย. 2555	พ.ค. - มิ.ย. 2555	ก.ค. - ธ.ค. 2555
1	น้ำดื่มเซ็นทรัลครั้งค์	UV, Ozone, R.O.	-	-	-	+	-	+
2	น้ำดื่มวังน้ำเย็น	UV, Ozone, R.O.	+	+	+	-	-	-
3	น้ำดื่มกรุงเทพน้ำทิพย์	UV, Ozone, R.O.	+	-	+	+	-	-
4	ชั้นยูเนียน เทคโนโลยี่	UV, Ozone, R.O.	-	-	-	+	-	-
5	แอ่นเดอร์เอนด์ เบเกอร์ส	UV, Ozone, R.O.	-	-	-	+	+	+
6	น้ำดื่มเบทาเทอร์ช้อยส์	UV, Ozone, R.O.	+	+	+	+	-	-
7	น้ำดื่มเพ็ญธร	UV, Ozone, R.O.	+	-	+	+	-	-
8	น้ำดื่มวอเตอร์ริส	UV, Ozone, R.O.	-	-	-	+	-	+
9	น้ำดื่มอินเทรนด์	UV, Ozone, R.O.	-	-	-	+	-	-
10	น้ำดื่มสัมฤทธิ์พันธุ์สุข	UV, Ozone, R.O.	-	-	-	+	-	-
11	เอส คับบลิว วอเตอร์ไลฟ์	UV, Ozone, R.O.	+	-	+	-	-	-
12	น้ำดื่มเบญจ	UV, Ozone, R.O.	-	-	-	+	+	-
13	น้ำดื่มกรีนเฟรช	UV, Ozone, R.O.	-	-	-	+	+	-
14	น้ำดื่มพอใจพานิช	UV, Ozone, R.O.	-	-	+	+	-	-
15	น้ำดื่ม ยู พี ซี	UV, Ozone, R.O.	-	-	+	+	-	-
16	น้ำดื่ม พี เอส	UV, Ozone, R.O.	-	-	+	-	-	-
17	น้ำดื่มสิทธิวัฒน์น้ำดื่ม	UV, Ozone, R.O.	-	-	+	-	-	-

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

ลำดับที่	ยี่ห้อน้ำดื่มบรรจุขวด	วิธีการฆ่าเชื้อ	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6
			ก.ค. - ธ.ค.2554	ก.ย. - ต.ค. 2554	ม.ค - ก.พ. 2555	มี.ค. - เม.ย. 2555	พ.ค. - มิ.ย. 2555	ก.ค. - ธ.ค. 2555
18	น้ำดื่มท็อปออฟเฟอร์	UV, R.O.	-	-	-	+	-	
19	น้ำดื่มประทุมพันธุ์	UV, R.O.	-	-	+	+	-	-
20	น้ำดื่มพี ที วี เซอร์วิส	UV, R.O.	-	-	-	+	+	-
21	น้ำดื่มนิวแมคอาเออร์	UV, R.O.	-	-	-	+	+	-
22	พีแอนด์พี เพียวริตี้	UV, R.O.	-	-	-	-	+	+
23	เอ็มพี วอเตอร์โปร	UV, R.O.	-	-	-	+	-	+
24	สุทส์น วอเตอร์	UV, R.O.	-	-	-	+	-	+
25	น้ำดื่มจิตรา	UV	-	-	+	+	+	+
26	น้ำดื่มมิไลท์	UV	-	-	+	+	+	-
27	น้ำดื่มแก้วทิพย์	UV	+	+	+	+	-	-
28	น้ำดื่ม เอ เอส เอ	UV	+	+	+	+	-	+
29	น้ำดื่ม ที ที ซี	UV	-	-	-	+	+	+
30	น้ำดื่มธีรบริรักษ์	UV	+	+	+	-	+	+
31	น้ำดื่มทรายทอง	UV	+	+	+	+	-	-
32	กรุงเทพน้ำกลั่นบริการ	UV	-	-	+	+	+	+
33	น้ำดื่ม เอ แอนด์ เอ รุ่งไผ่	UV	+	-	+	+	-	-
34	น้ำดื่มวอเตอร์สตาร์	UV	+	+	+	-	+	+

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

ลำดับที่	ยี่ห้อน้ำดื่มบรรจุขวด	วิธีการฆ่าเชื้อ	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6
			ก.ค. - ธ.ค. 2554	ก.ย. - ต.ค. 2554	ม.ค - ก.พ. 2555	มี.ค. - เม.ย. 2555	พ.ค. - มิ.ย. 2555	ก.ค. - ธ.ค. 2555
35	นีโอ มิลเลนเนียม	UV	+	+	+	+	+	-
36	น้ำดื่มคุณภาพ	UV	+	+	+	+	-	+
37	น้ำดื่มอินตา	UV	+	+	+	+	-	+
38	น้ำดื่มธนพร	UV	-	-	+	+	+	-
39	น้ำดื่มพนาสันต์	UV	-	-	+	+	+	+
40	สยามวอเตอร์เพียว	UV	+	-	+	+	+	+
41	สามัคคีรุ่งเรือง	UV	-	-	-	+	+	-
42	น้ำดื่มขาววัง	UV	+	-	+	+	-	-
43	ชั้น กรีน น้ำดื่ม	UV	+	+	+	-	-	+
44	ซีซั่นฟู้ดส์แอนด์ดริง	UV	+	-	+	+	-	+
45	น้ำดื่มเพิร์ล	UV	+	-	+	+	-	+
46	น้ำดื่มปาร์ดีลิส	UV	+	+	+	+	+	-
47	น้ำดื่มรัตนะ	UV	+	+	+	+	-	+
48	น้ำดื่มอินดี้	UV	-	+	+	+	-	-
49	น้ำดื่มนางฟ้า	UV	-	-	+	+	+	-

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

ลำดับที่	ยี่ห้อน้ำดื่มบรรจุขวด	วิธีการฆ่าเชื้อ	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 6
			ก.ค. - ธ.ค. 2554	ก.ย. - ต.ค. 2554	ม.ค - ก.พ. 2555	มี.ค. - เม.ย. 2555	พ.ค. - มิ.ย. 2555	ก.ค. - ธ.ค. 2555
50	น้ำดื่มเนปจูน	UV	-	-	+	+	+	+

หมายเหตุ เครื่องหมาย + แสดงผลการตรวจพบ typical colony บนอาหาร selective medium และเครื่องแสงสีเขียวภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต
 เครื่องหมาย – แสดงการตรวจไม่พบ typical colony บนอาหาร selective medium และไม่เครื่องแสงสีเขียวภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต,
 UV คือ Ultraviolet,
 RO คือ Reverse Osmosis

ตารางผนวกที่ ข3 แสดงความกว้างของ inhibition zone (มิลลิเมตร) ของ *P. aeruginosa* ที่แยกได้
 ตัวแทน 5 isolates เปรียบเทียบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด กับ standard
 inhibition zone ตามวิธีของ Kirby-Bauer

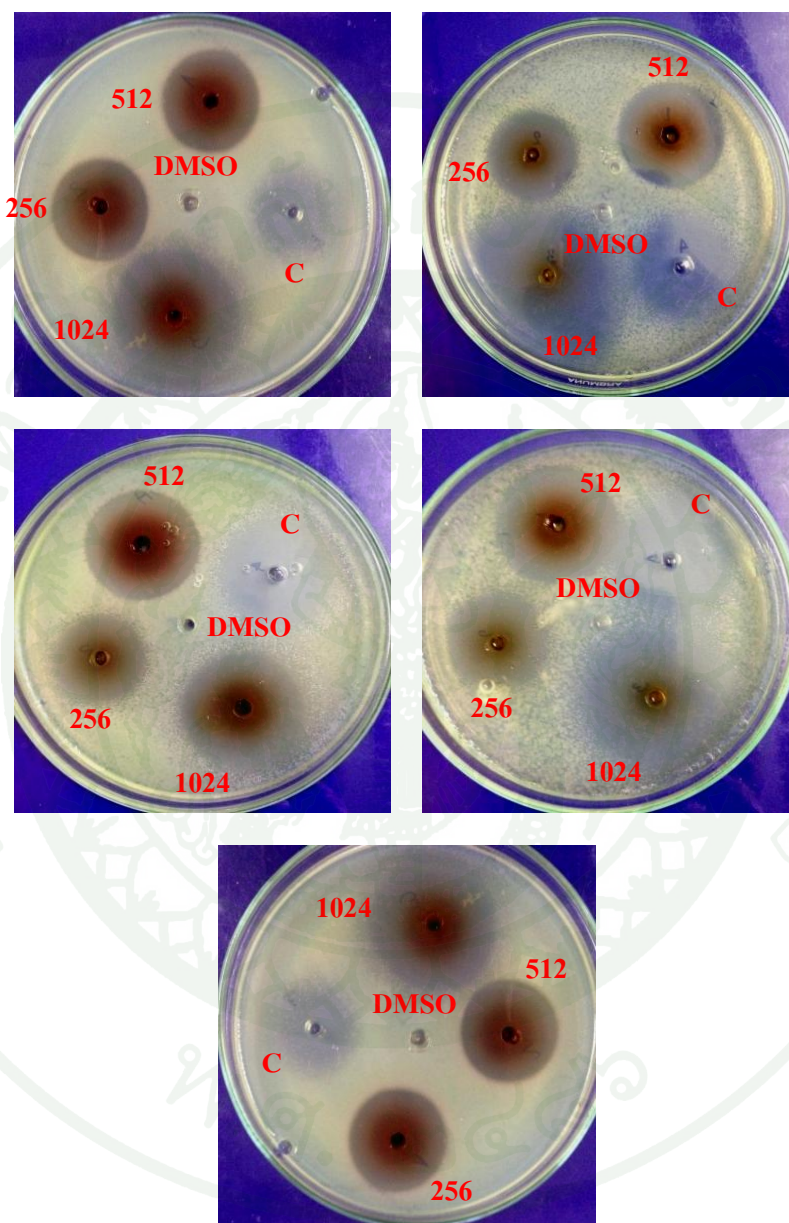
ยาปฏิชีวนะ	Inhibition zone (มิลลิเมตร)							
	Standard zone			Inhibition zone ของ 5 isolates				
	Resistant	Intermediate	Sensitive	1	2	3	4	5
Chloramphenicol (30mcg) ¹	≤ 12	13 - 17	≥ 18	20.1	18.7	19.5	22.5	21.3
Carbenicillin (100 mcg)	≤ 12	13 - 28	≥ 29	18.0	20.0	18.5	21.2	20.4
Gentamicin (100 mcg)	≤ 12	13 - 14	≥ 15	17.8	16.5	20.0	17.5	18.2
Kanamycin (30 mcg)	≤ 13	14 - 17	≥ 18	20.0	22.4	18.6	20.4	22.4
Piperracillin (100 mcg)	≤ 17	-	≥ 18	21.0	20.3	21.4	22.8	23.4
Amikacin (100 mcg)	≤ 14	15 - 16	≥ 17	8.2	8.0	12.4	9.5	8.0
Erythromycin (15 mcg)	≤ 13	14 - 17	≥ 18	0	0	0	0	0
Streptomycin (10 mcg)	≤ 11	12 - 14	≥ 15	6.8	7.3	7.0	8.2	7.3
Polymycin (300 U ²)	≤ 8	9 - 11	≥ 12	0	0	0	0	0
Tetracyclin ((30 mcg)	≤ 14	15 - 18	≥ 19	6.5	6.9	7.5	7.5	8.0

หมายเหตุ ¹ mcg = microgram

² U = Unit

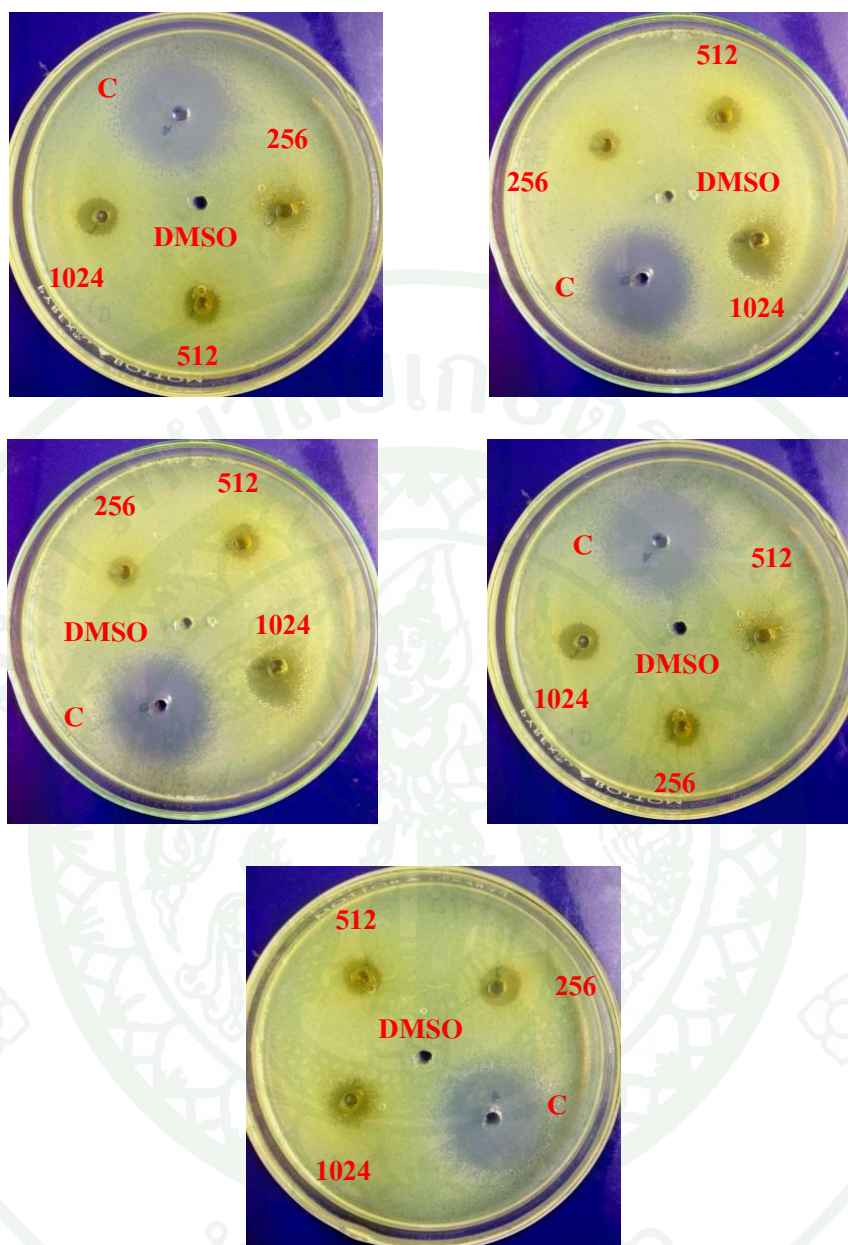


1. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* 5 isolates ของสารสกัดหยาบสมุนไพรด้วยวิธี Agar well diffusion



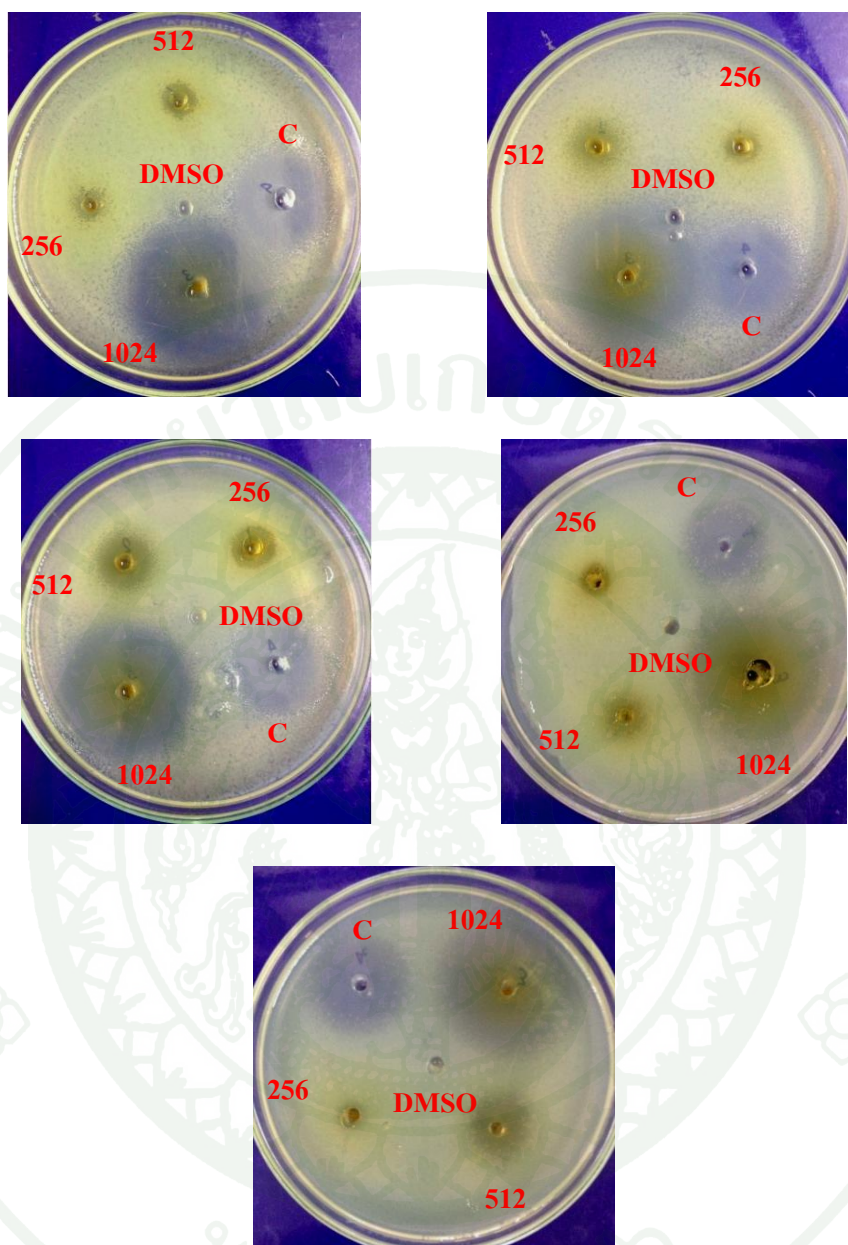
ภาพผนวกที่ ค1 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* 5 isolates ของสารสกัดหยาบด้วยแอลกอฮอล์ 95% จากกระเจี๊ยบ

หมายเหตุ C คือ ยา Chloramphenicol ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Positive control)
DMSO คือ 10% Dimethyl Sulfoxide (Negative control)
256, 512 และ 1,024 คือ ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)



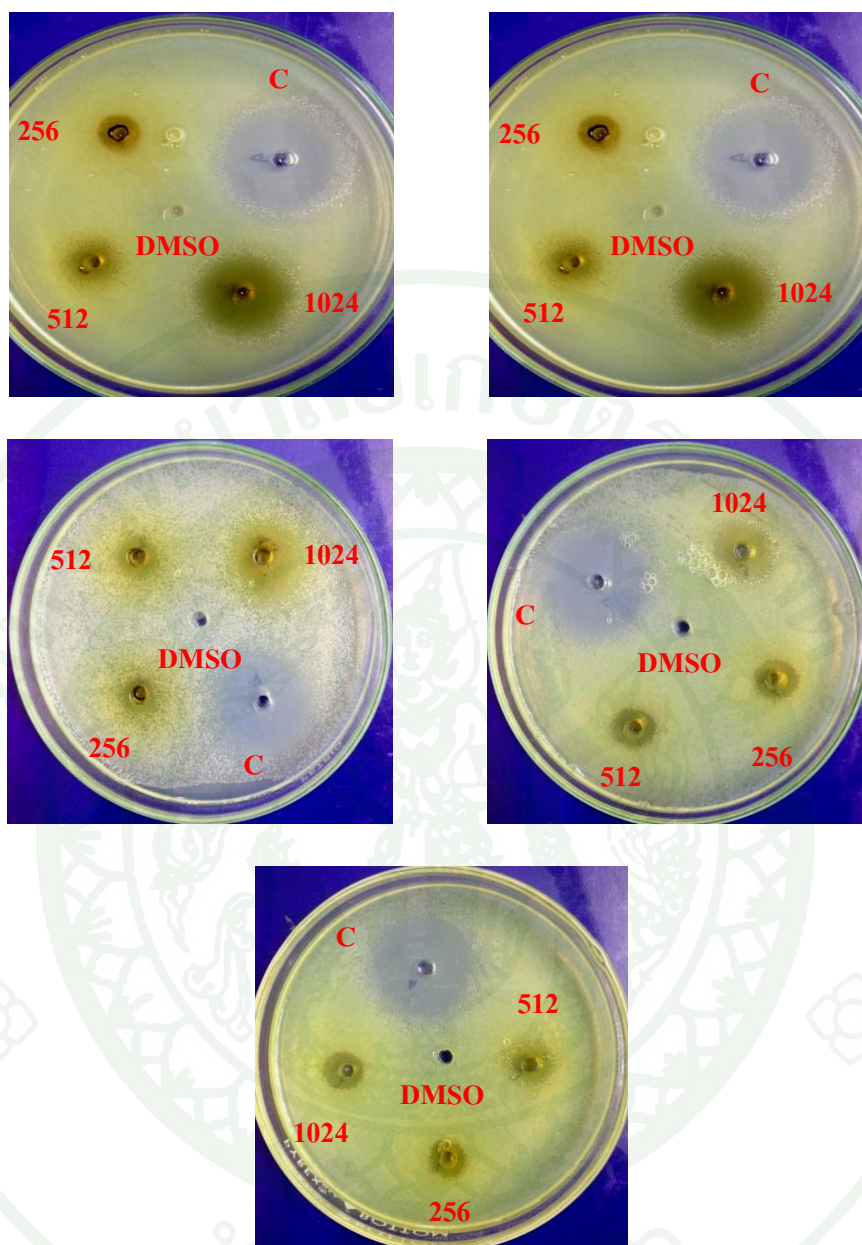
ภาพผนวกที่ ค2 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* 5 isolates ของสารสกัดหยาบ ด้วยแอลกอฮอล์ 95% จากใบบัวบก

หมายเหตุ C คือ ยา Chloramphenicol ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Positive control)
 DMSO คือ 10% Dimethyl Sulfoxide (Negative control)
 256, 512 และ 1,024 คือ ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)



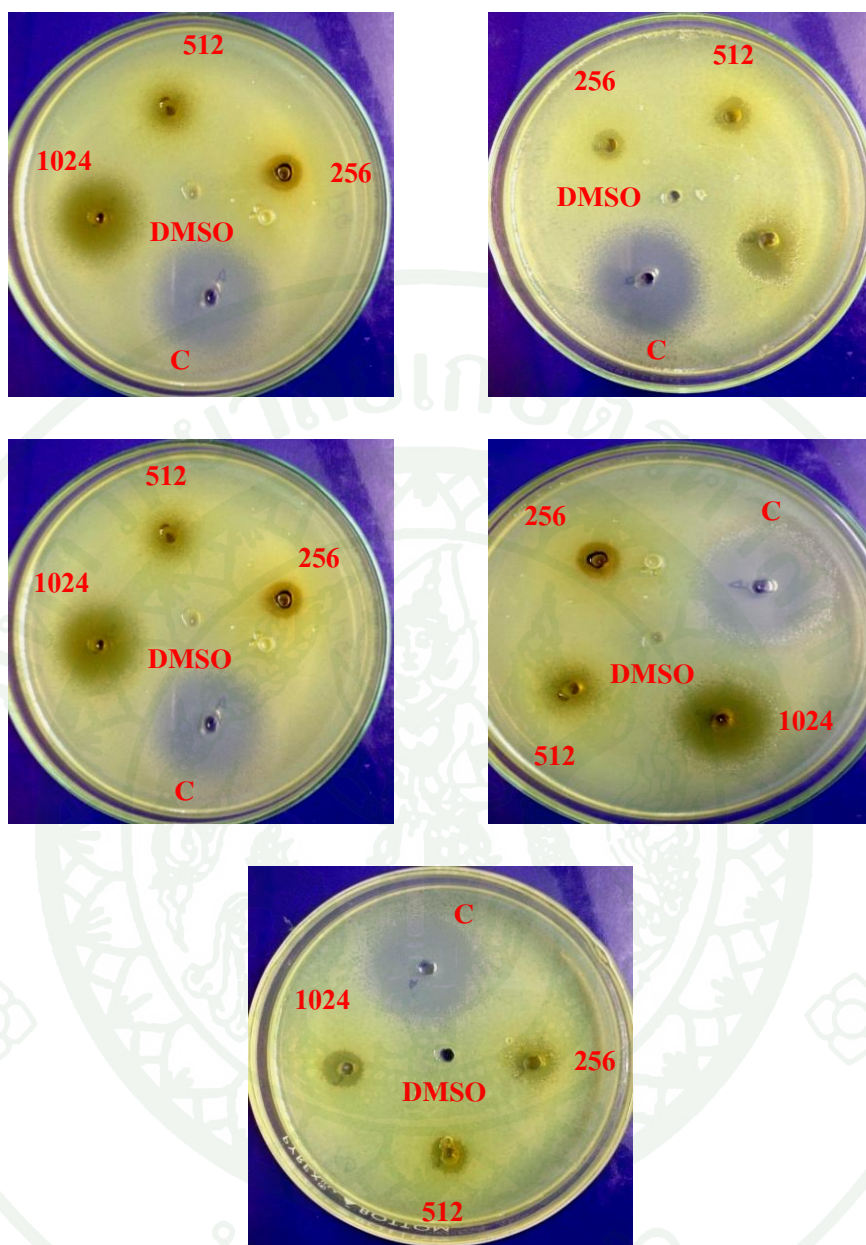
ภาพผนวกที่ ค3 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* 5 isolates สารสกัดหยาบด้วย น้ำร้อนจากฟ้าทะลายโจร

หมายเหตุ C คือ ยา Chloramphenicol ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Positive control)
 DMSO คือ 10% Dimethyl Sulfoxide (Negative control)
 256, 512 และ 1,024 คือ ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)



ภาพผนวกที่ ค4 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* 5 isolates สารสกัดหยาดด้วย แอลกอฮอล์ 95% จากฟ้าทะลายโจร

หมายเหตุ C คือ ยา Chloramphenicol ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Positive control)
 DMSO คือ 10% Dimethyl Sulfoxide (Negative control)
 256, 512 และ 1,024 คือ ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)



ภาพผนวกที่ ค5 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* 5 isolates ของสารสกัดหยาบ ด้วยแอลกอฮอล์ 95% จากขยอ

หมายเหตุ C คือ ยา Chloramphenicol ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Positive control)
 DMSO คือ 10% Dimethyl Sulfoxide (Negative control)
 256, 512 และ 1,024 คือ ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ - นามสกุล	นางสาวชุตินันท์ คงสรินทร์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	22 ธันวาคม 2530
สถานที่เกิด	อำเภอนาบอน จังหวัดนครศรีธรรมราช
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-