

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

Acetobacter xylinum TISTR 976

Escherichia coli TISTR 887

Staphylococcus aureus TISTR 118

Staphylococcus epidermidis TISTR 518

Micrococcus luteus TISTR 884

3.2 เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ

เซลล์ L929 (mouse fibroblast) จาก ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

3.3 สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย

เหง้าไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.)

3.4 สารเคมีและอุปกรณ์

3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

3.4.1.1 อาหารสูตรน้ำมะพร้าว

3.4.1.2 อาหารสูตรสำเร็จ Nutrient Agar (NA) Scharlau Chemic. Spain

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

3.4.1.4 อาหารสูตร Mueller Hinton Agar (MHA)

3.4.1.5 อาหารสูตร Hestrin-Schramm medium (HS medium)

3.4.1.6 อาหารสูตร Glucose Ethanol Yeast extract Agar (GEY medium)

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

3.4.2 เคมีภัณฑ์

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

3.4.3 อุปกรณ์

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

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

3.5 การหมักเซลล์ูโลส

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

3.6 ศึกษาการเตรียมแผ่นเซลล์โลสให้บริสุทธิ์

เปรียบเทียบวิธีการเตรียมแผ่นเซลล์โลสให้บริสุทธิ์ 3 วิธี ได้แก่

3.6.1 การต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำแผ่นเซลล์โลสที่ได้จากการหมัก ล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง จากนั้นนำแผ่นเซลล์โลสใส่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต้มให้เดือดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (2 ครั้ง) เพื่อย่อยสลายเซลล์แบคทีเรียภายในแผ่นเซลล์โลส จากนั้นต้มด้วยสารละลายกรดอะซิติก ร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 30 นาที เพื่อปรับค่าความเป็นด่างให้ลดลง จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดจนน้ำสุดท้ายมีค่า pH เป็นกลาง เก็บแผ่นเซลล์โลสที่ได้ในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดการใช้งาน (Maneerung และคณะ. 2008)

3.6.2 การต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และการฟอกสี

นำแผ่นเซลล์โลสที่ได้จากการหมัก มาล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง จากนั้นนำแผ่นเซลล์โลสใส่ในสารละลายสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต้มให้เดือด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเซลล์โลสใส่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 0.5 ต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อฟอกสีของแผ่นเซลล์โลสให้ขาว จากนั้นล้างแผ่นเซลล์โลสด้วยน้ำเปล่า และต้มในน้ำเปล่าให้เดือด 30 นาที เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น กระทั่งน้ำที่แช่แผ่นเซลล์โลสไม่มีกลิ่นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และมีค่า pH เป็นกลาง ดัดแปลงจากวิธีของ พิษพันธ์ พงษ์สกุล (2550)

3.6.3 การแช่แผ่นเซลล์โลสในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำแผ่นเซลล์โลสที่ได้จากการหมัก มาล้างด้วยน้ำเปล่า 2 ครั้ง จากนั้นนำแผ่นเซลล์โลสแช่ในสารละลายสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเซลล์โลสมาต้มในน้ำกลั่น 30 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำสะอาด จำนวนหลายครั้ง จนกว่ากลิ่นและความขุ่นของโซเดียมไฮดรอกไซด์หายไป และน้ำที่ล้างและแช่แผ่นเซลล์โลสมีค่า pH เป็นกลาง ดัดแปลงจากวิธีของ Saibuatong และ Phisalaphong (2010)

3.7 การสกัดสารจากโพล

นำเหง้าของโพลล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก จากนั้นนำโพลที่หั่นแล้วอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำโพลที่อบแล้วมาชั่งน้ำหนักให้ได้ 2.0 กิโลกรัม ห่อด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำมาแช่ในสารอินทรีย์ 3 ลำดับ ลำดับแรกแช่ในตัวทำละลาย เฮกเซน ปริมาตร 6.0 ลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ กรองสารที่สกัดได้ด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 90.0 มิลลิเมตร แล้วระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน เรียกสารส่วนนี้ว่าสารสกัดหยาบโพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซน ต่อมานำกากโพลที่สกัดด้วยเฮกเซนแล้วนั้น ห่อด้วยผ้าขาวบาง แล้วแช่ในสารอินทรีย์ลำดับต่อมาคือ ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และลำดับสุดท้ายคือ ตัวทำละลายเมทานอล โดยทำทุกขั้นตอนเหมือนวิธีสกัดสารในตัวทำละลาย เฮกเซน จนได้สารสกัดหยาบ ในชั้นของตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และสารสกัดหยาบในชั้นของตัวทำละลายเมทานอล ตามลำดับ (เชษฐ รัตนจารย์. 2548)

3.8 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

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

3.9 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากโพลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion

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

3.10 การสกัดสารจากเปลือกมังคุด

นำเปลือกมังคุดสดมาล้างให้สะอาด จากนั้นหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก นำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งน้ำหนักแห้งให้ได้ 2.0 กิโลกรัม จากนั้นแช่ด้วยสารอินทรีย์ 3 ลำดับ ทำวิธีการสกัดเช่นเดียวกับการสกัดโพล

3.11 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากเปลือกมังคุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Disc diffusion

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

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

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

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

3.13 เปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดไพลและสารสกัดเปลือกมังคุด โดยวิธี Disc diffusion

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

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

3.14 การเตรียมแผ่นเซลล์ูโลสร่วมกับสารสกัด

นำสารสกัดหยาบที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.13 มาเตรียมเป็นสารละลาย โดยเจือจางสารสกัดด้วยสารละลาย DMSO ลดระดับความเข้มข้นจากร้อยละ 10 เป็นร้อยละ 0.02 เพื่อลดความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ทดสอบ โดยใช้ความเข้มข้นสารสกัดที่สูงกว่าค่า MIC จากนั้นนำแผ่นเซลล์ูโลสที่ผ่านการเตรียมให้บริสุทธิ์แล้ว มาอัดรีดน้ำด้วยเครื่องอัดรีดน้ำ ฆ่าเชื้อแผ่นเซลล์ูโลสด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จุ่มแผ่นเซลล์ูโลสที่ปลอดเชื้อ ลงในสารละลายสารสกัด ใช้แผ่นเซลล์ูโลสที่จุ่มในสารละลาย DMSO ร้อยละ 0.02 เป็นชุดควบคุม แช่แผ่นเซลล์ูโลสในสารละลายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเซลล์ูโลสออกจากสารละลาย และซับด้วยกระดาษกรอง เพื่อนำสารละลายส่วนเกินที่ผิวหน้าแผ่นเซลล์ูโลสออก จากนั้นนำไปแช่แข็งในตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) 1-2 วัน บรรจุแผ่นแห้งเซลล์ูโลสที่มีสารสกัดรวมด้วยในถุงพลาสติก เก็บในที่แห้ง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และหลีกเลี่ยงแสง

3.15 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของแผ่นแห้งเซลล์ูโลสที่จุ่มสารสกัดโดยวิธี Agar Diffusion

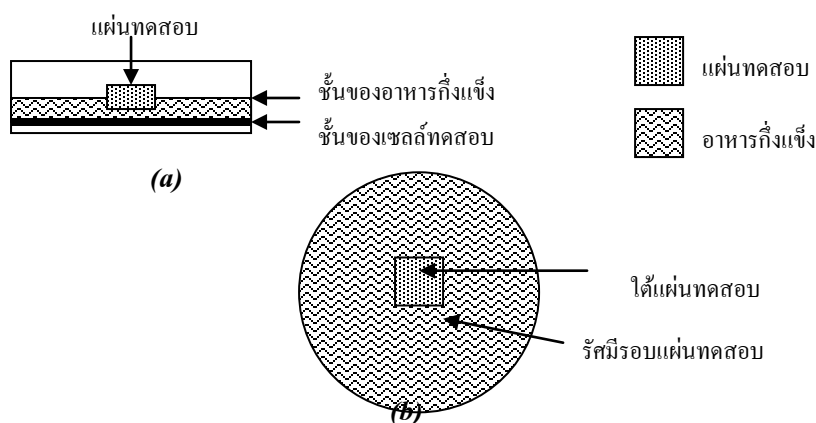
3.15.1. การเตรียมเซลล์เพื่อใช้ทดสอบ

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

3.15.2 การทดสอบความเป็นพิษ

ทดสอบความเป็นพิษของแผ่นแห้งเซลล์ูโลสที่จุ่มสารสกัดโดยวิธี Agar diffusion หลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเชื้อแล้ว ดูดสารละลายอาหารเก่าในจานเพาะ

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



ภาพที่ 3.1 แผนภาพแสดงการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี Agar diffusion

- (a) แผนภาพมองจากด้านข้างของจานเพาะเซลล์ที่วางแผ่นทดสอบบนอาหารกึ่งแข็ง
(b) แผนภาพมองจากด้านบนแสดงตำแหน่งของเซลล์ที่สังเกต

ตารางที่ 3.1 ระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบโดยวิธี Agar Diffusion ตามเภสัชตำรับของ
ประเทศสหรัฐอเมริกาและทะเบียนยาหลักแห่งชาติแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (USP-NF)

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

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

Permission Granted.

3.16 ทดสอบฤทธิ์ของแผ่นแห้งเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ แบคทีเรียโดยวิธี Broth dilution

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

ร้อยละการเจริญของแบคทีเรียชุดทดลอง

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

A คือการเจริญของแบคทีเรียชุดควบคุม

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

3.17 ศึกษาลักษณะสัณฐานของแผ่นแห้งเซลล์ูโลสที่จุ่มสารสกัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำแผ่นแห้งเซลล์ูโลสที่จุ่มสารสกัดมาวิเคราะห์โครงสร้างลักษณะสัณฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น JSM-5410 (JEOL) เปรียบเทียบกับแผ่นเซลล์ูโลสแห้งที่ไม่จุ่มสารสกัด โดยตัดแผ่นแห้งเซลล์ูโลสให้มีขนาด 10.0 × 10.0 ตารางมิลลิเมตร อบให้แห้ง วางแผ่นตัวอย่างลงบนแท่นวางสำหรับเคลือบทองคำ (sputter coater) เพื่อทำการเคลือบแผ่นตัวอย่างด้วยทองคำ จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และบันทึกภาพ ทดสอบที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สถาบันส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

3.18 ศึกษาเอกลักษณ์ของแผ่นแห้งเซลล์ูโลสที่จุ่มสารสกัดด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

วิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบอินทรีย์ของแผ่นแห้งเซลล์ูโลส จากการดูดกลืนแสงในช่วงอินฟราเรด เพื่อตรวจสอบสารสกัดภายในแผ่นเซลล์ูโลส โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของแผ่นแห้งเซลล์ูโลสที่จุ่มสารสกัด แผ่นแห้งเซลล์ูโลสที่ไม่จุ่มสารสกัด และสารสกัด โดยตัดแผ่นแห้งเซลล์ูโลส ขนาด 20.0 × 20.0 ตารางมิลลิเมตร อบให้แห้งเพื่อกำจัดความชื้น วางแผ่นแห้งเซลล์ูโลสบนแท่นวางวัตถุสำหรับตรวจสอบ ยิงลำแสงอินฟราเรด ช่วงของเลขคลื่น (wave number) เท่ากับ 400 – 4000 เซนติเมตร⁻¹ ทดสอบด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy บันทึกกราฟค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ทดสอบที่ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.19 ศึกษาอัตราการดูดซับน้ำของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด

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

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

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

A = น้ำหนักของแผ่นเซลลูโลสแห้ง (กรัม)

B = น้ำหนักของแผ่นเซลลูโลสเปียก (กรัม)

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

3.20 ศึกษาอัตราการซึมผ่านของไอน้ำของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด

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

3.21 ศึกษาอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด

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

วิธีการทดสอบในข้อ 3.20 และ 3.21 ส่งตัวอย่างแผ่นเซลลูโลสไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการทดสอบบรรจุภัณฑ์ ศูนย์การบรรจุหีบห่อไทย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.22 ศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นแห้งเซลลูโลสที่จุ่มสารสกัด

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

วิธีการคำนวณ

3.22.1 ความต้านทานแรงดึง (Tensile strength)

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

$$\begin{aligned} \text{เมื่อ } F &= \text{แรงดึงสูงสุดก่อนชิ้นงานเกิดการแตกหัก (นิวตัน)} \\ A &= \text{พื้นที่หน้าตัดเริ่มต้นของชิ้นงานทดสอบ (ตารางมิลลิเมตร)} \\ &= \text{ระยะ gauge length} \times \text{ความหนาของแผ่นวัสดุ} \end{aligned}$$

3.22.2 ค่ามอดูลัสของยัง (Young's Modulus)

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

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

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

แทนค่า (2) และ (3) ใน (1) จะได้

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

3.22.3 ค่าการยืด ณ จุดขาด (Elongation)

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

เมื่อ L_0 = ระยะเริ่มต้น
 L_t = ระยะที่ยืดจนขาด