

รายงานการวิจัย

การผลิตวัสดุปิดแผลจากเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียร่วมกับสารสกัด
เปลือกมังคุดและศึกษาสมบัติของวัสดุปิดแผลที่ได้

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

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภารัตน์ รักชลธี
ดร.วนิดา จันทร์วิบูล

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ประจำปีงบประมาณ 2553 - 2554
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กิตติกรรมประกาศ

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

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
หัวหน้าโครงการวิจัย

หัวข้อโครงการวิจัย

การผลิตวัสดุปิดแผลจากเซลล์โลสที่ได้จากแบคทีเรียร่วมกับสารสกัดเปลือกมังคุดและศึกษาสมบัติของวัสดุปิดแผลที่ได้

ผู้วิจัย

รศ.ดวงใจ โอชัยกุล

ผศ.ดร.สุภารัตน์ รักชลธิ

ดร.วนิดา จันทรวีกุล

บทคัดย่อ

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

คำสำคัญ : วัสดุปิดแผล, แบคทีเรียเซลล์โลส, สารสกัดเปลือกมังคุด, สารสกัดไพล, การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

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

ABSTRACT

The wound dressings were prepared from bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* TISTR 976 and incorporated with the herbal crude extract which showed a high antibacterial activity efficiency. In this study, the antibacterial activity of Phlai (*Zingiber cassumunar* Roxb.) and mangosteen peel (*Garcinia mangostana* L.) crude extracts obtained from the maceration methods with hexane, ethyl acetate and methanol were investigated against *Escherichia coli* TISTR 887 and *Staphylococcus aureus* TISTR 118 by disc diffusion method. The result showed that the antibacterial activity of mangosteen peel crude extract with methanol was more effective than that of Phlai crude extract. The same minimum inhibitory concentration (MIC) of mangosteen peel crude extract with methanol against *S. aureus* TISTR 118, *Staphylococcus epidermidis* TISTR 518 and *Micrococcus luteus* TISTR 884 were 0.195 mg/ml whereas was found its MIC against *E. coli* TISTR 887 was 3.125 mg/ml. The mangosteen peel crude extract were impregnated into bacterial cellulose to produce antibacterial wound dressings by immersing bacterial cellulose in crude extract and then being freeze-dried. The maximum concentration of crude extract which was non cytotoxic to L929 cells was 6.25 mg/ml. The inhibition zone of the dried bacterial cellulose incorporated with mangosteen peel extract (diameter = 6.00 mm) against *S. aureus* TISTR 118, *S. epidermidis* TISTR 518 and *M. luteus* TISTR 884 were 12.16 ± 0.28 , 11.94 ± 0.04 and 12.98 ± 1.32 mm, respectively, but it did not show the growth inhibition of *E. coli* TISTR 887. The wound dressing from the bacterial cellulose immersed in mangosteen crude extract demonstrated an increased water vapour transmission rate and an increased oxygen transmission rate. The water absorption of the dressing was 4.44 times of its dry weight. Its tensile strength, Young's modulus, and elongation at break were $13.33 \pm 1.95 \text{ N/m}^2$, $270.36 \pm 61.67 \text{ N/m}^2$ and $2.78 \pm 0.67 \%$, respectively. At wet state, the bacterial cellulose immersed in mangosteen crude extract possessed elongation at break 3.89 times of that of the dry bacterial cellulose.

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

สารบัญเรื่อง

หน้า

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

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 ระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบโดยวิธี Agar Diffusion.....	31
ตารางที่ 4.1 ลักษณะของแผ่นเซลล์โลสที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่างๆ.....	37
ตารางที่ 4.2 ลักษณะของสารสกัดหยาบโพลและร้อยละของสารที่สกัดได้.....	39
ตารางที่ 4.3 เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากโพล ในชั้นของตัวทำละลายชนิดต่างๆ.....	40
ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะของสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดและร้อยละของสารที่สกัดได้.....	42
ตารางที่ 4.5 เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเปลือกมังคุด จากชั้นของตัวทำละลายชนิดต่างๆ.....	43
ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> TISTR 118 และ <i>E. coli</i> TISTR 887 ของสารสกัดหยาบโพลและสารสกัดหยาบเปลือกมังคุดโดยวิธี Broth dilution...	44
ตารางที่ 4.7 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดโพล และเปลือกมังคุดจากตัวทำละลาย 3 ชนิด.....	45
ตารางที่ 4.8 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ เปลือกมังคุดแห้งที่สกัดจากเมทานอล.....	47
ตารางที่ 4.9 ระดับปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ทดสอบ L929 กับ แผ่นแห้งเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัดเปลือกมังคุดและชุดควบคุม.....	51
ตารางที่ 4.10 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งเชื้อของแผ่นเซลล์โลสที่จุ่มสารสกัด จากเปลือกมังคุดจากเมทานอลด้วยวิธี Disc diffusion.....	53
ตารางที่ 4.11 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของแผ่นแห้งเซลล์โลส ด้วยวิธี Broth dilution.....	54
ตารางที่ 4.12 ผลอัตราการซึมผ่านไอน้ำและออกซิเจนของแผ่นเซลล์โลส.....	59
ตารางที่ 4.13 อัตราการซึมผ่านของไอน้ำของแผ่นวัสดุปิดแผลทางการค้าชนิดต่างๆ.....	59
ตารางที่ 4.14 ค่าคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นแห้งเซลล์โลสและแผ่นแห้งเซลล์โลส ภายหลังจากการแช่น้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง.....	60

สารบัญภาพ

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