เอกสารอ้างอิง

กฤดา ชูเกียรติศิริ, ฎิลก วงศ์เสถียร, อภิธาน ลาภจิตร, ศราวิน สินธพทอง, สุรชัย พิกุลแก้ว, รัชต์ ขัตติยะ และสุนีย์ จันทร์สกาว. 2550. ผลของสารสกัดจากเปลือกทับทิม ใบชุมเห็ดเทศ และใบฝรั่งในการยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophilla.* ว. สัตวแพทย์ 17(1): 28-35.

กฤษณา จรรยาพูน. 2548. พื้นฐานการทดสอบทางวิทยาศาสตร์ภูมิคุ้มกัน. สำนักพิมพ์แอนนา ออฟเซต: ขอนแก่น.

เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2536. โรคติดเชื้อในไก่. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

ขวัญตา กังวาลวชิรธาดา. 2535. ฝรั่งผลไม้เพื่อสุขภาพ. นสพ.กสิกร 65: 562-564.

คณะอนุกรรมการศูนย์ประสานงานสารนิเทศ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2544. หัวหอม ยอดอาหารสู้โรค. ศปว. สาร 2(2): 8.

จริยา สินเดิมสุข และสมเกียรติ ดีกิจเสริมพงศ์. 2532. ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงและกลุ่มแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้. วารสารกรมการแพทย์ 14(6): 421-426.

จริยา สินเดิมสุข สมเกียรติ ดีกิจเสริมพงศ์ และวีณา จารุปรีชาชาญ. 2532. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาโรคอุจจาระร่วงระหว่างใบฝรั่งและเปลือกมังคุด. วารสารเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 16(2): 32-35.

จิโรจ ศศิปรียจันทร์. 2543. การจัดการและโรคสำคัญในไก่เนื้อ. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพ ฯ.

เฉลียว ศาลากิจ. 2548. โลหิตวิทยาทางสัตวแพทย์. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม.

ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว. 2541. สรีรวิทยาทางเดินอาหาร. ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

เชนทร์ ผางนุย. 2547. ผลของการเสริมใบฝรั่งและผลอ่อนผงในอาหาร ต่อสมรรถนะภาพการผลิตและการควบคุมโรคในไก่เนื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์. 2541. โลหิตวิทยาของสัตว์เลี้ยงและวิธีการวิเคราะห์. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

ตรีชฎา ศิริรักษ์, ถนอมจิต สุภาวิตา, กานดา ปานทอง และศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย. 2548. ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิม (*Punica granatum*) ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคกลุ่ม Gram-negative bacilli. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 27(ฉบับพิเศษ): 535-544.

ตรีเพชร กาญจนภูมิ. 2552. เคมีของสมุนไพร. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพฯ.

ธนิต เคลียพวงพิทย์. 2536. การศึกษาคุณสมบัติของแทนนินจากพืชเพื่อใช้ในการฟอกหนัง. รายงานการวิจัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

นฤมล มานิพพาน. 2548. การปลูกและขยายพันธุ์มังคุด. ส่งเสริมอาชีพธุรกิจ เพชรกะรัต. กรุงเทพฯ.

นพดล สมผล, วันทนีย์ พลวิเศษ, ไกรจักร แก้วพรม และ ศิริทัศน์ พันธุ์ประสิทธิ์. 2549. ผลของการใช้ผงใบฝรั่ง ผงกระเทียม และสมุนไพรผสมต่อสมรรถภาพการผลิตของแม่ไก่ไข่. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม. มหาสารคาม.

นพ ศักดิเศรษฐ์ และสมพร ณ นคร. 2545. มังคุด. บริษัทรำไทย เพรส จำกัด: กรุงเทพฯ.

นันทวัน บุณยะประภัศร. 2542. สมุนไพรพื้นบ้าน. สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

นวลจันทร์ พารักษา ทวีศักดิ์ ส่งเสริม และสินชัย พารักษา. 2548. คู่มือการวิจัย3: การทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรในสัตว์ปีก และสุกร. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

นิพนธ์ รัตนพล และ มณีรัตน์ รัตนพล. 2545. การใช้ใบฝรั่งป้องกันโรคบิดในเนื้อไก่. สมุนไพร 9(2): 15-23.

นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย จิโรจ ศศิปรียจันทร์ และสมศักดิ์ ภัคภิญโญ. 2538. การทดสอบความไวของเชื้อ อี. โคไลที่แยกได้จากไก่ต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ. เวชสารสัตวแพทย์ 25(4): 275-283.

นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย และ จิโรจ ศศิปรียจันทร์. 2548. ประสิทธิภาพของวัคซีนเบอร์ซาอักเสบติดต่อชนิดเชื้อเป็นสเตรนรุนแรงและสเตรนรุนแรงปานกลางในการป้องกันโรคเบอร์ซาอักเสบติดต่อในไก่กระทง. เวชชสารสัตวแพทย์ 35: 91-96.

นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย. 2551. ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ปีก. สัตว์เศรษฐกิจ 25(581): 47-50.

นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย. 2552. อี. โคไล ปัญหาเก่ากับทางเลือกใหม่. สัตว์เศรษฐกิจ 27(610): 44-46.

นิวัตร จันทร์ศิริพรชัย และ วิษณุ วรรณแสวง. 2552. ระบบภูมิคุ้มกันและการแปรผลซีรัมในสัตว์ปีก. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

บุญมี สัญญสุจจารี, เล็ก อัศวพลังชัย, สมลักษณ์ พวงชมภู, รุงโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช, อนุเทพ รังสีพิพัฒน์, วิจิตร บรรลุนารา, คมกฤช เทียนคำ, สมพร เตชะงามสุวรรณ, สว่าง เกษแดง สกลวุฒิ และ ทัดดาว ไทยวงษ์. 2549. พยาธิวิทยาคลินิกทางสัตวแพทย์. หน่วยพยาธิวิทยา. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ

บังอร คำบัวไหล, สุชน ตั้งทวีวิพัฒน์, บุญล้อม ชีวะอิสระกุล และวีระ วงศ์คำ. 2547. ระดับและชนิดของสมุนไพรที่มีผลต่อการป้องกันโรคบิดไก่. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการเรื่อง สมุนไพรไทยโอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ ครั้งที่ 2. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

เบญญาภา สุรสอน, ภาวดี ภักดี, เยาวมาลย์ ค้าเจริญ และบัณฑิต เต็งเจริญกุล. 2550. ผลของการเสริมผลกล้วยดิบ และใบฝรั่งผงในอาหารต่อสุขภาพ และระบบภูมิคุ้มกันโรคในไก่เนื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

ประสาร เปรมะสกุล. 2551. คู่มือแปลผลตรวจเลือด เล่มหนึ่ง. อรุณการพิมพ์: กรุงเทพฯ.

ประสาร เปรมะสกุล. 2552. คู่มือแปลผลตรวจเลือด เล่มสอง. อรุณการพิมพ์: กรุงเทพฯ.

ปริ่มเฉนียน มุ่งการดี ศศิธร คณะรัตน์ อารมณ์ พงษ์พันธุ์ วิมล ศรีสุข และอ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2545. ฤทธิ์ของสมุนไพรไทยต่อเชื้อ *Campylobacter jejuni* ในไก่. การประชุมวิชาการ: สมุนไพรไทย โอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ 24-25 ตุลาคม 2545. กรุงเทพฯ.

ปรียา ไตรรัตน์ณรงค์. 2552. คัมภีร์แพทย์สมุนไพร ผลไม้ พืชผักสวนครัว. สำนักพิมพ์ one world: กรุงเทพฯ.

พันธิตร์ มะลิสุวรรณ. 2549. การปลูกฝรั่งปลอดสารพิษและวิธีเพิ่มผลผลิตอีกเท่าตัว. สำนักพิมพ์ยูทิไลซ์: นนทบุรี.

พงศ์พิพัฒน์ ปรีชารัตน์. 2545. การประเมินสภาวะภูมิคุ้มกันโรคของไก่ในฟาร์ม. วารสารสาสน์ไก่และการเกษตร 50(5): 23-26.

พิณชอ กรมรัตนาพร, พิเชฏฐ์ เหลืองทองคำ และชัยพร สร้อยคำ. 2551. การใช้ใบฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn.) ในการควบคุมโรคขี้ไหลในลูกโคนม. วารสารวิจัย มข. 13(1): 33-44.

พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2537. สมุนไพรก้าวใหม่. สำนักพิมพ์เมดิคัลมีเดีย: กรุงเทพฯ

เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. 2548. การดูแลสุขภาพแบบพึ่งตนเองด้วยยาสมุนไพรในงานสาธารณะสุขมูลฐาน. ศูนย์พัฒนาตำราการแพทย์แผนไทย มูลนิธิการแพทย์แผนไทยพัฒนา. กรุงเทพฯ.

เมธา วรรณพัฒน์, อรอนงค์ พวงชมพู และ สุจิตรา แก่นภักดี. 2548. คู่มือวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารสัตว์และการวิจัยในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง. ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุด

ยุทธนา ศิริวัธนนุกูล. 2544. การทดสอบของสมุนไพร 5 ชนิด ในการรักษาโรคระบบทางเดินหายใจในสุกร. รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 2 โครงการวิจัยการใช้สมุนไพรในการลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเนื้อสุกรคุณภาพสูง และปลอดยาปฏิชีวนะตกค้าง. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

ยุทธนา ศิริวัธนนุกูล, สุรพล ชลดำรงค์กุล และสมเกียรติ ทองรักษ์. 2545. ผลของการใช้ฟ้าทะลายโจร ใบฝรั่ง ขมิ้นชัน ไพล และเปลือกมังคุด ต่อการรักษาโรคท้องร่วงในลูกสุกร. สมุนไพรไทยโอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมผลิตสัตว์. แสงเทียนการพิมพ์: กรุงเทพฯ.

ยุพิน บุญอำพล. 2538. แทนนินในข้าวฟ่าง. กสิกร 68(6): 520-521.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ. 2523. คู่มือปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, วงศ์สถิต ฉั่วกุล, สมภพ ประธานธุรารักษ์, พร้อมจิต ศรลัมพ์, วิชิต เปานิล และ นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. 2545. สมุนไพรยาที่ควรรู้. ศักดิ์โสภาการพิมพ์: กรุงทพฯ.

รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ. 2540. พืชเครื่องเทศและสมุนไพร. โอ. เอส. พริ้นติงเฮ้าส์: กรุงเทพฯ.

เรืองทอง กิจเจริญปัญญา. 2543. เอกสารประกอบการสอนวิชา 714341 วิทยาแบคทีเรียและวิทยาเห็ดราทางสัตวแพทย์เรื่อง วิทยาแบคทีเรีย. ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

เรืองทอง กิจเจริญปัญญา. 2543. เอกสารประกอบการสอนวิชา 714341 วิทยาแบคทีเรียและวิทยาเห็ดราทางสัตวแพทย์เรื่อง วิทยาแบคทีเรีย. ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

ลักขณา บรรณสาร และบุษกร ทองใบ. 2551. ประสิทธิภาพของสารสกัดใบฝรั่งและกรดแลคติกต่อการยับยั้งซาลโมเนลลาบนผลมะเขือเทศ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 39 (3 พิเศษ): 184-187.

วรรณพร พุทธนา. 2547. ผลของสารสกัดจากใบฝรั่งต่อการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และการเจริญเติบโตของสุกรหย่านม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

วินัย คำนนท์, พงษ์ศักดิ์ แสงทับ และอนุกูล นาชัยดูล. 2547. ผลของเปลือกมังคุดต่อการรักษาโรคท้องร่วงในลูกสุกร. การประชุมวิชาการระดับชาติองค์การเกษตรกรในอนาคตแห่งประเทศไทยครั้งที่ 26 ระหว่างวันที่ 22-26 ธันวาคม 2547. วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีลพบุรี. ลพบุรี.

วัฒนา วิริวุฒิกร. 2539. ความสำคัญของแทนนินที่มีต่ออุตสาหกรรมอาหาร. อาหาร 26(3): 157-167.

วันชัย ไอรารัตน์, วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์ และจินตนา สัตยาศัย. 2543. การศึกษาฤทธิ์ต้านอาการท้องร่วงของน้ำสกัดใบฝรั่งและเปลือกผลทับทิมตากแห้งในสัตว์ทดลอง. ศรีนครินทร์เวชสาร 15(1): 3-11.

วันดี กฤษณพันธ์. 2539. เกร็ดความรู้สมุนไพร. สำนักพิมพ์เมดิคัลมีเดีย: กรุงเทพฯ.

วันดี กฤษณพันธ์. 2541. สมุนไพรน่ารู้ โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง. พิมพ์ครั้งที่ 3 สำนักพิมพ์ประพันธ์สานส์: กรุงเทพฯ.

วิรัตน์ หาญธงชัย, เยาวมาลย์ ค้าเจริญ, บัณฑิต เต็งเจริญกุล และภาวดี ภักดี. 2550. ผลของการเสริมผลกล้วยดิบ และใบฝรั่งผงในอาหารต่อสมรรถนะการผลิตของไก่เนื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

วิศิษย์ เกตปัญญาพงศ์ ยุทธนา ศิริวัธนกูล อรุณพร อิฐรัตน์ และ วันวิศาข์ งามผ่องใส. 2543. ผลของใบฟ้าทะลายโจรและใบฝรั่งต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของลูกสุกรท้องร่วง. รวมบทคัดย่องานวิจัยการแพทย์แผนไทยและทิศทางการวิจัยในอนาคต สถาบันการแพทย์แผนไทย. นนทบุรี.

วีระศักดิ์ เลิศเรืองปัญญาวุฒิ. 2552. อี. โคไล ปัญหาเก่ากับทางเลือกใหม่. สัตว์เศรษฐกิจ 27(610): 46.

ศรีสุดา สุทธิมั่น, เยาวมาลย์ ค้าเจริญ และบัณฑิต เต็งเจริญกุล. 2549. การเสริมพริกป่นและเปลือกมังคุด ป่นในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพซาก และการควบคุมโรคบิดในไก่เนื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร. 2530. ก้าวไปกับสมุนไพร 2. กรุงเทพฯ ธรรมกมลการพิมพ์: กรุงเทพฯ.

สมพร ภูติยานันต์. 2542. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทยว่าด้วยสมุนไพรกับการแพทย์แผนไทย. ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

สมพร ภูติยานันต์. 2546. สมุนไพรใกล้ตัว เล่ม 6 ว่าด้วย สมุนไพรที่เป็นพิษ. ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

สรศักดิ์ เหลี่ยวไชยพันธุ์. 2531. ตำราเภสัชเวท เรื่อง พฤกษแทนนิน. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

สรัสวดี เผือกสกนธ์. 2532. สวนฝรั่ง. ฐานเกษตรกรรม. นนทบุรี.

สาโรช ค้าเจริญ. 2542. อาหารและการให้อาหารสัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน. 2541. ฝรั่ง. สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ.

สุขภาพดีด้วยสมุนไพรใกล้ตัว (9). 2541. โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง. สำนักพิมพ์ประพันธ์สานส์: กรุงเทพฯ.

สุพิศ จินดาวณิค. 2524. ชีวเคมีคลินิค เล่ม 1. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพฯ.

สุธา วัฒนสิทธิ์ ยุทธนา ศิริวัธนนุกูล และ อรุณพร อิฐรัตน์. 2548. ผลของการเสริมฟ้าทะลายโจรและใบฝรั่งต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่กระทง. ว. สงขลานครินทร์ 27(ฉบับพิเศษ 2): 587-596.

เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิต, เมตตา องค์สกุล, ลัดดา นิลรัตน์, ประสิทธิ์ ธราวิจิตรกุล, ศิริพรรณ บุญชู, ธวัชชัย เชื้อประไพศิลป์ และพิเษฐ์ วิริยะจิตรา. 2537. ฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อ *staphylococcus aureus* ที่ดื้อยา methicillin (MRSA) และ *Enterococcus species*. ว. สงขลานครินทร์ 16(4): 399-405.

เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิต, วิวิทย์ ศมศานต์, ยุทธนา ศิริวัธนนุกูล และสุรพล ดำรงค์กุล. 2543. การตรวจหาแบคทีเรียในมูลสุกร และการทดสอบความไวของเชื้อ *E. coli* ต่อยาต้านจุลินทรีย์โดยวิธี disk diffusion. โครงการการใช้ประโยชน์พืชสมุนไพรในการลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเนื้อสุกรคุณภาพสูงและปลอดยาปฏิชีวนะตกค้าง. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

โสมทัต วงศ์สว่าง. 2538. วิทยาศาสตร์ภูมิคุ้มกันทางสัตวแพทย์. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

อรวรรณ์ เพิ่มพิพัฒน์. 2551. การเสริมสมุนไพรผสมพริกป่น เปลือกมังคุดป่น และผลกล้วยดิบผงในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต คุณภาพซาก และการควบคุมโรคบิดในไก่เนื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

อารินี ชัชวาลชลธีระ, จินดา หวังบุญสกุล, กมลชัย ตรงวานิชนาม, อรุณี บุตรตาสี, ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, มัณฑนา ศรียามาตย์, น้ำผึ้ง นามปากดี และวรางครัตน์ เลาหวัฒน์. 2551. ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากใบฝรั่งและสารสกัดจากกระเทียมต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophilla*. และ *Streptococcus* spp. ที่แยกได้จากปลาป่วย. ว. สัตวแพทย์ มข. 18(1): 47-53.

อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, ประภัสสร รักถาวร, สิริพร ศิริวรรณ และพจมาน พิศเพียงจันทร์. 2552. การสกัดและการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

เอมมนัส อัตตวิชญ์, ปราณี ชวลิตธำรง, พัช รักษามั่น และปราณี จันทเพ็ชร. 2538. การศึกษาพิษของใบฝรั่ง. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 37(4): 289-305.

Ajay M., F.I. Achike, A.M. Mustafa and M.R. Mustafa. 2006. Direct effect of quercetin on impaired reactivity of spontanncously hypertensive of rat Aortae: comparative study with ascorbic acid. Clin. Exp. Pharnacal. Physiol. 33: 345-350.

Altan, O., D. Altan, M. Cabuk and H. Bayraktar. 2000. Effects of heat stress on some blood parameters in broiler. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 24: 145-148.

Asai, F., H. Tosa, T. Tanaka and M. Iinuma. 1995. A xanthone from pericarps of *Garcinia mangostana*. Phytochemistry 39(4): 943-944.

Brown, B.A. 1984. Hematology, 4th ed. Lea & Febiger: Philadelphia. USA.

Coles, B.H. 1997. Avian Medicine and Surgery. 2nd ed. Blackwell Science, Inc: USA.

Chung, K.T., Z. Lu and M.W. Chou. 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. Food and Chemical Toxicology 36: 1053-1060.

Di Carlo G., N. Mascolo, A.A. Izzo, F. Capasso. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci. 65: 337-353.

Escrig, A.J., M. Rincon, R. Pulido and F.S. Calixto. 2001. Guava fruit (*Psidium guajava* Linn.) as a new source of antioxidant dietary fibre. J. Agric. Food Chem. 49: 5489-5493.

Fan, C. and J. Su. 1998. Antioxidative mechanism of isolated components from methnol extract of fruit hull of Garcinia mangostana. Chemical Abstract 128(5): 513.

Gatto, M.T., S. Falcocchio, E. Grippa, G. Mazzanti, L. Battinelli, G. Nicolosi, D. Lambusta and L. Saso. 2002. Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-Acyl-Esters. Bioorganic and Medical Chemistry 10: 269 - 272.

Gross, W.B. and H.S. Siegel. 1983. Evaluation of the heterophill/lymphocyte ratio as a measure of stress in chicken. Avian. Disease. 27: 972-979.

Gustavson, K.H. 1965. The chemistry of tannin process. Academic Press Inc, Publishers. New York.

Habbu, P.V., K.M. Mahadevan, R.A. Shastry and H. Manjunatha. 2009. Antimicrobial activity of flavanoid sulphates and other fraction of *Argyrcia specious* (Burm.f) Boj. Indian Journal of Experimental Biology 47: 121-128.

Hagerman, A.E. 2002. Tannin Handbook; Tannin Chemistry. Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University. Miami.

Harrison, G.J. and L.R. Harrison. 1986. Clinical avian medicine and surgery. W.B.Saunders Company. The Curtis Center. Independence Square West. Philadephia, PA.

Hayes, A.W. 1994. Principles and methods of toxicology. 3rd ed. Raven Press: New York.

Hong, W.L., G.X. QU, X.S. YAO. 2002. A New Furostanol Saponin from *Dioscorea futshauensis*. Chinese Chemical Letters. 13 (3): 241-244.

Jagadish, L.K., V.V. Krishnan, R. Shenbhagaraman and V. Kaviyarasan. 2009. Comparitive study on the antioxidant, anticancer and antimicrobial property of *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach before and after boiling. African Journal of Biotechnology. 8 (4): 654-661.

Jaiarj, P., P. Khoohaswan, Y. Wongkrajang, P. Peungvicha, P. Suriyawong, M.L. Saraya and O. Ruangsomboon. 1999. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. Journal of Ethnopharmacology. 67: 203-212.

Khajavi, M., S. Rahimi, Z.M. Hassan, M.A. Kamali and T. Mousari. 2003. Effect of feed restriction early in life on humoral and cellular of two commercial broiler strains under heat stress condition. Br. Poultry Science. 44: 490-497.

Kumar, A., N. Jindal, C.L. Shukla, Y. Pal, D. R. Ledoux and G.E. Rottinghaus. 2003. Effect of ochratoxin A on *Escherichia coli*-challenged broiler chicks. Avian Disease. 47(2): 415-424.

Lakhanpal, P. and D.K. Rai. 2007. Quercetin: A Versatile Flavonoid. Internet Journal of Medical Update. 2 (2): 22-37.

Lamson, D.W. and M.S. Brignall. 2000. Antioxidants and Cancer III: Quercetin. Alternative Medicine Review. 5 (3): 196-208.

Lin, J., T. Puckree and T.P. Mvelase. 2002. Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. Journal of Ethnopharmacology. 79 (1): 53-56.

Lozota, X., M. Meckes, M. Abou-Zaid, J. Tortoriello, C. Nozzolillo and J.T. Amason. 1994. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* Linn. leaves and determination of spasmolytic principle. Archive of Medical Research. 25: 11-15.

Lutterodt, G.D. 1989. Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as a possible mode of action of Psidium guajava leaf extracts in the treatment of acute diarrhoeal disease. Journal of Ethnopharmacology. 25 (3): 235-247.

McFarlane. J.M. and S.E. Curtis. 1987. Multriple concurrent stressorsin chicks. Effect on plasma corticosterone and the heterophil: lymphocyte ratio. Poultry Science. 68: 522-527.

Pongsakorn, S., S. Pongsakorn and W. Settheetham. 1992. The antisecretory activity of mangosteen peel in rat jejunum in vitro. Royal Thai Army Medical Journal. 45(1): 25-28.

Post, J., J.M.J. Rebel and A.A.H.M. ter Huurne. 2003. Physiogical effects elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative mean by which to assess the Physiogical effects of stress. Poultry Science. 82: 1313-1318.

Rauha, J.P., S. Remes, M. Heinonen, A. Hopia, M. Kahkonen, T. Kujala, K. Pihlaja, H. Vuorela and P. Vuorela. 2000. Antimicrobail effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. International Journal of Food. 56: 3-12.

SAS, Institute. 1988. SAS/STAT User's guide. SAS Institute Inc. NC., USA.

Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry 30: 1875-3883.

Simmons, J.D., B.D. Lott and J.D. may. 1997. Heay loss from broiler chickens subject to various wind speeds and ambient temperatures. Applied Engineering in Agriculture. 13: 665-669.

Tachakittirungrod S., S. Okonogi and S. Chowwanapoonpohn. 2007. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. Food Chemistry. 103: 381-388.

Van Acker S.A., D.J. van den Berg, M.N. Tromp, D.H. Griffioen, W.P. van Bennekom, W.J. van der Vijgh amd A. Bast. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radical Biology & Medicine. 20: 331-42.

Vieira, R.H., D.P. Rodrigues, F.A. Goncalves, F.G. Menezes, J.S. Aragao and O.V. Sousa. 2001. Microbicidal effect of medicinal plants extracts (*Psidium guajava* Linn.) and *Carioca papaya* Linn. Upon bacteria isolated from fish muscles and know to induce diarrhea in children. Revita Do Institutor De Medicinal Tropical De Sao Paulo. 43: 145-148.

Wikipedia. 2009. *Escherichia coli.* [online] (cited 2009 November 12). Available from: http://th.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli.

Yohikawa, M., E. Harada., A. Miki., K. Tsukamoto., S.Q. Ljng., J.Yamahara and N. Marakaami. 1994. Antioxidant constituents from the fruit hulls of mangosteen origination. Vietnam Yakugara Zasshi. 1142: 129-133.

ภาคผนวก

วิธีวิเคราะห์แทนนินในใบฝรั่งและเปลือกมังคุด

สารเคมี

1. methanol
2. HCL 8%
3. vanillin 4%
4. Catechin

อุปกรณ์

1. เครื่อง Spectrophotometer
2. หลอดทดลอง (test tube)
3. flask ขนาด 125 มล.

สารละลายมาตรฐาน (standard solution)

1. เตรียม catechin solution โดยละลาย catechin 100 mg ใน methanol 50 ml ดังนั้น ใน 1 ml ของสารละลายจะมี catechin เท่ากับ 2 mg

2. การเตรียม standard curve โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายมาตรฐาน ตามจำนวนในตาราง ภาคผนวกที่ 1 นี้มาใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย vanillin-HCl อยู่ 5 ml. แล้วเติม methanol ให้มีปริมาตรสุดท้าย 10 ml.

3. นำไปวัด optical density ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ wave length 500 นาโนเมตร

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างใบฝรั่งหรือเปลือกมังคุดผงจำนวน 1 g ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 ml
2. เติมด้วย methanol 50 ml ปิดจุกแล้วเขย่า ทิ้งไว้ประมาณ 20-24 ชั่วโมง นำออกมาเขย่าอีกครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน
3. ดูดสารละลายส่วนที่ใสจากข้อ 2 ปริมาณ 1 ml เติม methanol 4 ml และ vanillin-HCl 5 ml เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร
4. Standard curve โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายมาตรฐานมา 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 ml เติม vanillin-HCl 5 ml เติม methanol ปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 10 ml นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 500 นาโนเมตร
5. เปรียบเทียบความเข้มข้นของแทนนินในตัวอย่างกับ standard curve

ตารางภาคผนวกที่ 1 ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ใช้เตรียมกราฟมาตรฐานแทนนิน

Cathechin standard solution (ml.)	vanillin-HCl (ml.)	Methanol (ml.)	Cathechin (ml.)
0	5	5.0	0
0.5	5	4.5	100
1.0	5	4.0	200
1.5	5	3.5	300
2.0	5	3.0	400
2.5	5	2.5	500
3.0	5	2.0	600
3.5	5	1.5	700
4.0	5	1.0	800

ที่มา: เยาวมาลย์ (2523)

คำนวณผล

เปอร์เซ็นต์แทนนิน = $\frac{\text{ความเข้มข้นของแทนนิน (มิลลิกรัม) x 5}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$

การสกัดแทนนินหยาบ (crude tannins) และซาโปนินหยาบ (crude saponin)

สารเคมี

1. 80% methanol
2. diethyl ether
3. butanal

อุปกรณ์

1. flask ขนาด 250 ml.
2. microwave
3. vacuum pump
4. volumetric flask
5. rotary vacuum evaporator (เครื่องระเหยสุญญากาศ)
6. separatory funnel
7. tarred round bottom flask (ขวดก้นกลม)
8. hot air oven
9. desiccators

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบและบดแล้วจำนวน 5 กรัมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล.

2. เติมเมทานอล 80% จำนวน 50 มล.

3. นำสารละลายกรองผ่านกระดาษกรอง 2 ชั้น โดยใช้เครื่องดูดสูญญากาศ ช่วยในการดูด

4. เก็บสารละลายที่กรองแล้วไว้ในขวดวัดปริมาตร ส่วนตะกอนที่เหลือนำกลับเข้าในไมโครเวฟตามขั้นตอนที่ 4 อีก 2 ถึง 3 ซ้ำ

5. นำสารละลายที่กรองทั้งหมด ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยเมทานอล 80% จนได้ 250 มล.

6. นำสารละลายไปทำการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ตะกอนที่ได้นำไปละลายในน้ำกลั่นจำนวน 50 มล.

7. นำมาผสมด้วยไดเอทิล อีเทอร์ จำนวน 50 มล. เพื่อแยกไขมันออกไปในชั้นอีเทอร์ โดยใช้กรวยแยก ทำตามขั้นตอนนี้ทั้งหมด 2 ครั้ง

8. นำชั้นที่เป็นน้ำ (aqueous) ที่แยกได้ไปผสมกับอีทิลอะซีเตรท (ethyl acetate) ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ จำนวน 50 มล. เพื่อแยกแทนนินนินออกมาในชั้นอีทิลอะซีเตรท ทำตามขั้นตอนนี้ทั้งหมด 4 ครั้ง

9. นำชั้นอีทิลอะซีเตรทที่แยกได้ไปล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 30 มล. เพื่อทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นทำตามขั้นตอนนี้ทั้งหมด 4 ครั้ง

10. ถ่ายสารละลายอีทิลอะซีเตรทลงในขวดก้นกลมที่อบแห้งและทราบน้ำหนัก เพื่อนำไประเหยโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

11. เมื่อระเหยเสร็จแล้วนำขวด ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณแทนนินหยาบ

การคำนวณปริมาณแทนนิน

แทนนิน (ก.) = (น้ำหนักขวด + น้ำหนักที่ได้จากการระเหยแล้วนำไปอบ) – น้ำหนักขวด

$$\% \text{ แทนนิน} = \frac{\text{แทนนิน (ก)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

วิธีการสกัดซาโปนินหยาบดำเนินตามขั้นตอนการสกัดแทนนินหยาบ แต่แปลี่ยนสารจาก อีทิลอะซีเตรทเป็นบิวทานอล (butanal)

การวัดปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed cell volume, PCV)

อุปกรณ์

1. capillary tube ยาว 75 mm.
2. ดินน้ำมัน
3. เครื่อง Hematocrit centrifuge
4. จานอ่านค่า reading device

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

วิธีการ

1. ใช้หลอดแก้วแคพพิลลารี (capillary tube) ความยาว 75 mm. และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอด 1 mm. (อาจใช้หลอดแก้วแคพพิลลารีที่ไม่มีเฮปารินเครือบอยู่ก็ได้) ดูดเลือดที่ต้องการวิเคราะห์ โดยเอียงหลอดเล็กน้อยเลือดจะไหลเข้าในหลอดแก้วเอง ให้ได้เลือดประมาณ ¾ ของหลอด

2. ปิดปลายหลอดด้านหนึ่งด้วยดินน้ำมัน

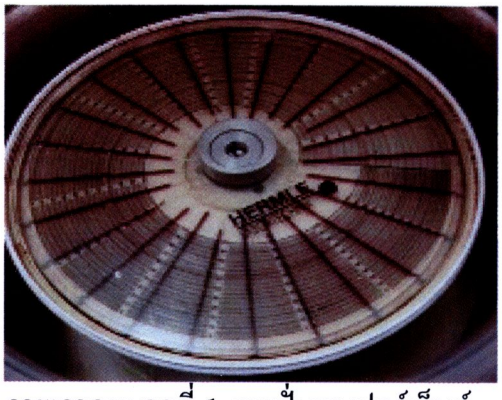
3. นำไปปั่นโดยใช้เครื่อง Hematocrit centrifuge ด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-5 นาที

4. อ่านค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นบนจานอ่านค่า (reading device) ค่าที่ได้มีค่าเป็นเปอร์เซนต์ การอ่านค่าให้พิจารณาเฉพาะชั้นเซลล์สีแดงเท่านั้น ไม่รวมชั้นเซลล์สีเทาขาว (buffy code) ซึ่งเป็นชั้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด และชั้นบนสุดซึ่งเป็นสีใส เรียกว่าชั้นพลาสมา (plasma layer)

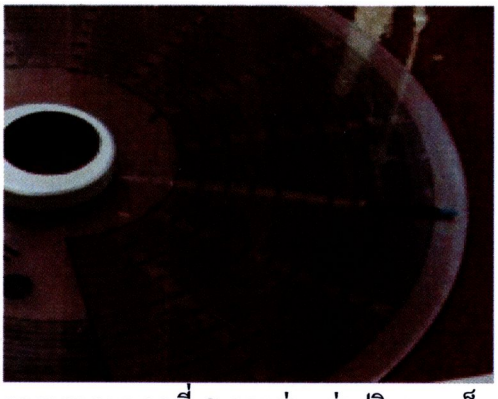
การคำนวณ

การคำนวณค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นสามารถคำนวณได้จากตัวเลขที่อ่าน

$$\text{ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (\%)} = \frac{\text{ความสูงของชั้นเม็ดเลือดแดง (มิลลิเมตร)} \times 100}{\text{ความสูงของเลือดทั้งหมด}}$$



ภาพภาคผนวกที่ 1 การปั่นหาเปอร์เซ็นต์ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น



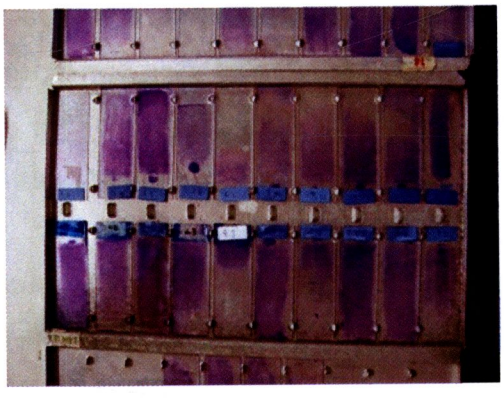
ภาพภาคผนวกที่ 2 การอ่านค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

การตรวจหาสัดส่วนของเม็ดเลือดขาวชนิดเฮทเทอร์โรฟิลต่อลิมโฟไซต์ (H/L ratio)

วิธีการ

1. นำตัวอย่างเลือดมาทำการเสมียร์เลือดบนสไลด์แล้วตากให้แห้งในอากาศ (air dry)
2. วางสไลด์ลงบนแท่งแก้วสำหรับย้อมในถาดย้อมโดยให้ด้านที่มีเลือดหงายขึ้น
3. หยดสี Wright-geimsa ลงไปให้ท่วม ทิ้งไว้ประมาณ 6 นาที ระวังอย่าให้สีแห้ง
4. หยด buffer pH 7 ปริมาณเท่ากับสีลงบนสไลด์ โดยไม่ให้สีหยดออกจากสไลด์ ใช้ลูกยางเป่าเบา ๆ ให้สีและ buffer เข้ากันได้ด้วยดี สังเกตถ้าสัดส่วน buffer กับสีถูกต้อง จะเกิดลักษณะ metallic sheen บนสไลด์ อย่าเป่าแรงจนสีออกนอกสไลด์ ทิ้งไว้ประมาณ 8 นาที
5. ล้างด้วยน้ำโดยใช้น้ำเทไล่สีบนสไลด์เพื่อไม่ให้เกิดตะกอนสี เช็ดด้านหลังสไลด์ให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง
6. นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุ 100X ทำการนับจำแนกเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดออกเป็นร้อยละ (ต่อ 100 เซลล์) ซึ่งประกอบด้วย เฮทเทอโรฟิล ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ เบโซฟิล อีโอสิโนฟิล
7. ค่าสัดส่วนของเม็ดเลือดขาวชนิด เฮทเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ (H/L ratio) สามารถหาได้โดย

$$\text{H/L ratio} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดเฮทเทอโรฟิล}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์}}$$



ภาพภาคผนวกที่ 3 การย้อมสี Wright-geimsa

ภาพภาคผนวกที่ 4 การส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (100X)

การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (total white blood cell count or eucocyte count)

การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดในตัวอย่างเลือด ทำได้โดยการเจือจางตัวอย่างเลือดด้วยน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาว ที่มีคุณสมบัติทำลายเม็ดเลือดแดง แต่มีคุณสมบัติในการรักษาสภาพเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ดี

อุปกรณ์

1. ไปเปตสำหรับเจือจางเม็ดเลือดขาว
2. แผ่นแก้วนับเซลล์เม็ดเลือด (hemocytometer counting chamber) และแผ่นกระจกปิดทับ (cover glass)
3. กล้องจุลทรรศน์
4. น้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาว

น้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาว Turk's solution มีส่วนประกอบดังนี้

1. glacial acetic acid (CH3COOH)	3.0 มล.
2. 1% (w/v) aqueous gentian violet	1.0 มล.
เติมน้ำกลั่นจนครบ	100 มล.

วิธีการ

1. เตรียมแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดให้พร้อมต่อการใช้
2. ใช้ไปเปตสำหรับเจือจางเม็ดเลือดขาว ดูดตัวอย่างเลือดที่จะนำมาวิเคราะห์ ให้ถึงขีด 0.5 เช็ดปลายไปเปตและรอบนอกไปเปตให้สะอาด
3. จากนั้นใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ สังเกตว่าบริเวณที่ใช้นับเม็ดเลือดมีการกระจายตัวของเซลล์ดีหรือไม่ ถ้าไม่ดีต้องทำใหม่
4. เปลี่ยนกำลังขายเป็น 40X แล้วนับเม็ดเลือดในช่อง W เป็นช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสทั้ง 4 มุม มีพื้นที่ช่องละ 1 ตารางมิลลิเมตร
5. การนับเซลล์เม็ดเลือดให้นับเซลล์ที่อยู่ในช่อง หากมีเซลล์ที่ทับอยู่บนเส้นแบ่งให้นับเฉพาะเซลล์ที่ทับอยู่บนเส้นด้านบนและด้านซ้ายของแต่ละช่องเท่านั้น เพื่อป้องกันการนับซ้ำ
6. นำจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้ของแต่ละช่องมารวมกัน และคำนวณกลับเป็นจำนวนเซลล์ทั้งหมดต่อปริมาณเม็ดเลือดแดง 1 มิลลิลิตร (เนื่องจากแผ่นแก้วนับเลือดมีทั้งหมด 2 ฝั่ง ดังนั้นให้นับเหมือนกันทั้ง 2 ฝั่ง และหาค่าเฉลี่ยเป็นจำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ที่จะใช้ในการคำนวณต่อไป)

วิธีการคำนวณ: สมมติให้การนับจำนวนเม็ดเลือดแต่ละช่องเป็นดังนี้

ในฝั่งด้านบน

ช่องที่ 1 นับได้ 25 เซลล์	ช่องที่ 2 นับได้ 29 เซลล์
ช่องที่ 3 นับได้ 31 เซลล์	ช่องที่ 4 นับได้ 28 เซลล์

รวมจำนวนเซลล์ที่นับได้ทั้งหมด 113 เซลล์

ในฝั่งด้านล่าง

ช่องที่ 1 นับได้ 30 เซลล์ ช่องที่ 2 นับได้ 28 เซลล์

ช่องที่ 3 นับได้ 24 เซลล์ ช่องที่ 4 นับได้ 29 เซลล์

รวมจำนวนเซลล์ที่นับได้ทั้งหมด 111 เซลล์

ค่าเฉลี่ยของจำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้คือ (113+111) /2 = 112 เซลล์

การคำนวณ

1. คำนวณค่าของตัวคูณปรับการเจือจาง (dilution correction factor)

การเจือจางเม็ดเลือดขาว ใช้ตัวอย่างเลือด 0.5 ส่วน และใช้น้ำยาเจือจางเม็ดเลือด 10 ส่วน ดังนั้นเลือดจึงถูกเจือจางในอัตราส่วน 0.5: 10 หรือ 1: 20 ดังนั้น dilution correction factor = 20

2. คำนวณค่าตัวคูณปรับปริมาตร (volume correction factor)

ช่องที่นับเม็ดเลือดขาวแต่ละช่องมีความกว้าง 1 มม. ยาว 1 มม. ลึก 0.1 มม. ดังนั้น 1 ช่อง มีปริมาตรเท่ากับ 1 x 1 x 0.1 = 0.1 ลบ.มม. นับทั้งหมดจำนวน 4 ช่อง 0.1 x 4 = 0.4 ลบ.มม.

volume correction factor = ปริมาตรที่ต้องการ/ ปริมาตรที่นับจริง

= 1 ลบ.มม./0.4 ลบ.มม.

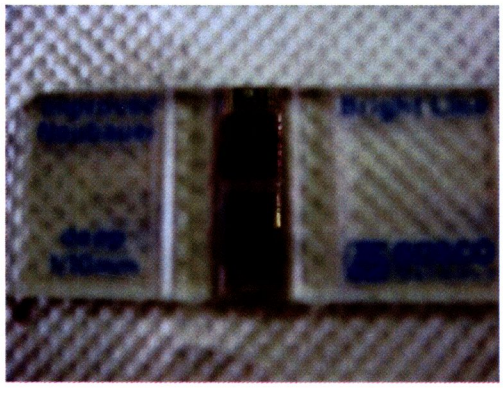
= 2.5

3. คำนวณหาจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวใน 1 ลบ.มม.

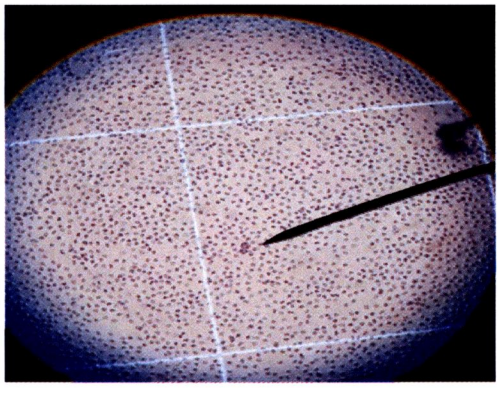
จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวใน 1 ลบ.มม.= จำนวนเซลล์ที่นับได้ x Dilution correction Factor x Volume correction factor

= 112 x 2.5 x 20

= 5,600 เซลล์/ลบ.มม.



ภาพภาคผนวกที่ 5 การหยดตัวอย่างลง hemocytometer

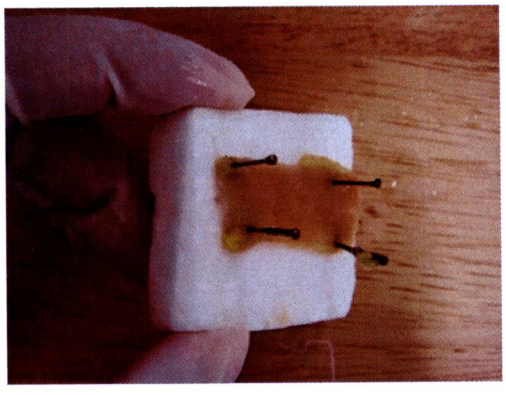


ภาพภาคผนวกที่ 6 ลักษณะเม็ดเลือดบน hemocytometer

การศึกษาความสูงของวิลไลของลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม

การเก็บตัวอย่างและการรักษาสภาพเนื้อเยื่อหลังการผ่าชาก

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อลำไส้เล็กโดยเก็บจากเนื้อเยื่อส่วนเจจูนัม (jejunum) ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร หรือตัดบริเวณส่วนเหนือส่วนถุงไข่แดง (meckel' s diverticulum) ประมาณ 10 เซนติเมตร ตัดส่วนลำไส้เล็กให้กางออก แล้วใช้เข็มหมุดตรึงลำไส้ให้แผ่ลงแผ่นโฟม โดยให้ด้านที่มีวิลไลหงายขึ้น นำไปคว่ำลงในขวดพลาสติกที่ 10% buffered neutral formalin เพื่อรักษาสภาพต่าง ๆ ภายในเซลล์ให้เหมือนกับสภาพที่มีชีวิตอยู่ และทำให้เนื้อเยื่อมีความแข็งสามารถตัดเป็นชิ้นบาง ๆ ได้ง่าย



ภาพภาคผนวกที่ 7 การตรึงลำไส้ลงแผ่นโฟม

ภาพภาคผนวกที่ 8 การแช่ในขวดที่มี 10% buffered neutral formalin

การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

เครื่องมือ

1. เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor)
2. เครื่องหยดพาราฟิน (dispenser)
3. ไมโตโคม (rotary microtome)
4. ตู้เย็น (refrigerator)
5. ตู้ดูดควัน (hood)
6. เครื่องชั่งสารเคมี
7. ตู้อบ (oven)
8. เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer)
9. อ่างน้ำ (water bath)
10. เครื่องกวนสารเคมีอัตโนมัติ (magnetic stirrer)
11. แผ่นร้อน (hotplate)
12. เครื่องวัด pH

13. กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope)

อุปกรณ์

1. ขวดดองชิ้นส่วนสัตว์ทดลอง
2. ชุดเครื่องมือผ่าตัด
3. กระบอกตวง (cylinder)
4. staining box, staining jar
5. beaker
6. flask
7. ตลับใส่เนื้อเยื่อ (cassette)
8. กระทงโลหะ (mold)
9. embedding ring
10. ใบมีดตัด microtome
11. กรวยแก้วหรือพลาสติก
12. กระดาษกรอง
13. ผ้าก๊อต
14. slide แก้วขอบฝ้า
15. ดินสอ
16. cover slip
17. กล่องใส่สไลด์

วิธีการ

1. การล้างสารละลายออกจากเนื้อเยื่อ

ล้างน้ำยา fixative (10% buffered neutral formalin) ออก แล้วใส่ในบีกเกอร์นำไปวางไว้ใต้ก๊อกน้ำ ให้เปิดน้ำประปาไหลผ่าน (running water) ขึ้นอยู่กับว่าแช่ฟอร์มาลีนนานเพียงใด ถ้าแช่นาน 12 ชั่วโมงให้ล้างนาน 10 นาที ดั้งนั้นถ้าแช่นาน 24 ชั่วโมง ควรล้างนาน 30 นาที ถึง 1 ชั่งโมง จนกระทั่งแน่ใจว่าออกดีแล้ว

2. การเตรียมเนื้อเยื่อ

2.1 การขจัดน้ำออกจากเซลล์เนื้อเยื่อ

ในการขจัดน้ำออกจากเซลล์นั้นต้องดึงออกทีละน้อยเพื่อไม่ให้เซลล์เสียรูปร่างมากเกินไป สารเคมีที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) คือ ethanol โดยเริ่มจาก ethanol ที่มีความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอลกอฮอร์ที่ใช้ในการดึงน้ำออกนั้น จะเท่ากับความเข้มข้นของแอลกอฮอร์ที่ใช้ล้างน้ำยาดองออกจากเนื้อเยื่อ ถ้าเนื้อเยื่อมีขนาดใหญ่อาจใช้ความแตกต่างได้ถึง 30-40% ถ้าเนื้อเยื่อมีขนาดเล็กบอบบาง ความแตกต่าง

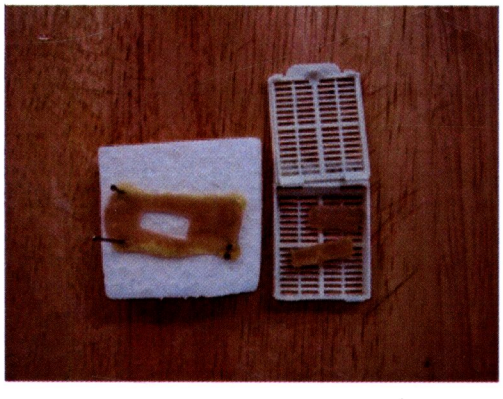
ของความเข้มข้นไม่ควรเกิน 15-20% เช่น 70% ethanol, 80% ethanol, 95% ethanol และ absolute ethanol ตามลำดับ

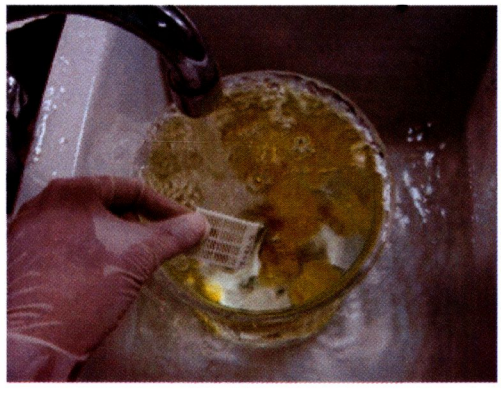
2.2 การขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing or dealcoholization)

เป็นการล้างแอลกอฮอล์ออกจากเนื้อเยื่อและทำให้เนื้อเยื่อมีลักษณะใส โดยการแทนที่ด้วย xylene ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกลางนำพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อได้ ถ้าขั้นตอนดึงน้ำออกไม่ดีจะทำให้ xylene ขุ่น ต้องย้อนกลับมาลง absolute alcohol ใหม่เพื่อไล่น้ำออกอย่างสมบูรณ์แล้วจึงนำกลับมาลง xylene ที่เปลี่ยนใหม่ 2 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าดึงน้ำออกอย่างสมบูรณ์

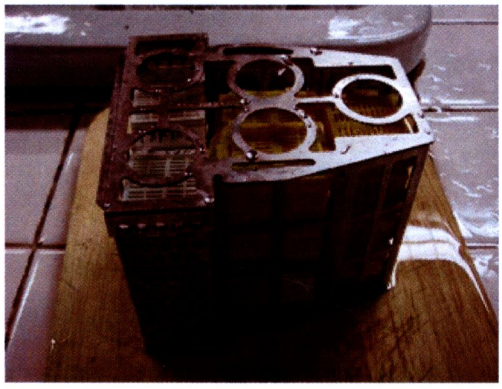
2.3 การแทรกซึมเนื้อเยื่อด้วยสารตัวกลาง (infiltration)

เป็นการทำให้พาราฟินที่หลอมเหลวแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อและเซลล์ เพื่อเป็นการเสริมโครงสร้างและองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเนื้อเยื่อให้แข็งแรงเท่าเทียมกันและสม่ำเสมอกันโดยตลอด สารเคมีที่ใช้คือ paraffin wax ต่อมามีการพัฒนาโดยการเติมพลาสติกเข้าไปในพาราฟินเรียกว่า พาราพลาส (paraplast) ที่มีจุดหลอมเหลวที่ 56-60 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการฝังเนื้อเยื่อที่แข็งและต้องการตัดบาง 5-7 ไมครอน และใช้พาราพลาสที่มีจุดหลอมเหลว 60-68 องศาเซลเซียส ใช้เมื่อต้องการตัดเนื้อเยื่อให้บางกว่า 5 ไมครอนตั้งแต่ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ การขจัดแอลกอฮอล์ออกทำให้เนื้อเยื่อใสจนถึงการแทรกซึมของพาราฟิน สามารถทำได้โดยเครื่องอัตโนมัติ เครื่องมือนี้จะทำงานโดยนำชิ้นเนื้อผ่านสารละลายไปตามลำดับขั้นและยังช่วยทำให้สารละลายซึมผ่านชิ้นเนื้อได้ดีขึ้น เพราะมีระบบกลไกที่ทำให้ตะกร้านี้หมุนผ่านสารละลายตามระยะเวลาที่กำหนด นอกจากนี้ยังมีระบบสุญญากาศที่ช่วยให้พาราฟินซึมผ่านชิ้นเนื้อได้เร็วยิ่งขึ้น





ภาพภาคผนวกที่ 9 การตัดลำไส้ใส่ตลับใส่เนื้อเยื่อ ภาพภาคผนวกที่ 10 การล้างน้ำยา fixative 10% buffered neutral formalin



ภาพภาคผนวกที่ 11 นำตลับเนื้อเยื่อใส่กระทงโลหะ

ภาพภาคผนวกที่ 12 การเตรียมเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง automatic tissue processing

ตารางภาคผนวกที่ 2 ขั้นตอนและการเตรียมตัวอย่างโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ (automatic tissue processing)

Step	สารละลาย	เวลาที่ใช้ (ชั่งโมง)	ขบวนการ
1	70% ethanol	3	Dehydration
2	80% ethanol	1.30	Dehydration
3	95% ethanol	1.30	Dehydration
4	95% ethanol	1.30	Dehydration
5	Absolute ethanol	1.30	Dehydration
6	Absolute ethanol	1.30	Dehydration
7	Absolute ethanol	1.30	Dehydration
8	Xyline I	1	Clearing
9	Xyline II	1.30	Clearing
10	Xyline III	1.30	Clearing
11	Paraffin I	3	Infiltration
12	Paraffin II	3	Infiltration

หมายเหตุ: เวลาที่ใช้สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสม

3. การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding)

เป็นการนำตัวอย่างที่ผ่านการแทรกซึมเนื้อเยื่อ แล้วนำไปฝัง (embed) ในพาราฟินเหลววิธีการฝังทำได้โดยใช้เครื่องหยอดพาราฟิน (dispender) ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนที่ร้อนมีที่ทำให้พาราฟินหลอมเหลวและสำหรับวางในการเตรียมตัวอย่าง อีกส่วนทำความเย็นเพื่อให้พาราฟินแข็งตัว

การฝังหยอดพาราฟินเหลวลงในกระทงโละ (mould) ใส่เนื้อเยื่อลงไป ไล่ฟองอากาศ โดยใช้ปากคีมเขี่ยวนในกระทงโละที่มีพาราฟินเหลวอยู่และเขี่ยที่เนื้อเยื่อ กดที่เนื้อเยื่อเบา ๆ เป็นการไล่ฟองอากาศ ถ้ามีฟองอากาศจะเห็นฟองอากาศลอยผุดขึ้นมาแล้วหายไป และจัดให้เนื้อเยื่ออยู่ตรงกลางกระทงโละให้เอาด้านผิวหน้าเรียบหรือด้านที่ต้องการตัดไว้ด้านล่าง แล้วนำไปวางในพื้นที่ที่ทำความเย็น วางกรอบพลาสติก (embedding ring) บนกระทงโลหะพอติดกันดีแล้ว เติมพาราฟินเหลวให้ท่วมตัวอย่าง แล้วทำให้พาราฟินรอบ ๆ เนื้อเยื่อมีอุณหภูมิลดลง โดยวางบนส่วนทำความเย็นหรือถาดน้ำแข็งทิ้งไว้ให้แข็ง และแคะออกจากกระทงโลหะนำไปแช่ในตู้เย็นให้บล็อกเย็นก่อนแล้วตัดด้วยเครื่องไมโครโตมต่อไป

4. การตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตม (rotary microtome)

เป็นการตัดเนื้อเยื่อที่อยู่ในพาราฟินแข็ง paraffin block) ให้บาง 4-5 ไมครอน ด้วยเครื่องไมโครโตม โดยนำ parpffin block มาตัด (trimming) พาราฟินส่วนที่เกินออก ตัดให้ห่างจากเนื้อเยื่อเล็กน้อย ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู สี่เหลี่ยมจัตุรัส หรือสี่เหลี่ยมผืนผ้า โดยให้ด้านบนและด้านล่างขนานกัน เพื่อการเกิดแถบ (ribbon) ของ section ยึดบล็อกเข้ากับที่ยึดตัวอย่างโดยให้หน้าบล็อกขนานกับใบมีด การปรับมุมระหว่างใบมีดกับบล็อก (0, 5 และ 10 องศา) ส่วนใหญ่จะใช้ 5 องศา ให้ตัดผิวหน้าบล็อกออกจนเห็นตัวอย่างเนื้อเยื่อครบ เรียกว่า ribbon

5. การติดเนื้อเยื่อกับแผ่นสไลด์

นำ section ที่ได้มาลอยในอ่างน้ำอุ่น (water bath) ที่ใส่ gelatin ประมาณ 0.5% ในน้ำกลั่น อุณหภูมิ 43-45 องศาเซลเซียส เทคนิคในการลอยที่ช่วยให้สไลด์ยึดไม่ย่นคือลอย section ใน 30% ethanol บนแผ่นแก้วหรือพลาสติกข้างนอกก่อนแล้วนำไปลอยในอ่างน้ำ ใช้สไลด์ตัก section ให้ติดตรงกลางสไลด์แก้ว เขียนชื่อเนื้อเยื่อที่ขอบฝ้าของสไลด์ด้วยดินสอ

6. การอบสไลด์

แผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อติดอยู่ต้องทำให้แห้งสนิท เพราะถ้าแห้งไม่สนิทจะทำให้เนื้อเยื่อหลุดออกจากสไลด์ในการย้อมสี ดั้งนั้นต้องทำให้สไลด์แห้งสนิทก่อนนำไปย้อม โดยวางลงในเครื่องสำหรับอุ่นสไลด์ (slide warmer) ตลอดทั้งคืนหรืออบในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 56-66 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที แล้วทำให้เย็นก่อนนำไปย้อมสี ถ้าไม่เย็นแล้วนำไปย้อมสีจะทำให้เนื้อเยื่อหลุดได้

7. การย้อมสีเนื้อเยื่อ

ขั้นตอนการย้อมสี heamatoxylin & eosin staining

1. deparafinnization ใน xyline 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที
2. hydration ดึงน้ำเข้าเซลล์และล้าง xyline โดยจุ่มใน absolute alcohol
3. 95% ethanol, 80% ethanol และน้ำประปาที่ไหลอยู่ตลอดเวลา ตามลำดับอย่างละ 1 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที

4. ย้อมด้วยสี heamatoxylin 6 นาที
5. ล้างด้วยน้ำประปาไหลตลอดเวลา นาน 2 นาที จะทำให้สีติดดีขึ้น
6. ล้างสีส่วนเกิน (differentiae) ด้วย 1% acid alcohol โดยจุ่มขึ้นลงอย่างเร็ว 2-3 ครั้ง ถ้าเนื้อเยื่อติดสีไม่เข้ม จุ่ม 1 ครั้ง สังเกตว่า เนื้อเยื่อจากสีม่วงเข้มออกดำ เปลี่ยนเป็นสีม่วงอ่อนออกแดง
7. ล้างด้วยน้ำประปาไหลตลอดเวลา นาน 2 นาที
8. ทำสไลด์ให้เป็นกลางโดยจุ่มใน saturated lithium carbonate จะเห็นว่าเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำเงินมากยิ่งขึ้น
9. ล้างด้วยน้ำประปาไหลตลอดเวลานาน 2 นาที
10. ย้อมสีซ้ำด้วย eosin (working solution) นาน 2-5 นาที จะติดสีแดงหรือชมพูเข้ม
11. dehydration โดยจุ่มขึ้นลงใน 70% ethanol นาน 30 วินาที - 1 นาที ถ้านานกว่านี้จะทำให้สีซีดจางเพราะ 70% ethanol จะล้างสี eosin ออก แล้วผ่าน 95% ethanol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที และผ่าน absolute ethanol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
12. ทำให้เนื้อเยื่อใสด้วย xyline 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที
13. mount สไลด์ด้วย permount

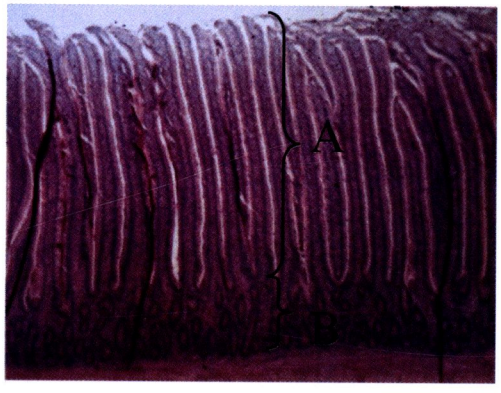
8. การตรวจวัดความสูงของวิลลัสและความลึกของคริปท์

นำสไลด์เนื้อเยื่อลำไส้ที่ผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อดังกล่าว มาศึกษาความสูงของวิลลัสและความลึกของคริปท์ โดยทำการสุ่มวิลลัสจำนวน 5 วิลลัส ต่อไก่ 1 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ร่วมกับกล้อง moticam digital (รุ่น moticam 1000) ที่มาตร (scale) อยู่ที่เลนส์ตา (eye piece) ของกล้องจุลทรรศน์ วัดขนาดด้วยโปรแกรม motic images plus 2.0 ด้วยกำลังขยาย 40 เท่า (เลนส์วัตถุ 4X และเลนส์ตา 10X) ความสูงของวิลลัสที่วัดได้มีหน่วยเป็นไมครอน (ไมโครเมตร; μm) ลักษณะของวิลลัสจากส่วนของเจจูนัมที่ถูกต้อง วิลลัสจะเรียงตัวเป็นระเบียบไม่ประสานกัน และ crypt of Leiberkuhn จะเรียงตัวชิดกันเป็นระเบียบไม่ซ้อนทับกัน ลักษณะของวิลลัสที่สมบูรณ์จะมีความยาวมากเนื่องจากเซลล์สามารถแบ่งตัวได้มาก

ภาพภาคผนวกที่ 13 การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน

ภาพภาคผนวกที่ 14 การตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตม

ภาพภาคผนวกที่ 15 การติดเนื้อเยื่อกับแผ่นสไลด์



ภาพภาคผนวกที่ 16 การวัดความสูงของวิลไล (A) และความลึกของคริปท์ (B)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

การตรวจหาเชื้อ *Escherichia coli (E. coli)*

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารเคมี

1. Eosin methylene blue ager (EMB)
2. Isopropyl alcohol 70% สำหรับฆ่าเชื้อ

อุปกรณ์

1. Volumetric flask ขนาด 1,500 มล.
2. Cylinder กระบอกตวง ขนาด 1,000 มล.
3. water bath
4. Hotplate
5. plate จานเพาะชื้อ
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์
7. เครื่องชั่ง
8. autoclave
9. hot air oven
10. incubator ตู้เพาะเชื้อ
11. กรดาษอลูมินัมฟอยล์

วิธีการ

1. เตรียมจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 2 จาน/1dilution

2. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB 36 กรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1,500 มล. แล้วตวงน้ำกลั่นปริมาณ 1,000 มล. ลงใน flask ปิดปากด้วยอลูมินัมฟอยด์ค่อย ๆ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นใส่ใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 115 ปอนด์ 15 นาที แล้วนำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นใน water bath ที่ 75 องศาเซลเซียส เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพาะในขณะที่ยังอุ่นอยู่ปิดผาจานโดยเร็ว และลนปาก flask อย่างเร็วบนเปลวไฟก่อนเทแล้วตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว

3. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวให้คว่ำจานเพาะเชื้อ หากพบว่าจานเพาะเชื้อมีไอน้ำเกาะอยู่ ให้นำไปทำให้แห้งในตู้เพาะเชื้อ (incubator) ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที

2. การเจือจางและเพาะเลี้ยงเชื้อจากมูลไก่เนื้อ

สารเคมี

1. เปปโตน (peptone) 0.1%
2. Isopropyl alcohol 70% สำหรับฆ่าเชื้อ

อุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มล.
2. ปิเปต
3. micropipette
4. tip ขนาด 1 และ 0.1 มล.
5. เครื่องชั่ง
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์
7. กระดาษอลูมินัมฟอยล์
8. spreader

วิธีการ

1. ใช้ปิเปตขนาด 10 มล. ดูดสารละลายเปปโตน 0.1% ที่ฆ่าเชื้อแล้วใส่หลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 9 มล. จำนวน 6 หลอด

2. ชั่งสิ่งขับถ่ายของไก่เนื้อ จำนวน 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุเปปโตน 0.1% ปริมาตร 9 มล. จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที เพื่อให้ตะกอนของสิ่งขับถ่ายตกลงสู่ก้นหลอด ขั้นตอนนี้เชื้อจะถูกเจือจางลง 10 เท่า หรือ 1: 10 จากนั้นทำการเจือจางต่อไป โดยใช้ pipet tip ขนาด 1 มล. ดูดเชื้อลงในหลอดที่บรรจุเปปโตน ซึ่งหลอดที่ 1 เชื้อถูกเจือจางลงอีก 10 เท่า หรือ 1: 100 ทำการเจือจางต่อไปเรื่อยๆ จนถึง 1: 10^7 (หลอดที่ 6) ควรทำให้เชื้อผสมกันดีก่อนถ่ายจากหลอดหนึ่งไปยังหลอดหนึ่ง และต้องลนปากหลอดด้วยเปลวไฟอย่างรวดเร็ว และใช้ปิเปตอันใหม่ในการถ่ายเชื้อแต่ละครั้ง

3. ใช้ pipet tip ขนาด 0.1 มล. ดูดสิ่งขับถ่ายที่ระดับความเจือจาง ปริมาตร 0.1 มล. ลงบนผิวอาหารแข็งแล้วกระจาย (spread) ให้ทั่วจำนวน 2 จาน ต่อ 1 dilution แล้วทำเครื่องหมายบนจานให้ชัดเจน

4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

3. การตรวจนับจำนวนโคโลนี

อุปกรณ์

1. hand counter

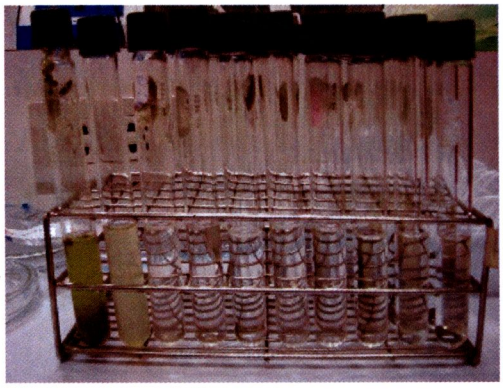
วิธีการ

1. สังเกตลักษณะของโคโลนีเชื้อ *E. coli* มีขนาดใหญ่ สีดำคล้ำ บริเวณส่วนกลางของโคโลนีมีเลื่อมคล้ายเงาโลหะสีเขียว

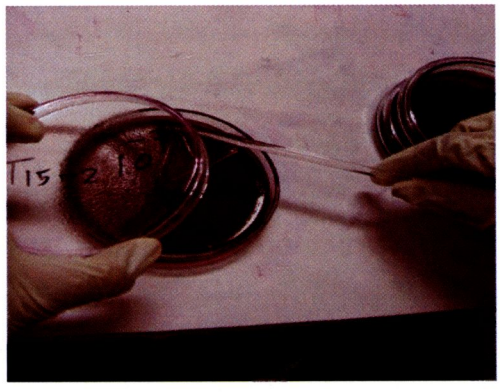
2. นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นับจำนวนโคโลนีแต่ละ plate โดยเลือดเอา plate ที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี มาคำนวณ

3. คำนวณหาจำนวนเซลล์เชื้อแบคทีเรียจากสูตร

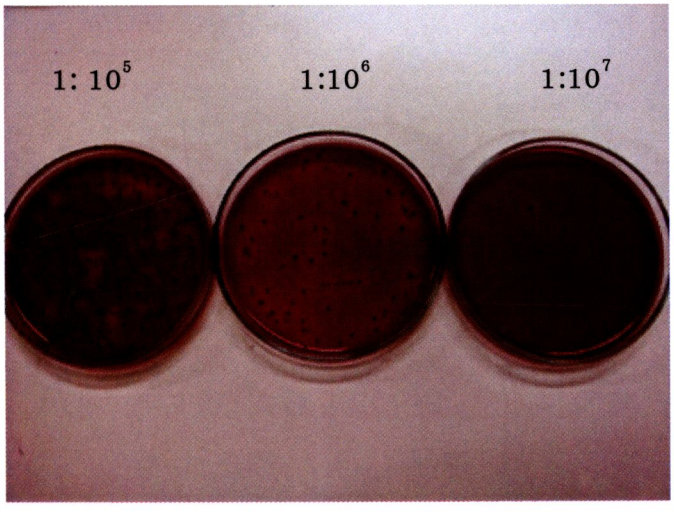
จำนวน *E. coli* ต่อ 1 กรัม = $\frac{\text{จำนวนโคโลนีบนจาน}}{\text{ความเจือจางของสิ่งขับถ่าย}}$



ภาพภาคผนวกที่ 17 การเจือจางสิ่งขับถ่าย 10 เท่า



ภาพภาคผนวกที่ 18 การ Spread สิ่งขับถ่ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพภาคผนวกที่ 19 ลักษณะโคโลนีของ *E. coli*

ประวัติผู้เขียน

นางสาวเกศรินทร์ แก้วมะณี เกิดเมื่อวันที่ 23 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2527 เป็นบุตรคนที่สองของคุณพ่อสมนึก แก้วมะณี และคุณแม่คำป่าย แก้วมะณี มีพี่ชายหนึ่งคน คือคุณพงษ์สวัสดิ์ แก้วมะณี สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนชุมชนบ้านร้องเข็ม และระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนร้องกวางอนุสรณ์ อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่ เข้าศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี (วิทยาศาสตรบัณฑิต) มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่เฉลิมพระเกียรติ และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีเมื่อปี พ.ศ. 2550 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างการศึกษาได้รับทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ และทุนนักศึกษาผู้ช่วยวิจัยจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน (TROFREC) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น