การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดข่าเหลือง (*Alpinia serumbet*) ข่าแดง (*Achasma sphaerocephallum*) และข่าลิง (*Alpinia conchigera*) ในระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอ

Study on Efficiency of Three Species of Alpinias Extracts at Different Concentrations in *Vibrio* sp. Growth Inhibition

สุทธิกานต์ สุวรรณโณ

สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

วิทยาลัยประมงติณสูลานนท์

สถาบันการอาชีวศึกษาเกษตรภาคใต้

ปีการศึกษา 2564

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดข่าเหลือง (*Alpinia serumbet*) ข่าแดง (*Achasma sphaerocephallum*) และข่าลิง (*Alpinia conchigera*) ในระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอ

Study on Efficiency of Three Species of Alpinias Extracts at Different Concentrations in *Vibrio* sp. Growth Inhibition

สุทธิกานต์ สุวรรณโณ

สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

วิทยาลัยประมงติณสูลานนท์

สถาบันการอาชีวศึกษาเกษตรภาคใต้

ปีการศึกษา 2564

ใบรับรองโครงงาน

เทคโนโลยีบัณฑิต (ทล.บ.)
สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เรื่อง **การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดข่าเหลือง (*Alpinia serumbet*) ข่าแดง (*Achasma sphaerocephallum*) และข่าลิง (*Alpinia conchigera*) ในระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอ**
Study on Efficiency of Three Species of Alpinias Extracts at Different Concentrations in *Vibrio* Sp. Growth Inhibition

โดย **นางสาวสุทธิกานต์ สุวรรณโณ**

ได้รับพิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(นายกรีฑา ดิษโสภา)

..... กรรมการ
(นางพัชรธิดา ขำขจร)

..... ประธานหลักสูตร
(นางกฤษณี วงศ์วุฒิวัฒน์) ทำหน้าที่ประธานกรรมการและเลขานุการ

วันที่ 29 ตุลาคม 2564
วิทยาลัยประมงติณสูลานนท์
สถาบันการอาชีวศึกษาเกษตรภาคใต้
ปีการศึกษา 2564

เรื่อง	การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดข่าเหลือง (*Alpinia serumbet*) ข่าแดง (*Achasma sphaerocephallum*) และข่าลิง (*Alpinia conchigera*) ในระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอ Study on Efficiency of Three Species of Alpinias Extracts at Different Concentrations in *Vibrio* Sp. Growth Inhibition
โดย	สุทธิกานต์ สุวรรณโณ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
อาจารย์ที่ปรึกษา	กฤษณี วงศ์วุฒิวัฒน์
ที่ปรึกษาร่วมโครงการ	ณรงค์ เผือกผ่อง และสิทธิพงษ์ พรมคำอ้าย

บทคัดย่อ

ปัจจุบันกุ้งไทยมีศักยภาพในการแข่งขันตลาดโลกสูงมาก เนื่องจากประเทศไทยมีสภาพภูมิประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์จึงได้เปรียบด้านการเพาะเลี้ยงกุ้ง แต่อีกทางหนึ่งประเทศไทยยังคงประสบปัญหาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงมาอย่างยาวนานคือ ปัญหาทางด้านโรคต่างๆ ที่ยังไม่สามารถหาวิธีจัดการให้หายขาดได้ อีกทั้งการใช้ยาปฏิชีวนะก็ส่งผลกระทบถึงคุณภาพของผลผลิตในเรื่องของสารตกค้าง ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดข่าทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ข่าเหลือง ข่าแดง และ ข่าลิง ที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอในความเข้มข้นที่ต่างกัน ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของขนาดวงใส (Clear zone) แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ประกอบด้วย ชุดการทดลองที่ 1 และ 2 เป็นชุดควบคุมทางลบและทางบวก ส่วนชุดการทดลองที่ 3,4 และ 5 ใช้สารสกัดข่าทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดข่าเหลืองมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอได้ดีที่สุดในระดับความเข้มข้น 100 และ 50 เปอร์เซ็นต์ และดีกว่าสารสกัดข่าแดง และสารสกัดข่าลิง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ในระดับความเข้มข้นที่ 12.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างสารสกัดข่าเหลือง และสารสกัดข่าลิง อย่างไรก็ตาม แม้ว่าประสิทธิภาพของสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโออาจจะยังด้อยกว่าประสิทธิภาพของยาออกซี่เตตราซัยคลิน แต่การนำสารสกัดข่าเหลืองในความเข้มข้นที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากสารสกัดข่าเหลืองที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ มาใช้ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงกุ้ง น่าจะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่สามารถลดต้นทุนการผลิต และช่วยลดปัญหาเรื่องสารตกค้างในผลผลิตของกุ้งได้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากการที่ผู้วิจัยได้รับความกรุณาเป็นอย่างสูง จากอาจารย์กฤษณี วงศ์วุฒิวัฒน์ ที่เป็นที่ปรึกษาโครงงาน และอาจารย์ประจำวิชา รวมไปถึงอาจารย์มายมูเนาะห์ มิดคาดี อาจารย์อภิรักษ์ จันทวงศ์ อาจารย์ศักดา วงศ์วุฒิวัฒน์ อาจารย์อนุสรณ์ ช่วยทอง อาจารย์ในหลักสูตรเทคโนโลยีบัณฑิต และอาจารย์ทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ที่คอยให้คำปรึกษา สอนให้รู้เตือนสติ และให้กำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องของโครงงานเล่มนี้ด้วยความใส่ใจอย่างเต็มที่ ผู้วิจัยมีความตระหนักถึงความตั้งใจ ทุ่มเท และใส่ใจของอาจารย์ทุกท่าน ตั้งแต่การเริ่มต้นคิดเรื่องที่จะทำการทดลอง การวางแผน ตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง ทำให้การทดลองครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณครอบครัว ที่ให้กำลังทรัพย์และกำลังใจในการทำโครงงานครั้งนี้ ขอขอบคุณรุ่นพี่เทคโนโลยีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อนๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาที่ดีตลอดมา ทำให้การทำโครงงานครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี และสุดท้ายนี้ ขอขอบคุณตัวเองที่ไม่ถอดใจ ถอยหนีปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นและพยายามสู้กับปัญหาที่เกิดขึ้นในทุกๆ ด้านจนทำให้โครงงานครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ส่วนข้อบกพร่องต่างๆ ที่เกิดขึ้นในโครงงานเล่มนี้นั้น ผู้วิจัยขอน้อมรับข้อติเพียงผู้เดียว และยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำชี้แนะจากทุกท่านที่เข้ามาเยี่ยมชมโครงงานเล่มนี้ เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาต่อไป ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมาอย่างสูง ณ ที่นี้

สุทธิกานต์ สุวรรณโณ
สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
วิทยาลัยประมงติณสูลานนท์ สถาบันการอาชีวศึกษาเกษตรภาคใต้
ตุลาคม 2564

สารบัญ

หน้า

สารบัญ (1)
สารบัญตาราง (2)
สารบัญภาพ (3)
บทนำ
ที่มาและความสำคัญ 1
วัตถุประสงค์ 3
การตรวจเอกสาร
เอกสารวิชาการ 4
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 24
วิธีการดำเนินการ
วัสดุและอุปกรณ์ 27
การวางแผนการทดลอง 29
วิธีการทดลอง 29
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง
ผลการทดลอง 33
วิจารณ์ผลการทดลอง 35
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ
สรุปผลการทดลอง 37
ข้อเสนอแนะ 37
เอกสารอ้างอิง **38**
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก วัสดุ และอุปกรณ์ 42
ภาคผนวก ข ตารางข้อมูล และตารางวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 52

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตารางแสดงผลการทดลองและค่าทางสถิติ	33
2	ตารางแสดงชุดควบคุมการทดลอง	33

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ข่า	5
2	ข่าเหลือง	9
3	ข่าแดง	10
4	ข่าลิง	10
5	วิธีการเจือจาง 10 เท่า	18
6	การเกิดวงใส	19

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

กุ้งนับเป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจรวมถึงเป็นสินค้าที่มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมากในเขตภาคใต้ของไทย จากการที่ประเทศไทยมีสภาพภูมิประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีความได้เปรียบ ทำให้การเพาะเลี้ยงกุ้งขยายตัวอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว และกุ้งไทยเป็นสินค้าที่มีศักยภาพการแข่งขันในตลาดโลกสูงมาก ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา การส่งออกของกุ้งไทยเติบโตเฉลี่ยราว 12 เปอร์เซ็นต์ต่อปี สูงกว่าอัตราการเติบโตเฉลี่ยของโลกที่ 4 เปอร์เซ็นต์ต่อปี ประเทศไทยสามารถผลิตกุ้งได้ราว 500,000 ตันต่อปี ผลผลิตส่วนใหญ่ประมาณ 400,000 ตัน ใช้เพื่อการส่งออก ซึ่งสามารถสร้างรายได้เข้าประเทศได้ปีละกว่า 90,000 ล้านบาทต่อปี ส่งผลให้ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกกุ้งรวมถึงผลิตภัณฑ์แปรรูปขนาดใหญ่เป็นอันดับ 1 ของโลกซึ่งเป็นที่ยอมรับและเป็นที่ต้องการของตลาด (คลังข้อมูลสารสนเทศระดับภูมิภาค (ภาคใต้), 2564)

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าประเทศไทยจะมีศักยภาพในการผลิตและการส่งออกกุ้งที่มากเพียงใด แต่ปรากฏว่าในปัจจุบันประเทศไทยต่างก็ประสบปัญหาทางด้านต่างๆ เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงกุ้งเช่นเดียวกัน อาทิ ปัญหาทางด้านคุณภาพวัตถุดิบ ปัญหาเกษตรกรขาดความรู้และความเข้าใจ ปัญหาที่มาจากสภาพอากาศ จากพ่อแม่พันธุ์ ปัญหาเศรษฐกิจ รวมไปถึงปัญหาใหม่ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยง และเรื่องที่ยังคงเป็นปัญหาสืบเนื่องกันมาเป็นเวลายาวนานต่อวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำคือปัญหาด้านโรคต่างๆ ที่ยังคงเกิดกับตัวกุ้ง ไม่ว่าจะเป็นสาเหตุมาจากสภาพคุณภาพน้ำที่ไม่ดี โรคที่ติดมาจากพ่อแม่พันธุ์ หรือโรคที่มาจากแหล่งที่ซื้อมา และอีกมากมาย เกษตรกรมักจะมีความวิตกกังวลในเรื่องของโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยง หรือแพร่ระบาดอย่างรุนแรงในแต่ละช่วงของฤดูกาล ไม่ว่าจะเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส หรือ ปรสิต โดยเฉพาะเชื้อไวรัสที่ยังไม่สามารถจัดการควบคุมได้อย่างแท้จริง ส่วนโรคในกุ้งก็มีอยู่มากมาย อาทิ โรคเรืองแสง (luminous disease) โรคขี้ขาว (White Feces Syndrome) โรคเฮปปาโตแพนเครียสอักเสบเนื้อตาย หรือโรคเอ็นเอชพี (Necrotizing hepatopancreatitis หรือ NHP) โรคกุ้งตายด่วน (Early Mortality Syndrome) เป็นต้น ซึ่งล้วนแต่เป็นโรคที่สร้างความเดือดร้อนให้แก่เกษตรกรเป็นอย่างมาก (ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมสัตว์น้ำชายฝั่ง, 2561) โรคที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มาจากโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ ตัวอย่างเช่น *Vibrio parahaemolyticus* ที่ทำให้เกิดโรคกุ้งตายด่วน, *Vibrio harveyii* ที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสง หรือโรคเพรชพลอย และยังมีเชื้ออีกหลายชนิดที่ก่อให้เกิดโรคอีกหลายโรคเช่นเดียวกัน ทั้งนี้ มีนักวิจัยหลายท่านที่พยายามคิดค้นทำงานวิจัยต่างๆ เพื่อให้ได้ยาที่สามารถใช้ต้านทานโรคเหล่านี้ได้ไม่ว่าจะเป็นการใช้ยาปฏิชีวนะ หรือยาสมุนไพร

ซึ่งยาสมุนไพร หมายถึงยาที่ได้มาจากพืช สัตว์ แร่ธาตุจากธรรมชาติที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพโครงสร้างภายใน สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคต่างๆ รวมทั้งสามารถบำรุงร่างกายได้ (คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี, 2564) และสมุนไพรตามพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. 2525 หมายถึงพืชที่ใช้ทำเป็นเครื่องยา สมุนไพรกำเนิดมาจากธรรมชาติและมีความหมายต่อชีวิตมนุษย์โดยเฉพาะในทางสุขภาพการส่งเสริมสุขภาพและการรักษาโรค (ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร, 2551) ซึ่งสมุนไพรสามารถนำมาใช้ประโยชน์ต่างๆ ได้มากมาย อีกทั้งยังสามารถใช้ในการรักษาโรคต่างๆ ได้ดี รวมถึงไปด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอีกด้วย ซึ่งจากการศึกษาค้นคว้างานวิจัย พบว่ามีงานวิจัยของนักวิจัยหลายท่านที่มีการนำสมุนไพรมาใช้ในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ไม่ว่าจะเป็นการใช้เสริมอาหาร ใช้ในบ่อเลี้ยง หรือใช้ในการรักษาโรคสัตว์น้ำ ซึ่งทั้งหมดล้วนส่งผลดีและสามารถนำไปใช้งานได้จริงในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ดังนั้น ผู้วิจัยซึ่งเป็นนักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีโอกาสได้เข้ารับการฝึกอาชีพในสถานประกอบการฟาร์มเพาะเลี้ยงลูกกุ้งทะเลที่จังหวัดจันทบุรี จึงได้มีโอกาสได้เห็น เรียนรู้ และประสบกับปัญหาที่เกี่ยวกับการระบาดของโรคในสัตว์น้ำ ซึ่งเกิดขึ้นจริงและส่งผลให้ผลผลิตลูกกุ้งทะเลลดน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด ทำให้มีความสนใจที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคที่เกิดขึ้นในสัตว์น้ำ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรบางชนิด ซึ่งเป็นสมุนไพรที่เป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดี สามารถพบและหาซื้อได้ทั่วไป อีกทั้งยังมีราคาที่ไม่แพง ได้แก่ ข่า (*Alpinia galanga*) ในการนำมาศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอ เนื่องจากมีการค้นพบสารเคมีในข่า คือ acetoxychavicol acetate และ tacetoxyeugenol acetate ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี โดยผู้วิจัยได้เลือกข่า 3 ชนิด ได้แก่ ข่าเหลือง (*Alpinia serumbet*) ข่าแดง (*Achasma sphaerocephallum*) และข่าลิง (*Alpinia conchigera*) มาศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพและความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอด้วยวิธี Agar well diffusion ซึ่งสามารถนำไปต่อยอดพัฒนาและใช้ประโยชน์ได้จริงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอเพื่อลดปัญหาที่เกี่ยวกับการแพร่ระบาดของโรคในสัตว์น้ำ และหวังว่าจะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกให้แก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในการนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและใช้ในการเพิ่มผลผลิตได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงงาน

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดข่าทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ข่าเหลือง (*Alpinia serumbet*) ข่าแดง (*Achasma sphaerocephallum*) และข่าลิง (*Alpinia conchigera*) ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* sp.)

2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* sp.) ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของสารสกัดข่าเหลือง (*Alpinia serumbet*) ข่าแดง (*Achasma sphaerocephallum*) และข่าลิง (*Alpinia conchigera*)

การตรวจเอกสาร

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดข่า 3 ชนิดได้แก่ ข่าเหลือง (*Alpinia serumbet*) ข่าแดง (*Achasma sphaerocephallu*) และข่าลิง (*Alpinia conchigera*) ที่มีฤทธิ์สามารถยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอ โดยการสกัดเย็นด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 99.7 – 100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี agar well diffusion มีเอกสารวิชาการและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

เอกสารวิชาการ

1. สมุนไพร

ตามพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. 2525 สมุนไพร หมายถึง พืชที่ใช้ทำเป็นเครื่องยา สมุนไพรกำเนิดมาจากธรรมชาติและมีความหมายต่อชีวิตมนุษย์โดยเฉพาะในทางสุขภาพ อันหมายถึงทั้งการส่งเสริมสุขภาพและการรักษาโรค ความหมายของยาสมุนไพรในพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 ได้ระบุว่า ยาสมุนไพร หมายถึงยาที่ได้จากพฤกษาชาติสัตว์หรือแร่ธาตุ ซึ่งมิได้ผสมปรุงหรือแปรสภาพ เช่น พืชในส่วนของราก ลำต้น ใบ ดอก ผล ฯลฯ ซึ่งมิได้ผ่านขั้นตอนการแปรรูปใดๆ แต่ในทางการค้า สมุนไพรมักจะถูกดัดแปลงในรูปแบบต่างๆ เช่น ถูกหั่นให้เป็นชิ้นเล็กลง บดเป็นผงละเอียด หรืออัดเป็นแท่ง แต่ในความรู้สึกของคนทั่วไปเมื่อกล่าวถึงสมุนไพร มักนึกถึงเฉพาะต้นไม้ที่นำมาใช้เป็นยาเท่านั้น (ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร, 2551) นอกจากนี้ สมุนไพร หมายถึงยาที่ได้มาจากพืช สัตว์ แร่ธาตุจากธรรมชาติที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพโครงสร้างภายใน สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคต่างๆ และบำรุงร่างกายได้ ประเภทของสมุนไพรสามารถแบ่งได้หลายประเภท ดังนี้

1.1. สมุนไพรที่ได้จากส่วนของพืชโดยตรง (พืชวัตถุ) โดยส่วนต่าง ๆ ที่นำมานั้นมีสารที่สามารถใช้เป็นยาได้ ได้แก่ ใบ ดอก ผล เปลือกผล เมล็ด เปลือกเมล็ด รากหรือหัว ต้น แก่น กระพี้ เนื้อไม้ เปลือกไม้

1.2. สมุนไพรที่ได้จากอวัยวะของสัตว์ (สัตว์วัตถุ) ได้แก่ ตับ ดี นอ เขา เอ็น เลือด น้ำมัน มูล ฯลฯ เช่น ขี้ผึ้ง รังนก น้ำมันตับปลา

1.3. สมุนไพรที่ได้จากแร่โดยธรรมชาติหรือสิ่งที่ประกอบขึ้นจากแร่ธาตุต่างๆ ตามกรรมวิธี (ธาตุวัตถุ) นำมาใช้เป็นยา เช่น เกลือ กำมะถัน น้ำประสานทอง ดีเกลือ สารส้ม

การจำแนกรูปแบบของสมุนไพรที่ใช้เป็นยา สมุนไพรไม่ว่าจะเป็นส่วนที่มาจากพืชวัตถุ สัตว์วัตถุ หรือธาตุวัตถุก็ตาม เมื่อต้องการจะนำมาใช้เพื่อบริโภค หรือเพื่อการรักษาตามกรรมวิธีจำเพาะอันใดก็ตาม พอจะจำแนกรูปแบบของสมุนไพรที่ใช้เป็นยาได้ดังนี้คือ รูปแบบที่เป็นของเหลว รูปแบบที่เป็นของแข็ง รูปแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว รูปแบบอื่นๆ ที่มีลักษณะการใช้พิเศษ ตัวอย่างเช่น ใช้วิธีรมควัน

สมุนไพรนอกจากจะมีประโยชน์ในการรักษาโรคภัยไข้เจ็บแล้ว ในทางตรงกันข้าม ถ้าใช้ไม่ถูกต้องก็อาจมีโทษและอันตรายได้เช่นกัน อันตรายจากสมุนไพรนั้นอาจแยกออกเป็น 3 ประการ คือ

1) อันตรายที่เกิดจากโรคที่ขาดการรักษา
2) เป็นอันตรายที่เกิดจากฤทธิ์ของสมุนไพรโดยตรง
3) อันตรายจากสารเจือปนในสมุนไพร

2. ชนิดของสมุนไพร

สมุนไพรที่นำมาทำการสกัดด้วยวิธีการต่างๆ แล้วเกิดประโยชน์มากมาย ทั้งทางด้านการแพทย์ รวมถึงด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีอยู่หลายชนิด แต่เลือกนำมาใช้ในการทดลองเพียงบางชนิด ได้แก่

2.1 ข่า

ภาพที่ 1 ข่า

ที่มา : ปลูกข่า “ข่า” ช่วยกำจัดแมลงศัตรูพืช (2561)

ข่า มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Alpinia galanga* มีชื่อพ้องคือ Languas galanga และมีชื่อสามัญ Greater Galangal, Galangal ข่าเป็นไม้ล้มลุก มีอายุหลายปี สูงประมาณ 1.5 – 2 เมตร มีลำต้นใต้ดินเรียกว่าเหง้า มีข้อและปล้องชัดเจน เลื้อยขนานพื้นดินและแตกแขนงเป็นแง่ง เหง้าหัวมีขนาดใหญ่ สีขาว ลำต้นเทียมเหนือดินคือส่วนของกาบใบที่หุ้มซ้อนทับกันมีสีเขียวทรงกระบอกกลม เนื้อในสีเหลืองและมีกลิ่นหอมเฉพาะ เป็นพืชใบเดี่ยว แตกใบเวียนรอบต้น ลักษณะใบรูปขอบขนาน หรือรูปขอบขนานแกมรูปไข่ ขอบใบเรียบและบางช่วงเป็นคลื่น ปลายใบเป็นติ่งแหลมหรือเรียวแหลม โคนใบเฉียงและเรียวเข้าหาก้านใบ แผ่นใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ก้านใบสั้นออกดอกเป็นช่อแบบช่อกระจะตรงปลายยอดแกนกลางช่อมีขนและดอกช่อจะจัดอยู่ด้วยกันอย่างหลวมๆ ช่อที่ยังอ่อนจะมีใบประดับรูปไข่ลักษณะเป็นกาบสีเขียวอมเหลืองหุ้มมิด ดอกสีขาวขนาดเล็ก กลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอดสั้นปลายแยกเป็น 3 กลีบ กลีบใหญ่มีริ้วสีแดง ผลลักษณะรูปทรงกระบอกหรือกลมรี มีขนาดเท่าเม็ดบัว ผลอ่อนสีเขียวเมื่อแก่จะมีสีแดงอมส้ม และภายในมีเมล็ดเล็กๆ สีดำ มีรสขมและเผ็ด ผลแห้งแตกได้ พบได้ทั่วไปในประเทศไทย

2.1.1 ประโยชน์ทางยา

1) เหง้าหรือลำต้นใต้ดิน รสเผ็ดร้อนขม แก้ฟกช้ำ แก้บวม แก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ จุกเสียด แน่น แก้กลาก เกลื้อน ขับลมในลำไส้ แก้ปวดมวนในท้อง ขับลมในสตรีหลังคลอด ใช้ภายนอกรักษาอาการคันในโรคลมพิษ ช่วยย่อยอาหาร แก้บิด แก้ลมพิษ แก้โรคปวดบวมตามข้อ หลอดลมอักเสบ มีฤทธิ์กดหัวใจ กระตุ้นการหายใจ กดการหายใจ กระตุ้นการหายใจในเด็ก เป็นยาธาตุ

2) ผล รสเผ็ดร้อนฉุน ช่วยย่อยอาหาร แก้ปวดท้อง แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้คลื่นไส้ อาเจียน แก้บิด แก้แน่นหน้าอก

3) ต้นแก่ นำไปเคี่ยวกับน้ำมันมะพร้าว ทาแก้ปวดเมื่อย เป็นตะคริว ใบมีรสเผ็ดร้อน แก้พยาธิ

4) น้ำมันหอมระเหย น้ำมันหอมระเหยจากข่ามีฤทธิ์ทำให้ไข่แมลงฝ่อ กำจัดเชื้อราบางชนิดได้ ใช้ผสมกับสะเดาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงข่า ลดการบีบตัวของลำไส้ ขับน้ำดี ขับลม ลดการอักเสบ ยับยั้งแผลในกระเพาะอาหาร ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ฆ่าเชื้อรา ใช้รักษากลากเกลื้อน

5) ใบ รสเผ็ดร้อน แก้กลากเกลื้อน ฆ่าพยาธิ ต้มอาบแก้ปวดเมื่อยตามข้อ

6) ต้น รสเผ็ดร้อนช่า ต้นแก่โขลกผสมน้ำมันมะพร้าวทาแก้ตะคริว แก้ปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อ ตามข้อ

7) ดอก รสเผ็ดร้อน เป็นยาแก้กลากเกลื้อน

8) หน่อ รสเผ็ดร้อนหวาน บำรุงไฟธาตุ แก้ลมแน่นหน้าอก

9) เหง้าและราก รสร้อนปร่า ขับลม แก้ปวดท้อง ท้องเสีย จุกเสียด แน่นท้อง อาหารไม่ย่อย

10) ราก รสร้อนปร่า ขับเสมหะ ขับโลหิต แก้เหน็บชา ขับหลอดลม

11) สารสกัดจากข่า มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (ข้อมูลพืชสมุนไพร, 2564)

2.1.2 องค์ประกอบทางเคมี เหง้าสด จะมีน้ำมันหอมระเหยอยู่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ 1,8 cineole (53.57 percent), α-pinene (2.67 percent), trans-caryophyllene (2.61 percent), terpinen-4-ol (2.41 percent), chavicol (1.00 percent)

2.1.3 การศึกษาทางเภสัชวิทยา

1) ฤทธิ์ลดการอักเสบ การศึกผลต่อเซลล์กระดูกอ่อนในหลอดทดลองของสารบริสุทธิ์ p-hydroxycinnamaldehyde ซึ่งแยกได้จากสารสกัดเหง้าข่าด้วยอะซีโตน โดยใช้เซลล์กระดูกอ่อนในมนุษย์ ผลการศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการสลาย hyaluronan (HA), sulfated glycosaminoglycans (s-GAGs) และ matrix metalloproteinase (MMPs) จากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ ซึ่งจะส่งผลให้สามารถลดการปวด การอักเสบ และปกป้องกระดูกอ่อน ผิวข้อ และน้ำบริเวณไขข้อ แสดงว่าสาร p-hydroxycinnamaldehyde จากข่ามีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเพื่อใช้รักษาอาการข้อเสื่อมได้

2) ฤทธิ์แก้แพ้ สารบริสุทธิ์ 1'S-1'-acetoxy chavicol acetate ที่แยกได้จากเหง้าข่า ซึ่งมีฤทธิ์แรงในการต้านการเกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้ชนิด type 1allergy โดยการทดสอบในหลอดทดลอง วัดจากการยับยั้งการปลดปล่อยเอนไซม์ β-hexosaminidase จาก RBL-2H3 cells เมื่อเกิดปฏิกิริยาการแพ้ ซึ่งแสดงถึงการยับยั้งปฏิกิริยาภูมิแพ้ระยะเฉียบพลันและฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง TNF-α และ IL-4 เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยสารที่ก่อภูมิแพ้ ซึ่งแสดงถึงการยับยั้งปฏิกิริยาภูมิแพ้ระยะท้าย ผลการทดลองพบว่า สารบริสุทธิ์ 1'S-1'-acetoxychavicol acetate ที่แยกได้จากเหง้าข่า และอนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ ออกฤทธิ์แรงในการต้านปฏิกิริยาภูมิแพ้ทั้งระยะเฉียบพลันและระยะท้าย โดยมีค่า IC_{50} ในการยับยั้ง β-hexosaminidaseของ 1'S-1'-acetoxychavicol acetate และ ยามาตรฐาน ketotifen fumalate เท่ากับ 17 และ 158 μM ตามลำดับ ค่า IC_{50} ในการยับยั้งการสร้าง TNF- α ของสารบริสุทธิ์ และอนุพันธ์ acetoxybenzhydrol methylcarboxylate analogueเท่ากับ 17 และ 11 μM ตามลำดับ ค่า IC_{50} ในการยับยั้งการสร้าง IL-4 ของสารบริสุทธิ์ และอนุพันธ์ มีค่าเท่ากัน เท่ากับ 12 μM

3) ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกันสารสกัด polysaccharide ส่วนที่ละลายได้ในน้ำร้อนของเหง้าข่า เมื่อนำมาทดสอบในหนูถีบจักร พบว่าเมื่อให้สารสกัดขนาด 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถกระตุ้นการเกิดฟาโกไซโตซิส (การที่เม็ดเลือดขาว

กำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยการกลืนกิน) ของเซลล์ที่เรียกว่าเรทิคิวโลเอนโดทีเรียลเซลล์ (พบบริเวณม้ามตับ ต่อมน้ำเหลือง และไขกระดูก เป็นต้น) ได้ โดยออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน zymosan และสามารถเพิ่มจำนวนของ peritoneal macrophage ซึ่งเป็นเซลล์ที่เก็บกินเชื้อโรคจากระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อใช้สารทดสอบในขนาดเดียวกัน นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มจำนวน spleen cell ที่ทำหน้าที่เก็บกินสิ่งแปลกปลอมในกระแสเลือดได้ ดังนั้นสาร polysaccharide จากเหง้าข่าจึงมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งแบบ phagocyte ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม โดยใช้เยื่อหุ้มเซลล์โอบล้อมเชื้อโรค ก่อนจะนำเข้าสู่เซลล์ และแบบ lymphocyte กำจัดเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกายโดยกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้หลายแบบในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกระแสเลือด

2.1.4 การศึกษาทางคลินิก ศึกษาการระงับปวดของยาทาภายนอกซึ่งประกอบด้วยสารสกัดเมทานอลของเหง้าข่า ในการทดลองแบบสุ่ม double-blind, placebo controlled, multicenter study โดยศึกษาในคนไข้โรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 261 คน ที่มีอาการปวดเข่าระดับปานกลางถึงรุนแรง ซึ่งพบว่าสารสกัดของข่าที่ความเข้มข้นสูง สามารถช่วยลดอาการของคนที่อาการโรคข้อเสื่อมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.1.5 การศึกษาทางพิษวิทยา ทำการศึกษาพิษเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง) และพิษเรื้อรัง (เป็นเวลา 90 วัน) ของสารสกัดเอทานอลจากเหง้าข่าในหนูถีบจักร พิษเฉียบพลันศึกษาที่ขนาด 0.5, 1.0 และ 3 กรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่พิษเรื้อรังศึกษาที่ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน จากนั้นบันทึกลักษณะพฤติกรรม, ค่าทางโลหิตวิทยา, การเปลี่ยนแปลงของสเปิร์ม, น้ำหนักตัว และน้ำหนักของอวัยวะสำคัญต่างๆ จากการทดลองพบว่าไม่มีสัตว์ทดลองตาย สารสกัดจากข่าทำให้น้ำหนักตัวของหนูเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในการศึกษาพิษเรื้อรัง การตรวจสอบค่าทางโลหิตวิทยาพบว่าสารสกัดจากข่าทำให้ปริมาณเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์เพิ่มขึ้น และจำนวนอสุจิเพิ่มขึ้นในหนูเพศผู้และไม่พบการเกิดพิษต่อตัวสเปิร์ม (ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร, 2564)

2.1.6 ชนิดของข่า ในประเทศไทยข่ามีอยู่หลายชนิด แต่เลือกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เพียง 3 ชนิด ได้แก่

1) ข่าเหลือง

ภาพที่ 2 ข่าเหลือง

ที่มา : NanaGarden.com (2564)

ข่าเหลือง มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Alpinia serumbet* และมีชื่อภาษาอังกฤษ Kha lueang : Galangal จัดเป็นพืชสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่มีการปลูกในภาคอีสานและภาคใต้ เนื่องจากมีความนิยมในการนำไปประกอบเป็นเครื่องแกง จึงทำให้พื้นที่ดังกล่าวมีเกษตรกรปลูกข่าเหลืองเลี้ยงชีพกันอย่างแพร่หลาย ในช่วงระยะเวลา 2-3 ปีที่ผ่านมานี้ ข่าเหลืองมีราคาค่อนข้างสูงมาโดยตลอด ทำให้เกษตรกรหันมาปลูกกันจำนวนมาก แต่ก็ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการ ลักษณะของข่าเหลืองจะมีกลิ่นและรสชาติแรงและหอมมากกว่าข่าชนิดอื่นสังเกตที่เนื้อจะเป็นสีเหลือง ข่าเหลืองนับว่าเป็นพืชที่เหมาะกับเกษตรกรที่ชอบปลูกพืชที่ไม่ต้องดูแลมาก เหมือนจำพวกตะไคร้ หรือขจรเป็นพืชเศรษฐกิจที่ทำราคาดีมาอย่างต่อเนื่อง มีลักษณะเป็นพืชล้มลุกที่มีอายุเก็บเกี่ยวสั้น และสามารถเลี้ยงข้ามปีได้ซึ่งทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นถึงหนึ่งเท่าตัว ขนาดลำต้นสูง 1 - 2 เมตร มีต้นใต้ดิน มีข้อ ปล้อง เห็นชัด เนื้อมีสีเหลือง ช่วงอายุ 6 - 8 เดือนข่าอ่อนจะไม่มีเสี้ยน รสไม่เผ็ดมาก ลักษณะใบเป็นใบเดี่ยว ก้านใบแผ่เป็นกาบหุ้มซ้อนๆ กัน มีดอกเป็นช่อออกที่ยอด สีขาว มีลักษณะผลเป็นผลสีแดงอมส้ม รูปกลมรี ภายในมี 2 - 3 เมล็ด (ข่าเหลืองเงินล้าน, 2564)

2) ข่าแดง

ภาพที่ 3 ข่าแดง

ที่มา : เทคนิคการปลูกข่าตาแดงให้ได้หัวใหญ่ (2564)

ข่าแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Achasma sphaerocephallum* และมีชื่อท้องถิ่น คือ ขิงแดง ข่าแดงเป็นพืชลำต้นใต้ดิน (เหง้า) และมีก้านใบห่อม้วนซ้อนกันแน่นชูเหนือผิวดิน (ลำต้นเทียม) มีสีเขียวเข้ม ความสูง 1 - 3 เมตร กาบใบ โคนหน่ออ่อนมีสีน้ำตาลแดง ลักษณะใบเป็นรูปไข่ โคนใบสอบ ปลายใบค่อนข้างแหลม ขอบใบเรียบแผ่นใบเป็นคลื่นเล็กน้อย มีสีเขียวเข้มเป็นมันวาว ท้องใบสีน้ำตาลแดงความยาว 10 - 30 เซนติเมตร ความกว้าง 5 – 10 เซนติเมตร ออกดอกเป็นดอกช่อออกที่ปลายยอด สีน้ำตาลแดง ดอกย่อยคล้ายดอกแค สีขาวลายน้ำตาล ลักษณะผลเป็นทรงกลมรี ปลายผลป้าน มีสีเขียว เมื่อสุกจะมีสีส้มแดง ภายในมีเมล็ด (บ้านสวนพอเพียง, 2556)

3) ข่าลิง

ภาพที่ 4 ข่าลิง

ที่มา : NanaGarden.com (2564)

ข่าลิง มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Alpinia conchigera* เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี มีเหง้าใต้ดินลำต้นเทียมสูงได้ถึง 120 เซนติเมตร ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปใบหอกถึงรูปใบหอกแกมไข่ กว้างได้ถึง 5 เซนติเมตรยาวได้ถึง 25 เซนติเมตร. ปลายใบเรียวแหลม โคนใบรูปลิ่ม ดอกช่อ แบบช่อแยกแขนงออกที่ปลาย กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นรูปถ้วย ปลายแยกเป็น 3 แฉก สีเขียวอ่อน กลีบดอกสีขาวแกมเขียว หลอดกลีบดอกยาวใกล้เคียงกับหลอดกลีบเลี้ยง เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน คู่ด้านข้างลดรูปเป็นเส้นสีแดง ยาวประมาณ 1.5 มิลลิเมตร กลีบปากรูปไข่กลับ สีขาวแกมชมพูมีลายสีน้ำตาลแดง ผลแห้งแตก รูปทรงกลมหรือเกือบกลม ขนาดประมาณ 8 มิลลิเมตร ผลสุกสีแดง เมล็ดมี 3 - 5 เมล็ด มีกลิ่นหอม (ข้อมูลสมุนไพร, 2564)

3. แบคทีเรียสกุลวิบริโอ

3.1 การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์

อาณาจักร Bacteria

ไฟลัม Proteobacteria

ชั้น Gamma Proteobacteria

อันดับ Vibrionales

วงศ์ Vibrionaceae

สกุล Vibrio

ที่มา : Pacini, (1854)

แบคทีเรียสกุลวิบริโอ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobic อยู่ในวงศ์ Vibrionaceae รูปร่างเป็นแท่งโค้ง (curved rods) หรือตรง มีขนาดความกว้าง 0.5 - 0.8 ไมโครเมตร ยาว 1.4 - 2.6 ไมโครเมตร ใช้แฟลกเจลลาในการเคลื่อนที่ในอาหารเหลว (liquid media) ใช้ monotrichous flagella ในการเคลื่อนที่เมื่อเจริญในอาหารแข็ง (solid media) สร้าง lateral flagella จำนวนมาก ไม่สร้าง endospore หรือ microcyst อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 18 - 37 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียที่ฉวยโอกาส คือเมื่อร่างกายของสัตว์อ่อนแอจากความเครียดจะทำอันตรายได้ ทำให้เกิดโรคแบบ secondary infection สามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่มีการเติมเกลือ 1.5 – 3.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่มอื่น ซึ่งยากต่อการใช้จำแนกชนิด ดังนั้น จึงมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อแบคทีเรียสกุลนี้ คือ Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) agar หรือ Brom thymol Blue Salt Teepol (BTBST) เมื่อเจริญจะให้โคโลนีสีเขียวหรือเหลือง ขนาดปานกลาง-ใหญ่ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสของแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้แบคทีเรียสกุลวิบริโอเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในน้ำกร่อย

หรือบริเวณแหล่งน้ำที่มีค่าความเค็มช่วงกว้าง ดังนั้น จึงสามารถพบแบคทีเรียสกุลวิบริโอในบ่อเลี้ยงกุ้ง (จุฑารัตน์ และมนฤทัย, 2557) จากการรวบรวมผลการศึกษาการแพร่กระจายของแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในสัตว์ทะเลหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในท้องทะเลรวมทั้งสัตว์น้ำที่มาจากการเพาะเลี้ยงพบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอที่พบได้มากที่สุด ในภาพรวมจากการศึกษาทั่วโลกและรองลงมาได้แก่ *V. damsela, V. alginolyticus, V. fluvialis, V. vulnificus, V. harveyii* และ *V. mediterranei* สำหรับ *V. cholerae* สามารถพบได้ในแหล่งน้ำบางแหล่งเท่านั้น (สุบัณฑิต และคณะ, 2548) นอกจากนี้โรค Vibriosis เป็นการติดเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอต่างๆ นอกจากเป็นปัญหาที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารให้แก่มนุษย์แล้ว การติดเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอต่างๆ ในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ ก่อให้เกิดการตายและความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างมากโดยเฉพาะอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง (ศิวาพร และคณะ, 2552) จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียสกุลวิบริโอมีอยู่อย่างน้อยประมาณ 25 ชนิด ดังนี้คือ *V. alginolyticus, V. anguillarum, V. camphelii, V. carchariae, V. cholera, V. costecola, V. damsela, V. fischer i, V. fluviaris, V. gazogenes, V. harveyii, V. logei, V. marinus, V. methnikovii, V. natriegens, V. nereis, V. nigripulchritudo, V. ordalii, V. pelagius* 1 และ 2, *V. proteus, V. parahaemolyticus, V. proteolyticus, V. proteus, V. salmonicida, V. splendidus* 1 และ 2, *V. vulnificus* และ *Vibrio spp*. (จุฑารัตน์ และมนฤทัย, 2557)

3.2 แบคทีเรียกลุ่มวิบริโอที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ แบคทีเรียกลุ่มวิบริโอเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ ที่สำคัญในสัตว์น้ำ

3.2.1 *Vibrio vulnificus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ พบในน้ำทะเลซึ่งก่อโรคในปลากุ้ง และในมนุษย์ โดยติดเชื้อรุนแรงในกระแสเลือดมีผลทำให้เสียชีวิตได้ ซึ่งสาเหตุการติดเชื้ออาจเกิดจากการบริโภคอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อน หรืออาจติดเชื้อทางบากแผลที่สัมผัสกับน้ำทะเลหรือสัมผัสกับปลา หอย หรือปูที่ติดเชื้ออยู่ *V. vulnificus* แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ Biotype 1 ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ Biotype 2 ก่อให้เกิดโรคในปลา Biotype 3 ก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและปลา (ศิวาพร และคณะ, 2552)

3.2.2 *Vibrio anguillarum* มีรูปร่างเป็นแท่งตรงหรือโค้ง ขนาด 0.5 x 1.0-2.0 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ด้วย flagella 1 เส้น ไม่เป็น acid-fast และไม่สร้างสารสีเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่มีเกลือ 1 – 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในปลาชนิดแรกที่สามารถแยกได้ในห้องปฏิบัติการโดยแยกจากปลาไหลในปี ค.ศ. 1974 *V. anguillarum* จัดเป็นแบคทีเรียตัวสำคัญที่ส่งผลให้ปลาทะเลและปลาน้ำกร่อยทั่วไปเป็นโรคโดยเฉพาะแหล่งน้ำที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งและในทะเล ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ปลาเป็นโรควิบริโอซิสถ้ามีอยู่ในตัวปลาหรือรอบๆ ตัวปลาในไม่ช้าจะทำให้เกิดโรคได้ (จุฑารัตน์ และคณะ, 2557) นอกจากนี้ *V. anguillarum*

ยังก่อให้เกิดโรคในปลาที่เกิดจากแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแกรมลบในสกุลวิบริโอ โดยจะพบว่าปลาที่ได้รับเชื้อนั้นจะมีรอยโรคที่พบ ได้แก่ การพบจุดหรือปื้นเลือดตามผิวหนังและที่เหงือกร่วมกับการพบแผลหลุมตามลำตัว นอกจากนี้ เมื่อผ่าชันสูตรโรคในปลาที่แสดงอาการป่วยหรือตาย นั้นพบว่ามีจุดเลือดออกกระจายตามอวัยวะภายใน ม้ามมีขนาดโตขยาย พบการอักเสบของทางเดินอาหารและพบภาวะโลหิตจางอันเนื่องมาจากเม็ดเลือดแดงถูกทำลายโดยสารพิษที่สร้างจากแบคทีเรีย (สิทธิชน และสุกัญญา, 2561)

3.2.3 *Vibrio harveyii* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีลักษณะเป็นแท่งตรง มีขนาดประมาณ 1.2 - 4 x 0.3 - 1.0 ไมโครเมตร สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงพีเอชกว้าง คือ 6 - 9 และอุณหภูมิ 20 - 50 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในน้ำที่มีปริมาณสารอินทรีย์มาก สร้าง lateral flagella บนอาหารแข็ง เจริญได้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลกเจลลา เป็นวิบริโอที่มีลักษณะพิเศษ คือ สามารถเรืองแสงได้ในสภาพต่างๆ เนื่องจากเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ luciferase ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ aldehyde และ flavin mononucleotide (FMNH2) ในรูป reduced ให้ได้น้ำกรดอินทรีย์และ flavin mononucleotide และ ปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปพลังงานเรืองแสง ซึ่งมีความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร มีสีเขียวแกมเหลืองออกมา ลักษณะอาการของโรคที่เกิดในกุ้งที่เรียกว่าโรคเรืองแสง กุ้งที่ป่วยจะขึ้นมาอยู่ที่บริเวณริมบ่อหรือตามผิวน้ำลำตัวมีสีเข้ม บางตัวอาจจะมีสีค่อนข้างแดง รยางค์กร่อนดำกินอาหารลดลง ตัวหลวม ตับมีสีซีดลง เซลล์เหงือกตาย เวลากลางคืนจะเห็นการเรืองแสง

3.2.4 *Vibrio parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้นหรือโค้ง มีขนาดความกว้าง 0.4 - 0.5 ไมโครเมตร และความยาว 1 - 3 ไมโครเมตร สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 - 4 เปอร์เซ็นต์โคโลนีทึบแสง จุดกลางโคโลนีสีเข้ม เชื้อเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 5 - 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเหมาะสมคือ 37.5 องศาเซลเซียส พีเอช 5 - 11 และช่วงที่เหมาะสมคือ 7.5 - 8.8 เจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน พบอาศัยอยู่ในแหล่งต่างๆ ทั้งในส่วนของสภาพแวดล้อม บริเวณชายฝั่งทะเล เขตน้ำกร่อย ตะกอนดิน รวมทั้งปลาทะเล หอยและสัตว์ในกลุ่มครัสตาเซียนใน หลายๆพื้นที่ทั่วโลก เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว *V. parahaemolyticus* สามารถสร้าง flagellum ที่มีเยื่อหุ้มขนาดใหญ่ 1 เส้น ติดอยู่กับส่วนของ outer membrane ของเซลล์เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง แบคทีเรียจะมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานหลังจากถูกถ่ายจากอาหารเหลวสู่อาหารแข็ง แบคทีเรียจะหยุดการแบ่งเซลล์และเริ่มยืดขยายตัวออกจากประมาณ 30 ไมโครเมตร เป็น 40 ไมโครเมตร พร้อมกับสร้าง flagella จำนวนมาก ซึ่งมีโครงสร้างต่างกับ polar flagellum โดยพบว่าไม่มีส่วนห่อหุ้ม เรียกว่า “lateral flagella” เรียงรายอยู่รอบเซลล์ซึ่งทำหน้าที่เคลื่อนที่บนผิวในอาหารแข็ง ในทางตรงกันข้ามเมื่อย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเหลวแบคทีเรียจะเริ่มแบ่งเซลล์พร้อมกับสร้าง lateral flagella จะหยุดลงและส่วนที่เหลือจะถูกสลัดให้หลุดออกไปในสภาพแวดล้อม

ดังกล่าว ซึ่งก่อให้เกิดโรคกุ้งตายด่วน ลักษณะอาการ พบการเสื่อมสภาพของตับและตับอ่อนอย่างเฉียบพลัน ตับกุ้งผิดปกติ ซีดขาว ฝ่อ ลีบ อาจมีจุดหรือเส้นสีดำที่ตับ ตับเหนียวบี้ด้วยนิ้วยากกว่าปกติ ลำไส้ไม่มีอาหารหรือขาดช่วง กุ้งโตช้า เฉื่อยหรือว่ายน้ำควงสว่านหรือกระโดดแล้วจมลงก้นบ่อ เนื้อมีสีขาวขุ่น เปลือกนิ่มหรือตาย หลังลอกคราบ การตายของกุ้งจะตายจมลงก้นบ่อแตกต่างจากโรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งกุ้งป่วยว่ายน้ำล่องหรือเกยขอบบ่อ

3.2.5 *Vibrio alginolyticus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอที่สามารถแยกได้จากกุ้งกุลาดำที่ป่วยเสมอและยังพบว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคกุ้งขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่ ซึ่งสามารถตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้มากในส่วนของตับ ตับอ่อนและน้ำเลือดจากตัวอย่างกุ้งที่ป่วย (จุฑารัตน์ และคณะ, 2557)

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพในห้องปฏิบัติการ คือ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญ (micro biostatic) หรือความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลชีพ (microbicidal) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสมุนไพร คือ การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพที่มีอยู่

4.1 การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ เป็นการทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อบ่งชี้ว่าแบคทีเรียก่อโรคมีความไวหรือดื้อต่อสารต้านจุลชีพใด เพื่อเป็นแนวทางสำหรับแพทย์ในการเลือกใช้สารต้านจุลชีพในการรักษาผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพ วิธีการทดสอบมีหลายรูปแบบทั้งการวิเคราะห์เชิง คุณภาพและการวิเคราะห์เชิงปริมาณ นอกจากนี้ยังให้ข้อมูลสำหรับการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาเพื่อตรวจหาการเกิดและการแพร่กระจายของสายพันธุ์แบคทีเรียที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะหรือปัจจัยความต้านทานในสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ

4.2 Minimal Inhibitory Concentration (MIC) เป็นการหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หน่วยที่ใช้โดยทั่วไป คือ ไมโครกรัม (µg) ต่อมิลลิลิตร (ml) หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อมิลลิลิตร ค่า MIC นี้ สามารถนำมาใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อหนึ่งๆ ต่อยาต้านจุลชีพหลายๆ ชนิดหรือความไวของเชื้อหลายๆ ชนิดต่อยาหนึ่งๆ และรวมทั้งเพื่อประเมินค่าอื่นที่เกี่ยวข้องกับยาหรือแปรผลของยาต่อเชื้อ ในการทดสอบเพื่อหาค่า MIC ยาควรได้รับการเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงทุก 2 เท่าไปเรื่อยๆ (2-fold serial dilution) (ณัฏฐิณี และคณะ, 2561)

4.3 Minimum Bactericidal Concentration (MBC) เป็นการหาปริมาณยาต่ำสุดจากหลอดทดลองที่นำมาเพาะเชื้อต่อใน agar plate ที่ไม่มียาต้านจุลชีพแล้วสามารถป้องกันไม่ให้เกิด

การเจริญของเชื้อได้ หยดอาหารที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจากการหาค่า MIC ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) โดยใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำไปเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดลองค่า MBC โดยบันทึกค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ คือ ไม่มีโคโลนีของเชื้อของอาหาร NA ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เพื่อ ยืนยันผลการทดลอง (มณฑล, 2562)

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อในห้องปฏิบัติการ ปัจจุบันมีการวิจัยและพัฒนายาต้านจุลชีพจากแหล่งต่างๆ เพิ่มมากขึ้น การตรวจสอบคุณภาพของยาต้านจุลชีพด้วยวิธี Bioassay ได้แก่ disk-diffusion, well diffusion และ broth หรือ agar dilution ก็ยังเป็นวิธีที่นิยม ส่วนวิธีอื่นๆ ที่ใช้กัน ได้แก่ flow cytofluorometric และ bioluminescent ซึ่งแต่ละวิธีจะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน Diffusion method ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย ประหยัด และสามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก ซึ่งได้แก่ Agar disk-diffusion, Antimicrobial gradient method (Etest), Agar well diffusion method, Agar plug diffusion method, Cross streak method และ Poisoned food method. Agar disk-diffusion จัดเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง (วลัยลักษณ์, 2559)

4.4.1 Dilution Susceptibility Test การทดสอบ MIC การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี dilution test จะเป็นการทดสอบในเชิงปริมาณเพราะสามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ทำลายเชื้อได้ นิยมใช้ทดสอบเชื้อที่เจริญได้ช้า หลักการโดยทั่วไปของวิธีทดสอบแบบ broth และ agar dilution susceptibility test จะคล้ายคลึงกัน คือ จะเจือจางสารสกัดสมุนไพรใน medium ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นจึงใส่เชื้อลงในบน medium ที่มีสมุนไพรภายหลังการบ่มเพาะให้ดูค่า MIC ทั้งนี้ โดยสังเกตความขุ่นหรือใสของ broth และมีหรือไม่มีเชื้อเจริญขึ้นบน agar Broth dilution test เป็นการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสมุนไพรที่ละเอียดวิธีหนึ่ง การทดสอบนี้จะทำให้ทราบทั้ง MIC และ MBC ของสมุนไพรนั้นๆ กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ

4.4.2 Broth dilution test การทดสอบนี้จะทำให้ทราบทั้ง MIC และ MBC ของสารต้านจุลชีพนั้นๆ กับเชื้อจุลชีพที่ทำการทดสอบ หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้คือ เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีสารสารต้านจุลชีพในปริมาณต่างๆ กันผสมอยู่และสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ

1) การทำ broth dilution test วิธีการนี้ยังสามารถแบ่งเป็น macro dilution (หรือtube) test และ micro dilution test broth macro dilution test จะทำในหลอดทดลอง โดยทำการเจือจางสารสกัดสมุนไพร stock solution ด้วยตัวเจือจางหรือด้วย broth ในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution) ไปเรื่อยๆ ปริมาตรสุดท้ายที่อยู่ในหลอด เท่ากับ 0.5 มิลลิตร และต้องมีหลอดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร เตรียมเชื้อที่ทดสอบให้ได้ขนาดโดยอาจจะ

ใช้วิธีเทียบ 10 ความขุ่นกับ McFarland เบอร์ 0.5 หรืออาจใช้การวัดความขุ่นด้วย spectrophotometer แล้วเจือจางลงเพื่อให้ได้ขนาดเชื้อที่ต้องการ

2) การทำ broth macro dilution test จะทำในหลอดทดลอง โดยทำการเจือจางสารต้านจุลชีพ stock solution ด้วยตัวเจือจางหรือด้วย broth ในลักษณะลดลงทุก 2 เท่าไปเรื่อยๆ (2-fold serial dilution) ปริมาตรสุดท้ายที่อยู่ในหลอดเท่ากับ 0.5 มิลลิตร และต้องมีหลอดควบคุมที่ไม่มีสารต้านจุลชีพ เตรียมเชื้อที่ทดสอบให้ได้ขนาด โดยอาจใช้วิธีเทียบ 10 ความขุ่นกับ McFarland เบอร์ 0.5 หรืออาจใช้การวัดความขุ่นด้วย spectrophotometer แล้วเจือจางลงเพื่อให้ได้ขนาดเชื้อที่ต้องการ

3) broth micro dilution test ทำใน micro titer plate 96-well โดยเจือจาง stock solution ด้วย broth แบบ 2- fold serial dilution มีหลุมควบคุมเป็น broth ที่ไม่มีสารต้านจุลชีพในแต่ละหลุมจะมีปริมาตรเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เชื้อที่ปรับขนาดแล้ว (ใช้เชื้อประมาณ 105 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วปิดฝาก่อนนำไปบ่มเพาะ อ่านค่า MIC โดยดูความขุ่นด้วยตาเปล่าหรืออาจใช้สารบางอย่างที่สามารถบ่งชี้การเจริญของเชื้อได้เพื่อให้อ่านค่าได้ง่ายขึ้น

4.5 Agar dilution test เป็นการทดสอบความไวของเชื้อแบบปริมาณวิเคราะห์ โดยมีหลักการทดสอบคล้ายคลึงกับ Broth dilution method ต่างกันเพียงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น กล่าวคือทำการทดสอบ โดยการเจือจางสารทดสอบในอาหารวุ้นและถ่ายเชื้อลงบนผิวของอาหารวุ้น ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานเดียวกันได้

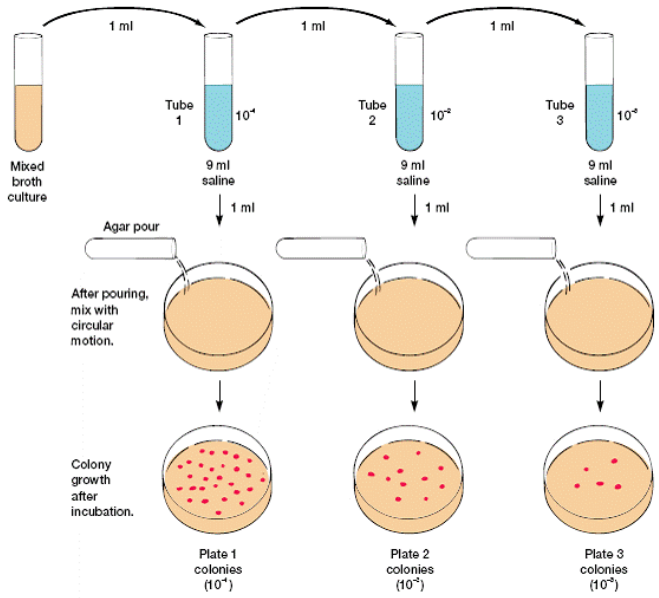
1) การทำ agar dilution test นำ stock solution มาเจือจางด้วยน้ำหรือตัวเจือจางที่เหมาะสมจนได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ แล้วจึงใส่ใน agar medium ซึ่งหลอมไว้ (45 - 50 องศาเซลเซียส) การเตรียมขนาดเชื้อด้วยวิธีการเดียวกับที่ทำใน broth dilution test แต่เจือจางขนาดเชื้อลง ซึ่งเมื่อแตะลงบน agar แล้วให้ได้เชื้อประมาณ 1 × 104 ตัวต่อจุด เมื่อแตะเชื้อลงบน agar ทดสอบแล้วต้องทิ้งให้ซึมหมดก่อนคว่ำ plate นำไปบ่มที่ 35 - 37 องศาเซลเซียส นาน 16- 20 ชั่วโมง (เชื้อที่เจริญช้าอาจให้นานมากกว่า 48 ชั่วโมง) แล้วอ่านค่า MIC ที่ความเข้มข้นที่จะต้องไม่มีเชื้อขึ้นเลย

2) Disc diffusion method (Kirby-Bauer) เป็นวิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุดเนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ ไม่อาจทราบค่า MIC ได้ ไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญช้าและเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ หลักการทั่วไปคือ การทำให้สารต้านจุลชีพที่มีในแผ่น paper disc ที่เตรียมไว้ก่อนซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อในจำนวนที่เหมาะสมไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งจะเห็น

เป็นวงใสไม่มีโคโลนีเชื้อรอบแผ่น disc ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแปรตามขนาดของ inhibition zone วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบสารต้านจุลชีพเพียงความเข้มข้นเดียวและใช้เป็นการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารต้านจุลชีพ เช่น ยา หรือสมุนไพรในเบื้องต้นนอกจากขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณวงใสที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบแล้ว ยังอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารต้านจุลชีพ ความสามารถในการละลายหรือซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรด-ด่าง และ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อ สำหรับแหล่งรองรับสมุนไพรที่ใช้มักใช้เป็นกระดาษซับวงกลม หรืออาจเรียกว่า dish sensitivity test หรืออาจเป็นหลุมที่เจาะลงในเนื้อ agar

3) Disc diffusion test และ Hole–plate diffusion เป็นการเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบโดยเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว วัดความขุ่นของเชื้อเพื่อให้ได้จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมกับการทดสอบแล้ว spread เชื้อบน Mueller-Hinton agar ให้ทั่ว จุ่มกระดาษกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ในสารละลายสารต้านจุลชีพและวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อควรทำกลุ่มควบคุม คือ กระดาษกรองปลอดเชื้อที่จุ่มในตัวทำละลายสารต้านจุลชีพหรืออาจใช้วิธีการเจาะหลุม (hole – plate diffusion) (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) แล้วหยดสารละลายสารต้านจุลชีพลงไปประมาณ 40 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มเพาะเชื้อนาน 24 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมการแปรผลของวิธีนี้จะสามารถบอกได้เพียงว่าสารต้านจุลชีพที่ความเข้มข้นนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากหรือน้อยตามขนาดของบริเวณใสเท่านั้นและอาจใช้การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เกิดจากยาปฏิชีวนะมาตรฐานก็ได้ (ณัฏฐิณี และคณะ, 2561)

5. การเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution)



ภาพที่ 5 วิธีการเจือจาง 10 เท่า

ที่มา : Food Network Solution (2564)

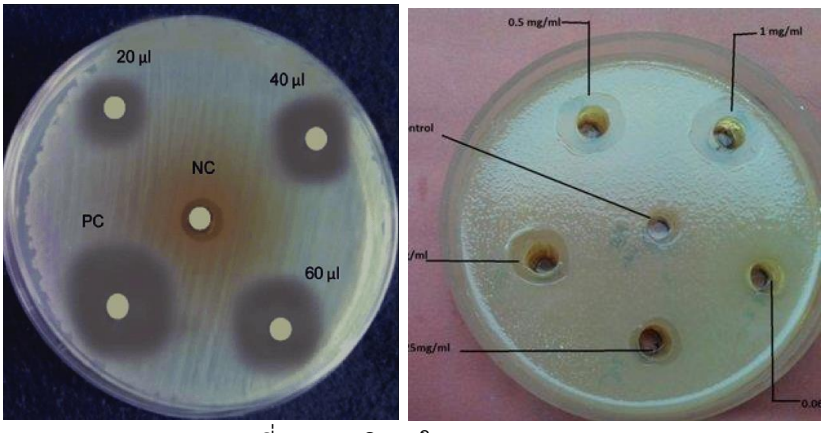
เป็นการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น เพื่อการนับจำนวนจุลินทรีย์ (microbial population count) ให้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture media) มีจำนวนเซลล์ระหว่าง 25 - 250 เซลล์ ไม่มากหรือน้อยเกินไปโดยทั่วไปทำเป็นลำดับๆ ละ 10 เท่า

5.1 วิธีการเตรียมน้ำยา stock solution โดยละลาย potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) จำนวน 34 กรัม ในน้ำกลั่นปรับค่าพีเอชที่ 7.2 ด้วย NaOH แล้วเติมน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร วิธีการเตรียม buffered blanks นำ stock solutionจำนวน 1 มิลลิลิตร บรรจุขวด ขวดละ 900 มิลลิลิตร อุดด้วยจุกยาง นึ่งใน autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (พิมพ์เพ็ญ, 2564)

5.2 การเจือจาง 10 เท่า (Tenfold serial dilution) เจือจางแบคทีเรียสกุลวิบริโอที่ต้องการทำการทดลอง โดยทำ 1 ครั้งเท่ากับเจือจางไป 10 เท่า (ยกกำลัง -1) ทำไปเรื่อยๆ ทีละ 10 เท่า ก็ยกกำลัง -2, -3 ไปเรื่อยๆ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการจะทำการทดลอง สารละลายที่ใช้ในการเจือจาง Nutrient Broth 0.85 percent, NaCl, Peptone water เป็นต้น ตัวอย่างเช่น ดูดเชื้อตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่สารละลาย 90 มิลลิลิตร เท่ากับเจือจางไป 10 เท่า และหากต้องการจะเจือจางอีกให้ทำซ้ำอีกจนกว่าจะได้ความเข้มข้นที่ต้องการ (การแยกเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์และการเก็บรักษา, 2564)

6. การทดสอบการเกิดรัศมีการยับยั้งเชื้อ (Halo test) หรือ วงใส (Clear zone)

การทดสอบการเกิดรัศมีการยับยั้งเชื้อ คือ การสังเกตบริเวณที่จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้รอบชิ้นงานทดสอบหรือเรียกว่า การเกิดบริเวณใส (Clear zone) โดยทั่วไป การทดสอบนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการแพร่ของสารยับยั้งเชื้อบนวุ้นอาหารหรือภายในวัสดุที่ผสมสารยับยั้งเชื้ออยู่ซึ่งถือเป็นวิธีการทดสอบเชิงคุณภาพ อย่างไรก็ตาม ขนาดของบริเวณใสสามารถถูกนำมาใช้เพื่อรายงานผลในเชิงปริมาณได้โดยอาศัยสมการที่ 1 สำหรับขั้นตอนการทดสอบเริ่มจากการนำเชื้อแบคทีเรียทดสอบเข้มข้ม 106 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เกลี่ยให้สม่ำเสมอบนวุ้นอาหารจาน Petri dish จากนั้นวางชิ้นงานทดสอบในตำแหน่งที่กำหนดไว้แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการสังเกตและบันทึกรัศมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยใช้จำนวนตัวอย่างในการทดสอบอย่างน้อย 2 ตัวอย่าง (อภิสิทธิ์ และคณะ, 2553) กล่าวคือ วงใส (Clear zone) หมายถึง บริเวณใสรอบแผ่นชุบตัวยา ซึ่งแสดงถึงบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญ การวัดขนาดของ clear zone (มิลลิเมตร) จะวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น (ณัฐภัทร และคณะ, 2554)



ภาพที่ 6 การเกิดวงใส (Clear Zone)

ที่มา : ResearchGate (2562)

7. การควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา นับว่ามีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการที่จะได้มาซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ ซึ่งการควบคุมคุณภาพเริ่มตั้งแต่เครื่องมือต่างๆ ที่ใช้รวมถึงคุณภาพของน้ำและสารเคมีต่างๆ และเมื่อผ่านกระบวนการเตรียมแล้ว ยังต้องมีการควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้ออีก 2 ขั้นตอน คือ

7.1 ควบคุมด้านการปลอดเชื้อปนเปื้อน (Sterility check) จะทำการทดสอบโดยสุ่มตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเตรียมจำนวน 100 หน่วย และสุ่มตัวอย่างสูงสุด 10 หน่วย เมื่อเตรียมจำนวนมากกว่านี้ โดยนำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วไป incubate ไว้ ตรวจดูการเจริญเติบโตของเชื้อที่ contaminate

7.2 การทดสอบความถูกต้องของคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นๆ เป็นการทดสอบคุณสมบัติของอาหารแต่ละชนิด โดยใช้เชื้อสายพันธุ์มาตราฐาน เมื่อห้องปฏิบัติการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเสร็จแล้วต้องทำการควบคุมคุณภาพ โดยดูการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารแต่ละชนิดนั้น เช่น ใช้เชื้อสายพันธุ์มาตราฐาน ตลอดจนการให้ผลปฏิกิริยาในการทดสอบทางชีวเคมีชนิดต่างๆ โดยใช้ทั้งเชื้อสายพันธุ์ที่ให้ผลบวก และสายพันธุ์ที่ให้ผลลบ มาทำการทดสอบแต่ละครั้ง

หลักการควบคุมคุณภาพอาหารเพาะเชื้อ ให้จัดทำบันทึกคุณสมบัติของอาหารเพาะเชื้อแต่ละชนิดดังนี้

1) ลักษณะทางกายภาพ (physical appearance)

- ถ้าขุ่นหรือมีตะกอน แสดงว่ามีส่วนประกอบบางอย่างในอาหารเพาะเชื้อที่ไม่สามารถละลายน้ำ

- สีเปลี่ยนจากที่ควรจะเป็น เช่น สีเข้มขึ้น อาจเกิดจากใช้ความร้อนมากเกินไป หรือใช้อุณหภูมิของเครื่องนึ่งไอน้ำแรงดันสูงถูกต้อง แต่เวลานานเกินไป

- เตรียมอาหารเพราะเชื้อแล้วเก็บไว้นานเกินไป ทำให้เกิดการแห้ง ซึ่งไม่เหมาะสมกับการใช้งาน ดังนั้นการเตรียมอาหารเพาะเชื้อแต่ละครั้ง ควรมีจำนวนเพลทหรือปริมาณพอเหมาะ ถ้าต้องการเก็บไว้ใช้งานนาน ควรเก็บใส่ถุงพลาสติกแล้วผูกปากถุงให้แน่น

2) ภาวะไร้เชื้อก่อนนำมาใช้งาน ทำการทดสอบ โดยการนำอาหารเพาะเชื้อไปอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

การควบคุมอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อมี 2 ชนิด คือ ชนิดสำเร็จรูป (commercially prepared media) และชนิดเตรียมขึ้นใช้เอง (user-prepared media และ nonexempt commercially prepared media) นอกเหนือจากเอกสารที่แสดงวันเดือนปีที่ผลิต และหมดอายุ Lot number ของการผลิตแล้ว จะต้องมีเอกสารจากทางบริษัทผู้ผลิตที่ระบุว่าอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นๆ ได้ผ่านการตรวจสอบคุณภาพ โดยเชื้อมาตราฐานที่เหมาะสมในการทดสอบหรือดำเนินการตามมาตราฐานของ Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) หมายเลขเอกสาร M 22-A ซึ่งในกรณีนี้ อาจอนุโลมยกเว้นการสุ่มทดสอบ sterility test โดยทดสอบเพียงคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อตามคุณสมบัติ

8. การสกัดสาร

การสกัดสารสำคัญนั้นมีหลายวิธี เช่น วิธีการหมัก (marceration) วิธีการหมักแบบต่อเนื่อง (percolation) การสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ความร้อน (soxhlet extraction) การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction) การสกัดน้ำมันหอมระเหย (extraction of volatile oil) เป็นต้น ในการเลือกว่าจะใช้วิธีการใดนั้นต้องพิจารณาจากจุดประสงค์ของเราว่าต้องการให้ได้สารสกัดที่สมบูรณ์หรือเกือบสมบูรณ์ เช่น หากต้องการสารสกัดเจือจางอาจใช้วิธีการหมักก็เพียงพอ นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาจากคุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด ตลอดจนความพร้อมของอุปกรณ์และเครื่องมือที่มีอยู่เพราะแต่ละวิธีการสกัดนั้นจะมีข้อดี ข้อเสียรวมถึงวิธีการที่แตกต่างกันซึ่งจำเป็นต้องศึกษาการสกัดของแต่ละวิธีและเลือกให้เหมาะสมกับสิ่งที่เราต้องการ (ศิริวัลย์, 2564) นอกจากนี้การสกัดสารด้วยตัวทำละลายเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีประโยชน์มากในเคมีอินทรีย์สำหรับแยกสารและทำให้สารบริสุทธิ์ เช่น การสกัดสารประกอบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ การสกัดแยกสารที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกจากของผสมในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ต่างๆ หลักการของการสกัดจะเป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากของผสม การสกัดสามารถทำได้หลากหลายวิธี ดังนี้

8.1 การสกัดสารจากของเหลว (Liquid-Liquid Extraction) การสกัดของเหลวด้วยของเหลว เกี่ยวข้องกับการกระจายของสารระหว่างตัวทำละลายสองชนิด ซึ่งมีอัตราส่วนคงที่ที่อุณหภูมิหนึ่ง เครื่องมือวิเคราะห์อย่างง่ายที่นิยมใช้สกัดของเหลวจากของเหลวคือ กรวยแยก วิธีการสกัดจะทำได้โดยใส่สารที่ต้องการแยกลงไปก่อน แล้วเติมตัวทำละลายที่ต้องการตามลงไป ปิดจุกเขย่าเพื่อให้ตัวทำละลายทั้งสองมีพื้นที่ผิวสัมผัสกันให้มากที่สุด วิธีการจับกรวยแยกและเขย่า เมื่อเขย่าจะมีความดันสูงขึ้นซึ่งเกิดจากตัวทำละลายกลายเป็นไอขึ้นมาทำให้ต้องลดความดันออกบ้าง ทำได้โดยหงายกรวยแยกขึ้นและเปิดก๊อกที่ปลายออก การสกัดบางชนิด ถ้าเขย่ารุนแรงจะเกิดอิมัลชันทำการแยกชั้นออกจากกันได้ยาก การสกัดจะต้องเขย่าเบาๆ หรือแกว่งแบบวน ซึ่งตัวทำละลายทั้งสองจะเกิดการผสมกันทำให้มีการกระจายตัวของสารในตัวทำละลายทั้งสองเกิดขึ้น เมื่อตั้งกรวยในแนวตั้งและเปิดจุกตัวทำละลายทั้งสองจะแยกชั้นกัน ทำให้สารแต่ละชั้นออกจากกันได้ การสกัดเพื่อให้ได้สารออกมามากที่สุดมักทำซ้ำได้อีก เมื่อนำชั้นที่สกัดมารวมกันและละเหยตัวทำละลายออกจะได้สารที่ต้องการ

8.2 การสกัดสารจากของแข็ง (Solid - Liquid Extraction) สารผสมที่เป็นของแข็งมีเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทั้งที่เป็นพืชที่เป็นสัตว์ การสกัดโดยทั่วไปจะกำจัดน้ำออกก่อนแล้วจึงบดให้ละเอียด เพื่อทำให้มีพื้นที่ผิวมากซึ่งสกัดออกมาได้มากที่สุด จากนั้นจึงนำไปแช่ในตัวทำละลายที่อุณหภูมิปกติ หรือต้มที่อุณหภูมิของจุดเดือดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด เมื่อแช่หรือต้มในระยะหนึ่งจึงกรองเอาของแข็งออกและนำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกจะได้

สารสกัดขั้นต้นของแข็งที่เหลืออาจนำไปสกัดต่ออีกในกรณีที่สกัดขั้นแรกด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเมื่อสกัดต่อจะต้องใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูง วิธีนี้จะทำให้ได้สารสกัดขั้นต้นมีสารผสมต่างชนิดกันและเมื่อนำไปแยกต่อจะได้สารบริสุทธิ์การสกัดสารโดยต้มกับตัวทำละลายนั้น วิธีที่นิยมใช้มากคือ การสกัดแบบต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า เครื่องสกัดแบบซอกห์เล็ท

8.3 การสกัดสารด้วยกรด - เบส (Acid - Base Extraction) การสกัดด้วยกรด - เบส เป็นการใช้ปฏิกิริยาของกรด - เบส เพื่อแยกสารอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นกรดและเป็นเบสออกจากกัน การที่จะเลือกใช้วิธีการสกัดแบบใดนั้นจะพิจารณาทั้งคุณสมบัติและปริมาณของสารที่ต้องการสกัด รวมทั้งตัวทำละลายที่ใช้ให้เหมาะสม เพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ในปริมาณมากที่สุดโดยใช้ตัวทำละลายน้อยที่สุด (การสกัดสาร, 2564)

8.4 การสกัดด้วยไอน้ำ จะใช้หลักการให้ไอน้ำพาสารที่เราต้องการออกมา โดยสารนั้นควรมีจุดเดือดต่ำ ระเหยง่าย และไม่ละลายน้ำ แต่ถ้าเป็นสารที่มีจุดเดือดสูงจะอาศัยการเปลี่ยนแปลงของความดันเข้ามาช่วยเพื่อให้สารนั้นกลายเป็นไอได้โดยยังไม่ถึงจุดเดือดปกติของสาร โดยส่วนมากจะใช้ในการสกัดพวกน้ำมันหอมระเหยจากพืช

8.5 การสกัดด้วยตัวทำละลาย การสกัดด้วยตัวทำละลายจะใช้หลักการที่ว่าสารแต่ละชนิดมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกันได้ไม่เท่ากัน เช่น เรามีสารสองชนิดคือ a และ b ปนกันอยู่แต่ a ก็จะละลายได้ดีในเฮกเซนและ b ไม่ละลายในเฮกเซน ดังนั้น เมื่อเทเฮกเซนลงไป a ก็จะละลายแต่ b จะไม่ละลาย ซึ่งถ้าเป็นของแข็งกับของเหลวก็ให้เรานำไปกรองต่อแต่ถ้าเป็นของเหลวกับของเหลวก็ให้ใช้กรวยแยกในการแยกต่อไปหรือถ้าตัวทำละลายระเหยได้ง่ายให้นำไประเหยตัวทำละลายออก (E-Chemistry, 2564)

8.6 การสกัดโดยการต้ม สารสกัดที่ได้จากวิธีการต้มนี้อาจเรียกว่า สารสกัดน้ำ หรือน้ำสกัด มีขั้นตอนดังนี้

1) ให้ชั่งสมุนไพรสด หรือแห้ง ย่อยสมุนไพรให้มีขนาดเล็กพอประมาณห้ามบดละเอียด

2) เติมน้ำ 3 - 5 เท่า ของน้ำหนัก ถ้าเป็นสมุนไพรสดจะใช้น้อยกว่า โดยให้น้ำท่วมสูงเกินสมุนไพรประมาณ 5 นิ้ว จดบันทึกน้ำหนักของน้ำที่ใช้ ถ้าเป็นสมุนไพรแห้งให้แช่ในน้ำ 20 นาที ก่อนนำขึ้นตั้งไฟปานกลางจนเดือด จับเวลาเมื่อเริ่มเดือด ใช้เวลาประมาณ 30 - 45 นาที หากน้ำแห้งให้เติมน้ำเข้าไปได้ เมื่อสีน้ำสกัดไม่เข้มจากเดิมให้ยกลงกรองด้วยผ้าขาวบาง 3 ชั้น

3) นำกากมาต้มซ้ำเช่นเดิมและรวมน้ำสกัด 2 ครั้ง เข้าด้วยกัน ตั้งไฟเคี่ยวต่อจนได้น้ำหนักที่ต้องการ การเคี่ยวอาจไม่ใช้ไฟตรง เพื่อหลีกเลี่ยงการไหม้ ส่วนใหญ่จะนิยมให้น้ำหนักน้ำสกัดเท่ากับน้ำหนักสมุนไพรที่นำมาสกัด เช่น สมุนไพร 1 กิโลกรัม เมื่อสกัดเสร็จแล้วได้น้ำสกัด 1 กิโลกรัม ซึ่งง่ายต่อการคำนวณสัดส่วน

ข้อเสียของการต้ม กรณีที่จะเตรียมเก็บไว้นานๆอาจมีเชื้อแบคทีเรียหรือราทำให้บูดเน่าเสียได้ง่ายสามารถแก้ไขได้ 2 วิธี คือ เติมสารกันเสีย หรือเคี่ยวให้เข้มข้นมากที่สุดเท่าที่จะทำได้

8.7 การสกัดโดยการคั้นน้ำสด สารสกัดที่ได้อาจเรียกว่า น้ำสกัด หรือน้ำคั้น และต้องใช้สมุนไพรสด บีบเอาแต่น้ำซึ่งเหมาะสมกับสมุนไพรที่ทนความร้อนไม่ได้ ซึ่งมีวิธีการเตรียมแยกเป็น 2 วิธี เลือกใช้ตามความเหมาะสม

1) น้ำคั้นผลไม้ น้ำคั้นผลส้ม น้ำคั้นผลมะเฟือง วิธีทำ ล้างทำความสะอาดผิวด้านนอกของผลไม้ ผ่าออก จากนั้นบีบหรือปั่นด้วยเครื่อง

2) น้ำคั้นใบหรือเหง้า เช่น ขมิ้น วิธีทำ ปั่นสมุนไพรสดกับน้ำจำนวนครึ่งเท่าของน้ำหนักสมุนไพร ในเครื่องปั่นน้ำผลไม้ กรอง ด้วยผ้าขาวบาง

ข้อเสีย การสกัดแบบนี้สารสกัดสมุนไพรไม่ค่อยคงตัว มักต้องใช้สารกันบูด

8.8 การสกัดโดยการเคี่ยวในน้ำมันหรือการหุงน้ำมัน น้ำมันที่ใช้ควรเป็นน้ำมันปาล์มหรือน้ำมันมะพร้าว สัดส่วนสมุนไพรที่ใช้ให้ใช้สมุนไพรสดหรือแห้ง 1 - 2 เท่า ของน้ำหนักน้ำมันพืช มีขั้นตอนดังนี้

1) ชั่งน้ำหนักสมุนไพร

2) ชั่งน้ำหนักน้ำมันพืช

3) ยกขึ้นตั้งไฟปานกลาง จากนั้นเมื่อน้ำมันพืชร้อนประมาณ 100 - 150 องศาเซลเซียส ใส่สมุนไพรลงไปที่ละน้อย ทอดจนกรอบตักกากสมุนไพรทิ้ง และเติมลงไปที่ละน้อยทำซ้ำจนหมด

4) กรองน้ำมันพืชด้วยผ้าขาวบาง 3 ชั้น จึงนำน้ำมันไปใช้

8.9 การสกัดด้วยแอลกฮอล์ ตัวทำละลายที่ใช้ คือ เอทิลแอลกอฮอล์ เป็นการสกัดที่ได้สารเคมีจากพืชในปริมาณมากที่สุด แต่มีข้อเสีย คือ ได้สารที่ไม่ต้องการติดมาด้วยและในการทำให้เข้มข้นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง จึงเหมาะสมสำหรับการสกัดในระดับอุตสาหกรรมเท่านั้น การสกัดด้วยแอลกอฮอล์มีหลายวิธี ได้แก่ การหมัก (Maceration) การสกัดแบบต่อเนื่อง และการสกัดแบบชง (โดยใช้ Percolator) ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะวิธีแรกเท่านั้น

การหมัก (Maceration) เหมาะสำหรับสารที่ไม่ทนต่อความร้อน ตัวอย่างเช่น การสกัดพญายอ การสกัดยานอนหลับ จากใบขี้เหล็ก หรือยาดองเหล้าของไทยเกือบทุกชนิด นิยมใช้กับถังหมักคล้าย คูลเลอร์ มีก๊อกไขเอาสารละลายออก และเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ มีวิธีทำดังนี้

1) นำสมุนไพรที่จะใช้มาใส่ในถุงผ้าจากนั้นนำไปชั่งให้ได้ปริมาณที่ต้องการใช้โดยหักน้ำหนักของผ้าออกไปด้วยแล้วนำไปทำหั่นหรือบดให้เล็กลง

2) นำสมุนไพรที่ชั่งแล้วไปล้างทำความสะอาดและนำไปแช่แอลกอฮอล์ในปริมาณ 2 - 3 เท่าตัว ในภาชนะปิดสนิททิ้งไว้ 7 วัน และคนทุกวันเพื่อให้แอลกอฮอล์เข้าถึงทุกสัดส่วนของสมุนไพร

3) ใช้ผ้าขาวบางมากรองเอาส่วนน้ำบีบสารละลายออกจากกาก เอาน้ำที่กรองแล้วมากรองซ้ำ กรองซ้ำวนไป 3 ครั้งเพื่อป้องกันกากหลงเหลือของกากสมุนไพร

4) เติมสารละลายหรือน้ำกลั่นเพื่อล้างกากสมุนไพร และทำซ้ำอีกครั้ง คือ การเอากากสมุนไพรไปแช่แอลกอฮอล์ในปริมาณ 2 - 3 เท่าตัว ในภาชนะปิดสนิททิ้งไว้ 7 วัน และคนทุกวัน เป็นการหมักซ้ำ เพื่อให้ได้สารสกัดมากที่สุด

5) เอาสารสกัดทั้ง 2 ครั้งมารวมกัน นำไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ เพื่อป้องกันการเกิดอันตรายต่อคนทำงานและป้องกันการทำลายสิ่งแวดล้อม ห้ามนำไปทำให้เข้มข้นด้วยการตั้งไฟตรงหรือตุ๋นในลัง ถัง หรือเครื่องไอน้ำเพราะแอลกอฮอล์ที่ระเหยออกมาขณะทำงานจะกระจายในอากาศบริเวณนั้นซึ่งเป็นอันตรายต่อร่างกายมนุษย์

8.10 การสกัดเย็น การสกัดเย็นคือการแยกส่วนของน้ำมันออกมาจากส่วนต่างๆ ของพืช โดยการบีบอัดที่อุณภูมิปกติโดยพืชที่นำมาสกัดเย็นจะต้องไม่ผ่านความร้อนหรือสารเคมีมาก่อนแล้วตั้งทิ้งไว้จนตกตะกอน จากนั้นจึงกรองเอาเฉพาะส่วนของน้ำมันที่บริสุทธิ์มาใช้น้ำมันที่ได้จะใส สะอาด ไม่มีกลิ่นหืน และยังคงสภาพวิตามินต่างๆ ตามธรรมชาติไว้อย่างครบถ้วน (สวทช., 2554)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แก้วตา และคณะ (2559) ได้ทำการศึกษาเรื่องผลของสารสกัดกระเทียมต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus และ Vibrio harveyi* ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดกระเทียมในทุกระดับความเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* ที่ระดับความเข้มข้น 3.13 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดกระเทียมที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* ได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาเรื่องผลของสมุนไพรบางชนิดต่อกรีการีน (ไลค) เชื้อรา และแบคทีเรียกลุ่ม Vibrio ในกลุ่มกุ้งขาวแวนนาไม (*Penaeus vannamei*, Boone 1931) ผลการศึกษาพบว่า กระเทียมสดมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อดีที่สุด ต่อด้วยข่า และเปลือกมังคุด ตามลำดับ (ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และคณะ, 2564)

ชุติมา และคณะ (2550) ได้ทำการศึกษาเรื่องประสิทธิภาพของสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่แยกได้จากกุ้งทะเล โดยทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทย 3 ชนิด ได้แก่ ข่า กระวาน กระชาย ในการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอ. ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากข่าสามารถยับยั้งได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดจากกระวาน และกระชาย ไม่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรีย และเมื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (MBC) มีค่าเท่ากับ 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของการันต์ (2549) ได้ทำการศึกษาเรื่องฤทธิ์ของสารสกัดข่าต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli* ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของไก่

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดข่าที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลดีที่สุด และงานวิจัยในข้างต้นยังเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของอนันต์ และคณะ (2562) การศึกษาเรื่องคุณสมบัติต้านการอักเสบและความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพร ในกลุ่มที่รักษาเบาหวาน ในการศึกษาได้นำเหง้าข่าสด และกากของเหง้าข่าสด หลังจากคั้นน้ำ ผลการศึกษาพบว่าสกัดด้วยตัวทำละลาย 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล สามารถยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจเพาะเลี้ยงชนิด RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Ic50) ที่ความเข้มข้น 10.8 ± 1.15 และ 9.0 ± 2.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อีกทั้งสารสกัดดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติเพาะเลี้ยงชนิด Vero อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเชื้อซึ่งเป็นการศึกษาเรื่องประสิทธิภาพของสารสกัดข่าในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคผิวหนังในสัตว์ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดข่าจากโคลโรฟอร์มดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารละลายอีก 2 ชนิด คือ เอทิลอะซีเตทและเมทานอล (ไฉน และคณะ, 2556)

อภิชาติ และคณะ, (2560) ได้ทำการศึกษาเรื่องผลของสารสกัดจากใบชะครามในอาหารต่อการเติบโตและต้านทานเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในการอนุบาลกุ้งขาวแวนาไม ผลการศึกษาพบว่า ใบชะครามที่สกัดด้วยน้ำกลั่นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาเป็นเอทานอลและปีโตรเลียมอีเทอร์ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนอัตรารอดของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากใบชะครามสูตรต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเสริมสารสกัดจากใบชะครามในอาหาร 50 กรัมต่อกิโลกรัม อาหารส่งเสริมให้มีการเติบโตและสามารถต้านทานเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ดี และพบงานวิจัยที่ทำการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอ โดยการศึกษาเรื่องฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากตำรับยาเขียว 2 ชนิดต่อการต้านเชื้อก่อโรคกุ้ง จากการทดสอบโดยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบยาเขียวตำรับที่ 2 โดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila, Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด (มลธิรา และคณะ, 2559)

พัชรา และคณะ (2557) ได้ศึกษาเรื่องผลของสารสกัดจากเปลือกส้มโอต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi และ Vibrio parahaemolyticus* โดยศึกษาที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ ระดับความเข้มข้นสารสกัด 100 เปอร์เซ็น และ กลุ่มที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนความเข้มข้น 1:1 1:2 1:4 และ 1:6 ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสมีขนาดเท่ากับ 2.10, 1.67, 1.50 และ 1.53 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางในทุกระดับความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ส่วนสารสกัดจากเปลือกส้มโอด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไม่พบการเกิดวงใสในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด

นันทนัช และคณะ (2557) ได้ทำการศึกษาเรื่องผลของสารสกัดจากใบชาเขียวต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Penaeus vannamei*) ระยะ PL19 โดยสกัดใบชา 3 วิธี คือ การต้มใบชา 5 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร นาน 10 นาที การแช่ใบชา 10 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ในน้ำอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และการแช่ใบชา 10 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ในน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่าสารสกัดใบชาที่สกัดได้ทั้ง 3 วิธี สามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในห้องปฏิบัติการได้

ธีนิดา และคณะ (2562) ได้ทำการศึกษาเรื่องการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดหยาบจากหงอนไก่ฝรั่ง ด้วยวิธี agar dilution ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากใบหงอนไก่ฝรั่งที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์มีความสามารถในการต้านเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ($p<0.05$) โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใสเท่ากับ 9.23 ± 0.64 มิลลิเมตร ซึ่งเชื่อมโยงกับงานวิจัยของชนากานต์ และคณะ (2563) ที่ได้ทำการศึกษาเรื่องประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยบางชนิดต่อการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* โดยศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดใบของต้นฝรั่ง ผักติ้ว ผักแพว และเถาของบอระเพ็ด ด้วยวิธี agar disc diffusion ผลการศึกษาพบว่า การสกัดโดยใช้เมทานอลให้ผลผลิตของสารสกัดจากพืชทุกชนิดมีค่ามากที่สุด รองลงมาคือเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ และ เอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความมีขั้วพบว่า เอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความเป็นขั้วของตัวทำละลายจากมากไปน้อยคือ เอธานอล 40 เปอร์เซ็นต์ > เมทานอล > เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ยังพบงานวิจัยที่ใช้ 2 วิธีในการทดลอง คือ งานวิจัยของ ทัศนีย์ (2560) ซึ่งได้ทำการศึกษาเรื่องประสิทธิภาพของมะกรูด (Citrus hystrix) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสกุลวิบริโอ โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดได้แก่ น้ำกลั่น และเอทานอลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ ด้วยวิธี Agar well diffusion และ Broth dilution ผลการทดลองพบว่าวิธี Agar well diffusion มะกรูดที่สกัดด้วยน้ำกลั่นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. vulnificus* ได้ดีที่สุดโดยมีขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางส่วนใสเท่ากับ 1.66 ± 0.06 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) มะกรูดที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. alginolyticus* ได้ดีที่สุดโดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ส่วนใสเท่ากับ 2.36 ± 0.10 เซนติเมตร. แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) วิธี Broth dilution สารสกัดมะกรูดที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. vulnificus* ได้ดีที่สุดโดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.49และ 0.98 ppt ตามลำดับ ส่วนสารสกัดมะกรูดที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. alginolyticus* ได้ดีที่สุดโดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.0076 และ 0.02 ppt ตามลำดับ

วิธีการดำเนินการ

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากข่า 3 ชนิด ได้แก่ ข่าเหลือง (*Alpinia serumbet*) ข่าแดง (*Achasma sphaerocephallum*) และข่าลิง (*Alpinia conchigera*) ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอ โดยใช้วิธีการสกัดเย็นด้วยเอทานอล มีวัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง ดังนี้

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องมือ

1) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
2) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical Balance; 2 digits)
3) หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
4) เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator complete set)
5) ไมโครปิเปต (Micropipette)
6) ตู้เขี่ยเชื้อ (Microbiological cabinet)
7) เตาให้ความร้อน (Hot plate)
8) ตู้อบความร้อน (Hot Air Oven)
9) เวอร์เนียร์ (Vernier caliper)
10) เครื่องเขย่าสารแบบตั้งเวลา (Orbital shaker)
11) เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer)
12) เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge)
13) เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
14) ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet)
15) เครื่องคนสาร (Hot plate Stirrer)

2. อุปกรณ์

1) จานเพาะเชื้อ (Plate)
2) ขวดรูปชมพูขนาด 1,000 มิลลิลิตร (Erlenmeyer flask)

3) หลอดทดลอง (Tube)
4) ไม้พันสำลี (Cotton swab)
5) กรวยกรอง (Cone filter)
6) กระบอกตวง (Graduated cylinder)
7) ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
8) ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
9) หลอดหยดสาร (Dropper)
10) ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test Tube Rack)
11) แท่งเหล็กเจาะวุ้น (Cork borer) No.3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร
12) Micropipette ปริมาณ 5 มิลลิลิตร
13) Micropipette Tip ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ 5 มิลลิลิตร

3. สารเคมี

1) เอทานอล 99.7 - 100 เปอร์เซ็นต์ (Ethanol 99.7 - 100 percent)
2) น้ำกลั่น
3) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

4. สมุนไพร

1) ข่าเหลือง (*Alpinia serumbet*)
2) ข่าแดง (*Achasma sphaerocephallu*)
3) ข่าลิง (*Alpinia conchigera*)

5. เชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) Nutrient Agar (NA)
2) Tryptic Soy Broth (TSB)
3) Tryptic Soy Agar (TSA)

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ซึ่งประกอบด้วย 5 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ใช้น้ำกลั่นที่เติม NaCl 2.5 เปอร์เซ็นต์ **(ชุดควบคุมแบบลบ: Negative Control)**

ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินที่ระดับความเข้มข้น 0.0005 เปอร์เซ็นต์ **(ชุดควบคุมแบบบวก: Positive Control)**

ชุดการทดลองที่ 3 ใช้สารสกัดข่าเหลือง ที่ระดับความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 4 ใช้สารสกัดข่าแดง ที่ระดับความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 5 ใช้สารสกัดข่าลิง ที่ระดับความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสถานที่ วัสดุและอุปกรณ์

1) ขอความอนุเคราะห์ใช้สถานที่ ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา อาคารอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำ วิทยาลัยประมงติณสูลานนท์ จังหวัดสงขลา

2) เตรียมสถานที่โดยทำความสะอาดสถานที่ที่จะใช้ทำการทดลอง ใช้แอลกอฮอล์ในการทำความสะอาดทั้งการฉีดในอากาศและการเช็ดถูให้ทั่วห้องปฏิบัติการเพื่อฆ่าเชื้อโรคต่างๆ

3) เตรียมวัสดุและอุปกรณ์ โดยจะมีวิธีการเตรียมวัสดุ อุปกรณ์แตกต่างกันออกไปตามประเภทของวัสดุและอุปกรณ์ ดังนี้

- วัสดุและอุปกรณ์ประเภทเครื่องแก้ว เตรียมโดยนำอุปกรณ์ที่เป็นเครื่องแก้วไปใส่ในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งการใช้ตู้อบลมร้อนเป็นการอบด้วยความร้อนจะส่งผลให้เกิดการทำลายเซลล์ โดยการดึงน้ำออกจากเซลล์ทำให้เซลล์ตาย

- วัสดุและอุปกรณ์ประเภทพลาสติก เตรียมโดยนำอุปกรณที่เป็นพลาสติกไปใส่ในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งการใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อเป็นการใช้ความร้อนและความดันทำให้โปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อจุลชีพเสียสภาพ ดังนั้น การใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ทุกชนิดรวมไปถึงสปอร์ของแบคทีเรียด้วย เมื่อนึ่งเสร็จแล้วให้นำมาอบต่อในตู้อบลมร้อนที่อุณภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

- แท่งเหล็กเจาะวุ้น (Cork borer) นำไปฆ่าเชื้อโดยการน้ำไปใส่ในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาห่อฟรอยด์ไว้เพื่อเตรียมใช้งาน

วัสดุและอุปกรณ์ที่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำเป็นต้องมีการห่อด้วยฟรอยด์ไว้และต้องระบุ วัน เดือน ปี ที่ได้ทำการฆ่าเชื้อและวันหมดอายุ เป็นอีก 1 วิธีที่สามารถป้องกันการปนเปื้อนในการทำการทดลองอีกด้วย

2. การเตรียมและการสกัดสมุนไพร

ทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดเย็นโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) สกัดกับเอทานอลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 99.7 – 100 เปอร์เซ็นต์ และข่าทั้ง 3 ชนิด มีขั้นตอน ดังนี้

1) นำข่าทั้ง 3 ชนิดที่เตรียมไว้จำนวน 1 กิโลกรัม มาหั่นซอยแบบละเอียด โดยแยกทำทีละชนิดเพื่อป้องกันการผสมกัน

2) นำข่าที่ได้ทำการหั่นซอยแบบละเอียดแล้วไปตากแดดจนแห้ง โดยในการตากให้ใช้มุ้งหรือผ้าขาวบางปิดทับด้านบนเพื่อป้องกันการปลิวขณะตาก หรือมีสิ่งแปลกปลอม

3) นำข่าที่ตากจนแห้งแล้วมาปั่นในโถปั่นที่แห้งสนิทให้เป็นผงละเอียด ควรล้างโถปั่นและตากให้แห้งสนิทก่อนนำมาใช้งานใหม่ ไม่ควรใช้โถปั่นซ้ำกันเพราะอาจจะเกิดการปนเปื้อนได้

4) นำผงข่าที่ปั่นละเอียดแล้วมาชั่งและนำไปผสมกับเอทานอลแอลกอฮอล์ที่เข้มข้น 99.7 – 100 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:1

5) นำเอทานอลแอลกอฮอล์ที่เข้มข้น 99.7 – 100 เปอร์เซ็นต์ที่ได้ผสมกับผงข่าแล้วไปทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดเย็นโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) โดยระเหยเรื่อยๆ จนเอทานอลแอลกอฮอล์ระเหยออกจนหมดจะได้สารสกัดข่าเพรียวๆ

6) เตรียมสารสกัดข่าทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:4 และ 1:8 ตามลำดับ

7) นำสารสกัดข่าที่ได้ไปเก็บรักษาในอุณหภูมิที่ 5 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมไว้สำหรับการใช้งาน

3. การเตรียมแบคทีเรียสกุลวิบริโอ

ในงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์และการรับรองเชื้อวิบริโอ (*Vibrio* Sp.) จากศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมสัตว์น้ำชายฝั่งมาใช้ในการทำการทดลอง

1) นำเชื้อมาเลี้ยงใน Nutrient agar (NA) ที่เติม NaCl 2.5 เปอร์เซ็นต์

2) นำไปใส่ในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) นำมาเลี้ยงต่อในหลอดทดลองที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) ที่เติม NaCl 2.5 เปอร์เซ็นต์

4) นำไปใส่ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5) นำมาปั่นเพื่อแยกเซลล์ให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 2,500 rpm. เป็นเวลา 10 นาที

6) ใช้ Micropipette ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองออก ให้เหลือแต่เชื้อที่ตกตะกอนอยู่บริเวณก้นหลอดทดลอง

7) เติม NaCl 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงในหลอดที่ลองที่มีตะกอนเชื้ออยู่

8) นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร และวัดค่า Optical Density (OD) ให้เท่ากับ 0.1 (10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ซึ่งเป็นปริมาณของเชื้อที่อยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้ง

4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ มี 3 ชนิด ได้แก่ Nutrient Agar (NA), Tryptic Soy Broth (TSB) และ Tryptic Soy Agar (TSA) โดยมีวิธีการเตรียม ดังนี้

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ ในปริมาณ 300 มิลลิลิตร เพื่อไว้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอของสารสกัดข่าทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) โดยมีสารประกอบ ดังนี้

1) Nutrient Agar (NA) 42 กรัม
2) Sodium chloride 0.23 กรัม
3) Water 300 มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ต้มวุ้นให้ละลายด้วยเครื่องคนสาร (Hotplate Stirrer) จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปเทในจานเพาะเชื้อ

2) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ ในปริมาณ 300 มิลลิลิตร เพื่อไว้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอของสารสกัดข่าทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) โดยมีสารประกอบ ดังนี้

1) Tryptic Soy Broth (TSB) 9 กรัม
2) Sodium chloride 0.24 กรัม
3) Water 300 มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ต้มวุ้นให้ละลายด้วยเครื่องคนสาร (Hotplate Stirrer) จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปเทใส่ไว้ในหลอดทดลอง

3) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ ในปริมาณ 300 มิลลิลิตร เพื่อไว้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอของสารสกัดข่าทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) โดยมีสารประกอบ ดังนี้

1) Tryptic Soy Agar (TSA) 60 กรัม

2) Sodium chloride 1.2 กรัม

3) Water 1,500 มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ต้มวุ้นให้ละลายด้วยเครื่องคนสาร (Hotplate Stirrer) จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปเทใส่ไว้ในจานเพาะเชื้อ

5. การศึกษาประสิทธิภาพ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดข่า 3 ชนิดต่อการยับยั้งเชื้อวิบริโอ (*Vibrio* sp.) โดยวิธีการ agar well diffusion

1) นำเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ มาทำการเจือจาง 10 เท่า ด้วยวิธีการ Ten fold dilution ให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อที่ 10^{-3}

2) ใช้ Micropipette ดูดสารละลายเชื้อปริมาณ 0.1 ไมโครลิตร แล้วนำไปหยดลงบน plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) อยู่ แล้วทำการ Spread plate ให้ทั่ว

3) ใช้แท่งเหล็กเจาะวุ้นที่เตรียมไว้มาเจาะลงบนผิวอาหารวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 จุด โดยกำหนดระยะห่างให้เท่าๆ กัน ซึ่งอาจจะใช้เวอร์เนีย (Vernier caliper) เป็นตัววัดระยะห่างระหว่างจุด

4) เติมน้ำกลั่น ยาปฏิชีวนะ และสารสกัดข่าทั้ง 3 ชนิด ในทุกระดับความเข้มข้นลงในหลุมที่เจาะไว้ปริมาณ 0.1 ไมโครลิตร โดยใส่ความเข้มข้นละ 1 plate ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

5) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. การเก็บและการวิเคราะห์ข้อมูล

6.1. อ่านผลการทดลองโดยการดูวงใส (Clear Zone) ที่เกิดขึ้นหลังจากผ่านการบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้เวอร์เนียในการวัดขนาดของวงใส โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

บริเวณวงใส = เส้นผ่านศูนย์กลางทั้งหมด – เส้นผ่านศูนย์กลางเหล็กเจาะวุ้น

6.2 วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองโดยใช้วิธี Duncan’s New Multiple Range Test ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรมแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลอง

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพและความเข้มข้นของสารสกัดข่าทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ข่าเหลือง (*Alpinia serumbet*) ข่าแดง (*Achasma sphaerocephallum*) และข่าลิง (*Alpinia conchigera*) ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* Sp.) ด้วยวิธี Agar well diffusion วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ซึ่งประกอบด้วย 5 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ มีผลการทดลอง ดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงการศึกษาประสิทธิภาพและความเข้มข้นของสารสกัดข่าทั้ง 3 ชนิด ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อวิบริโอ (*Vibrio* Sp.) โดยการเปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (Clear Zone) ด้วยวิธี Agar well diffusion ชุดการทดลองแบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 ใช้น้ำกลั่น (ชุดควบคุมแบบลบ) และชุดการทดลองที่ 2 ใช้ยาออกซี่เตตราซัยคลิน ที่ระดับความเข้มข้น 0.0005 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุมแบบบวก) ชุดการทดลองที่ 3, 4 และ 5 ใช้สารสกัดข่าเหลือง ข่าแดง และข่าลิง ที่เจือจางด้วยเอทานอลเข้มข้น 99.7-100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีผลการทดลอง ดังนี้

ชนิด	ขนาดวงใสเฉลี่ย (มิลลิเมตร) ความเข้มข้น (%)			
	100	50	25	12.5
สารสกัดข่าเหลือง	16.90±0.26^{C}	13.28±0.12^{c}	12.59±0.42^{b}	8.18±0.22^{b}
สารสกัดข่าแดง	13.32±0.16^{b}	11.97±0.13^{b}	11.39±0.06^{a}	7.98±0.22^{a}
สารสกัดข่าลิง	12.57±0.11^{a}	11.03±0.12^{a}	10.90±0.12^{a}	7.18±0.16^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรในแนวตั้ง หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใส ชุดควบคุมทางลบ และชุดควบคุมทางบวก

ชุดควบคุม	ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)
น้ำกลั่นเติม NaCl	2.5	0.00
ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน	0.0005	20.08

จากตารางที่ 1 ผลการทดลอง พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ของสารสกัดข่าเหลือง มีค่าเท่ากับ 16.90 ± 0.26 มิลลิเมตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอได้มากกว่าทุกชุดการทดลอง รองลงมา คือ สารสกัดข่าแดง มีค่าเท่ากับ 13.32 ± 0.16 มิลลิเมตร ในขณะที่สารสกัดข่าลิง มีประสิทธิภาพน้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 12.57 ± 0.11 มิลลิเมตร

ที่ระดับความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ของสารสกัดข่าเหลือง มีค่าเท่ากับ 13.28 ± 0.12 มิลลิเมตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ ได้ดีกว่าทุกชุดการทดลอง รองลงมา คือ สารสกัดข่าแดง มีค่าเท่ากับ 11.97 ± 0.13 มิลลิเมตร ในขณะที่สารสกัดข่าลิง มีประสิทธิภาพน้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 11.03 ± 0.12 มิลลิเมตร

ที่ระดับความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ของสารสกัดข่าเหลือง มีค่าเท่ากับ 12.59 ± 0.42 มิลลิเมตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ ได้ดีกว่าทุกชุดการทดลอง รองลงมา คือ สารสกัดข่าแดง มีค่าเท่ากับ 11..39 ± 0.06 มิลลิเมตร ในขณะที่สารสกัดข่าลิง มีประสิทธิภาพน้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 10.90 ± 0.12 มิลลิเมตร

ที่ระดับความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ ของสารสกัดข่าเหลือง มีค่าเท่ากับ 8.18 ± 0.22 มิลลิเมตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ ได้ดีกว่าทุกชุดการทดลอง รองลงมา คือ สารสกัดข่าแดง มีค่าเท่ากับ 7.98 ± 0.22 มิลลิเมตร ในขณะที่สารสกัดข่าลิง มีประสิทธิภาพน้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 7.18 ± 0.16 มิลลิเมตร

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า สารสกัดข่าเหลือง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอได้ดีกว่าสารสกัดข่าแดง และข่าลิง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในทุกระดับความเข้มข้น ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างสารสกัดข่าเหลือง และข่าลิง

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาประสิทธิภาพของความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดข่าทั้ง 3 ชนิด ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ ด้วยวิธี Agar well diffusion ซึ่งพบว่า สารสกัดข่าเหลืองมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอได้ดีกว่าสารสกัดข่าลิง และข่าแดง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งน่าจะเป็นเพราะมีสาร acetoxychavicol acetate, acetoxyeugenol acetate และ eugenol ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และมีฤทธิ์ในการช่วยลดการอักเสบได้อยู่ในข่าเหลืองเยอะกว่าข่าลิง และข่าแดง อย่างไรก็ตามที่ระดับความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างสารสกัดข่าเหลือง และสารสกัดข่าลิง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของชุติมา และคณะ (2550) ที่ได้ทำการศึกษาเรื่องประสิทธิภาพของสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่แยกได้จากกุ้งทะเล โดยทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทย 3 ชนิด ได้แก่ ข่า กระวาน กระชาย ในการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากข่าสามารถยับยั้งได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดจากกระวาน และกระชาย ไม่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรีย และเมื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (MBC) มีค่าเท่ากับ 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดจากข่า 3 ชนิด ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ ด้วยวิธี agar well diffusion โดยเปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางของขนาดวงใส (Clear Zone) สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดข่าเหลืองมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอได้ดีที่สุดในระดับความเข้มข้น 100 และ 50 เปอร์เซ็นต์ และดีกว่าสารสกัดข่าแดงและสารสกัดข่าลิง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ในระดับความเข้มข้นที่ 12.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างสารสกัดข่าเหลือง และสารสกัดข่าลิง

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าประสิทธิภาพของสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโออาจจะยังด้อยกว่าประสิทธิภาพของยาออกซี่เตตราซัยคลิน แต่การนำสารสกัดข่าเหลืองในความเข้มข้นที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากสารสกัดข่าเหลืองที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ มาใช้ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงกุ้ง น่าจะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่สามารถลดต้นทุนการผลิต และช่วยลดปัญหาเรื่องสารตกค้างในผลผลิตของกุ้งได้อีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. ควรใช้ข่าหลายชนิดผสมเข้าด้วยกันในการสกัด เพื่อศึกษาว่าสามารถเพิ่มประสิทธิ์ภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอได้ดีกว่าหรือไม่
2. ควรนำส่วนอื่นของข่าหรืออาจจะใช้ทั้งต้นของข่ามาทำการทดสอบซึ่งอาจจะเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอหรือไม่
3. ควรนำสารสกัดที่ทำการทดสอบแล้วว่าสามารถยับยั้งได้จริงในห้องปฏิบัติการไปใช้ในการทดสอบในการเลี้ยงกุ้งจริงในห้องปฏิบัติการหรือในฟาร์มเลี้ยง
4. ควรมีการศึกษาต่อยอดกับสมุนไพรชนิดอื่น

เอกสารอ้างอิง

การแยกเชื้อจุลินทรีย์และการเก็บรักษา (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://biology.crru.ac.th/ (22 สิงหาคม 2564)

การสกัดสาร (ออนไลน์). สืบค้นจาก : https://sites.google.com/ (22 สิงหาคม 2564)

แก้วตา ลิ้มเฮง, จุฑารัตน์ หิรัญวัฒนสุข และ มนฤทัย อินทวัฒน์. 2559. ผลของสารสกัดกระเทียมต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi*. แก่นเกษตร 44 ฉบับพิเศษ 1. คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ. พระนครศรีอยุธยา

การันต์ ชีพนุรัตน์. 2549. ฤทธิ์ของสารสกัดข่าต่อการยับยั้งเชื้อ Salmonella spp. และ Escherichia coli ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของไก่. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

ข่าเหลืองเงินล้าน!! (ออนไลน์). สืบค้นจาก : https://sites.google.com/ (22 สิงหาคม 2564)

คลังข้อมูลสารสนเทศระดับภูมิภาค (ภาคใต้). 2564. การเลี้ยงกุ้งของไทย. สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน).

คณะแพทย์ศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาลัยมหิดล. 2564. สมุนไพร. ศูนย์พิษวิทยารามาธิบดี.

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2564. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร. (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.thaicrudedrug.com/ (20 สิงหาคม 2564)

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. 2564. ข้อมูลพืชสมุนไพร (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://pharmacy.su.ac.th/ (20 สิงหาคม 2564)

จุฑารัตน์ หิรัญวัฒนสุข และ มนฤทัย อินทวัฒน์. 2557. ผลของสารสกัดกระเทียมต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi.* คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี.

ไฉน น้อยแสง และการันต์ ชีพนุรัตน์. 2556. ประสิทธิภาพของสารสกัดข่าในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคผิวหนังในสัตว์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล.

ชนากานต์ ลักษณะ และอรสุรางค์ โสภิพันธ์. 2563. ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยบางชนิดต่อการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*. มหาวิทยาลัยบรูพา

ชุติมา ขมวิลัย, ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และวิสุทธิ์ วีระกุลพิริยะ. 2560. ประสิทธิภาพของสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งแบคทีเรีย Vibrio spp. ที่แยกได้จากกุ้งทะเล. กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด.

ณัฏฐิณี ธีรกุลกิตพงศ์, อาลักษณ์ ทิพยรัตน์, ภักดี สุขพรสวรรค์, อาณัติ ดีพัฒนา, สมชาติ โชคชัยธรรม จักริน สุขสวัสดิ์ชน และ มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร. 2561. การวิเคราะห์ความไวต่อยาปฏิชีวนะ

รูปแบบใหม่และมีประสิทธิภาพสูง สำหรับการทดสอบตัวอย่างทางคลินิกระดับจุลภาคด้วยวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ภาพดิจิตอล. มหาวิทยาลัยบรูพา.

ณัฐภัทร ฤทธิ์ทองพิทักษ์, กัญญารัตน์ ฤดีสิน และ ธัญชนก ศรีสวัสดิ์. 2554. การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ด้วยสารสกัดจากใบย่านาง.

ทัศนีย์ นลวชัย. 2560. ประสิทธิภาพของมะกรูด *(Citrus hystrix)* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Vibrio spp.* แก่นเกษตร 45 ฉบับพิเศษ 1. คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ. พระนครศรีอยุธยา

ธิดาพร ฉวีภักดิ์,ชุติมา ขมวิลัย, สุรชาต ฉวีภักดิ์ และ บุญยี่ หมื่นไธสง.2564. การศึกษาเรื่องผลของสมุนไพรบางชนิดต่อกรีการีน (ไลค) เชื้อรา และแบคทีเรียกลุ่ม Vibrio ในกลุ่มกุ้งขาวแวนนาไม (*Penaeus vannamei*, Boone 1931).

ธีนิดา อินตา, อาริสา แซ่ลี, ภรภัทร สำอางค์, มนตรา ศรีษะแย้ม, วราภรณ์ ผาลี และ อรุณลักษณ์ โชตินาครินทร. 2561. การยับยั้งเชื้อ Staphylococcus aureus และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดหยาบจากหงอนไก่ฝรั่ง. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

นันทนัช เจริญศักดิ์ และภาพิมน ทรัพย์ประเสริฐ. 2557. ผลของสารสกัดจากใบชาเขียวต่อการยับยั้ง Vibro parahaemolyticus ในกุ้งขาวแวนนาไม (litopenaeus vannamei). มหาวิทยาลัยศิลปากร.

พัชรา เพชรบัวทอง และ อรรวรรณ จงอ่อน. 2557. ผลของสารสกัดจากเปลือกส้มโอต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Virio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus*. คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2564. Serial dilution. Food Wiki.

มณฑล วิสุทธิ์. 2560. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกลุ่ม Staphylococci ของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นบางชนิดในจังหวัดนครราชสีมา. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มลธิรา ศรีถาวรม, อนุสรา ทุยหุ่น, อรวรรณ ชุณหชาติ และ สุทธิเดช ปรีชารัมย์. 2558. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากตำรับยาเขียวต่อการต้านเชื้อก่อโรคกุ้ง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

วลัยลักษณ์ เมธาภัทร. 2559. ปัญหาสมุนไพร. การทดสอบความชำนาญสำนักยาและวัตถุเสพติด. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วันละนิดวิทย์เทคโน. 2554. การสกัดเย็น คืออะไร ? (ออนไลน์). สืบค้นจาก : https://www.nstda.or.th/ (24 สิงหาคม 2564)

ศิริวัลย์ สร้อยกล่อม. 2564. หลักการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก. ม.เกษตรศาสตร์

ศิวาพร ลงยันต์, ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกรู, ภัทริน ศรีดุลกุล, สมบัติ รักประทานพร และ ไพศาล สิทธิกรกุล. 2552. การพัฒนาชุดตรวจแบบแถบสีสำหรับเชื้อ. ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมสัตวน้ำชายฝั่ง. 2561. โรคกับการเลี้ยงกุ้ง. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา.

สถาบันวิจัยสมุนไพร. 2551. ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://webdb.dmsc.moph.go.th/ (20 สิงหาคม 2564)

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, แก้วกานต์ ศักดิ์อนุชัยชาญ, นเรศ เชื้อสุวรรณ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2548. การแพร่กระจายของแบคทีเรียกลุ่ม Vibrio spp. ในสัตว์ทะเลจากธรรมชาติและการเพาะเลี้ยง. มหาวิทยาลัยบูรพา.

สิทธิชน รัตนจันทร์ และสุกัญญา ผลิตกุล. 2561. การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียสกุลวิบริโอที่แยกได้จากปลากะพงขาวที่เลี้ยงในฟาร์ม. สัตวแพทย์มหานครสาร.

อภิสิทธิ์ โฆษิตชัยยงค์, จันทร์ฉาย ทองปิ่น, ขวัญเนตร สมบัติสมภพ, ชญาน์ จันทวสุ, ธีระศักดิ์ หมากผิน, เอกชัย วิมลมาลา และ ณรงค์ฤทธิ์ สมบัติสมภพ. 2553. สมบัติของวัสดุและความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ของพอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูงที่ผสมไตรโคลซาน. ฉบับที่ 3. ปีที่ 1 วารสารวิจัยและนวัตกรรมเพื่ออุตสาหกรรมไทย.

อภิชาติ ภาวนา, นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และ สมชาย หวังวิบูลย์กิจ. 2560. ผลของสารสกัดจากใบชะครามในอาหารต่อการเติบโตและต้านทานเชื้อ Vibrio parahaemolyticus ในการอนุบาลกุ้งขาวแวนาไม. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า.

อนันต์ อธิพรชัย, สุวรรณา เสมศรี และ สุรีย์พร หอมวิเศษวงศา. 2563. คุณสมบัติต้านการอักเสบและความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรในกลุ่มที่รักษาเบาหวาน. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Wansarit. 2564. E-Chemistry (ออนไลน์). สืบค้นจาก : https://e-chemistry.tripod.com/ (24 สิงหาคม 2564)

Watermelon. 2556. บ้านสวนพอเพียง (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.bansuanporpeang.com/ (22 สิงหาคม 2564)

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วัสดุและอุปกรณ์

ภาพที่ 1 เอทานอลแอลกอฮอล์ 99.7-100 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 2 ยาปฏิชีวนะ

ภาพที่ 3 Tryptic Soy Agar (TSA)

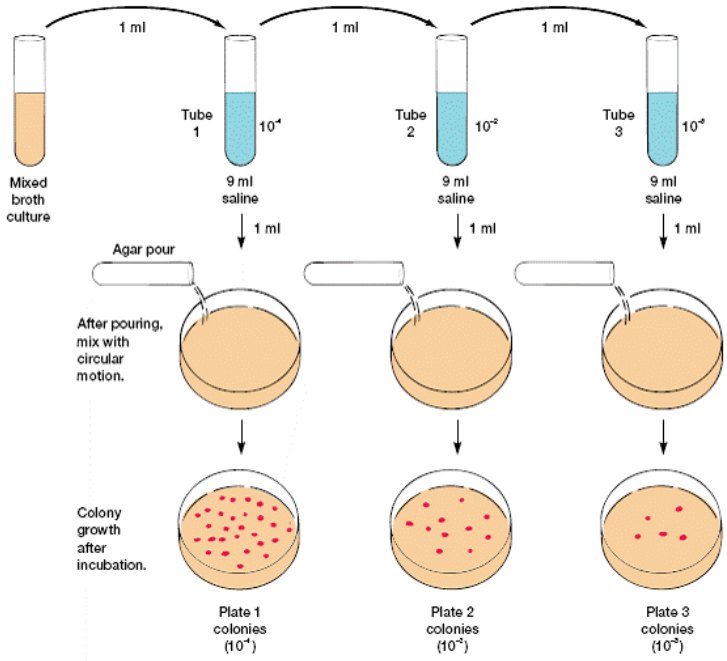
ภาพที่ 4 Tryptic Soy Broth (TSB)

ภาพที่ 5 Nutrient Agar (NA)

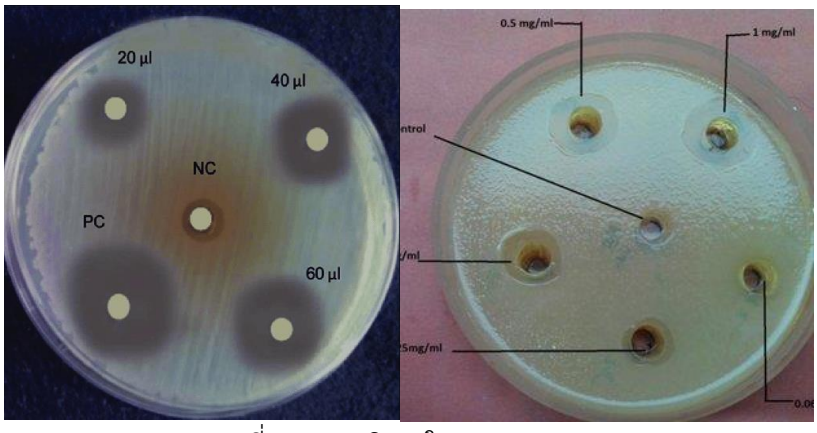
ภาพที่ 6 ข่าเหลือง

ภาพที่ 7 ข่าแดง

ภาพที่ 8 ข่าลิง



ภาพที่ 9 การเจือจางอย่างต่อเนื่อง



ภาพที่ 10 การเกิดวงใส (Clear Zone)

ภาพที่ 11 อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

ภาพที่ 12 rotary evaporator

ภาพที่ 13 Autoclave

ภาพที่ 14 ตู้บ่มเชื้อ

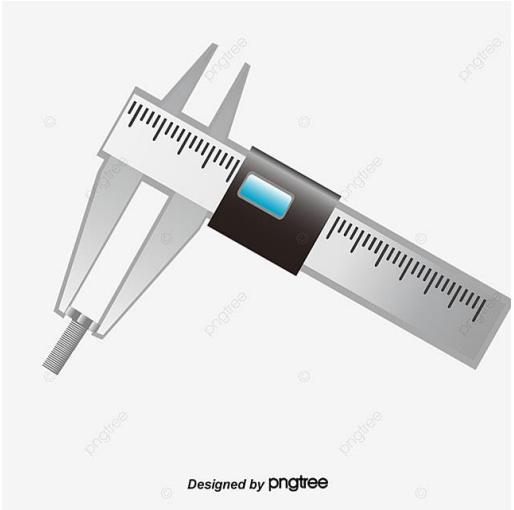
ภาพที่ 15 Hot air oven

ภาพที่ 16 เครื่องคนสาร

ภาพที่ 17 เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง

ภาพที่ 18 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง

ภาพที่ 19 แท่งเหล็กเจาะวุ้น (Cork borer)



ภาพที่ 20 Vernier

ภาคผนวก ข

ตารางข้อมูล และ ตารางวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ชุดการทดลองที่ 1 น้ำกลั่น (เติม NaCl 2.5 percent)

ชุดการทดลอง	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร) *รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของเหล็กเจาะวุ้น)		
	R1	R2	R3
น้ำกลั่น (เติม NaCl 2.5%)	8.00	8.00	8.00

ตารางที่ 1 น้ำกลั่น (เติม NaCl 2.5 percent)

ชุดการทดลองที่ 2 ยาปฏิชีวนะ (ความเข้มข้น 0.0005 percent)

ชุดการทดลอง	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร) *รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของเหล็กเจาะวุ้น)		
	R1	R2	R3
ยาปฏิชีวนะ (เข้มข้น 0.0005%)	28.14	27.87	28.23

ตารางที่ 2 ยาปฏิชีวนะ (ความเข้มข้น 0.0005 percent)

ชุดการทดลองที่ 3 สารสกัดข่าเหลือง

ชุดการทดลอง		ขนาดวงใส (มิลลิเมตร) *รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของเหล็กเจาะวุ้น)			
		ความเข้มข้น 100 %	ความเข้มข้น 50 %	ความเข้มข้น 25 %	ความเข้มข้น 12.5 %
สารสกัดข่าเหลือง	R1	24.28	21.25	20.64	16.36
	R2	23.79	21.42	20.98	15.94
	R3	24.19	21.18	20.14	16.25

ตารางที่ 3 สารสกัดข่าเหลือง

ชุดการทดลองที่ 4 สารสกัดข่าแดง

ชุดการทดลอง		ขนาดวงใส (มิลลิเมตร) *รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของเหล็กเจาะวุ้น)			
		ความเข้มข้น 100 %	ความเข้มข้น 50 %	ความเข้มข้น 25 %	ความเข้มข้น 12.5 %
สารสกัดข่าแดง	R1	20.38	19.12	18.84	15.26
	R2	20.69	18.89	18.95	15.35
	R3	20.45	19.09	18.92	14.94

ตารางที่ 4 สารสกัดข่าแดง

ชุดการทดลองที่ 5 สารสกัดข่าลิง

ชุดการทดลอง		ขนาดวงใส (มิลลิเมตร) *รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของเหล็กเจาะวุ้น)			
		ความเข้มข้น 100 %	ความเข้มข้น 50 %	ความเข้มข้น 25 %	ความเข้มข้น 12.5 %
สารสกัดข่าลิง	R1	21.34	20.09	19.53	15.87
	R2	21.42	19.86	19.36	16.16
	R3	21.21	19.95	19.29	15.92

ตารางที่ 5 สารสกัดข่าลิง

วงใส - เส้นผ่านศูนย์กลางแท่งเหล็กเจาะวุ้น (Cork borer)

ชุดการทดลอง	ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์			
	R1	R2	R3	Average
สารสกัดข่าเหลือง	16.28	15.79	16.19	16.09
สารสกัดข่าแดง	12.38	12.69	12.45	12.51
สารสกัดข่าลิง	13.34	13.42	13.34	13.32

ตารางที่ 6 วงใส - เส้นผ่านศูนย์กลางแท่งเหล็กเจาะวุ้น (Cork borer)

วงใส - เส้นผ่านศูนย์กลางแท่งเหล็กเจาะวุ้น (Cork borer)

ชุดการทดลอง	ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์			
	R1	R2	R3	Average
สารสกัดข่าเหลือง	13.25	13.42	13.18	13.28
สารสกัดข่าแดง	11.12	10.89	11.09	11.03
สารสกัดข่าลิง	12.09	11.86	11.95	11.97

ตารางที่ 7 วงใส - เส้นผ่านศูนย์กลางแท่งเหล็กเจาะวุ้น (Cork borer)

วงใส - เส้นผ่านศูนย์กลางแท่งเหล็กเจาะวุ้น (Cork borer)

ชุดการทดลอง	ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์			
	R1	R2	R3	Average
สารสกัดข่าเหลือง	12.64	12.98	12.14	12.59
สารสกัดข่าแดง	10.84	10.95	10.92	10.90
สารสกัดข่าลิง	11.53	11.36	11.29	11.39

ตารางที่ 8 วงใส - เส้นผ่านศูนย์กลางแท่งเหล็กเจาะวุ้น (Cork borer)

วงใส - เส้นผ่านศูนย์กลางแท่งเหล็กเจาะวุ้น (Cork borer)

ชุดการทดลอง	ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์			
	R1	R2	R3	Average
สารสกัดข่าเหลือง	8.36	7.94	8.25	8.18
สารสกัดข่าแดง	7.26	7.35	6.94	7.18
สารสกัดข่าลิง	7.87	8.16	7.92	7.98

ตารางที่ 9 วงใส - เส้นผ่านศูนย์กลางแท่งเหล็กเจาะวุ้น (Cork borer)

ตารางวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ชนิด	ขนาดวงใสเฉลี่ย (มิลลิเมตร) ความเข้มข้น (%)				ผลการวิเคราะห์
	100	50	25	12.5	
สารสกัดข่าเหลือง	16.90±0.26^{C}	13.28±0.12^{c}	12.59±0.42^{b}	8.18±0.22^{b}	0.00
สารสกัดข่าแดง	13.32±0.16^{b}	11.97±0.13^{b}	11.39±0.06^{a}	7.98±0.22^{a}	0.00
สารสกัดข่าลิง	12.57±0.11^{a}	11.03±0.12^{a}	10.90±0.12^{a}	7.18±0.16^{b}	0.00
ผลการวิเคราะห์	0.00				

ตารางที่ 10 ตารางวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ข่าเหลือง	Between Groups	96.342	3	32.114	415.402	.000
	Within Groups	.618	8	.077		
	Total	96.961	11			
ข่าแดง	Between Groups	46.318	3	15.439	673.224	.000
	Within Groups	.183	8	.023		
	Total	46.501	11			
ข่าลิง	Between Groups	46.429	3	15.476	968.271	.000
	Within Groups	.128	8	.016		
	Total	46.556	11			

ตารางที่ 11 ตาราง ANOVA สารสกัดข่า

ตารางวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข่าเหลือง

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05			
treatment	N	1	2	3	4
4	3	8.1833			
3	3		12.5867		
2	3			13.2833	
1	3				16.0867
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ 12 ตาราง Duncan ข่าเหลือง

ตารางวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข่าแดง

Duncan[a]

treatment	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4	3	7.1833		
3	3		10.9033	
2	3		11.0333	
1	3			12.5067
Sig.		1.000	.324	1.000

ตารางที่ 13 ตาราง Duncan ข่าแดง

ตารางวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข่าลิง

Duncan[a]

treatment	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
4	3	7.9833			
3	3		11.3933		
2	3			11.9667	
1	3				13.3233
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ 14 ตาราง Duncan ข่าลิง

ตารางวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
หนึ่งร้อย	Between Groups	21.119	2	10.560	299.707	.000
	Within Groups	.211	6	.035		
	Total	21.331	8			
ห้าสิบ	Between Groups	7.667	2	3.834	259.612	.000
	Within Groups	.089	6	.015		
	Total	7.756	8			
ยี่สิบห้า	Between Groups	4.498	2	2.249	34.247	.001
	Within Groups	.394	6	.066		
	Total	4.892	8			
สิบสองจุดห้า	Between Groups	1.680	2	.840	21.374	.002
	Within Groups	.236	6	.039		
	Total	1.916	8			

ตารางที่ 15 ตาราง ANOVA ความเข้มข้น

ตารางวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

หนึ่งร้อย

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05		
treatment	N	1	2	3
2	3	12.5067		
3	3		13.3233	
1	3			16.0867
Sig.		1.000	1.000	1.000

ตารางที่ 16 ตาราง Duncan ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ห้าสิบ

Duncan[a]

treatment	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
2	3	11.0333		
3	3		11.9667	
1	3			13.2833
Sig.		1.000	1.000	1.000

ตารางที่ 17 ตาราง Duncan ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์

ตารางวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ยี่สิบห้า

Duncan[a]

treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
2	3	10.9033	
3	3	11.3933	
1	3		12.5867
Sig.		.058	1.000

ตารางที่ 18 ตาราง Duncan ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์

ตารางวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สิบสองจุดห้า

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05	
treatment	N	1	2
2	3	7.1833	
3	3		7.9833
1	3		8.1833
Sig.		1.000	.263

ตารางที่ 19 ตาราง Duncan ความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์