การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ กระเทียม ผลเสม็ดแดง และมะระขี้นก ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ

Study on Efficiency of Three Herb Extracts; *Allium sativum*, *Syzygium antisepticum* and *Momordica charantia* in *Vibrio* sp. Growth Inhibition

สรอรรถ เผือกผ่อง

สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

วิทยาลัยประมงติณสูลานนท์

สถาบันการอาชีวศึกษาเกษตรภาคใต้

ปีการศึกษา 2564

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ กระเทียม ผลเสม็ดแดง และมะระขี้นก ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ

Study on Efficiency of Three Herb Extracts; *Allium sativum*, *Syzygium antisepticum* and *Momordica charantia* in *Vibrio* sp. Growth Inhibition

สรอรรถ เผือกผ่อง

สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
วิทยาลัยประมงติณสูลานนท์
สถาบันการอาชีวศึกษาเกษตรภาคใต้
ปีการศึกษา 2564

ใบรับรองโครงงาน

เทคโนโลยีบัณฑิต (ทล.บ.)
สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เรื่อง การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ กระเทียม ผลเสม็ดแดง และมะระขี้นก ที่มีผลต่อการยั้บยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ

Study on Efficiency of Three Herb Extracts; *Allium sativum*, *Syzygium antisepticum* and *Momordica charantia* in *Vibrio sp.* Growth Inhibition

โดย นายสรอรรถ เผือกผ่อง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(นายกรีฑา ดิษโสภา)

..... กรรมการ
(นางพัชริดา ขำขจร)

..... ประธานหลักสูตร
(นางกฤษณี วงศ์วุฒิวัฒน์) ทำหน้าที่ กรรมการและเลขานุการ

วันที่ 29 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2564
วิทยาลัยประมงติณสูลานนท์
สถาบันการอาชีวศึกษาเกษตรภาคใต้
ปีการศึกษา 2564

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยทำขึ้นด้วยความมานะพยายาม และสำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาเป็นอย่างสูงจาก อาจารย์กฤษณี วงศ์วุฒิวัฒน์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ปรับปรุง แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิจัยตั้งแต่ต้นตลอดจนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

ความสำเร็จในการทำงานวิจัยฉบับนี้ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึง พระคุณบิดามารดา ที่ได้ส่งเสริมสนับสนุน และได้รับกำลังใจเป็นอย่างดีจากครอบครัว ตลอดจนเพื่อนร่วมห้องหลักสูตรเทคโนโลยีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ วิทยาลัยประมงติณสูลานนท์ สถาบันการอาชีวศึกษาเกษตรภาคใต้ และขอรำลึกถึงอาจารย์และผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่สั่งสอนและให้ความรู้ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

ท้ายที่สุดคุณประโยชน์ใดที่ได้จากงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน และขอขอบพระคุณ ผู้ที่เป็นเจ้าของแนวคิด และทฤษฎีต่างๆ งานวิจัย วารสาร เอกสาร และบทความที่ผู้วิจัยนำมาอ้างอิงในการทำวิจัยฉบับนี้ไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

สรอรรถ เผือกผ่อง
สาขาวิชาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
วิทยาลัยประมงติณสูลานนท์ สถาบันการอาชีวศึกษาเกษตรภาคใต้
ตุลาคม 2564

เรื่อง	การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ กระเทียม ผลเสม็ดแดง และมะระขี้นก ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ Study on Efficiency of Three Herb Extracts; *Allium sativum*, *Syzygium antisepticum* and *Momordica charantia* in *Vibrio sp*. Growth Inhibition
โดย	สรอรรถ เผือกผ่อง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
อาจารย์ที่ปรึกษา	กฤษณี วงศ์วุฒิวัฒน์
ที่ปรึกษาร่วมโครงงาน	สิทธิพงษ์ พรมคำอ้าย และ ณรงค์ เผือกผ่อง

บทคัดย่อ

การเลี้ยงกุ้งในปัจจุบันมีการเลี้ยงแบบความหนาแน่นสูงจึงทำให้เกิดของเสียภายในบ่อ และเมื่อการจัดการของเสียไม่ดีพอจะทำให้เกิดเชื้อโรคต่างๆ ขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเชื้อแบคทีเรียเกิดขึ้นในบ่อจะทำให้เป็นแหล่งก่อโรคในกุ้ง ซึ่งเมื่อกุ้งเป็นโรค เกษตรกรก็มักจะใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรคกุ้งที่เกิดจากแบคทีเรีย ซึ่งกุ้งที่รักษาโดยยาปฏิชีวนะนั้นอาจจะมีสารตกค้างไปยังผู้บริโภคได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* sp.) ที่เป็นสาเหตุหลักในการเกิดโรคต่างๆ ในกุ้ง โดยการใช้สารสกัดสมุนไพร กระเทียม ผลเสม็ดแดง และมะระขี้นกที่ระดับความเข้มข้น 3.13 เปอร์เซ็นต์มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* sp.) ด้วยวิธีการ disc diffusion method โดยแบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ประกอบด้วย สารสกัดกระเทียม สารสกัดผลเสม็ดแดง สารสกัดมะระขี้นก น้ำกลั่นเติม NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุมแบบลบ) และยาต้านจุลชีพออกซีเตตร้าไซคลิน 30 ไมโครกรัม (ชุดควบคุมแบบบวก) ผลการศึกษาพบว่าใน สารสกัดจากมะระขี้นก มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับทุกชุดการทดลอง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างสารสกัดกระเทียมและสารสกัดผลเสม็ดแดง โดยมีค่าเฉลี่ยวงใสมากที่สุดอยู่ที่ 10.81±00.36 มิลลิเมตร รองลงมาคือ สารสกัดจากกระเทียมและผลเสม็ดแดงมีค่าเฉลี่ยวงใสเท่ากับ 7.12±00.16 มิลลิเมตรและ 6.88±00.13 มิลลิเมตรตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าประสิทธิภาพของสารสกัดมะระขี้นกยังมีน้อยกว่ายาต้านจุลชีพออกซีเตตร้าไซคลิน แต่ก็น่าจะเป็นอีกทางเลือกที่นำไปใช้ทดแทนยาต้านจุลชีพออกซีเตตร้าไซคลินได้ เพราะสามารถยับยั้งเชื้อได้ดี เป็นการลดต้นทุน และแก้ปัญหาสารตกค้างได้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	**(1)**
สารบัญภาพ	**(2)**
สารบัญตาราง	**(3)**
บทนำ	
ที่มาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์	2
ตรวจเอกสาร	
เอกสารวิชาการ	3
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	41
วิธีดำเนินงานวิจัย	
วัสดุและอุปกรณ์	43
การวางแผนการทดลอง	44
วิธีการทดลอง	45
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	
ผลการทดลอง	48
วิจารณ์ผลการทดลอง	49
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	
สรุปผลการทดลอง	51
ข้อเสนอแนะ	51
เอกสารอ้างอิง	**52**
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก วัสดุและอุปกรณ์	57
ภาคผนวก ข ตารางข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	62

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตารางแสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* sp.) ของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิดและชุดควบคุม	48
2	ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชุดการทดลอง	49

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วิธี Streak-Plate Technique	36
2	Serial dilution	38

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

ประเทศไทยนับว่าเป็นหนึ่งในประเทศผู้นำทางด้านการประมงของโลก โดยผลผลิตสัตว์น้ำเฉลี่ยสูงถึงปีละ 3.7 ล้านตัน และในช่วงปี พ.ศ. 2554 - 2557 ทั้งสัตว์น้ำจืดและน้ำเค็มถือเป็นสัตว์เศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย (สุนันทา และคณะ, 2562) และในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยเป็นอาชีพที่สามารถทำรายได้ให้เกษตรกรได้เป็นอย่างมาก เนื่องจากกุ้งมีราคาที่แพงและเป็นสินค้าส่งออกระดับต้นๆ ของประเทศ แต่การเลี้ยงกุ้งในปัจจุบัน โดยส่วนใหญ่จะเป็นแบบกึ่งพัฒนาและแบบพัฒนา ที่นิยมปล่อยกุ้งที่ความหนาแน่นสูง โดยปล่อยลูกกุ้งขาวระยะ PL 12 ที่ความหนาแน่น 100,000-150,000 ตัว/ไร่ ความหนาแน่นของลูกกุ้งที่ปล่อยลงเลี้ยงเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญและส่งผลกระทบไปถึงการจัดการ และการแก้ไขปัญหาในระหว่างการเลี้ยง โดยทั่วไปสภาพบ่อเลี้ยงกุ้ง เครื่องมือที่ใช้ในฟาร์ม เกษตรกรและคนงานของแต่ละฟาร์ม มีความพร้อมและความสามารถไม่เท่ากัน การกำหนดความหนาแน่นของลูกกุ้งมากเกินศักยภาพของเกษตรกรและฟาร์มในการจัดการ กุ้งมักจะเครียดและป่วยเป็นโรคได้ง่าย มีปัญหาบ่อยครั้งและโตช้า (กรมประมง, 2564) และเมื่อการจัดการสารอินทรีย์ในบ่อไม่ดีพอทำให้สภาพแวดล้อมในบ่อเลี้ยงไม่เหมาะสมจึงทำให้เกิดโรคได้ง่าย โรคที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ มักมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียสกุลวิบริโอ *(Vibrio* sp.) เช่น *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* เป็นต้น แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะได้ แต่การใช้สารเคมีสังเคราะห์และยาปฏิชีวนะในการป้องกันรักษาโรคในสัตว์น้ำ มีข้อจำกัด การใช้ยาและสารเคมีดังกล่าวในลักษณะที่ไม่เหมาะสมสามารถส่งผลเสียต่อกระบวนการผลิตสัตว์น้ำได้ในภายหลัง เช่น ทำให้เกิดสารตกค้างในสัตว์น้ำและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรค และสามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่อยู่ในธรรมชาติได้ ส่งผลให้เกิดแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ดื้อยาจำนวนมาก นอกจากนี้การใช้ยาปฏิชีวนะทำให้เกิดผลข้างเคียงกับสัตว์น้ำเนื่องจากยาปฏิชีวนะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียประจำถิ่นที่อยู่ในสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์น้ำเกิดความเครียด ภูมิคุ้มกันร่างกายลดลง และเจริญเติบโตช้า ด้วยเหตุนี้หลายประเทศจึงได้มีการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อการค้าและการส่งออก (อัครวิทย์, 2554)

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีความคิดที่จะศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากสมุนไพรที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อวิบริโอ *(Vibrio* sp.*)* ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีสมุนไพรหลากหลายชนิดที่สามารถนำมาสกัดและมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อสกุลวิบริโอได้ เช่น ข่า กระเทียม กระชาย ใบย่านาง ผลเสม็ดขาว มะระขี้นก เป็นต้น และผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค้นคว้าข้อมูลจากงานวิจัยต่างๆ พบว่า มีสมุนไพร 3 ชนิดที่น่าสนใจ

สามารถยับยั้งเชื้อวิบริโอได้ดี และหาได้ง่ายในท้องถิ่น นั่นก็คือ กระเทียม *(Allium sativum)* ผลเสม็ดแดง *(Syzygium antisepticum)* และมะระขี้นก *(Momordica charantia)* โดยนำมาทำการสกัดเย็นด้วยเอทานอล และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี disc diffusion method ซึ่งน่าจะมีประโยชน์ในการยับยั้งการระบาดหรือติดเชื้อจากโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ ประหยัด และปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่เกษตรกรจะสามารถนำสิ่งที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด เพื่อที่จะเป็นการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี ทำให้ต้นทุนการผลิตลดลงและเพิ่มมูลค่าให้แก่ผลผลิตกุ้งและสัตว์น้ำของไทยที่เป็นประโยชน์ต่อการส่งออก สอดคล้องกับการค้าเสรีของโลกในอนาคต และเพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงงาน

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพร กระเทียม ผลเสม็ดแดง และมะระขี้นก ในการยับยั้งเชื้อสกุลวิบริโอ (*Vibrio* sp.)

การตรวจเอกสาร

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพร 3 ชนิด กระเทียม (*Allium sativum*) ผลเสม็ดแดง *(Syzygium antisepticum*) และ มะระขี้นก (*Momordica charantia*) ที่มีฤทธิ์สามารถยั้บยั้งเชื้อวิบริโอ (*Vibrio* sp.) โดยการสกัดเย็นด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี disc diffusion method ที่ระดับความเข้มข้น 3.13 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือ เชื้อวิบริโอบริสุทธิ์ (*Vibrio* sp.) มีเอกสารวิชาการและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

เอกสารวิชาการ

1. สมุนไพร

ตามพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. 2525 สมุนไพร หมายถึง พืชที่ใช้ทำเป็นเครื่องยา สมุนไพรกำเนิดมาจากธรรมชาติและมีความหมายต่อชีวิตมนุษย์โดยเฉพาะ ในทางสุขภาพ อันหมายถึงทั้งการส่งเสริมสุขภาพและการรักษาโรค ความหมายของยาสมุนไพรในพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 ได้ระบุว่า ยาสมุนไพร หมายความว่า ยาที่ได้จากพฤกษาชาติสัตว์หรือแร่ธาตุ ซึ่งมิได้ผสมปรุงหรือแปรสภาพ เช่น พืชก็ยังเป็นส่วนของราก ลำต้น ใบ ดอก ผล ฯลฯ ซึ่งมิได้ผ่านขั้นตอนการแปรรูปใดๆ แต่ในทางการค้า สมุนไพรมักจะถูกดัดแปลงในรูปแบบต่างๆ เช่น ถูกหั่นให้เป็นชิ้นเล็กลง บดเป็นผงละเอียด หรืออัดเป็นแท่ง (ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร, 2564)

1.1 ความเป็นมาและความเชื้อเกี่ยวกับสมุนไพร

ความเชื้อและการใช้สมุนไพรนั้นมีมาตั้งแต่สมัยโบราณ ความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรมีในตำราแพทย์ตั้งแต่สมัยกรีก อินเดีย จีน และโดยเฉพาะอย่างยิ่งการแพทย์ไทยแผนโบราณ นอกจากนี้ก็มีการศึกษาค้นคว้าต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน ถ้าจะพูดถึงประโยชน์ของสมุนไพร ในปัจจุบันยาต่างๆ ที่ใช้กันอยู่มีจำนวนไม่น้อยที่ได้มาจากสมุนไพรโดยตรง เช่น ยาแก้ปวด aspirin มาจากเปลือกไม้ของพืชชนิดหนึ่ง ยาแก้ปวด morphine ก็มาจากต้นฝิ่น ยาควินินรักษาโรคมาลาเรียก็ได้มาจากการสกัดเปลือกไม้ cinchona ยารักษาโรคหัวใจล้มเหลว digitalis ก็ได้มาจากต้น foxglove เป็นต้น

1.2 การจำแนกรูปแบบของสมุนไพรที่ใช้เป็นยา

สมุนไพรไม่ว่าจะเป็นส่วนที่มาจากพืชวัตถุ สัตว์วัตถุ หรือธาตุวัตถุก็ตาม เมื่อจะนำมาใช้เพื่อบริโภค หรือเพื่อการรักษาตามกรรมวิธีจำเพาะอันใดก็ตาม พอจะจำแนกรูปแบบของสมุนไพรที่ใช้เป็นยาได้ดังนี้คือ

1) รูปแบบที่เป็นของเหลว ยาเหล่านี้มักได้จากกรรมวิธีต่างๆ กันเช่น ยาต้ม คือ หั่นต้นของยาแล้วต้มกับน้ำ ยาชงเป็นยาแห้งหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ คั่วแล้วนำไปชงกับน้ำ น้ำคั้นสมุนไพร เตรียมโดยการเอาต้นสมุนไพรสดๆ ตำให้ละเอียด เติมน้ำแล้วคั้นเอาน้ำยามารับประทาน และยาดอง เตรียมโดยบดสมุนไพรให้แห้งห่อด้วยผ้าขาวบาง ดองในสุรา

2) รูปแบบที่เป็นของแข็ง ยาปั้นลูกกลอน เตรียมโดยหั่นต้นไม้ยาสดให้เป็นแว่นบางๆ ตากแดดให้แห้ง บดเป็นผง ผสมกับน้ำผึ้งหรือน้ำเชื่อม 1 ส่วน ปั้นเป็นลูกกลมๆ เล็กๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ปั้นเสร็จผึ่งแดดจนแห้ง

3) รูปแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว สมุนไพรเหล่านี้จะทำให้อยู่ในลักษณะพอทรงตัวได้ มักใช้เพื่อการรักษาภายนอก เช่น ยาพอก เตรียมโดยใช้ต้นสดตำให้แหลกหรือเหลว

4) รูปแบบอื่นๆ ที่มีลักษณะการใช้พิเศษ เช่น ใช้วิธีรมควัน เพื่อรักษาโรคทางเดินหายใจ หรือการรมควันเพื่อรักษาแผล และให้มดลูกเข้าอู่ในสตรีภายหลังคลอด

1.3 การเก็บสมุนไพรเพื่อใช้ทำยา

วิธีการเก็บเกี่ยวสมุนไพรเพื่อนำไปใช้ทำยาจะมีผลโดยตรงต่อคุณสมบัติทางเคมีและฤทธิ์ทางยาสมุนไพรควรเก็บสมุนไพรในวันที่อากาศแห้ง ในระยะที่พืชโตเต็มที่ หรือในช่วงที่พืชสะสมปริมาณของตัวยาไว้ค่อนข้างสูง หลังการเก็บสมุนไพรแล้วควรทำให้แห้งเร็วที่สุดด้วยการตากหรือการอบ เมื่อสมุนไพรแห้งดีแล้ว ควรจัดเก็บให้ดีเพื่อรักษาคุณภาพและฤทธิ์ทางยาไว้

1) การเก็บดอกควรเก็บในตอนเช้าหลังหมดน้ำค้าง โดยทั่วไปเก็บในช่วงดอกเริ่มบานหรือบานเต็มที่แล้ว แต่บางชนิดเก็บในช่วงดอกตูม เช่น ดอกกานพลู การเก็บดอกควรเก็บด้วยความทะนุถนอม เพราะส่วนดอกมักเสียหายได้ง่าย

2) การเก็บใบ โดยทั่วไปควรเก็บในช่วงที่พืชเจริญเติบโตมากที่สุด ช่วงที่ใบมีสีเขียวสด ไม่แก่ไม่อ่อนจนเกินไป ถ้าเป็นใบ ใหญ่ก็เด็ดเป็นใบๆ ล้างให้สะอาดแล้วตากแห้ง ถ้าเป็นใบเล็กให้ตัดมาทั้งกิ่งมัดเป็นกำ แล้วแขวนตากไว้ทั้งกำแห้งดีแล้วรุดออกจากกิ่ง เก็บในภาชนะที่ทึบปิดฝาให้สนิท ถ้าเป็นพืชที่มีน้ำมันไม่ควรตากแดดควรผึ่งลมไว้ในที่ร่ม เช่น กะเพรา สะระแหน่

3) ในกรณีที่เป็นเมล็ดขนาดเล็ก เก็บเมื่อเมล็ดเกือบจะสุก แก่เต็มที่ เพื่อป้องกันการถูกลมพัดให้กระจัดกระจายไปโดยเก็บมาทั้งกิ่ง แล้วมัดรวมเป็นกำแขวนไว้ให้หัวที่มลงเหนือถาดที่รองไว้ ในกรณีที่เก็บเมล็ดจากผลให้เก็บผลที่สุกแก่เต็มที่นำมาตากให้แห้ง แล้วจึงเอาเปลือกออกเอาเมล็ดออกมาตากให้แห้งอีกครั้ง พืชสมุนไพรบางชนิดเก็บผลในช่วงที่ยังไม่สุก เช่น ฝรั่งเก็บผลอ่อน

ใช้แก้ท้องร่วง แต่โดยทั่วไปมักเก็บตอนผลแก่หรือสุกใหม่ๆ แต่อย่าให้สุกจนเละ จะทำให้แห้งยาก เมื่อนำไปตากแดด หรืออบ

4) การเก็บรากและหัว ควรเก็บในช่วงที่พืชหยุดการเจริญเติบโต ใบ ดอก ร่วงหมด หรือในช่วงต้นฤดูหนาวถึงปลายฤดูร้อน ช่วงนี้หัวและรากจะมีการสะสมปริมาณของตัวยาไว้ค่อนข้างสูง

5) การเก็บเมือกหรือยางจากต้นไม้ ให้กรีดรอยลึกๆ ลงบนเปลือกไม้ หรือด้วยการเจาะรูแล้วใช้ถ้วยรอง เมือกหรือยางของต้นไม้บางชนิดอาจเป็นพิษระคายเคืองควรสวมถุงมือขณะกรีดยาง สำหรับว่านหางจระเข้ เลือกใบที่อวบแล้วใช้มีดผ่าเปลือกนอกตรงกลางตามแนวยาวของใบ แล้วแหวกเปลือกออก จากนั้นใช้ด้านที่อของมีดขูดเมือกของว่านหางจระเข้ออก

6) การเก็บเปลือกโดยมากเก็บระหว่างฤดูร้อนต่อกับฤดูฝน จะมีปริมาณยาค่อนข้างสูง และลอกเปลือกได้โดยง่าย

1.4 โทษและอันตรายจากการใช้ยาสมุนไพร

สมุนไพรนอกจากจะมีประโยชน์ในการรักษาโรคภัยไข้เจ็บแล้ว ในทางตรงกันข้ามถ้าใช้ไม่ถูกต้องก็อาจมีโทษและอันตรายได้เช่นกัน อันตรายจากสมุนไพรนั้นอาจแยกออกเป็น 3 ประการคือ

1) อันตรายที่เกิดจากโรคที่ขาดการรักษาเช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน หรือโรคหืด ซึ่งการแพทย์ปัจจุบันยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ การให้ยานั้นเพื่อบรรเทาอาการและป้องกันโรคแทรกซ้อนที่อาจจะเกิดขึ้น ถ้าไม่เข้าใจเกี่ยวกับโรคที่ถูกต้องอาจจะเบื่อก็เลยหยุดยาแล้วรักษาด้วยสมุนไพร มียาสมุนไพรหลายชนิดที่อาจจะไม่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรค นอกจากนั้นโรคที่ท่านเป็นอยู่บางครั้งก็อาจจะไม่มีอาการเด่นชัด ทำให้เข้าใจผิดคิดว่าโรคหายแล้วละเลยกับการรักษาที่ถูกต้อง นานๆ ไปโรคเดิมอาจจะกำเริบเช่น เป็นความดันโลหิตสูงมากๆ ไม่ได้รักษาก็อาจจะทำให้เส้นเลือดแตกในสมองเป็นอัมพฤกษ์อัมพาตได้

2) เป็นอันตรายที่เกิดจากฤทธิ์ของสมุนไพรโดยตรง มีสมุนไพรหลายชนิดที่มีสารเคมีที่เป็นพิษร้ายแรง ถ้าได้รับเข้าไปจะทำให้เกิดอาการจากพิษของสารชนิดนั้นๆ ยกตัวอย่างเช่น มะเกลือ (มะเกลือเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง) เป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่าผลมะเกลือมีสารเคมีที่สำคัญหลายชนิดที่มีสรรพคุณในการขับถ่ายพยาธิ์ ตำรับยากลางบ้านได้แนะนำให้ใช้ผลมะเกลือสดตำคั้นผสมกระทิ ได้มีรายงานผู้ป่วยหลายรายที่ได้รับพิษจากมะเกลือ ผู้ป่วยมีอาการไข้ อาเจียน ท้องเดิน หลังจากนั้นจะมีอาการตามัว ตามองไม่เห็น ตาบอดได้ จากการศึกษาวิจัยพบว่า ผลมะเกลือที่แก่เต็มที่จนมีสีดำนั้น อาจจะมีสาร naphthalene ซึ่งเป็นพิษต่อประสาทตาโดยตรง

3) อันตรายจากสารเจือปนในสมุนไพร ทางคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดีได้ทำการตรวจวิเคราะห์ยาสมุนไพร เพื่อจะหาสารเจือปนที่อาจจะเป็นอันตรายจากตัวอย่างจำนวน

ร่วมร้อย พบว่ามี arsenic 60 เปอร์เซ็นต์ มีสาร steroids 30 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นมีสารปรอทและตะกั่วประปราย

1.5 หลักการในการใช้สมุนไพร

1) ถ้าเป็นโรคที่ยังพิสูจน์ไม่ได้แน่ชัดว่ารักษาด้วยสมุนไพรได้ผลดี ก็ไม่ควรรักษาด้วยสมุนไพร เช่น งูพิษกัด สุนัขบ้ากัด โรคบาดทะยัก กระดูกหัก วัณโรค เบาหวาน เป็นต้น

2) กลุ่มอาการบางอย่างที่บ่งชี้ว่า อาจจะเป็นโรคร้ายแรงที่จำเป็นต้องรักษาอย่างรีบด่วนเช่น ไข้สูง ซึม ไม่รู้สึกตัว ปวดอย่างรุนแรง อาเจียนเป็นเลือด ตกเลือดจากช่องคลอด ท้องเดินอย่างรุนแรง หรือคนไข้เป็นเด็กและสตรีมีครรภ์ ควรรีบนำปรึกษาแพทย์ แทนที่จะรักษาด้วยสมุนไพร

3) การใช้ยาสมุนไพรนั้น ควรค้นคว้าจากตำรา หรือปรึกษาท่านผู้รู้ โดยใช้ให้ถูกต้อง ใช้ให้ถูกส่วน ใช้ให้ถูกขนาด ใช้ให้ถูกวิธี ใช้ให้ถูกโรค ใช้ให้ถูกคน

4) ไม่ควรใช้สมุนไพรติดต่อกันเป็นเวลานานๆ เพราะพิษอาจจะสะสมได้ เมื่อใช้ยาหลายสัปดาห์ อาการไม่ดีขึ้น ควรปรึกษาแพทย์

5) ถ้ามีอาการพิษที่เกิดขึ้นจากยาสมุนไพร ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว ควรรีบหยุดยาโดยเร็ว (คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี, 2564)

2. ชนิดของสมุนไพร

สมุนไพรมีมากมายหลากหลายชนิด มีสรรพคุณแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด บางชนิดรักษาแผล บางชนิดรักษาหวัด บางชนิดรักษาอาการปวดเมื่อยได้ และบางชนิดสามารถรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี อย่างเช่น ข่า กระเทียม ขิง ฟ้าทะลายโจร เป็นต้น ทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจสมุนไพร 3 ชนิดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่ กระเทียม ผลเสม็ดแดง และ มะระขี้นก

2.1 เสม็ดแดง *(Syzygium antisepticum)*

เสม็ดแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Syzygium antisepticum* อยู่ในวงศ์ Myrtaceae เป็นไม้พุ่มต้นไม่ผลัดใบ เปลือกต้นสีน้ำตาลแดง แตกสะเก็ดแผ่นบางๆ โคนต้นมักเป็นพูพอน ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้าม รูปหอก ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม ดอกออกเป็นช่อซี่ร่มเล็กๆ สีเหลืองอ่อนที่ปลาย ยอด ผลมีลักษณะกลม สีขาว มีขนาดเล็ก เมล็ดมีลักษณะเหมือนลิ่ม สามารถนำส่วนต่างๆ ไปใช้ประโยชน์ได้ ได้แก่ ส่วนใบสดนำมาตำปั่นปิดพอกแก้เคล็ดยอก ฟกบวมได้ดี หรือใช้ผลมะกรูด หรือใบพลูรมควัน ใต้ใบเสม็ดพออุ่นๆ นาบท้องเด็กแก้ท้องขึ้น ท้องอืด ท้องเฟ้อในเด็ก แก้ปวดท้องได้ น้ำมันจากใบมีกลิ่นคล้ายการบูร ใช้นวดแก้เคล็ด เมื่อย ปวดบวม แก้หมัด เหา

ชุบสำลีอุดฟันแก้ปวดฟันส่วนใบอ่อนกินเป็นยาขับเสมหะ แก้หลอดลมอักเสบ ขับลม ยอดอ่อนรับประทานเป็นผักสดกับน้ำพริก

2.1.1 ลักษณะทั่วไป

1) ต้นเสม็ด จัดเป็นไม้พุ่มกึ่งไม้ยืนต้นขนาดเล็กไม่ผลัด มีความสูงของต้นประมาณ 5-25 เมตร มีเรือนยอดแคบเป็นพุ่มทรงสูง ลำต้นมักบิด เปลือกลำต้นเป็นสีขาวนวลจนถึงสีน้ำตาลเทา เปลือกเป็นแผ่นบางๆ เรียงซ้อนกันเป็นปึกหนานุ่ม ลอกออกได้เป็นแผ่นๆ ส่วนเปลือกชั้นในบางและเป็นสีน้ำตาลอ่อน ตามยอดอ่อน ใบอ่อน และกิ่งอ่อนมีขนสีขาวเป็นมันคล้ายเส้นไหมขึ้นปกคุม และกิ่งมักห้อยลง ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด เจริญเติบโตได้ดีมากในสภาพที่ลุ่มมีน้ำขัง มักพบได้ทั่วไปตามชายทะเล ป่าชายหากใกล้ทะเล ในที่ลุ่มมีน้ำขัง ตามขอบของป่าพรุที่ถูกไฟเผาทำลายจนโล่งเตียน ในประเทศไทยพบต้นเสม็ดขาวได้มากทางภาคตะวันตกเฉียงใต้ ภาคตะวันออกเฉียงใต้ และทางภาคใต้ ส่วนในต่างประเทศพบได้ที่พม่า มาเลเซีย และอินโดนีเซีย สามารถออกดอกและติดผลได้ตลอดทั้งปี

2) ใบเสม็ด ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ ลักษณะของใบเป็นรูปรีแกมขอบขนานหรือรูปใบหอก ปลายใบแหลม โคนใบแหลมหรือมนหรือเป็นรูปลิ่ม ส่วนขอบใบเรียบ ใบมีขนาดกว้างประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร และยาวประมาณ 4-8 เซนติเมตร เนื้อใบค่อนข้างหนาและกรอบ เป็นสีเขียวอมเทา มีเส้นใบหลักประมาณ 5-7 เส้น ออกจากโคนใบจรดปลายใบ มีก้านใบยาวประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร ส่วนใบอ่อนมีขนคล้ายเส้นไหมขึ้นปกคลุม

3) ดอกเสม็ด ออกดอกเป็นช่อแบบช่อเชิงลด โดยจะออกตามซอกใบหรือใกล้กับปลายกิ่ง ดอกย่อยเป็นสีขาวและมีขนาดเล็ก ดอกประกอบไปด้วยกลีบเลี้ยง 5 กลีบ กลีบเลี้ยงดอกยาวประมาณ 0.3 เซนติเมตร โคนกลีบติดกัน ส่วนดอกมีกลีบดอก 5 กลีบ กลีบดอกยาวประมาณ 0.2-0.3 เซนติเมตร ลักษณะเป็นรูปช้อนแกมรูปไข่ เกสรเพศผู้เป็นเส้นเล็กสีขาวและมีจำนวนมาก ก้านเกสรเพศผู้ยาวพ้นกลีบดอกเป็นพู่ ก้านชูช่อดอกมีขนสีขาว โดยจะออกดอกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤษภาคม และเดือนสิงหาคมถึงเดือนพฤศจิกายนผล

4) ผลเสม็ด ผลเป็นผลแห้ง แตกออกได้เป็นพู 3 พู ลักษณะของผลเป็นรูปถ้วย ปลายปิด ขนาดเล็กและแป้น มีขนาดกว้างและยาวประมาณ 0.4 เซนติเมตร ผลแก่เป็นสีน้ำตาลอมเทาถึงสีคล้ำ ผลแห้งแตกด้านบน ภายในมีเมล็ดขนาดเล็กอยู่เป็นจำนวนมาก

2.1.2 สรรพคุณของเสม็ด

สรรพคุณของเสม็ดมีมากมาย ดังต่อไปนี้

1. ทางยาสมุนไพร คือ น้ำมันจากใบ มีกลิ่นคล้ายการบูร เรียกว่า “น้ำมันเขียว” ใช้นวดแก้เคล็ด เมื่อย ปวดบวม แก้หมัด เหา ชุบสำลีอุดฟันแก้ปวดฟัน

2. ทางอาหาร คือ กินเป็นยาขับเสมหะ แก้หลอดลมอักเสบ ขับลม กินมากเป็นยาขับพยาธิ ใช้ใบสด ตำป่นปิดพอกแก้เคล็ดยอก ฟกบวมได้ดี ใช้ผลมะกรูด หรือใบพลู รมควันใต้ใบเสม็ดพออุ่นๆ นาบท้องเด็กแก้ท้องขึ้น ท้องอืด ท้องเฟ้อในเด็ก แก้ปวดท้องได้ดีมาก

3. ส่วนที่ใช้เป็นอาหาร ใบอ่อน ยอดอ่อนรับประทานเป็นผักสดกับน้ำพริก ลาบ ยำ รส เปรี้ยวใช้ทานกับขนมจีนหรือเป็นผักจิ้ม น้ำพริก นอกจากนี้ยังนำมาปรุงกับเครื่องปรุงต่าง ๆ เช่น ปลาร้า มะนาว ข้าวคั่ว หอมแดง พริก ฯลฯ คลุกเคล้าให้เข้ากัน ชิมรสตามชอบ เรียกชุบผัก เม็กผักเม็กมีรสฝาดปนเปรี้ยวนิดๆ ยอดสีขาวจะ อร่อยกว่ายอดสีแดง นิยมรับประทานกันมาแต่โบราณจนถึง ปัจจุบัน (ภิรมย์วรุณ ,2564)

4. ส่วนที่พึงระวัง สำหรับการรับประทานผักเม็ก คือ ในผักเม็กมีสารออกซาเลต (Oxalate) สูง หากรับประทานสดหรือรับประทานจำนวนมากอาจเสี่ยงต่อการเป็นนิ่วได้ ซึ่งแก้ไขโดยการรับประทานอาหารที่มีโปรตีนหรือประเภทเนื้อ

2.2 กระเทียม (*Allium sativum*)

กระเทียมมีมากมายหลายชนิด โดยมีลักษณะทางพฤกษาศาสตร์ดังต่อไปนี้

2.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุก สูง 30-60 เซ็นติเมตร มีกลิ่นแรง มีหัวใต้ดิน ลักษณะกลมแป้น เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 เซ็นติเมตร มีแผ่นเยื่อสีขาวหรือสีม่วงอมชมพูหุ้มอยู่ 3-4 ชั้น ซึ่งลอกออกได้ แต่ละหัวมี 6-10 กลีบ กลีบเกิดจากตาซอกใบของใบอ่อน ลำต้นลดรูปลงไปมาก ใบเดี่ยว ขึ้นมาจากดิน เรียงซ้อนสลับ แบนเป็นแถบแคบ กว้าง 0.5-2.5 เซ็นติเมตร ยาว 30-60 เซ็นติเมตร ปลายแหลม ขอบเรียบและพับทบเป็นสันตลอดความยาวของใบ โคนแผ่เป็นแผ่นและเชื้อมติดกันเป็นวงหุ้มรอบใบที่อ่อนกว่าและก้านช่อดอกทำให้เกิดเป็นลำต้นเทียม ปลายใบสีเขียวและสีจะค่อยๆ จางลงจนกระทั่งถึงโคนใบ ส่วนที่หุ้มหัวอยู่มีสีขาวหรือขาวอมเขียว ช่อดอกแบบช่อซี่ร่ม ประกอบด้วยตะเกียงรูปไข่เล็กๆ จำนวนมากอยู่ปะปนกับดอกขนาดเล็กซึ่งมีจำนวนน้อย มีใบประดับใหญ่ 1 ใบ ยาว 7.5-10 เซ็นติเมตร ลักษณะบาง ใส แห้ง เป็นจะงอยแหลมหุ้มช่อดอกขณะที่ยังตูมอยู่ แต่เมื่อช่อดอกบานใบประดับจะเปิดอ้าออกและห้อยลงรองรับช่อดอกไว้ ก้านช่อดอกเป็นก้านโดด เรียบ รูปทรงกระบอกตัน ยาว 40-60 เซ็นติเมตร ดอกสมบูรณ์เพศ กลีบรวม 6 กลีบ แยกจากกันหรือติดกันที่โคน รูปใบหอกปลายแหลม ยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร สีขาวหรือขาวอมชมพู เกสรเพศผู้ 6 อัน ติดที่โคนกลีบรวม อับเรณูและก้านเกสรเพศเมียยื่นขึ้นมาสูงกว่าส่วนอื่นๆ ของดอก รังไข่ 3 ช่อง แต่ละช่องมีออวุล 1 - 2 เม็ด ผลเล็กเป็นกระเปาะสั้นๆ รูปไข่หรือค่อนข้างกลม มี 3 พู เมล็ดเล็ก สีดำ (ราชบัณฑิตยสถาน, 2538)

2.2.2 สรรพคุณของกระเทียม

1) หัว รสร้อนฉุน มีน้ำมันหอมระเหยใช้เป็นยาขับเหงื่อ ขับปัสสาวะและขับเสมหะ น้ำกระเทียมผสมน้ำ 4 เท่า ใช้ใส่แผลที่เป็นหนอง น้ำคั้นจากกระเทียมหยอดใส่หูแก้หูอื้อหูตึง ทาแผลแก้กลากเกลื้อน ขับลมในลำไส้ แก้ท้องขึ้น แน่นท้องจุกเสียด ท้องเฟ้อ ขับพยาธิในลำไส้ แก้หืด อัมพาต โขลกสระผมป้องกันผมหงอก ทาถูนวดแก้อาการชักกระตุกของเด็ก โขลกพอกหัวเหน่าแก้ขัดเบา โขลกกับน้ำส้มกวาดคอแก้อักเสบเสียงแหบแห้ง แก้อาการไขมันอุดตันในเส้นเลือด แก้ความดันโลหิตสูง ใช้พอกตรงที่ถูกแมลง ตะขาบ และแมลงป่องต่อย เพื่อบรรเทาอาการเจ็บปวด

2) ใบ รสร้อนฉุน ทำให้เสมหะแห้ง กระจายโลหิต แก้ลมปวดมวนในท้อง

2.2.3 ประโยชน์ทางสมุนไพร

ตำรายาไทยใช้น้ำมะนาวและผลดองแห้งเป็นยาขับเสมหะแก้ไอ แก้โรคเลือดออกตามไรฟัน เพราะมีวิตามินซีน้ำมะนาวเป็นกระสายยาสำหรับสมุนไพรที่ใช้ขับเสมหะ เช่นดีปลีมีฤทธิ์ในการฆ่าและยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแทบทุกชนิด เช่น เชื้อยีสต์, เชื้อราได้ผลดีมาก ความเข้มข้นเพียง 0.02 เปอร์เซ็นต์ ต่อปริมาตร ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในน้ำเลี้ยงเชื้อได้ (ถ้าเจือจางเพียง 0.001 เปอร์เซ็นต์ สามารถฆ่าเชื้ออหิวาต์และเชื้อไทฟอยด์ได้)

รักษาโรคผิวหนัง กลากเกลื้อน, โรคผิวหนังที่ติดเชื้อราหรือแบคทีเรีย โดยใช้กระเทียมบดพอก หรือกระเทียมฝานทาได้ผลดีและเป็นที่ยอมรับทางวงการวิทยาศาสตร์ว่ากระเทียมมีสารเคมีหรือน้ำมัน กระเทียมฆ่าเชื้อราได้ดีพอๆ กับยาปฏิชีวนะหลายชนิด หรือดีกว่ายาปฏิชีวนะบางอย่างเพราะยาปฏิชีวนะบางชนิดสามารถฆ่าเชื้อได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา การสกัดเอาน้ำมันกระเทียมให้บริสุทธิ์แล้วผสมครีมหรือขี้ผึ้งทำเป็นลักษณะครีมหรือบาล์ม อาจจะได้ผลดีมาก คือช่วยให้มีการซึมซาบได้ยิ่งขึ้น

รักษาโรคภายใน ตามความเชื้อแผนโบราณเชื้อว่ารักษาโรคบิด โรคท้องร่วง ขับน้ำได้ ขับพยาธิและพยาธิเส้นด้าย รักษาวัณโรค (นิวโมเนีย) ลดน้ำตาลในเลือด รักษาโรคอหิวาต์ไทฟอยด์ ขับลม แก้ปวดท้อง ท้องขึ้น ยาขับพยาธิในช่องท้อง ยาลดไข้ แก้ไอ รักษาโรคหืด หอบ โรคประสาท มะเร็ง และโรคต่างๆ อีกมากมาย แต่เท่าที่ได้มีรายงานจากการทดลองทางวิทยาศาสตร์พบว่ากระเทียมรักษาโรคภายในดังนี้คือ

1) ลดความดันโลหิตสูงที่เกิดจากไขมันอุดตันหลอดเลือด เนื่องจากมีสารละลายไขมันในเส้นเลือด รับประทานเป็นประจำ 15 วัน ความดันโลหิตลดลงอย่างเห็นได้ชัด ฉะนั้นผู้ที่เป็นโรคความดันโลหิตสูงขณะรับประทานกระเทียมเป็นประจำควรจะมีการตรวจความดันโลหิตก่อน

2) มีสารเป็นตัวนำของวิตามินบี 1 เข้าสู่ทางเดินอาหารได้ดีเพื่อทำให้วิตามินบี1 นำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย โดยรวมเป็นสารอัลลิลไทอะมิน (Allithiamine) ทำให้วิตามิน

บี1 ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้นถึง 20 เท่า และสารอัลลิซัลไฟด์จะช่วยกระตุ้นการดูดซึมของวิตามินบี1 ในลำไส้ดีขึ้นเท่าตัว

3) ช่วยกระตุ้นการบีบตัวของผนังกระเพาะลำไส้ ป้องกันโรคท้องผูกและขับลมในกระเพาะลำไส้

4) ป้องกันการเป็นวัณโรคหรือนิวโมเนียได้ สำหรับผู้ที่รับประทานกระเทียมสดเป็นประจำ เนื่องจากขณะที่รับประทานกระเทียมสารมีกลิ่นกระเทียมจะระเหยออกมาทางลมหายใจ ทางปอด สารนี้จะไปทำลายเชื้อโรคที่ทางเดินหายใจก่อนที่เชื้อจะเข้าสู่ปอด แก้ไอขับเสมหะ

5) ป้องกันโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร มีกลไกเช่นเดียวกับป้องกันวัณโรค คือจากสารที่ได้จากกระเทียมจะเข้าไปยับยั้งหรือฆ่าเชื้อต่างๆ ที่ติดเข้าไปกับอาหาร

6) ความเข้มข้นของน้ำมันกระเทียมเพียง 0.001 เปอร์เซ็นต์ สามารถฆ่าเชื้ออหิวาต์และไทฟอยด์ในหลอดทดลองได้

7) เมอร์แคปแตน (mercaptan) เป็นสารกำมะถันอินทรีย์ที่อยู่ในกระเทียม ช่วยทำให้เนื้อและโปรตีนที่ทำลายยาก เช่น โปรตีนจากไข่ขาว นม ละลายและดูดซึมในลำไส้ได้ง่ายขึ้น

8) น้ำคั้นจากกระเทียมบดผสมน้ำอุ่น 5 เท่า ผสมเกลือเล็กน้อย อมกลั้วคอฆ่าเชื้อในปากและลำคอได้

9) ในอินเดียใช้กระเทียมโขลกสระผมช่วยป้องกันผมหงอก นอกจากนี้กระเทียมยังมีไอโอดีนเช่นเดียวกับสาหร่ายทะเล หอยต่างๆ กุ้ง น้ำมันตับปลา สับปะรด

10) น้ำคั้นกระเทียมผสมน้ำเชื่อมรับประทานเป็นยาขับปัสสาวะ ขับเสมหะ บรรเทาอาการไข้หวัดเจ็บคอ น้ำมูกไหล และอาการไอ

11) กระเทียมบดห่อด้วยผ้าขาวบางวางบริเวณริมฝีปากที่เกิดการอักเสบ 8-10 ชั่วโมง อาการจะบรรเทา (thethan, 2564)

2.2.4 สารที่พบ

สารสำคัญที่ทำให้กระเทียมมีกลิ่นหอมฉุนเผ็ดร้อนคือเอนไซม์อัลลิเนส (Allinase) ที่เปลี่ยนสารอินทรีย์กำมะถันอัลลิอิน (Alliin) ให้เป็นน้ำมันหอมระเหยอัลลิซิน (Allicin) และเมื่อนำหัวกระเทียมสดมากลั่นด้วยไอน้ำจะได้น้ำมันกระเทียม (Garlic oil) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารอาหาร น้ำ กรดไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต น้ำตาล กรดอะมิโน เหล็ก แคลเซียม วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 และวิตามินซี ฯลฯ

2.2.5 องค์ประกอบทางเคมี

น้ำมันหอมระเหย ประมาณ 0.1-0.4 เปอร์เซ็นต์ มีองค์ประกอบหลักคือ allicin ajoene alliin allyldisulfide diallyldisulfide ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มกลุ่ม organosulfur สารในกลุ่มนี้ที่พบในกระเทียมเช่น สารกลุ่ม S-(+)-alkyl-L-cysteine sulfoxides, alliin 1 เปอร์เซ็นต์, meshing 0.2 เปอร์เซ็นต์, isoalliin 0.06 เปอร์เซ็นต์ และ cycloalliin 0.1 เปอร์เซ็นต์ และสารที่ไม่ระเหยคือ สารกลุ่ม gamma-L-glutamyl-S-alkyl-L-cysteines , gamma-glutamyl-S-trans-1-propenylcysteine 0.6 เปอร์เซ็นต์ และ gamma-glutamyl-S-allylcysteine รวมประมาณ 82 เปอร์เซ็นต์ ของสารกลุ่ม organosulpur ทั้งหมด ส่วนสารกลุ่ม thiosulfinates (allicin) สารกลุ่ม ajoenes(E-ajoene และ Z-ajoene) สารกลุ่ม vinyldithiins (2-vinyl-(4H)-1,3-dithiin , 3-vinyl-(4H)-1,2-dithiin) และสารกลุ่ม sulfides (diallyl disulfide, diallyl trisulfide) ซึ่งเป็นสารที่ไม่ได้พบในธรรมชาติแต่เกิดจากการสลายตัวของสาร allin ซึ่งถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ alliinase หลังจากนั้นจึงเกิดการรวมตัวกันใหม่ได้สาร allicin ซึ่งเป็นสารที่ไม่เสถียร สลายตัวได้สารกลุ่ม sulfides อื่นๆ ดังนั้นกระเทียมที่ผ่านกระบวนการสกัด การกลั่นน้ำมัน หรือความร้อน สารประกอบส่วนใหญ่ที่พบเป็นสารกลุ่ม diallyl sulfide, diallyl disulfide, diallyl trisulfide และ diallyl tetrasulfide ส่วนกระเทียมที่ผ่านกระบวนการหมักในน้ำมัน สารประกอบที่พบส่วนใหญ่เป็น 2-vinyl-(4H)-1, 3-dithiin, 3-vinyl-(4H)1, 2-dithiin, E-ajoene และ Z-ajoene ปริมาณของ alliin ที่พบในกระเทียมสด ประมาณ 0.25-1.15 เปอร์เซ็นต์ สารกลุ่มอื่นๆ ที่พบ เช่น สารเมือก และ albumin, scordinins, saponins 0.07 เปอร์เซ็นต์, beta-sitosterol 0.0015 เปอร์เซ็นต์, steroids, triterpenoids และ flavonoids

2.2.6 ฤทธิ์ปกป้องตับจากสารพิษ

การทดลองป้อนสาร diallyl disulfide (DADS) จากกระเทียมให้แก่หนูขาว ขนาดวันละ 50 และ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ในหนูแต่ละกลุ่ม นานติดต่อกัน 5 วัน ก่อนเหนี่ยวนำให้ตับเกิดการเสียหายด้วยสาร carbon tetrachloride (CCl4) พบว่า DADS ทั้งสองขนาดสามารถป้องกันตับเป็นพิษได้ การตรวจสอบลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์พบว่าสามารถยับยั้งความเสียหายของเซลล์ตับ โดยลดการทำงานของเอนไซม์ aspartate transaminase (AST) และ alanine transaminase (ALT) ในตับลงได้ ลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบ และการตายของเซลล์ตับ ได้แก่ Bax, cytochrome C, caspase-3, nuclear factor-kappa B, I kappa B alpha นอกจากนี้ยังมีผลเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สาร DADS จากกระเทียมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปกป้องตับจากสารพิษ

โดยกลไกกระตุ้นการทำงานของ nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) ซึ่งเป็น transcription factor หรือโปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์ และเนื้อเยื่อจากอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา การกระตุ้น Nrf2 มีผลเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และสร้างเอนไซม์ในระบบการกำจัดสารพิษออกจากร่างกายในขั้นตอนที่ 2 (detoxifying Phase II enzyme) และยับยั้ง nuclear factor-kappa B มีผลให้ลดการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบลง และปกป้องตับจากสารพิษได้ (Lee, et al, 2014)

2.2.7 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดน้ำโดยไม่ผ่านความร้อน (raw garlic) และสารสกัดกระเทียมที่ผ่านการต้มแล้ว นำมาทดสอบในหลอดทดลอง โดยใช้เนื้อเยื่อของกระต่าย พบว่า raw garlic สามารถยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase (ที่ทำให้เกิดการสร้างสารอักเสบ) แบบ non-competitive และ irreversible จากการศึกษาพบว่า raw garlic สามารถยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase ได้ โดยมีค่า LC_{50} ต่อเกล็ดเลือด, ปอด และหลอดเลือดแดงในกระต่ายเท่ากับ 0.35, 1.10 และ 0.90 มิลลิกรัม ในขณะที่กระเทียมที่ต้มแล้วมีฤทธิ์ยับยั้ง cyclooxygenase ได้เล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกระเทียมที่ไม่ผ่านความร้อน เนื่องจากส่วนประกอบสำคัญในกระเทียมนั้นถูกทำลายในขณะที่ให้ความร้อน จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากระเทียมน่าจะมีประโยชน์ในการป้องกันโรคหลอดเลือดอุดตันได้ (Ali, 1995)

จากการรวบรวมงานวิจัย ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของกระเทียม โดยสรุปพบว่ากระเทียมมีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านหลายกลไก ดังนี้คือ ต้านการอักเสบผ่าน T-cell lymphองศาเซลเซียส โดยไปยับยั้ง SDF1a-chemokine-induced chemotaxis มีผลให้การมารวมกลุ่มกันของสารที่ทำให้เกิดการอักเสบลดลง, ยับยั้ง transendothelial migration of neutrophils มีผลให้ลดการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ในกระบวนการอักเสบลง, ยับยั้งการหลั่งสาร TNFα ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นในขบวนการอักเสบ, กดการสร้างอนุมูลไนโตรเจนที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาการอักเสบ และการทำงานผ่าน ERK1/2 ทั้ง 2 กลไก ได้แก่ การยับยั้ง phosphatase-activity (directly related with ERK1/2 phosphorylation) และการเพิ่ม phosphorylation of ERK1/2 kinase (ผ่านทาง p21ras protein thioallylation) มีผลทำให้การอักเสบลดลง (Martins, 2016)

2.2.8 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อ Escherichia coli ซึ่งป็นเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร ของสารสกัดหัวกระเทียมด้วย เอทานอล เมทานอล อะซิโตน และการสกัดสดโดยวิธีบีบคั้นแบบเย็น โดยใช้วิธี microdilution broth susceptibility test พบว่าการสกัดสดมีค่า MIC และค่า MBC ต่ำที่สุด (3.125 กรัมต่อลิตร) และรองลงมาคือ สารสกัดจากตัวทำละลาย

เอทานอล เมทานอล และอะซิโตน ให้ค่า MIC และ MBC เท่ากัน (6.25 กรัมต่อลิตร) แสดงว่าสารสกัดสดมีสมบัติในการยับยั้ง และฆ่าเชื้อแบคทีเรียดีที่สุด เนื่องจากในกระเทียมสดมี allin เป็นสารประกอบกำมะถันที่สำคัญ เมื่อกระเทียมสดถูกบด หรือผ่านกระบวนการแปรรูป allinase จะถูกปลดปล่อยออกมาจากภายใน vacuole ของเซลล์ และอาศัยน้ำเป็นกลไกในการทำปฏิกิริยาได้เป็น allicin ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งกระบวนการสกัดสดช่วยให้การทำปฏิกิริยาระหว่างสาร allin และ allinase ดีขึ้น เนื่องจากจะต้องใช้เวลาในการบีบเค้นน้ำกระเทียมซึ่งระยะเวลาดังกล่าวช่วยให้การทำปฏิกิริยาระหว่างสารมากขึ้น อาจทำให้ได้ allicin เพิ่มขึ้น (ภรภัทรและคณะ, 2554)

2.2.9 ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดน้ำที่ได้จากหัวกระเทียมทำการศึกษาในหลอดทดลอง โดยใช้วิธี tube dilution method ใช้ยา Ciprofloxacin 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella typhi* ผลการทดสอบ พบว่าสารสกัดน้ำจากหัวกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) ต่อเชื้อ *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa, S. aureus* และ *S. typhi* เท่ากับ 120, 120, 120, 80 และ 120 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) เท่ากับ 120, 160, 120, 120 และ 160 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Lawal, 2016)

2.2.10 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยให้ผงกระเทียม อัดเม็ดเคลือบ ขนาด 900 มิลลิกรัม (เทียบเท่ากับปริมาณของ alliin 1.3 เปอร์เซ็นต์ และ allicin 0.6 เปอร์เซ็นต์) ต่อวัน เป็นเวลา 2 เดือน ศึกษาผลต่อระดับสาร malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นสารที่หลั่งออกมาเมื่อเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) และวัดระดับความเข้มข้นของ reduced (GSH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และ oxidized (GSSG) glutathione คือ GSH ที่เกิดขึ้นหลังถูกออกซิไดส์ ในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 25 คน หลังจาก 2 เดือนผ่านไป พบว่าระดับ MDA ลดลง 60 เปอร์เซ็นต์ จากค่าเริ่มต้น ในทุกกลุ่มอายุ ซึ่งการศึกษานี้ทำกับคน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มคนอายุน้อยกว่า 30 ปี และกลุ่มคนอายุมากกว่า 40 ปี และพบว่าความเข้มข้นของระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ GSH ในเม็ดเลือดแดงมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ 40 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้นของ GSSG เปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (Grune, 1996)

2.2.11 การศึกษาทางพิษวิทยา

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของกระเทียมสกัดชนิด freeze dried ในหนูขาว โดยหาค่า LD_{50} (ขนาดของกระเทียมสกัดที่ทำให้หนูทดลองตายร้อยละ 50) ใช้หนูขาว 50 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่ม กรอกน้ำกลั่นเป็นกลุ่มควบคุมหนึ่งกลุ่ม อีกสี่กลุ่ม กรอกน้ำละลายของกระเทียมสกัดจำนวน 2, 4, 8 และ 16 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ และเฝ้าดูอาการของการเป็นพิษภายหลังกรอกน้ำละลายของกระเทียมสกัดไปแล้ว 1, 2, 4 ชั่วโมง และทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 14 วัน พบว่าหนูทดลองไม่แสดงอาการผิดปกติไปจากกลุ่มควบคุม ไม่มีสัตว์ทดลองตาย แสดงว่า LD_{50} ของสารสกัดกระเทียมที่ให้ทางปากของหนูขาวมีค่าสูงกว่า 16 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม หลังจากนั้นนำเลือดมาทดสอบทางเคมี และตัดอวัยวะภายในรวมทั้งสมองตรวจหาพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อ ไม่พบสิ่งผิดปกติที่ต่างไปจากกลุ่มควบคุม สรุปตาม WHO recommended classification ความเป็นพิษของสารทดสอบได้ว่ากระเทียมสกัดชนิด freeze dried เป็นสารปลอดภัยไม่ก่อให้เกิดพิษ (นันทพรและคณะ, 2532)

2.3 มะระขี้นก (*Momordica charantia*)

มะระขี้นกเป็นสมุนไพรที่มีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ โดยมีลักษณะทางพฤกษาศาสตร์ดังต่อไปนี้

2.3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

1) ราก เป็นพวก cap root system มีรากแก้วแทงลงไปในดินและมีรากแขนงแตกออกไปจากรากแก้วอีก

2) ลำต้น ลักษณะเป็นเถาเลื้อยมีสีเขียวขนาดเล็ก เป็นเหลี่ยม 5 เหลี่ยม มีขนอยู่ทั่วไป มีมือเกาะที่เจริญออกมาจากส่วนของข้อ ใช้สำหรับยึดจับ

3) ใบ เป็นใบเดี่ยว รูปฝ่ามือมีสีเขียวอ่อน และมีขนอ่อนนุ่มปกคลุมเล็กน้อย เมื่อแก่จัดจะมีสีเขียวเข้ม ออกเรียงสลับกัน ก้านใบยาว ขอบใบเว้าหยักลึกเข้าไปในตัวใบ 5 – 7 หยัก ปลายใบแหลม ใบกว้าง 4.5 – 11.5 เซนติเมตร ยาว 3.5 – 10 เซนติเมตร เส้นใบแยกออกจากจุดเดียวกัน แล้วแตกออกเป็นร่างแห

4) ดอก เป็นดอกเดี่ยว ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกเพศกัน อยู่ในต้นเดียวกัน เจริญมาจากข้อ

5) ดอกตัวผู้ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 – 1.5 นิ้ว กลีบนอก 5 กลีบ สีเขียวปนเหลือง กลีบในมี 5 กลีบ สีเหลืองสด เกสรตัวผู้มี 3 อัน แต่ละอันจะมีเรณูและก้านชูเกสรตัวผู้อย่างละ 3 อัน เจริญออกมาก่อนดอกตัวเมีย

6) ดอกตัวเมีย เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 – 1.5 นิ้ว มีรังไข่แบบ inferior ovary ประกอบด้วยกลีบดอก 5 กลีบ สีเขียวปนเหลือง กลีบใน 5 กลีบ สีเหลืองสด เกสรตัวเมียมีรังไข่ 1 อัน stigma 3 คู่ ก้านชูเกสรตัวเมีย 3 อัน

7) ผล รูปร่างคล้ายกระสวยสั้นๆ ผิวเปลือกขรุขระและมีปุ่มยื่นออกมา ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่เต็มที่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมแดง ปลายผลจะแตกอ้าเป็น 3 แฉก ผลยาว 5 – 7 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางผล 2 – 4 เซนติเมตร

8) เมล็ด เมื่อแก่เต็มที่มีเมือกสีแดงสดห่อหุ้มเมล็ดอยู่ เมล็ดมีรูปร่างกลม รีแบน ปลายแหลมสีฟางข้าว

2.3.2 ประโยชน์ทางยา

1) ลดน้ำตาลในเลือด รักษาโรคเบาหวาน หั่นเนื้อมะระตากแห้งชงน้ำดื่ม ถ้าต้องการกลบรสขมให้เติมใบชาลงไปด้วยขณะที่ชง ดื่มต่างน้ำชา นอกจากนี้น้ำต้มผลมะระ สามารถลดการเกิด ต้อกระจก ซึ่งเป็นอาการข้างเคียงในคนที่เป็นโรคเบาหวานได้

2) รักษาโรคเอดส์ต้านเชื้อ HIV ใช้ผลอ่อนทำเป็นน้ำคั้น หรือบดเป็นผงใส่แคปซูล หรือยาลูกกลอน การใช้น้ำคั้นจากผลดื่มได้ผลดีกว่ากินสดหรือต้ม แต่การสวนทวารด้วยน้ำคั้นมะระจะได้ผลดีกว่าการดื่ม เพราะสารสำคัญ MAB 30 เป็นสารโปรตีนที่จะถูกทำลายโดยกรดและน้ำย่อยอาหารในกระเพาะอาหารได้

3) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง คือ guanylate cyclase inhibitor สกัดได้จากผลสุก MAB 30 สกัดจากเนื้อผลสุกและเมล็ด momorchrin สกัดจากเมล็ด ผลและเมล็ดต้มน้ำดื่ม

4) ช่วยเจริญอาหาร ใช้เนื้อของผลที่ยังไม่สุกไม่จำกัดจำนวน ใช้ประกอบเป็นอาหาร ผักจิ้ม ต้ม แกง

5) ใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ ใช้ใบสดมะระขี้นก 20-30 ใบ หั่นใบชงด้วยน้ำร้อน เติมเกลือ เล็กน้อย ช่วยกลบรสขม ดื่มแต่น้ำ ใช้ได้ดีสำหรับถ่ายพยาธิเข็มหมุด นอกจากนี้ยังใช้เมล็ด 2-3 เมล็ด รับประทานขับพยาธิตัวกลม

6) ทำให้อาเจียน ใช้เถาสด 1/3 กำมือ หรือ 6-20 กรัม เติมน้ำพอท่วม ต้มให้เดือด 5-10 นาที ดื่มแต่น้ำ

7) รักษาชันนะตุและศีรษะเป็นเม็ดผื่นคัน ใช้ผลสดที่ยังไม่สุกหั่นเนื้อมะระแล้วตำคั้นเอาแต่น้ำ เติมดินสอพองลงในพอสมควร ใช้ทาบริเวณที่เป็นชันนะตุ (ดารณี, 2544)

8) เป็นยาแก้ไข ใช้ผลมะระต้มน้ำแล้วดื่ม อาการตัวร้อนจะหายไป

9) แก้ไข้ที่เกิดจากกระทบความร้อน ใช้ผลสด 1 ผล ควักไส้ในออกใส่ใบชาเข้าไปแล้วประกบกันนำไปตากให้แห้งในที่ร่ม รับประทานครั้งละ 6-10 กรัม โดยต้มน้ำดื่มหรือชงน้ำดื่มต่างชา ก็ได้

10) แผลสุนัขกัด ใช้ใบสดตำพอก

11) แก้ปวดฝี ใช้ใบแห้ง บดเป็นผงชงเหล้าอื่น แก้ฝีบวมอักเสบใช้ใบสดตำคั้นเอาน้ำทาบริเวณที่เป็นหรือใช้รากแห้งบดเป็นผงผสมน้ำพอก

12) แก้ปวดฟัน ใช้รากสดตำพอก

13) แก้คัน แก้หิด และโรคผิวหนังต่างๆ ใช้ผลแห้งบดเป็นผง ใช้โรยแผลแก้คันหรือทำเป็นขี้ผึ้ง ใช้ทาแก้หิดและโรคผิวหนังต่างๆ (thethan, 2564)

2.3.3 สารสำคัญ

1) ผลมี Charantin, 5-hydroxyseratonin และ amino acids เช่น glutamic acid, alanine, β-alanine, phenylalanine, proline, citrulline, galacturonic acid

2) ผลสุก มีสาร saponin.

3) เมล็ดมีไขมัน 31.0 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย butyric acid 1.8 เปอร์เซ็นต์ palmitic acid 2.8 เปอร์เซ็นต์, stearic acid 21.7 เปอร์เซ็นต์, oleic acid 30 เปอร์เซ็นต์, ∝-elaeostearic acid, 43.7 เปอร์เซ็นต์ momordicine และ protein

4) ใบสดมี momordicine (ไทยเกษตรศาสตร์, 2564)

2.3.4 การศึกษาทางเภสัชวิทยา

ตั้งแต่อดีตงานวิจัยสมุนไพรมะระขี้นกได้ดำเนินอย่างต่อเนื่องมาตั้งแต่ ค.ศ. 1962 ซึ่ง Lotlika และ Rao ได้ค้นพบชาแรนตินในผลมะระ ที่แสดงฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลอง ในปี 1965 Sucrow ได้พิสูจน์โครงสร้างเคมีของชาแรนติน พบว่าเป็นสารผสมของ sitosteryl- และ 5,25-stigmastadien-3-beta-ol-D-glucosides ในอัตราส่วน 1:1 ปี 1977 Baldwa และคณะ ได้แยกสารคล้ายอินซูลินจากผลมะระและมีฤทธิ์ลดน้ำตาล ในปี 1981 Khana และคณะได้พิสูจน์โครงสร้างของสารคล้ายอินซูลิน พบว่าเป็นโพลีเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 11,000 ดาลตัน และมีกรดอะมิโน 166 residues เรียกสารนี้ว่า โพลีเปปไทด์ พี สารขมกลุ่มคิวเคอร์บิตาซินซึ่งเป็น chemotaxonomic character ของพืชวงศ์ Cucurbitaceae คิวเคอร์บิตาซินในมะระ คือ มีรายงานว่าสารขมดังกล่าวมีฤทธิ์ลดน้ำตาลได้

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Joseph B และคณะ(2013) พบว่าสารทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ charantin, momocharin, monordicin จัดเป็นสารสำคัญ active compound ของมะระขี้นกในการลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยเฉพาะอย่างยิ่ง charantin มีฤทธิ์ระดับน้ำตาล

ในเลือดที่แรงกว่ายา tolbutamide และยังมีการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของมะระขี้นก ซึ่งมีผลดังนี้

1) ฤทธิ์ลดไข้ มีการศึกษาฤทธิ์ลดไข้ของมะระขี้นก โดยใช้สารสกัดเอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 1:1 ให้เข้าทางกระเพาอาหาร (gastric intubation) ของกระต่าย พบว่ามีฤทธิ์ลดไข้ และยังได้ทดลองกรอกเข้าทางกระเพาะอาหาร (intragastric) ของหนูขาว ปรากฏว่า สามารถลดไข้ได้เช่นเดียวกัน

2) ฤทธิ์แก้ปวด สารสกัดเมทานอล มีฤทธิ์แก้ปวด สารสกัดจากเมล็ดมีฤทธิ์แก้ปวดในหนูขาวและหนูถีบจักร นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้สารสกัดเมทานอลฉีดเข้าใต้ผิวหนังในหนูถีบจักรที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ของขนาดที่ทำให้หนูตาย (LD_{50}) เท่ากับ 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีฤทธิ์แก้ปวด แต่สารสกัดเอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 1:1 กรอกเข้าทางกระเพาะอาหาร (intragastric) ของหนูถีบจักรไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว

2.3.5 การศึกษาทางพิษวิทยา

1) การทดสอบความเป็นพิษ เมื่อฉีดสารสกัดพืชทั้งต้น ด้วยเอทานอล (50 เปอร์เซ็นต์) เข้าใต้ผิวหนังในขนาด 20 กรัม/กิโลกรัม หรือให้หนูถีบจักรกินในขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม ไม่พบพิษ สารสกัดส่วนเหนือดินและไม่ระบุส่วนที่ใช้ด้วยเอทานอล (50 เปอร์เซ็นต์) เมื่อฉีดเข้าช่องท้องหนูถีบจักร ขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 681 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และมีค่าสูงกว่า 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แอลคาลอยด์ที่แยกได้จากมะระขี้นก เมื่อให้กระต่ายกินขนาด 56 มิลลิกรัม/ตัว หรือฉีดเข้าช่องท้องหนูถีบจักร 14 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ไม่พบพิษ ฉีดน้ำคั้นจากผลเข้าช่องท้องหนูขาวขนาด 15 มิลลิลิตร/กิโลกรัม หรือ 40 มิลลิลิตร/กิโลกรัม พบว่าทำให้สัตว์ทดลองตายภายใน 18 ชั่วโมง และเมื่อฉีดน้ำคั้นผลเข้าช่องท้องของกระต่ายในขนาด 15 มิลลิลิตร/กิโลกรัม พบว่าทำให้กระต่ายตายภายใน 18 ชั่วโมง แต่เมื่อให้เข้าทางกระเพาะของกระต่ายในขนาด 6 มิลลิลิตร/กิโลกรัม พบว่ากระต่ายตายหลังจากได้รับสารสกัดอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 23 วัน ขณะที่อีกการทดลองหนึ่งให้สารสกัด (ไม่ระบุชนิด) เข้าทางกระเพาะในขนาด 8 กรัม/กิโลกรัม กับกระต่ายไม่พบพิษ เมื่อให้คนรับประทานน้ำคั้นจากผลในขนาด 50 มิลลิลิตร/วัน น้ำต้มผลแห้ง ขนาด 500 มิลลิกรัม ไม่พบพิษ

2) ส่วนน้ำต้มผลสดฉีดเข้าช่องท้องหรือฉีดเข้าใต้ผิวหนังหนูถีบจักร ค่า LD_{50} เท่ากับ 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 270 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อฉีดสารสกัดผลด้วยเอทานอล (50 เปอร์เซ็นต์) เข้าช่องท้องหนูถีบจักรพบว่า LD_{50} เท่ากับ 681 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ให้หนู gerbil กินสารสกัดผลด้วยเอทานอล (95 เปอร์เซ็นต์) ขนาด 1.1 กรัม/กิโลกรัม นานติดต่อกัน 30 วัน และสารสกัด (ไม่ระบุส่วนที่ใช้) ด้วยเอทานอล (95 เปอร์เซ็นต์) เมื่อผสมอาหารในขนาด 50 ไมโครกรัม/ตัว ให้หนูถีบจักรกิน พบว่าไม่ทำให้เกิดพิษ แต่เมื่อฉีดสารสกัดเมล็ดด้วยน้ำเข้าช่องท้อง

หนูขาวพบว่า LD_{50} เท่ากับ 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สารสกัดผลด้วยคลอโรฟอร์ม เมื่อฉีดเข้าทางช่องท้องหนูถีบจักรในขนาด 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทำให้สัตว์ทดลองอ่อนแรงและตายหลังได้รับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ส่วนสกัดที่ได้จากสารสกัดส่วนผลของมะระด้วยเอทานอล (80 เปอร์เซ็นต์) เมื่อฉีดให้หนูถีบจักรในขนาด 15 มิลลิลิตร/กิโลกรัม พบว่าทำให้สัตว์ทดลองตายภายหลังได้รับสารสกัด 4 ชั่วโมง และส่วนสกัดที่ได้จากสารสกัดส่วนใบ ฉีดเข้าช่องท้องหนูถีบจักรในขนาด 24.3 มิลลิลิตร/กิโลกรัม หลังฉีด 10 นาที หนูมีอาการชักและอ่อนแรงและตายภายใน 1 ชั่วโมง 15 นาที

3) พิษต่อระบบสืบพันธุ์ เมื่อให้น้ำคั้นจากผลในขนาด 6 มิลลิลิตร/กิโลกรัม ในกระต่ายที่ตั้งท้องทำให้มีเลือดออกจากมดลูกและมีกระต่ายตายจากการตกเลือด เมื่อฉีดสารสกัดผลซึ่งมีสาร charantin และเมล็ดซึ่งมีสาร vicine เข้าทางช่องท้องของสุนัขในขนาด 1.75 กรัม/ตัว พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งขบวนการสร้างอสุจิ และในหนูถีบจักรเพศเมียเมื่อได้รับสารสกัด (ไม่ระบุชนิด) พบว่ามีผลยับยั้งการผสมพันธุ์ เมื่อให้ใบและเปลือกลำต้น (ไม่ระบุขนาด) เข้าทางกระเพาะในหนูขาวที่ตั้งท้องพบว่ามีเลือดออกผิดปกติจากมดลูก น้ำคั้นผลสด เมื่อให้ในหนูถีบจักรเพศเมียมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญพันธุ์ และน้ำคั้นผลสดเมื่อให้เข้าทางกระเพาะของหนูขาวเพศผู้ในขนาด 5 มิลลิลิตร/กิโลกรัม เป็นเวลา 49 วัน พบว่ามีผลยับยั้งการผสมพันธุ์ และพบว่ามีผลฆ่าอสุจิในหนูขาว เมื่อให้น้ำคั้นจากผล (ไม่ระบุขนาด)

4) สารสกัดด้วยน้ำ (ไม่ระบุส่วนที่ใช้) ในขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เมื่อให้หนูขาวที่ท้องกินไม่พบว่าเป็นพิษต่อตัวอ่อนหรือทำให้แท้ง และสารสกัดด้วยเอทานอลในขนาดที่เท่ากันก็ไม่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนหรือทำให้แท้ง น้ำต้มจากใบเมื่อให้หนูขาวเพศเมียกินในขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อน และไม่เป็นพิษต่อตัวอ่อน สารสกัดด้วยเบนซิน สารสกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (ไม่ระบุส่วนที่ใช้) เมื่อให้ทางกระเพาะหรือฉีดเข้าทางช่องท้องหนูขาวในขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างอสุจิ สารสกัดน้ำจากเมล็ด มีผลทำให้แท้งเมื่อฉีดเข้าทางช่องท้องหนูขาวที่ตั้งท้องในขนาด 8 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และหนูถีบจักรในขนาด 0.04 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดเมล็ดด้วยอะซีโตน ซึ่งประกอบด้วยสาร 0.08 เปอร์เซ็นต์ b-momorcharin และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ a-momorcharin เมื่อฉีดเข้าทางช่องท้องหนูถีบจักรที่ตั้งท้องได้ 12 วัน ในขนาด 4 ไมโครกรัม/กรัม ทำให้แท้ง (กรายงานหนึ่งพบว่าสารสกัด (ไม่ระบุส่วนที่ใช้) ด้วยน้ำเมื่อฉีดในขนาด 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีผลทำให้แท้ง สาร momorcharins ในเมล็ดมะระขี้นกพบว่าทำให้เกิดความผิดปกติของตัวอ่อนหนูถีบจักรในระยะแรกของการสร้างอวัยวะโดยทำให้เกิดความผิดปกติส่วนหัว ลำตัว และแขนขา

5) ผลต่อเม็ดเลือดขาวน้ำคั้นจากผลในขนาดที่มีผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (lymphocyte) ตายครึ่งหนึ่งมีค่าเท่ากับ 0.35 มิลลิกรัม/จานเพาะเชื้อ สารสกัดด้วยน้ำเกลือ (ไม่ระบุส่วนที่ใช้) เมื่อทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte)ในขนาด 40 ไมโครกรัม/จานเพาะเชื้อ พบว่ามีความเป็นพิษต่อยีน lectin และโปรตีนบางชนิดในเมล็ดของมะระมีผลยับยั้งบางขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA ของทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติและเซลล์มะเร็ง ป้อนน้ำคั้นจากผลสดและเมล็ดของมะระให้หนูขาวเพศผู้ในขนาด 1 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 100 กรัม เป็นเวลา 30 วันพบว่าทำให้ enzyme serum g-glutamyltransferase และ alkaline phosphatase มีความเข้มข้นสูงขึ้น จึงคาดว่าน่าจะมีสารที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับ (disthai, 2564)

3 การใช้สารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรในสัตว์น้ำ

จากการที่มีการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงปลาเพื่อการค้าและการส่งออก จึงทำให้มีความพยายามที่จะหาสิ่งที่สามารถนำมาใช้แทนยาปฏิชีวนะในการป้องกัน และรักษาโรคปลา สิ่งหนึ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบันคือพืชสมุนไพรเนื่องจากมีข้อดีหลายประการ เช่น

1) สมุนไพรเกือบทุกชนิดสามารถหาได้ตามธรรมชาติหรือปลูกได้เอง ทำให้ เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาไม่จำเป็นต้องเสียค่าใช้จ่ายมากในการซื้อยาปฏิชีวนะซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้ยัง ทำให้เกษตรกรสามารถพึ่งพาตนเองได้โดยไม่จำเป็นต้องพึ่งพาบริษัทผลิตยาปฏิชีวนะ

2) สมุนไพรส่วนใหญ่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยจากการที่มีการใช้รักษาโรคในคนหรือสัตว์ต่างๆ มาเป็นเวลานาน

3) สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่าสามารถใช้ป้องกัน และรักษาโรคในคนและสัตว์ต่างๆ ได้

4) สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ (antimicrobial activity) เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัสได้

5) สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่ามีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ซึ่งจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของปลาได้

6) สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่ามีความสามารถในการลดความเครียดได้ ซึ่งการลดความเครียดในปลาจะช่วยทำให้ปลามีมีการเจริญเติบโตได้ดีและมีโอกาสติดเชื้อได้น้อยลง

7) สมุนไพรหลายชนิดได้รับการยืนยันทางวิชาการว่ามีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulation) ของคน และสัตว์ต่างๆ รวมทั้งปลาได้ สารเคมีที่พบ

ในสมุนไพรจำนวนมากได้รับการพิสูจน์และยืนยันว่ามีส่วนช่วยให้ สมุนไพรมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การกำจัด อนุมูลอิสระ การลดความเครียดและการป้องกันการเกิดโรค ตัวอย่างของสารดังกล่าว เช่น alkaloids, flavonoids, phenolics, terpenoids, steroids และ essential oils (อัครวิทย์, 2554)

4. แบคทีเรีย

แบคทีเรียคือจุลินทรีย์ที่เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่เป็นเซลล์แบบโปรแคริโอต (Prokaryotic cell) พบทั่วไป ในธรรมชาติ ดิน น้ำ อากาศ แบคทีเรียเป็นจุลชีพเซลล์เดียวที่มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต อื่นทั่วไป โดยมีส่วนประกอบหลัก 2 ส่วน คือ

1) ส่วนที่หนึ่งเป็นผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์จะเป็น ผนังที่อยู่ชั้นนอกสุด มีความแข็งแรงและเปรียบเสมือนโครงกระดูกของแบคทีเรีย มีหน้าที่รักษาลักษณะ 6 และรูปร่างของแบคทีเรียเอาไว้ให้คงที่ ถัดจากผนังเซลล์เข้าไปจะเป็นเยื่อหุ้มบางๆ เรียกว่าเยื่อหุ้มเซลล์ ทำหน้าที่ควบคุมการแลกเปลี่ยนสารอาหารต่างๆ และน้ำที่อยู่ภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียให้มีความเหมาะสมในการดำรงชีวิต

2) ส่วนที่สอง อยู่ถัดจากเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไป ประกอบด้วยสารกึ่งเหลวเรียกว่าไซโตพลาสซึม ภายในไซโตพลาสซึมประกอบไปด้วย โปรตีน สารอาหารต่างๆ เช่น แป้ง ไขมัน และเอนไซม์ต่างๆ ที่ใช้ในการ ดำรงชีวิต นอกจากนั้นยังมีกรดนิวคลีอิกหรือดีเอ็นเอ ซึ่งบรรจุรหัสพันธุกรรม สำหรับควบคุมการดำรงชีวิต และการสืบพันธุ์ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ไว้ด้วย แบคทีเรียบางสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้าง ผนังเซลล์ที่มีความหนากว่าปกติล้อมรอบตัวมัน เรียกผนังที่หนาเป็นพิเศษนี้ว่าสปอร์หรือแคปซูล สปอร์จะคงทนต่อความร้อน ความเย็น ความชื้น และมีชีวิตอยู่ได้นานหลายปีแม้ว่าจะไม่มีอาหารเลยก็ตาม

4.1 การขยายพันธุ์ของแบคทีเรีย

แบคทีเรียขยายพันธุ์โดยไม่ต้องมีเพศผู้หรือเพศเมีย เมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม มีอาหาร สมบูรณ์จะสร้างส่วนต่างๆ ที่ใช้ในการดำรงชีวิตขึ้นมาอีกชุดหนึ่ง หลังจากนั้นก็จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมา ล้อมรอบส่วนประกอบต่างๆ แต่ละชุด แล้วกลายเป็นสองเซลล์ จากสองเซลล์เป็นสี่เซลล์ จากสี่เซลล์เป็น 8เซลล์ ไปเรื่อยๆ แบคทีเรียจะสังเคราะห์สาระสำคัญไว้ในเซลล์และแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 7 เหมือนกัน จากนั้นแต่ละส่วนจะถูกแยกออกจากกันและมีผนังเซลล์มาห่อหุ้มไว้ในแต่ละส่วน จนกลายเป็น 2เซลล์ ซึ่งอาจจะแยกจากกันโดยเด็ดขาด หรือยังคงเชื้อมอยู่ด้วยกัน จะเห็นว่าเซลล์ที่แบ่งตัวแล้วจะมีลักษณะการจัดเรียงของโครงสร้างสารต่างๆ ของเซลล์เหมือนกันทั้ง 2 เซลล์

กล่าวกันว่าในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ของแบคทีเรียแต่ละชนิด มันสามารถแบ่งตัวทุกๆ 20 – 30 นาที โดยมีอัตราการแบ่งตัว ดังนี้

หลังจาก ½ ชั่วโมง จะแบ่งตัวเป็น 2 เซลล์

หลังจาก 1 ชั่วโมง จะแบ่งตัวเป็น 4 เซลล์

หลังจาก 1 ½ ชั่วโมง จะแบ่งตัวเป็น 8 เซลล์

หลังจาก 2 ชั่วโมง จะแบ่งตัวเป็น 16 เซลล์

หลังจาก 11 ชั่วโมง จะแบ่งตัวเป็น 10 ล้านเซลล์

อย่างไรก็ตาม อัตราการแบ่งตัวอาจถูกยับยั้งหรือช้าลง ถ้าอยู่ในสภาพขาดสารอาหาร มีสารพิษ หรือมีของเสียที่เป็นอันตรายต่อมันหรืออยู่ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม ไม่อากาศ หรือมีอากาศที่ไม่เหมาะสม และถ้ายังคงอยู่ในสภาพดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลานานก็จะหยุดเจริญเติบโต หยุดแบ่งตัว และตายในที่สุด

4.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

การจำแนกแบคทีเรียสามารถทำได้โดยวิธีดังต่อไปนี้

4.2.1 จำแนกตามการติดสีย้อมแกรม (Gram stain)

การแบ่งแบคทีเรียออกเป็นแกรมบวกและแกรมลบ โดย นำสีแกรมซึ่งเป็นสีน้ำชนิดหนึ่ง หยดลงไปบนแบคทีเรียจะทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีสีแตกต่างกัน คือ

1) แบคทีเรียที่ผนังเซลล์ติดสีแดง เราจะจัดเป็นแบคทีเรียประเภทแกรมลบ (Gram negative bacteria)

2) แบคทีเรียที่ผนังเซลล์ติดสีน้ำเงิน เราจะจัดเป็นแบคทีเรียประเภทแกรมบวก (Gram positive bacteria)

4.2.2 จำแนกตามรูปร่างของแบคทีเรีย

แบคทีเรียมีขนาด 0.5-10 ไมครอน (micron) มีรูปร่างต่างกัน

1) บาซิลลัส (bacillus) มีรูปร่างเป็นท่อนหรือเป็นแท่ง เช่น Bacillus, Pseudomonas, Salmonella

2) ทรงกลมหรือค็อกคัส (coccus) Micrococcus, Streptococcus, Staphylococcus

3) สไปโรคีท (spirochete) รูปร่างบิดเป็นเกลียว ผนังเซลล์ยืดหยุ่นได้ เช่น *Campylobacter jejuni*

4.2.3 จำแนกตามการใช้ออกซิเจนของแบคทีเรีย

1) แบคทีเรียที่ต้องใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต เรียกว่า Aerobic bacteria

2) แบคทีเรียที่ไม่ต้องใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต เรียกว่า Anaerobic bacteria

3) แบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในบรรยากาศที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เรียกว่า Facultative anaerobic bacteria

4) แบคทีเรียที่เจริญในบรรยากาศที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย เรียกว่า microaerophilic bacteria

4.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับปัจจัยดังต่อไปนี้

1) อุณหภูมิสามารถแบ่งแบคทีเรียได้ 3 ประเภท ตามความแตกต่างของอุณหภูมิ

– Psychrophiles สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า

– Mesophiles เจริญได้ดีในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส – 40 องศาเซลเซียส

– Thermophiles เจริญได้ในอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส – 60 องศาเซลเซียส

2) สภาพความเป็นกรด-ด่าง แบคทีเรียส่วนมากเจริญได้ดีในช่วงของ pH 6.5-7.5 พวกราหรือยีสต์ทนต่อกรดได้ดีกว่า คือประมาณ pH 5

3) ความชื้น แบคทีเรียส่วนใหญ่ต้องการความชื้น การใช้อาหารในรูปของสารละลาย (solution) แบคทีเรียบางชนิดทนต่อ ความแห้งแล้งได้ดี เช่น *Tubercle bacilli* และ *Staphylococcus aureus* พวกที่มีสปอร์ก็ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี

4) แสงสว่าง แบคทีเรียทั่วไปไม่ต้องการแสงในการเจริญเติบโต ยกเว้นแบคทีเรียพวกที่สังเคราะห์แสงได้เท่านั้นที่ต้องการแสงในการเจริญเติบโต

5) เสียง ความถี่ของเสียงสูงจะทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกได้

4.2.5 การเกิดโรคแบคทีเรียในสัตว์น้ำ

โรคแบคทีเรียที่เกิดกับสัตว์น้ำ มีสาเหตุจากหลายประการ ได้แก่

1) การให้อาหารที่ไม่ดีหรือมากเกินไปเหลือในบ่อ ส่งผลให้น้ำมีคุณภาพไม่ดี เนื่องจาก ไม่มีการปรับปรุงคุณภาพน้ำหรือการถ่ายเทน้ำเก่าออก ทำให้สัตว์น้ำโตช้าหรือเครียด ประกอบกับมีเชื้อ โรคและพาหะของโรคติดมา

2) การเลี้ยงหนาแน่น ถ้าให้อาหารน้อยทำให้สัตว์น้ำขาดสารอาหารที่จำเป็น หรือถ้าให้อาหารมากเกินไปทำให้เศษอาหารที่เหลือตกค้างสะสมในบ่อ และเกิดการเน่าเป็นก๊าซพิษต่อสัตว์น้ำ ผลต่อสุขภาพสัตว์น้ำอ่อนแอ

3) นำสัตว์น้ำที่ติดเชื้อโรคมาเลี้ยงโดยไม่ได้ป้องกันกำจัดก่อน

4) ใช้เครื่องมือจับขนส่งที่ปนเปื้อนของเชื้อโรค โดยไม่ทำความสะอาดก่อน และทำให้เกิดบาดแผลในสัตว์น้ำ

4.2.6 โรคที่เกิดจากแบคทีเรียในสัตว์น้ำ

โรคที่เกิดกับแบคทีเรียในกับสัตว์น้ำ มีสาเหตุจากหลายประการ ได้แก่

1) โรคแผลตามลำตัว (Ulcerative disease)

สาเหตุ : เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ เช่น แอโรโมนาส ไฮโดรฟิล่า (*Aeromonas hydrophila*) และซูโดโมนาส แอรูจิโนซ่า (*Pseudomonas aeruginosa*)

-อาการ : ระยะเริ่มแรก ปลามีอาการเกล็ดหลุดร่วง ส่วนบริเวณรอบๆ เกล็ดที่หลุดออกนั้นเกล็ดจะตั้งขึ้นหรือเกิดลักษณะของดร๊อปซี่ (Dropsy) คืออาการตัวบวมและเกล็ดตั้ง ถ้า เป็นปลาไม่มีเกล็ด บริเวณนั้นจะบวมขึ้นและมีสีแดง ต่อมาผิวหนังจะเริ่มเปื่อยเป็นแผลลึกจนเห็น กล้ามเนื้อ โดยแผลที่เกิดจะกระจายไปทั่วตัว และเป็นสาเหตุให้ปลาติดโรคเชื้อราแทรกซ้อนต่อไป ปลาที่มักพบบ่อยว่าเป็นโรคนี้ได้แก่ ปลาดุก ปลาบู่ ปลาช่อน และปลาสวยงามต่างๆ

-การป้องกันและรักษา

- ใช้ยาปฏิชีวนะจำพวกไนโตรฟูราโซน (Nitrofurazone) ในอัตราส่วน 1 - 2 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร แช่นาน 2 - 3 วัน แช่ปลาที่เป็นโรคในสารละลายออกซีเตตร้าซัยคลิน (Oxytetracycline) หรือเตตร้าซัยคลิน (Tetracycline) ในอัตราส่วน 10 - 20 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร นาน 1 - 2 วัน ติดต่อกัน 3 - 4 ครั้ง หรืออาจใช้ยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ

- ตามความเหมาะสม หรือตามผลการตรวจหาความไวรับของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

- การฆ่าเชื้อในบ่อเลี้ยงโดยใช้ปูนขาวในอัตรา 50 - 60 กิโลกรัมต่อไร่

2) โรคสเตรปโตคอคโคซีสหรือโรคสมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อสเตรปโตคอคคัส (Streptococcosis or Streptococcal meningoencephalitis)

-สาเหตุ : เกิดจากแบคทีเรียในสกุลสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus* sp.) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. iniae* และ *S. Agalactiae* เข้าไปทำลายอวัยวะภายในโดยติดเชื้อทั้งจาก อาหารจากการนำปลาเป็นโรคเข้าฟาร์ม มักพบโรคในปลานิลและปลานิลทับทิม

-อาการ : ปลาว่ายน้ำเฉื่อยมาก หรือลักษณะการว่ายน้ำเปลี่ยนไป ตาโปนออกมา และมีแผลนูนช้ำบริเวณโคนครีบหลัง เมื่อผ่าซากจะพบลักษณะตับบวมโต และช้ำ ม้ามและไตบวมโต

-การป้องกันและรักษา :

- ใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น ออกซิเตตราไซคลิน (Oxytetracycline) ผสมอาหารในอัตราส่วนยา 150 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้กินติดต่อกัน 5 วัน

- การป้องกันทำได้โดยให้ปลากินอาหารที่สดอยู่เสมอ ไม่ควรนำปลาเป็นโรคมาเลี้ยงปนกับปลาที่ไม่เป็นโรคควรผ่านการตรวจและรักษาให้หายเสียก่อน

3) Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) หรือ กลุ่มอาการตายด่วน (EMS)

- สาเหตุ : การเกิดโรคนี้เกิดจากสายพันธุ์หนึ่งของเชื้อแบคทีเรียชนิดที่พบได้ทั่วไปในน้ำกร่อยบริเวณชายฝั่งทะเลทั่วโลก ซึ่งก็คือ *Vibrio parahaemolyticus*

- อาการ : กรณีที่ตรวจไม่พบสิ่งมีชีวิตหรือเชื้อที่ทำให้เกิดโรคอื่นๆ สามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคนี้โดยใช้เป็นข้อสันนิษฐานการเกิดโรคที่ระดับบ่อเลี้ยง อาการของโรคที่ระดับบ่อ ได้แก่ ตับมีสีซีดขาว เนื่องจากสูญเสียเม็ดสีในชั้นแคปซูลของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ตับฝ่อลีบอย่างเห็นได้ชัด เปลือกนิ่ม ลำไส้ไม่มีอาหาร หรือขาดช่วง อาจมีจุดหรือเส้นสีดำที่ตับ ตับเหนียวบี้ด้วยนิ้วมือยาก พบอาการของโรคและการตายในกุ้งได้ตั้งแต่วันที่ 10 หลังการปล่อย กุ้งป่วยจะจมลงก้นบ่อ พบกุ้งตายในบ่อประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 3 - 5 วัน อายุกุ้งป่วยอยู่ในช่วง 10 - 35 วัน อาการของโรคที่ระดับตัวกุ้ง เกิดการเสื่อมสภาพของตับและตับอ่อนอย่างเฉียบพลัน โดยมีการลดจำนวนลงของ R - cell B - c ell และ F - cell ในตับและตับอ่อน ตามด้วย การลดอัตราการแบ่งตัวของนิวเคลียสใน E - cell เซลล์ตับและตับอ่อนเริ่มมีการเสื่อมสภาพจากส่วนต้นของท่อไปจนถึงส่วนปลายของท่อ โดย R, B, และ F - cell เริ่มทำงานผิดปกติก่อนและตามด้วย E - cell ที่ทำงานผิดปกติเป็นชนิดสุดท้าย ซึ่งจะพบความผิดปกติของนิวเคลียสในเซลล์ตับและตับอ่อน เช่น นิวคลีไอของนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างเห็นได้ชัดและมีรูปร่างกลม ทำให้เซลล์จำนวนมากตายและหลุดออกจากผนังของท่อตับและตับอ่อน เซลล์ตับและตับอ่อนที่หลุดลอกจะเป็นอาหารอย่างดีให้กับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งจะทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสทำให้เกิดการอักเสบของท่อตับและตับอ่อน ทำให้กุ้งตายเป็นจำนวนมาก การหลุดลอกของเซลล์บุผนังท่อตับและตับอ่อนร่วมกับการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดฉวยโอกาส ทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดและมาห้อมล้อมบริเวณท่อตับและตับอ่อนที่ตาย และยังพบการรวมตัวของเม็ดสีเมลานินบริเวณท่อตับส่วนต้นในกุ้งบางตัวด้วย

4) โรคติดเชื้อวิบริโอ (Vibriosis)

-สาเหตุ : โรคติดเชื้อวิบริโอพบได้ทั่วโลก และเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของการเลี้ยงกุ้ง เกิดจากเชื้อวิบริโอ (*Vibrio*) เช่น *Vibrio harveyi, Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio Vulnificus* เป็นต้น ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนใหญ่รูปร่างแท่ง ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต (> 10 ppt = >1 เปอร์เซ็นต์) จึงเรียกว่า “halophilic” เชื้อนี้พบได้ทั่วไปในน้ำทะเล แม้แต่ในกุ้งที่แข็งแรงก็สามารถพบเชื้อวิบริโอหลายสปีชีส์ในทางเดินอาหารของกุ้งได้ และเชื้อวิบริโอนี้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพได้ง่ายมาก

-อาการ : เนื้อตายในเฮปปาโตแพนเครียสเกิดจากการติดเชื้อวิบริโอ เชื้อวิบริโอหลายสปีชีส์เป็นเชื้อจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของกุ้งปกติ จึงคาดว่าการติดเชื้อน่าจะผ่านทางเดินอาหารเป็นส่วนใหญ่ เชื้อนี้ก่อโรคได้ในกุ้งทุกระยะ ตั้งแต่ไข่จนถึงกุ้งโตเต็มวัย อาจพบโรคนี้ได้ ในโรงเพาะฟัก เชื้ออาจเป็นสาเหตุโดยตรงของโรคหรือเป็นเชื้อฉวยโอกาส ซึ่งต้องอาศัยสิ่งโน้มนำอื่น เช่น การติดเชื้อไวรัส หรือความเครียด เชื้อวิบริโออาจทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร โรคตามระบบ (systemic infection) หรือโรคบริเวณเปลือกกุ้ง ซึ่งอาจแสดงอาการต่างๆ กัน เช่น อัตราการตายสูง การกินอาหารลดลง สังเกตได้จากกุ้งไม่มีอุจจาระ และลอกคราบช้าลง อาการและรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่อาจใช้ในการวินิจฉัยเบื้องต้น ได้แก่ ฮีโมลิมฟ์ (hemolymph หรือเลือด) แข็งตัวช้า แบคทีเรียในฮีโมลิมฟ์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ แผ่นคราบแบคทีเรีย (bacterial plaques) บนคิวติเคิล จุดดำ โนดูลในเนื้อเยื่อ (melanized hemocytic nodules) มีแบคทีเรียตรงกลางโนดูล ไขมันในเฮปปาโต แพนเครียสต่ำ และ/หรือ melanized tubules การเรืองแสงของตัวกุ้ง (luminescence) การพบ โคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีเขียวขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS)

โรคทางจุลพยาธิวิทยาทำให้แยกการติดเชื้อวิบริโอได้เป็น 3 แบบ ดังนี้

1) โรคติดเชื้อวิบริโอภายนอก พบกลุ่มแบคทีเรียที่คิวติเคิลจำนวนมาก

2) โรคติดเชื้อวิบริโอในทางเดินอาหาร พบกลุ่มแบคทีเรียที่คิวติเคิลภายใน (internal cuticle) เช่น บริเวณปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร การลอกหลุดของเซลล์ เยื่อบุเฮปปาโตแพนเครียสและลำไส้ส่วนกลาง การอักเสบชนิด hemocytic inflammation (การอักเสบชนิดหนึ่งที่มีเซลล์ฮีโมไซต์แทรกตามเนื้อเยื่อที่เกิดการ อักเสบ) และ melanization (การอักเสบชนิดหนึ่ง มีสีดำเมื่อตรวจด้วยกล้อง จุลทรรศน์

3) โรคติดเชื้อวิบริโอตามระบบ (systemic infection) พบ septicemia hemocytic nodules กล้ามเนื้อฝ่อ (muscle atrophy) หรือ septic hepatopancreatic necrosis การติดเชื้อวิบริโอเป็นสาเหตุของโรคมากมาย เช่น hatchery vibriosis, sea gull syndrome, septic hepatopancreatic necrosis (SHPN), luminescent vibriosis, swollen hindgut syndrome, shell disease, appendage necrosis (rot), splinters

การรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อวิบริโอ

- ฆ่าเชื้อโรคและพักบ่อระหว่างการเลี้ยงแต่ละครั้ง
- ฆ่าเชื้อที่อาจมากับไข่กุ้งนอร์เพลียสทั้งของกุ้งและของอาร์ทีเมีย
- ใช้การจัดการที่ดี เช่น ดูแลการให้อาหาร ความหนาแน่น อุณหภูมิน้ำ เป็นต้น
- ใช้โปรไบโอติกและใช้ยาต้านจุลชีพเมื่อจำเป็น

- ใช้การจัดการที่ดี เช่น ควบคุมการเพิ่มจำนวนของแพลงก์ตอน ให้อาหารในปริมาณที่เหมาะสม ใช้ปูนขาวโรยบ่อ พักบ่อ เป็นต้น

ในปัจจุบันการป้องกันและรักษาโรคกุ้งหรือปลามักใช้สารเคมีสังเคราะห์และยาปฏิชีวนะ ถึงแม้ว่าวิธีการดังกล่าวจะให้ผลดีแต่ก็มีข้อด้อยอยู่หลายประการดั้งนี้

1) สารเคมีสังเคราะห์และยาปฏิชีวนะสามารถตกค้างอยู่ในตัวปลาได้ ซึ่งเป็นสิ่งที่ผู้บริโภคกังวลว่าจะทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค

2) การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสม เช่น ใช้ในปริมาณที่มากเกินไป หรือใช้เป็นเวลานานเกินไป อาจส่งผลให้เกิดการดื้อยาของเชื้อก่อโรค ซึ่งความสามารถในการดื้อยาสามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่อยู่ในธรรมชาติได้ ส่งผลให้เกิดแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ดื้อยาจำนวนมาก

3) การใช้ยาปฏิชีวนะมักทำให้เกิดผลข้างเคียง (side effect) กับปลา เนื่องจากยาปฏิชีวนะมักไปมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่อยู่ในตัวปลา ซึ่งจะทำให้ปลาเกิดอาการเครียด มีภาวะภูมิคุ้มกันที่ต่ำลง และมีการเจริญเติบโตที่ช้าลง ด้วยเหตุนี้ในหลายๆ ประเทศได้มีการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดในการเพาะเลี้ยงปลาในเพื่อการค้าและการส่งออก (อัครวิทย์, 2554)

4.3 แบคทีเรียสกุลวิบริโอ

การจัดจำแนกแบคทีเรียสกุลวิบริโอสามารถจัดจำแนกได้ดังต่อไปนี้

4.3.1 อนุกรมวิธาน

อาณาจักร: Bacteria

ไฟลัม: Proteobacteria

ชั้น: Gamma Proteobacteria

อันดับ: Vibrionales

วงศ์: Vibrionaceae

สกุล: *Vibrio*

ที่มา : wikipedia, (2564)

4.3.2 ลักษณะทั่วไป

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 microyst อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 18-37 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียที่ฉวยโอกาส คือเมื่อร่างกายของสัตว์อ่อนแอจากความเครียดจะเข้าทำอันตรายได้ทำให้เกิดโรคแบบ secondary infection สามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่มีการเติม เกลือ 1.5 – 3.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่มอื่น ซึ่งยากต่อการใช้จำแนกชนิด ดังนั้นจึงมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อแบคทีเรียสกุลนี้ คือ Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) agar หรือ Bromthymol Blue Salt Teepol (BTBST) เมื่อเจริญจะให้โคโลนีสีเขียวหรือเหลือง ขนาดปานกลาง-ใหญ่ ขึ้นอยู่กับ ความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสของแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้ *Vibrio* sp. เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในน้ำกร่อย หรือบริเวณแหล่งน้ำที่มีค่าความเค็มช่วงกว้าง ดังนั้น จึงสามารถพบ *Vibrio* sp. ในบ่อเลี้ยงกุ้ง (จุฑารัตน์ และคณะ , 2557)

5. ยาปฏิชีวนะ

ในวงการแพทย์มักเรียกยาปฏิชีวนะว่า แอนไทไบโอติก หรือ บางคนออกเสียงว่า แอนติไบโอติก (Antibiotics) เป็นคำที่มาจากภาษากรีก หมายถึงยาต้านสิ่งมีชีวิต (Anti หมายถึง ต่อต้าน Bios หมายถึง ชีวิต) ซึ่งสิ่งมีชีวิตในที่นี้ คือ จุลชีพหรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ซึ่งคือเชื้อโรคนั่นเอง ดังนั้นยาปฏิชีวนะก็คือ ยา ยับยั้ง ฆ่า หรือต้านทานจุลชีพซึ่งโดยทั่วไปมักเป็นเชื้อแบคทีเรีย บางคนจึงเรียกว่า ยาต้านแบคทีเรีย (Antibacterial) แต่ยังอาจครอบคลุมถึงเชื้อไวรัสและเชื้อราบางชนิดได้ด้วย ในร่างกายของมนุษย์จะมีระบบภูมิคุ้มกันต้านทานโรค เช่น เม็ดเลือดขาวที่ใช้ป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย อาทิ เชื้อ วัณโรค เมื่อใดก็ตามที่เชื้อโรคมีมากจนภูมิต้านทานหรือเม็ดเลือดขาวสู้ไม่ได้ เราก็จำเป็นต้องหาผู้ช่วย เช่น ยาปฏิชีวนะ เข้ามาเป็นกำลังเสริม ปัจจุบันยังมีความเข้าใจผิดในการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นอย่างมาก ใช้ผิดวิธีโดยมิได้ตั้งใจและก่อให้เกิดผลเสียตามมา ซึ่งบางครั้งอาจถึงกับเสียชีวิตได้ทั้งจากการแพ้ยาและเชื้อดื้อยา (Reddish, 1929) ได้ทำการพัฒนาเทคนิคการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพ โดยเป็นการใช้ Red dish modified ที่มีการตัดเข้าไปใน agar เพื่อให้เกิดลักษณะเป็นวงจากนั้นเติมสาร ปฏิชีวนะลงไปในวงดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากการตัดเป็นวงของ agar ต้องอาศัยเทคนิคและความชำนาญซึ่งอาจจะมีผลต่อ clear zone Abraham และคณะ (1941) ด้วย จากเทคนิคการตัด agar เป็นวงเพื่อเติมสารปฏิชีวนะยังมีข้อจำกัดในเรื่องของเทคนิคการจัดการ Abraham และคณะจึงได้พัฒนาเทคนิควิธีการทดสอบความไวของเชื้อที่มีต่อสารจุลชีพรูปแบบใหม่ ด้วยการวางชิ้นทรงกระบอกลงบน agar จากนั้นบรรจุสารปฏิชีวนะลงในชิ้นกระบอกดังกล่าวแทน

5.1 ชนิดของยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะกลุ่มแรกเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ ยาเพนิซิลลิน (Penicillin) ซึ่งสังเคราะห์ได้จากเชื้อรา แต่ในยุคปัจจุบันได้กำเนิดยาต้านเชื้อโรค โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียรุ่นลูกหลานออกมามากมาย จนนับไม่ถ้วน ยกตัวอย่าง กลุ่มยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในประเทศไทย ดังนี้

1) เพนิซิลลิน เป็นยาใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียได้ในหลายเนื้อเยื่อ อวัยวะ เช่น คออักเสบ เป็นต้นเป็นกลุ่มยาที่ไม่ทนกับกรดในกระเพาะอาหาร จึงจำเป็นต้องรับประทานยาก่อนอาหาร และถูกขับ ออกจากร่างกายโดยผ่านไต แต่ยาบางตัวในกลุ่มนี้ก็ถูกขับออกโดยผ่านกระบวนการที่ตับก่อน ตัวอย่างยา ในกลุ่มเพนิซิลลิน เช่น อะมอกซิซิลลิน (Amoxicillin) แอมพิซิลลิน (Ampicillin) คาร์เบนิซิลลิน (Carbenicillin) คลอกซา ซิลลิน (Cloxacillin) และฟลูคลอซาซิลลิน (Flucloxacillin) เป็นต้น

2) อะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycosides) เป็นยาปฏิชีวนะใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียที่กระดูก ข้อ การติดเชื้อที่ผิวหนัง การติดเชื้อทางเดินหายใจ การติดเชื้อหลังผ่าตัด ยากลุ่มนี้

ไม่ดูดซึมทางลำไส้ต้องใช้วิธีฉีเข้ากล้ามหรือฉีดเข้าทางหลอดเลือด มีความเป็นพิษต่อไตและหูชั้นใน ตัวอย่างยากลุ่มอะมีโนไกลโคไซด์ เช่น เจนตามัยซิน (Gentamycin) โทบรามัยซิน (Tobramycin) อะมิคาซิน (Amikacin) สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) สเปคทิโนมัยซิน (Spectinomycin) เป็นต้น

3) เซฟาโลสปอริน (Cephalosporin) กานำมัยซิน (Kanamycin) และ นีโอมัยซิน (Neomycin) จัดเป็นกลุ่มยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น ชนิดก่อการอักเสบของทางเดินหายใจและทางเดินอาหาร ยากลุ่มนี้ไม่ทนกรดเช่นเดียวกับกลุ่มเพนิซิลลิน (Penicillin) และดูดซึมในทางเดินอาหารได้ไม่ดี จึงต้องใช้การฉีดเข้ากล้ามหรือเข้าหลอดเลือด แต่ก็พบว่ายาเซฟาโลสปอรินบางตัวมีคุณสมบัติทนกรดได้ดีทั้งยังสามารถให้ยาโดยการรับประทานได้ ยาเซฟาโลสปอรินขับออกจากร่างกายโดยผ่านทางไตออกมากับปัสสาวะ บางส่วนถูกทำลายและผ่านออกมาทางตับแต่เป็นส่วนน้อย ตัวอย่างยาในกลุ่ม เซฟาโลสปอริน เช่นเซฟาโซลิน (Cefazolin) เซฟาคลอร์ (Cefaclor) เซฟูรอกซีม (Cefuroxime) เซโฟแทคซีม (Cefotaxime) และเซฟไตรอะ โซน (Ceftriaxone) เป็นต้น

4) แมคโครไลด์ (Macrolide) จัดเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้แพร่หลายอีกกลุ่มหนึ่ง สามารถยับยั้ง เชื้อแบคทีเรียโดยการก่อกวนที่สารพันธุกรรม หรือที่เรียกว่า อาร์เอนเอ (RNA) ตัวอย่างยากลุ่มแมคโครไลด์ เช่น อีรีโทรมัยซิน (Erythromycin) อซิโรมัยซิน(Azithromycin) คลาริโทรมัยซิน (Clarithromycin) และรอซิโทรมัยซิน (Roxithromycin) ทำให้เชื้อไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนในการดำรงชีวิตได้ มักใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียในทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง เป็นต้น

5) เตตราไซคลีน (Tetracyclines) ใช้รักษาการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะและการติดเชื้อในลำไส้ รักษาหลอดลอักเสบแผล ฝีหนอง มีกลไกการออกฤทธิ์โดยก่อกวนการทำงานของสารพันธุกรรมหรือ RNA ของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เชื้อไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้และทำให้เชื้อหยุดการเจริญเติบโต ตัวอย่างยากลุ่มเตตราไซคลีน เช่น ดอกซีไซ คลีน (Doxycycline) และออกซีเตตราไซคลิน (Oxytetracycline) ข้อควรระวังเกี่ยวกับการใช้ยากลุ่มเตตราไซคลิน (Tetracyclines) คือ ห้ามใช้ยาในเด็กอ่อนและสตรีมีครรภ์เพราะอาจส่งผลถึงการเจริญเติบโตของกระดูกของเด็กและของทารกในครรภ์ได้ หากใช้ร่วมกับยาคุม กำเนิดจะลดประสิทธิภาพในการคุมกำเนิดจึงอาจตั้งท้องได้ ห้ามใช้ร่วมกับยาลดกรด และยากลุ่มวิตามินที่มีเหล็กเป็นส่วนประกอบ เพราะจะลดการดูดซึมยาเตตราไซคลีนได้

6) ควิโนโลน (Quinolones) ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินปัสสาวะ ทางไต และต่อม ลูกหมาก แต่ไม่ค่อยนำไปใช้รักษาการติดเชื้อในโพรงไซนัส (Sinusitis) ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดย รบกวนการสร้าง โปรตีนในสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่า DNA ข้อควรระวัง

และห้ามใช้ยากลุ่มควิโนโลน คือ ในผู้ที่เป็นโรคลมชักเพราะอาจกระตุ้นสมองเป็นสาเหตุให้ชักได้บ่อยขึ้น ตัวอย่างยากลุ่มควิโนโลน เช่น ไซโปรฟลอซาซินหรือ ซิโปรฟลอซาซิน (Ciprofloxacin) เลโวฟลอซาซิน (Levofloxacin) นอร์ฟลอซาซิน (Norfloxacin) และโอฟลอซาซิน (Ofloxacin) เป็นต้น

5.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ

การออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะมีกระบวนการทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดังต่อไปนี้

1) ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ศัพท์ทางวิทยาศาสตร์เรียกว่า เซลล์เมมเบรน (Cell membrane) ซึ่งเป็นเยื่อบางๆ ที่ หุ้มตัวเชื้อแบคทีเรีย (มีหน้าที่แลกเปลี่ยนสารต่างๆ ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์) ส่งผลให้สมดุลในการดำรงชีวิตของเชื้อโรคเสียไปและตายในที่สุด

2) ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ศัพท์ทางวิทยาศาสตร์ เรียกว่า เซลล์วอลล์ (Cell Wall) ซึ่งเป็น ผนังภายนอกสุดของเซลล์ที่ห่อหุ้มเยื่อหุ้มเซลล์อีกที (มีหน้าที่ปกป้องและคงรูปร่างของเซลล์ มักพบกับ เซลล์แบคทีเรียและเซลล์พืช ไม่พบในเซลล์สัตว์) ด้วยกลไกนี้จะทำให้เชื้อแบคทีเรียต่างๆ ไม่สามารถแพร่พันธุ์จึงหยุดการเจริญเติบโต

3) ก่อกวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรมในตัวของเชื้อแบคทีเรีย สารพันธุกรรมที่เรามักคุ้นเคยกัน เรียกว่า DNA และ RNA กลไกดังกล่าวจะทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถผลิตลูกหลานออกมาทำอันตรายต่อร่างกายคนเราได้อีกต่อไป

4) กระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียปลดปล่อยน้ำย่อยออกมาย่อยตัวเองและตายลง อนึ่ง ความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของยาปฏิชีวนะไม่ได้ขึ้นกับวิธีการหรือกลไกทำลายเชื้อโรคเท่านั้นแต่ยังขึ้นกับความสามารถในการนำหรือพายาปฏิชีวนะไปยังอวัยวะที่มีการติดเชื้อ หากร่างกายไม่สามารถนำยาไปยัง อวัยวะที่มีการติดเชื้อได้ก็ไม่สามารถทำลายเชื้อโรคได้ ซึ่งการนำยาไปยังอวัยวะเป้าหมายมีหลายช่องทาง เช่น การกิน การฉีดใต้ผิวหนัง การฉีดเข้ากล้าม การฉีดเข้าหลอดเลือด และการทาที่ผิวหนัง เป็นต้น

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพในห้องปฏิบัติการ

ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ คือ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญ (microbiostatic) หรือความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลชีพ (microbicidal) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสมุนไพร คือการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพที่มีอยู่

6.1 การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ เป็นการทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อบ่งชี้ว่าแบคทีเรียก่อโรคมีความไวหรือดื้อต่อสารต้านจุลชีพใด เพื่อเป็นแนวทาง

สำหรับแพทย์ในการเลือกใช้สารต้านจุลชีพในการรักษาผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพ วิธีการทดสอบมีหลายรูปแบบทั้งการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและการวิเคราะห์เชิงปริมาณ นอกจากนี้ยังให้ข้อมูลสำหรับการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาเพื่อตรวจหาการเกิดและการแพร่กระจายของสายพันธุ์แบคทีเรียที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะหรือปัจจัยความต้านทานในสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ประเทศสหรัฐอเมริกาได้กำหนดวิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพเป็นวิธีมาตรฐานไว้ โดยมีขั้นตอนที่ชัดเจนตามชนิดของเชื้อ (รวมถึงเชื้อดื้อยาที่เป็นปัญหา) อาหารเลี้ยงเชื้อ ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเตรียมเชื้อในการทดสอบอุณหภูมิ เวลา และสภาวะในการบ่มเพาะเชื้อ ตลอดจนการอ่านและแปรผล ดังนั้นห้องปฏิบัติการต้องปฏิบัติตามแบบแผนอย่างถูกต้องทุกขั้นตอน จึงจะทำให้ผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพเชื้อถือได้และทำให้การอ่านและแปรผลถูกต้อง

MIC (minimal inhibitory concentration) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หน่วยที่ใช้โดยทั่วไป คือ ไมโครกรัม (ug) ต่อมิลลิลิตร (ml) หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อมิลลิลิตร ค่า MIC นี้ สามารถนำมาใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อหนึ่งๆ ต่อยาต้านจุลชีพหลายๆ ชนิดหรือความไวของเชื้อหลายๆ ชนิดต่อยาหนึ่งๆ และรวมทั้งเพื่อประเมินค่าอื่นที่เกี่ยวข้องกับยา หรือแปรผลของยาต่อเชื้อในการทดสอบ เพื่อหาค่า MIC ยาควรได้รับการเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงทุก 2 เท่าไปเรื่อยๆ (2-fold serial dilution)

6.2 การเลือกรูปแบบวิธีการทดสอบ

ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างที่สำคัญ คือ ลักษณะของงาน เช่น เป็น งานวิจัย งานตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่ทำเป็นประจำหรือนานๆ ทำครั้งงานที่ต้องรู้ค่า MBC (minimum bactericidal concentration) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของยาที่สามารฆ่าเชื้อได้ดังตัวอย่าง งานตรวจสอบในห้องปฏิบัติการที่นานๆ ทำครั้ง และแต่ละครั้งมีจำนวนเชื้อที่ทดสอบน้อย จะนิยมใช้ agar diffusion test (เพื่อตัดปัญหาต้องเตรียมและเก็บสารละลายของตัวยาที่ต้องใช้ใน dilution test) ขณะที่งานที่ต้องการรค่า MBC ของตัวยาจะนิยมใช้ broth dilution test ชนิดของเชื้อทดสอบ เช่น เชื้อที่เจริญช้าหรือเลือก เฟ้นการใช้อาหารมาก (fastidious dilution test) จะนิยมใช้ broth dilution test ขณะที่เชื้อซึ่งต้องเจริญบนเลือดหรือไม่ต้องการ ออกซิเจน (anaerobe) มักใช้ agar diffusion test หรือเชื้อที่มีอัตราการ เจริญไม่คงที่ควรเลือก dilution test จำนวนเชื้อทดสอบ เช่น มีจำนวนเชื้อทดสอบมากและต้องการหาค่า MIC จะนิยมทำ agar dilution test ชนิดของยาทดสอบ เช่น ตัวยาแพร่กระจาย (diffuse) ใน agar medium ไม่ดี จะนิยม หาค่า MIC ด้วยวิธี dilution test เป็นต้น จำนวนยาทดสอบ เช่น มีตัวยาจำนวนมากแต่มีเชื้อจำนวนน้อย จะนิยมใช้ agar diffusion test เมื่อเลือกรูปแบบวิธีการทดสอบได้แล้วอาจต้องพิจารณาปัจจัยต่างๆ ที่อาจมีผลต่อการทดสอบ อาทิ ชนิดของ medium สำหรับ medium ที่ดีควรยอมให้เชื้อทุกชนิด

เจริญได้ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง (pH) มากขณะที่มีเชื้อเจริญ ไม่มีสารรบกวนการออกฤทธิ์ของยา มีส่วนผสมที่ปรากฏใน broth และ agar medium เหมือนกัน (ยกเว้นสารช่วยให้แข็ง) และควรทดสอบก่อนว่าเชื้อชนิดที่ต้องการทดสอบสามารถเจริญได้ (Alderman and Smith, 2001) medium ที่นิยมใช้ ได้แก่ Mueller Hinton (MH) broth (agar)) ถ้าทดสอบพวกที่เจริญยากจะ นิยมใช้ brain heart infusion broth (agar) หรือ trypticase soy broth (agar) ในการทดสอบเชื้อรา medium ที่ใช้มีหลายชนิดขึ้นกับชนิดของราและชนิดของยาที่ทดสอบ กล่าวคือ ถ้าเป็นราชั้นสูงจะใช้ Sabouraud dextrose broth (agar), tryptic soy broth (agar), potato dextrose agar แต่ถ้าเป็นราชั้นต่ำ จะใช้ glucose yeast extract broth (agar) เป็นต้น

6.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อในห้องปฏิบัติการได้ดังต่อไปนี้

6.3.1 Dilution Susceptibility Test

การทดสอบ MIC การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี dilution test จะเป็นการทดสอบในเชิงปริมาณ เพราะสามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ทำลายเชื้อได้ นิยมใช้ทดสอบเชื้อที่เจริญได้ช้า ใช้ทดสอบยืนยันผลวิธี diffusion ที่ให้ความไวปานกลางหรือดื้อยาเพื่อสามารถใช้สารสกัดสมุนไพรนั้นในจำนวนสูงๆ ได้ และใช้ทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ (anaerobe) หลักการโดยทั่วไปของวิธีทดสอบแบบ broth และ agar dilution susceptibility test จะคล้ายคลึงกัน คือ จะเจือจางสารสกัดสมุนไพรใน medium ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นจึงใส่เชื้อลงบน medium ที่มีสมุนไพรภายหลังการบ่มเพาะให้ดูค่า MIC ทั้งนี้โดยสังเกตความขุ่น หรือใสของ broth และมีหรือไม่มีเชื้อเจริญขึ้นบน agar Broth dilution test (J.M. Ericsson and J.C. Sherris, 1971) เป็น การทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสมุนไพรที่ละเอียดวิธีหนึ่ง การทดสอบนี้จะทำให้ทราบทั้ง MIC และ MBC ของสมุนไพรนั้นๆ กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้คือ เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีสารสกัดสมุนไพรในปริมาณต่างๆกันผสมอยู่และสังเกตการณ์เจริญเติบโตของเชื้อ วิธีการทำ broth dilution test วิธีการนี้ยังสามารถแบ่งเป็น macrodilution (หรือ tube) test และ microdilution dilution test broth microdilution test จะทำในหลอดทดลองโดยทำการเจือจางสารต้านจุลชีพ stock solution ด้วยตัวเจือจาง หรือด้วย broth ในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution) ไปเรื่อยๆ ปริมาตรสุดท้ายที่อยู่ในหลอด เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร และต้องมีหลอดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร เตรียมเชื้อที่ทดสอบให้ได้ขนาดโดยอาจใช้วิธีเทียบ

6.3.2 Broth dilution test (J.M. Ericsson and J.C. Sherris, 1971)

เป็นการทดสอบหาความ ไวของเชื้อต่อสาต้านจุลชีพที่ละเอียดวิธีหนึ่ง การทดสอบนี้จะทำให้ทราบทั้ง MIC และ MBC ของสารต้านจุลชีพนั้นๆ กับเชื้อจุลชีพที่ทำการทดสอบ หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้ คือเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ซึ่งมีสารต้านจุลชีพในปริมาณต่างๆ กันผสมอยู่และสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ

1) การทำ broth dilution test วิธีการนี้ยังสามารถแบ่งเป็น macrodilution (หรือ tube) test และ microdilution dilution test broth macrodilution test จะทำในหลอดทดลอง โดยทำการเจือจางสารสกัดสมุนไพร stock solution ด้วยตัวเจือจางหรือด้วย broth ในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution) ไปเรื่อยๆ ปริมาตรสุดท้ายที่อยู่ในหลอด เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร และต้องมีหลอดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร เตรียมเชื้อที่ทดสอบให้ได้ขนาดโดยอาจใช้วิธีเทียบ 10 ความขุ่นกับ McFarland เบอร์ 0.5 หรืออาจใช้การวัดความขุ่นด้วย spectrophotometer แล้วเจือจางลงเพื่อให้ได้ขนาดเชื้อที่ต้องการ

2) การทำ broth macrodilution test จะทำในหลอดทดลอง โดยทำการเจือจางสารต้านจุลชีพ stock solution ด้วยตัวเจือจาง หรือด้วย broth ในลักษณะลดลงทุก 2 เท่า (2-fold serial dilution) ไปเรื่อยๆ ปริมาตรสุดท้ายที่อยู่ในหลอดเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร และต้องมีหลอดควบคุมที่ไม่มีสารต้านจุลชีพ เตรียมเชื้อที่ทดสอบให้ได้ขนาด โดยอาจใช้วิธีเทียบ ความขุ่นกับ McFarland เบอร์ 0.5 หรืออาจใช้การวัดความขุ่นด้วย spectrophotometer แล้วเจือจางลงเพื่อให้ได้ขนาดเชื้อที่ต้องการ

3) broth microdilution test ทำใน microtiter plate 96-well โดยเจือจาง stock solution ด้วย broth แบบ 2- fold serial dilution มีหลุมควบคุมเป็น broth ที่ไม่มีสารต้านจุล ชีพในแต่ละหลุมจะมีปริมาตรเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เชื้อที่ปรับขนาดแล้ว (ใช้เชื้อประมาณ 105 CFU/มิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วปิดฝาก่อนนำไปบ่มเพาะ อ่านค่า MIC โดยดูความขุ่น ด้วยตาเปล่าหรืออาจใช้สารบางอย่างที่สามารถบ่งชี้การเจริญของเชื้อได้ เพื่อให้อ่านค่าได้ง่ายขึ้น เช่นงานการวิจัยของ Eloff (1998) ที่ได้ทดลองโดยใช้สาร tetrazolium dye หลายชนิด ได้แก่ tetrazolium red, thiazolyl blue และ p-lodonitrotetra- zolium violet (INT) เป็นสารบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรีย (biologically active organisms) โดยหากเชื้อมีการเจริญจะสามารถเปลี่ยนสารที่ไม่มีสีเป็นสารสีได้ ซึ่ง พบว่า p - lodonitrotetrazolium violet ให้ผลการวัดการเจริญได้ของเชื้อที่ดีที่สุด ซึ่งวิธีการนี้สามารถทำได้รวดเร็ว แม่นยำและเหมาะนำมาใช้ศึกษาสมุนไพร เนื่องจากสามารถลดการรบกวนการอ่านผล เนื่องจากสีและความขุ่นของสมุนไพรบางชนิดได้หากดูความขุ่นด้วยตาเปล่า

6.3.3 Agar dilution test

เป็นการทดสอบความไวของเชื้อแบบปริมาณวิเคราะห์โดยมีหลักการทดสอบคล้ายคลึงกับ Broth dilution method ต่างกันเพียงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น กล่าวคือ ทำการทดสอบ โดยการเจือจางสารทดสอบในอาหารวุ้นและถ่ายเชื้อลงบนผิวของอาหารวุ้น ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานเดียวกันได้ วิธีนี้สามารถหาค่า MIC ได้

1) การทำ agar dilution test นำ stock solution มาเจือจางด้วยน้ำหรือตัวเจือจางที่เหมาะสมจนได้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ แล้วจึงใส่ใน agar medium ซึ่งหลอมไว้ (45-50 องศาเซลเซียส) การเตรียมขนาดเชื้อด้วยวิธีการเดียวกับที่ทำใน broth dilution test แต่เจือจางขนาดเชื้อลงให้ได้ขนาดเชื้อซึ่งเมื่อแตะลงบน agar แล้วให้ได้เชื้อประมาณ 1×10^4 ตัวต่อจุด เมื่อ แตะเชื้อลงบน agar ทดสอบแล้วต้องทิ้งให้ซึมหมดก่อนคว่ำ plate นำไปบ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 16- 20 ชั่วโมง (เชื้อที่เจริญช้าอาจให้นานมากกว่า 48 ชั่วโมง) แล้วอ่านค่า MIC ที่ความเข้มข้นที่จะต้องไม่มีเชื้อขึ้นเลย

2) Disc diffusion method (Kirby-Bauer) เป็นวิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุด เนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่า เชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ ไม่อาจทราบค่า MIC ได้ ไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญช้าและเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ หลักการทั่วไปคือ การทำให้สารต้านจุลชีพที่มีในแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ที่เตรียมไว้ก่อนซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อ (spread) ในจำนวนที่เหมาะสมไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสไม่มีโคโลนีเชื้อรอบแผ่น disc ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแปรตามขนาดของ inhibition zone วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบสารต้านจุลชีพเพียง ความเข้มข้นเดียวและใช้เป็นการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารต้านจุลชีพ เช่น ยา หรือสมุนไพรในเบื้องต้น นอกจากขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบแล้วยังอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารต้านจุลชีพ ความสามารถในการละลายหรือซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรด-ด่าง และ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อ สำหรับแหล่งรองรับสมุนไพร (drug reservoir) ที่ใช้มักใช้เป็นกระดาษซับวงกลม (filter paper dish) หรืออาจเรียกว่า dish sensitivity test หรืออาจเป็นหลุมที่เจาะลงในเนื้อ agar

3) Disc diffusion test และ Hole–plate diffusion เตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบโดยเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว วัดความขุ่นของเชื้อเพื่อให้ได้

จำนวนเชื้อ แบคทีเรียที่เหมาะสมกับการทดสอบแล้ว spread เชื้อบน Mueller-Hinton agar ให้ทั่ว จุ่มกระดาษกรอง ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ในสารละลายสารต้านจุลชีพและวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรทำกลุ่มควบคุม คือ กระดาษกรองปลอดเชื้อที่จุ่มในตัวทำละลายสารต้านจุลชีพ หรืออาจใช้ วิธีการเจาะหลุม (hole – plate diffusion) (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) แล้วหยดสารละลายสารต้านจุลชีพ ลงไปประมาณ 40 ไมโครลิตร/หลุม บ่มเพาะเชื้อนาน 24 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม การแปรผลของวิธีนี้จะสามารถบอกได้เพียงว่าสารต้านจุลชีพ ที่ความเข้มข้นนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากหรือน้อยตามขนาดของบริเวณใสเท่านั้น และอาจใช้การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เกิดจากยาปฏิชีวนะมาตรฐานก็ได้

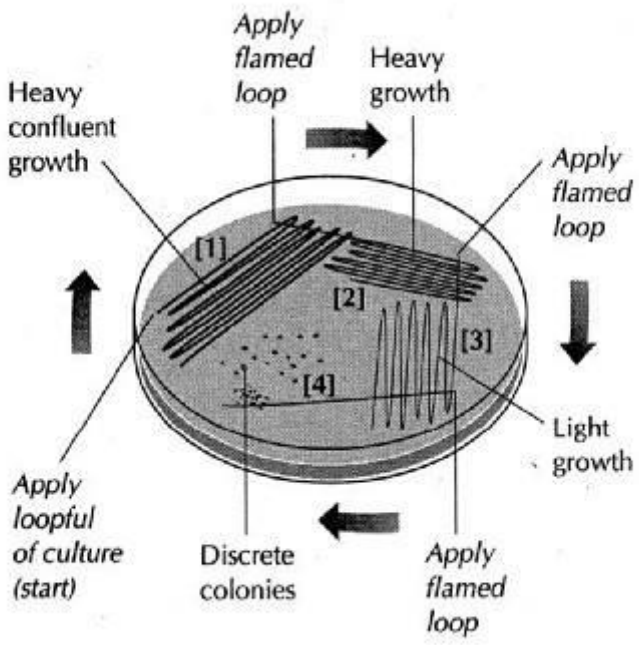
7. การแยกเชื้อบริสุทธิ์

การที่จะได้มาซึ่งเชื้อที่มีความบริสุทธินั้นสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

7.1 วิธี Streak-Plate Technique

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เป็นเทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยาที่มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น น้ำ อากาศ พื้นห้องเรียน หรือแม้แต่ร่างกายของคนก็มีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หลายชนิดที่อาจปนเปื้อนในหลอดเพาะเชื้อได้ หลักการของการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium) คือ จะต้องแยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (Single colony) จำนวนมาก จากนั้นจึงนำเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวไปศึกษารูปร่างลักษณะ และคุณสมบัติต่างๆ เพื่อให้ทราบว่าเป็นเชื้อชนิดใด เทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์คือ วิธี cross streak plate ซึ่งทำได้โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) แตะตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจแล้วลากหรือขีด (Streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง (Agar plate) อยู่ให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น หลังจากเสร็จในระนาบแรกซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หนาแน่นที่สุด ให้นำห่วงเขี่ยเชื้อมาเผาไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดให้หมด จากนั้นจึงขีดเชื้อจากส่วนของรอยลากในระนาบแรกออกมาเพียงหนึ่งครั้งแล้วลากเป็นระนาบที่สอง 4-5 เส้นติดกันโดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับกับระนาบแรกอีก หลังจากนั้นก็ทำเช่นเดียวกันกับระนาบที่สองจนครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อซึ่งมีประมาณสี่ระนาบ เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วจะมีการศึกษาเชื้อต่อไปในด้านต่างๆ ซึ่งจะต้องมีการถ่ายเชื้อจากอาหารเดิมไปยังอาหารใหม่หรือมีการเพาะเชื้อลงในอาหารเพื่อการทดสอบและการวิเคราะห์ต่างๆ ดังนั้นการเรียนรู้เทคนิคที่ถูกต้องในการถ่ายเชื้อจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งซึ่งต้องอาศัยหลักการของ aseptic technique เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นซึ่งจะทำให้ผลการทดลองผิดพลาดได้ อุปกรณ์พื้นฐานที่ใช้ในการถ่ายเชื้อคือ ห่วงเขี่ยเชื้อ เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle) และตะเกียงแอลกอฮอล์สำหรับใช้ฆ่าเชื้อโดยการ

เผา (Incineration) การถ่ายเชื้อจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียและยีสต์จะใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเป็นส่วนใหญ่ มีบางครั้งที่ใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายตรง ส่วนเชื้อราที่เป็นเส้นสาย (filamentous fungi) มักจะใช้เข็มเขี่ยปลายงอ



ภาพที่ 1 วิธี Streak-Plate Technique
ที่มา : medicallabs, (2564)

ในแหล่งธรรมชาตินั้นปกติเชื้อแบคทีเรียจะเติบโตอยู่รวมกันหลายๆ สายพันธุ์ เพื่อการคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะต้องมีขั้นตอนการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) โดยเทคนิคที่ทำได้ง่ายคือ spread plate technique ซึ่งเทคนิคนี้แบคทีเรียที่ถูกทำให้เจือจางให้มีจำนวนประมาณ 100-200 เซลล์ หรือน้อยกว่าจะถูกนำไปวางตำแหน่งตรงกลางของจานเพาะเชื้อ (Petri dish/plate) แล้วทำการเกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วด้วยแท่งแก้วรูปตัว L หลังจากบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมและมีระยะเวลาเพียงพอ จะปรากฏโคโลนี (Colony) ของเชื้อแบคทีเรียขึ้น โดยแต่ละโคโลนีจะมีจำนวนแบคทีเรียอยู่จำนวนมาก และแต่ละโคโลนีจะถือว่ามาจากแบคทีเรียสายพันธุ์เดียว ดังนั้น จะทำให้เกิดการแยกจุลินทรีย์ออกมาเป็นเชื้อบริสุทธิ์ขึ้น เมื่อมองด้วยตาเปล่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์โคโลนีจะมีลักษณะแตกต่างกัน

7.2 การเทเพลท (Pour – plate technique)

เทคนิคการเพาะเชื้อแบบ pour-plate technique ก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้เช่นกัน โดยตัวอย่างเริ่มต้นจะถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นหลายๆ ระดับด้วยเทคนิค serial dilution เพื่อทำให้เชื้อถูกเจือจางมากพอที่จะทำให้เกิดโคโลนีเดี่ยวๆ บนจานเพาะเชื้อ โดยนำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมเติมลงในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วทำการเทอาหารวุ้นลง (Agar Medium) ไปในจานเพาะเชื้อ (โดยอุณหภูมิของอาหารเพาะเชื้อประมาณ 48-50 องศาเซลเซียส ซึ่งจะไม่ทำให้เชื้อแบคทีเรียและยีสต์ตายได้) ผสมอาหารและเชื้อให้เข้ากันและให้เกิดการกระจายอย่างสม่ำเสมอด้วยการหมุนจานเพาะเชื้อ เมื่อวุ้นเกิดการแข็งตัว เซลล์จุลินทรีย์จะถูกตรึงให้อยู่ด้านในของอาหาร และจะเกิดโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อขึ้นมา

การแยกเชื้อโดย pour-plate technique วิธีการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์วิธีนี้ ทำได้ดังนี้

1) นำหลอดอาหารที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 3 หลอด ไปหลอมให้ละลายและแช่ใน Water bath ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส

2) นำลวดเขี่ยเชื้อ (Loop) ที่สะอาดปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลอดที่มีเชื้อผสมแล้วนำไปใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดที่ 1 เขย่าหลอดเพื่อให้เชื้อกระจายทั่วหลอด

3) นำ Loop ที่สะอาดปราศจากเชื้อจุ่มลงในเชื้อผสมหลอดที่ 1 ถ่ายลงในหลอดอาหารที่ 2 เขย่าเพื่อให้เชื้อแพร่กระจายทั่วหลอด

4) นำ Loop ที่สะอาดปราศจากเชื้อจุ่มลงในเชื้อผสมหลอดที่ 2 ถ่ายลงในหลอดอาหารที่ 3 เขย่าเพื่อให้เชื้อแพร่กระจายทั่วหลอด

5) นำอาหารในหลอดที่ 1 เทใส่จานเพาะเชื้อจานที่ 1 หมุนจานเบาๆ เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียกระจายโดยทั่วจาน ปล่อยทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว

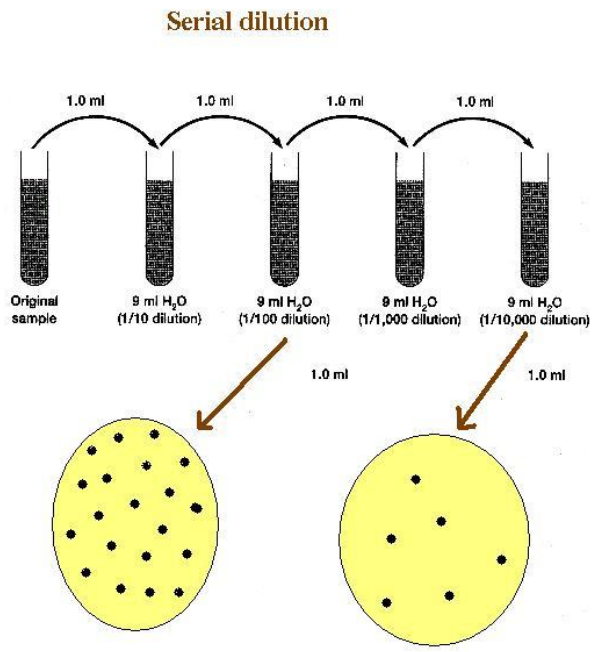
6) นำอาหารในหลอดที่ 2 และ 3 เทใส่จานเพาะเชื้อจานที่ 2 และ 3 ตามลำดับ หมุนจานเบาๆ เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียกระจายโดยทั่วจาน ปล่อยทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว

7) นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิที่เหมาะสม ทิ้งไว้ประมาณ 24-48 ชั่วโมง จะเห็นโคโลนีเดี่ยวๆ ของแบคทีเรียเจริญขึ้นจนมีขนาดใหญ่พอที่จะเขี่ยเชื้อ หรือนำไปศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ ต่อไป

ผลจากการแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีนี้ จะพบว่าในจานเพาะเชื้อที่ 1 จะมีเชื้อเจริญหนาแน่นมากที่สุด สำหรับจานเพาะเชื้อที่ 2 และ 3 มีเชื้อเจริญหนาแน่นน้อยลงมาตามลำดับ นอกจากวิธีการแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีนี้ ยังสามารถศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศได้ด้วย ถ้าเชื้อมีการเจริญเฉพาะบนผิวหน้าอาหาร แสดงว่าเชื้อนั้นเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจน ถ้าเชื้อใดเจริญบนก้นจานเพาะเชื้อ แสดงว่าเชื้อนั้นเจริญได้ดีในสภาพไม่มีออกซิเจน (เนียรวรรณ, 2560)

7.3 การเจือจางอย่างต่อเนื่อง (serial dilution)

การเจือจางอย่างต่อเนื่อง คือ การเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น เพื่อการนับจำนวนจุลินทรีย์ (microbial population count) ให้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture media) มีจำนวนเซลล์ระหว่าง 25-250 เซลล์ ไม่มากหรือน้อยเกินไปโดยทั่วไปทำเป็นลำดับๆ ละ 10 เท่า (พิมพ์เพ็ญ, 2564)



ภาพที่ 2 Serial dilution

ที่มา : foodnetworksolution, (2564)

8. ข้อควรปฏิบัติในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

การปฏิบัติงานทางจุลชีววิทยาจำเป็นต้องมีการควบคุมห้องปฏิบัติการและบุคลากรต้องสามารถใช้เทคนิคปฏิบัติที่ถูกต้อง โดยการปฏิบัติตามหลักเกณฑ์การปฏิบัติที่ดีทางจุลชีววิทยาเพื่อควบคุมคุณภาพงานด้านจุลชีววิทยาและป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการ

8.1 หลักเกณฑ์การปฏิบัติที่ดีทางจุลชีววิทยา

หลักเกณฑ์การปฏิบัติที่ดีทางจุลชีววิทยาต้องใช้การทำงานอย่างที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ การทำงานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทุกครั้งจำเป็นต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ โดยมีวัตถุประสงค์ดังนี้

1) ป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการออกไปปนเปื้อนสิ่งแวดล้อม ช่วยให้ผู้ปฏิบัติงานและผู้อื่นปลอดภัยจากงานที่ปฏิบัติอยู่

2) ป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก เป็นการควบคุมคุณภาพงานที่ปฏิบัติ

8.2 เทคนิคการปลอดเชื้อ

เป็นเทคนิคที่ทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่สะอาดเพื่อให้จุลินทรีย์ที่เลี้ยงอยู่เจริญได้ดี ไม่สัมผัสกับสิ่งอื่นจากภายนอก เทคนิคนี้ใช้สำหรับควบคุมภาชนะที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ เช่น ขวดรูปชมพู่ ขวดต่างๆ จานเพาะเชื้อรวมทั้งจุลินทรีย์ที่เลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งหรือเหลว

การใช้เทคนิคปลอดเชื้อประโยชน์ดังนี้

การทำงานต่างๆ ในห้องจุลชีววิทยามักจะเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย การใช้เทคนิคปลอดเชื้อจึงมีประโยชน์ดังต่อไปนี้

1) สุขภาพของผู้ปฏิบัติงาน เป็นการป้องกันการเจ็บป่วย การติดเชื้อและได้รับบาดเจ็บจากการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

2) ด้านสิ่งแวดล้อม เป็นการป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

3) ด้านคุณภาพของงาน เป็นการป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการจากภายนอก

หลักการของเทคนิคปลอดเชื้อ

ในห้องจุลชีววิทยามักจะเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย จึงมีการใช้เทคนิคปลอดเชื้อดังต่อไปนี้

1) ล้างมือก่อนและหลังปฏิบัติงานทุกครั้งเช็ดมือให้แห้งด้วยกระดาษชำระใหม่ใช้ผ้าเช็ดมือ

2) ปิดฝาภาชนะบรรจุอยู่เสมอ เว้นแต่การถ่ายเชื้อ ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อ หากเปิดฝาต้องทำให้เสร็จอย่างรวดเร็ว

3) ต้องฆ่าเชื้อปากภาชนะทุกครั้ง อาจใช่เปลวไฟหรือยาฆ่าเชื้อป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ปนเปื้อนลงไปในภาชนะที่ปิดอยู่

4) ใช้วิธีลดการปนเปื้อน เช่น ใช้มือหรือนิ้วเปิดจุกและมือถือเอาไว้หรือคีบด้วยนิ้วโดยไม่ต้องวางจุดลงบนพื้น

5) วัสดุอุปกรณ์ซึ่งฆ่าเชื้อแล้วต้องบรรจุในภาชนะบอร์ดเชื้อที่สามารถป้องกันป้องกันการปนเปื้อนจากการสัมผัสกับมือ โต๊ะหรือภายนอกภาชนะบรรจุ รวมทั้งมีการฆ่าเชื้อภาชนะหลังการใช้อย่างถูกวิธี

6) ป้องกันแม้เกิดการฟุ้งกระจายของละอองอากาศทำได้ดังนี้

- เขย่าหลอดหรือขวดจะช้าๆ
- จุ่มปลายปีเปตลงในของเหลวระหว่างการดูดและปล่อยสารละลาย
- จัดวางหลอดทดลองหรือภาชนะที่จะถ่ายเชื้อไว้ใกล้ๆ กันจะได้ไม่เกิดการหกหรือล้นขณะปฏิบัติงาน
- ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อด้วยไฟแล้วในการถ่ายเชื้อทุกครั้งแต่ต้องรอให้เย็นก่อนมิฉะนั้นอาจเกิดทำให้จุลินทรีย์ที่ต้องการถูกทำลายไปด้วย
- หากใช้เครื่องปั่นความเร็วสูงอย่าใส่ของเหลวจนเต็มหลอดอาจทำให้หกรดตัวเครื่องได้

7) เก็บหลอดทดลองจานเพาะเชื้อขวดต่างๆ ในภาชนะที่ป้องกันไม่ให้เกิดการหกล้มได้ง่าย

8) ปรับทิศทางของลมจากเครื่องปรับอากาศไม่ให้ตกใส่บริเวณที่ปฏิบัติงาน

9) จัดพื้นที่ในห้องปฏิบัติการให้เป็นสัดส่วนทำได้ดังนี้

- แยกตอนเก็บของที่ฆ่าเชื้อแล้วกับสวนเก็บของที่ยังไม่ฆ่าเชื้อและมีป้ายบอก
- ทุกคนในห้องปฏิบัติการทราบถึงพื้นที่ส่วนต่างๆ เป็นอย่างดีไม่วางของปนกัน
- ควรจัดพื้นที่ที่เหมาะสมต่อการทำงานให้เป็นระเบียบมีระบบจะไม่เกิดการสับสน

10) ก่อนและหลังการปฏิบัติงานจะต้องใช้น้ำยาฆ่าเชื้อเช็ดโต๊ะและพื้นที่โดยรอบที่ปฏิบัติงาน (เกรียงไกร, 2549)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กันต์ สอนสง, ณัฐนิช ไตรภพ และ พุฒิพงศ์ คงสัตย์ (2557) ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิดในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* จากการสกัดสารจากสมุนไพรทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกส้มโอ, เปลือกสับปะรด, มะระขี้นก, เปลือกทับทิม และใบฝรั่ง โดยการนำสมุนไพรมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบด้วยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดเปลือกส้มโอมีฤทธิ์และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio. parahaemolyticus* เหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาใช้ในการป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งขาวได้และ พบว่าแก้วตา ลิ้มเฮง, จุฑารัตน์ หิรัญวัฒนสุข และ มนฤทัย อินทวัฒน์ (2559) ศึกษาผลของสารสกัดกระเทียมโดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย ที่ระดับความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์, 50 เปอร์เซ็นต์, 25 เปอร์เซ็นต์, 12.5 เปอร์เซ็นต์, 6.25 เปอร์เซ็นต์ และ 3.13 เปอร์เซ็นต์ ต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi* พบว่าพบว่าทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมสามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio. harveyi* ได้ โดยทุกระดับความเข้มข้นให้ผลของค่าความขุ่นที่ต่ำกว่าหลอดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมที่ 3.13 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับสุนันทา ข้องสายและลักษมี วิทยา (2562) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเสม็ดขาวและเสม็ดแดงต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งและปลา โดยทำการสกัดส่วนใบ ดอก และผลของเสม็ดขาวและ เสม็ดแดงด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตต เอทานอล และเมทานอล ทดสอบการออกฤทธิ์ ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งและปลา ได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus Vibio harveyi, Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactie* เทียบกับยาปฏิชีวนะ Oxytetracyclin โดยมี DMSO เป็นสารควบคุม พบว่าสารสกัดจากผลเสม็ดแดงที่ใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ได้ดีกว่ายาปฏิชีวนะ Oxytetracycline สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์เพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำได้ในอนาคต อีกทั้งยังสอดคล้องกับ สกาพร ดิเรกบุษราคัม, สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์, อังคณา หิรัญสาลี และลิลา เรืองแป้น (2539) ได้ศึกษาสารสกัดสมุนไพร 16 ชนิดคือ กระเพราแดง กระเพราขาว ชุมเห็ดเทศ ชิงช้าชาลี กะเม็ง บอระเพ็ด ฝรั่ง พญายอ ฟ้าทะลายโจร มะระขี้นก ก้างปลาเครือ ธรณีสาร มะยม และลูกใต้ใบ 3 ชนิดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ 10 สายพันธุ์ในกุ้งกุลาดำ พบว่า มะระขี้นกและฝรั่ง สามารถยับยั้งเชื้อวิบริโอได้ แต่มะระขี้นกยับยั้งเชื้อได้เปอร์เซ็นต์สูงกว่าใบฝรั่งที่ความเข้มข้นเดียวกัน เช่นเดียวกับทัศนีย์ นลวชัย (2560) ศึกษาประสิทธิภาพของมะกรูด โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดได้แก่ น้ำกลั่น และเอทานอลในการยับยั้งเชื้อ

แบคทีเรียสกุล Vibrio ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ได้แก่ *Vibrio vulnificus, Vibrio.parahaemolyticus, Vibrio cholerae, Vibrio harveyi, Vibrio flurialis, Vibrio alginolyticus และ Vibrio mimicus* พบว่า สารสกัดมะกรูดที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio vulnificus* ได้ดีที่สุดส่วนสารสกัดมะกรูดที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio alginolyticus* ได้ดีที่สุด

วิธีการดำเนินการ

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพร 3 ชนิด คือ กระเทียม *(Allium sativum)* ผลเสม็ดแดง *(Syzygium antisepticum)* และมะระขี้นก *(Momordica charantia)* ในการยั้บยั้งเชื้อสกุลวิบริโอ *(Vibrio* sp.) ด้วยวิธี disc diffusion method มีวิธีการดำเนินการดังต่อไปนี้

วัสดุและอุปกรณ์

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) จานเพาะเชื้อ (Plate)
10) ขวดรูปชมพู (Erlenmeyer flask)
11) หลอดทดลอง (Tube)
12) แผ่น Paper disc ขนาด 6 มิลลิเมตร
13) ไม้พันสำลี (Cotton swab)
14) กรวยกรอง (Cone filter)
15) กระบอกตวง (Graduated cylinder)
16) ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
17) ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
18) เวอร์เนีย (Vernier Caliper)
19) เอทานอล 95เปอร์เซ็นต์ (ethanol 95 percent)
20) น้ำกลั่น (Distilled water)
21) กระเทียม *(Allium sativum)*
22) ผลเสม็ดแดง *(Syzygium antisepticum)*
23) มะระขี้นก *(Momordica charantia)*

24) เชื้อวิบริโอ (*Vibrio sp.*)

25) อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)

26) Aluminum Foil

การวางแผนการทดลอง

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารสกัดจากสมุนไพร 3 ชนิด คือ กระเทียม *(Allium sativum)* ผลเสม็ดแดง *(Syzygium antisepticum)* และมะระขี้นก *(Momordica charantia)* ในการยับยั้งเชื้อวิบริโอ (*Vibrio sp.)* โดยวิธี disc diffusion method โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) ซึ่งประกอบด้วย 5 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ใช้สารสกัดจากกระเทียมความเข้มข้น 3.13 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 2 ใช้สารสกัดจากผลเสม็ดแดงความเข้มข้น 3.13 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 3 ใช้สารสกัดจากมะระขี้นกความเข้มข้น 3.13 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 4 น้ำกลั่น+น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุมแบบลบ)

ชุดการทดลองที่ 5 ยาต้านจุลชีพ ออกซี่เตตร้าไซคลิน ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม (ชุดควบคุมแบบบวก)

วิธีการทดลอง

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพร 3 ชนิด คือ กระเทียม *(Allium sativum)* ผลเสม็ดแดง *(Syzygium antisepticum)* และมะระขี้นก *(Momordica charantia)* ในการยั้บยั้งเชื้อวิบริโอ *(Vibrio* sp.*)* ด้วยวิธี disc diffusion method มีวิธีการดำเนินการดังต่อไปนี้

1. การเตรียมสถานที่

ทำความสะอาดสถานที่ที่จะทำการทดลองเพื่อให้สะดวกต่อการทดลอง จากนั้นก็ทำความสะอาดวัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นต้องใช้ในการทดลอง โดยขอความอนุเคราะห์ใช้สถานที่ ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา อาคารอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์น้ำ วิทยาลัยประมงติณสูลานนท์

2. การเตรียมวัสดุ และอุปกรณ์

ทำการฆ่าเชื้อเครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่เป็นเครื่องแก้วด้วย Hot Air Oven ที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

เครื่องมืออุปกรณ์ที่เป็นพลาสติก ก้านไม้พันสำลี หรือกระดาษกรอง จะทำการฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ก่อน ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำมาไล่ความชื้นต่อด้วย Hot Air Oven ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

3. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

1) การสกัดสมุนไพร

- กระเทียมสดทั้งกรีบปอกเปลือกออก มาล้างให้สะอาด แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ผึ่งลมให้แห้ง
- ผลเสม็ดแดงล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ผึ่งลมให้แห้ง
- มะระขี้นกทั้งผลล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ผึ่งลมให้แห้ง

2) นำมาสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมาอบให้แห้งด้วยเตาอบไอร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง

3) นำมาสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดบดให้ละเอียด และหมักกับเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อัตราส่วนสมุนไพรต่อเอทานอลเท่ากับ 1 ต่อ 9 หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

4) กรองด้วยผ้ากรองตาถี่ 1 ครั้ง และหลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองแบคทีเรีย เบอร์ 4 ทำซ้ำ 3 ครั้ง

5) นำสมุนไพรที่กรองด้วยกระดาษกรองแล้ว ไประเหยเพื่อแยกเอทานอลด้วยเครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศ อุณหภูมิหม้อน้ำ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จนเอทานอลระเหยออกไปหมด นำสารสกัดสมุนไพรที่ได้ใส่ขวดแล้วหุ้มด้วย Aluminum Foil เพื่อป้องกันไม่ให้โดนแสง เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6) ทำการเจือจางสารสกัดสมุนไพรในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 3.13 เปอร์เซ็นต์ โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 ต่อ 32

4. การเตรียมเชื้อวิบริโอ (*Vibrio* sp.)

เตรียมเชื้อวิบริโอ (*Vibrio* sp.) โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้รับการยืนยันจากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา

1) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ที่เติม Sodium chloride (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์

2) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) หลังจากนั้นใช้วิธีการเจือจางด้วยน้ำกลั่นเติม Sodium chloride (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์ ไปจนได้ความเข้มข้น 10^{-3}

5. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

1) เตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อวิบริโอ (*Vibrio* sp.) 1000 มิลลิลิตร โดยใช้ Nutrient Agar (NA) เพิ่ม Sodium chloride (NaCl) 0.85 เปอร์เซนต์ โดยมีสัดส่วนดังนี้

Nutrient Agar (NA)	40	กรัม
Sodium chloride	8.5	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

2) นำอาหารที่เตรียมไว้มาละลายในน้ำแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3) นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย Autoclave มาเทลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเชื้อ

6. การเตรียมแผ่นทดสอบ

เตรียมแผ่นทดสอบ (Disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการนำไปอบใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำมาไล่ความชื้นต่อด้วยHot Air Oven ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

7. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการต้านเชื้อวิบริโอ (*Vibrio* sp.)

ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากกระเทียม สารสกัดผลเสม็ดแดงและสารสกัดมะระขี้นก ด้วยวิธี disc diffusion method

1) นำสำลีพันก้านไม้ที่ปราศจากเชื้อแล้ว มาจุ่มในสารละลายน้ำเกลือ (NaCl) 0.85 เปอร์เซนต์ ที่มีเชื้อ *Vibrio* sp. ที่เจือจางเชื้อจนได้ 10^{-3} แล้ว Swap ให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

2) นำแผ่นทดสอบมาแช่ในภาชนะที่มีสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่เตรียมไว้เป็นเวลา 15 นาทีจนแผ่นชุ่ม

3) จากนั้นใช้คีมที่ปราศจากเชื้อคีบแผ่นทดสอบยามาวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 5 ตำแหน่งต่อจานเพาะเชื้อ เป็นเวลา 5 นาที

4) จากนั้นนำไปบ่มในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

5) อ่านผลโดยการดูบริเวณวงใส (Clear Zone) ที่เกิดขึ้นด้วย Vernier Caliper รายงานเป็นหน่วยมิลลิเมตร โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

-บริเวณส่วนใส = เส้นผ่านศูนย์กลางที่เกิดขึ้นทั้งหมด–เส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ

6) อ่านผลการทดลองและบันทึกผลการทดลอง

8. การเก็บข้อมูล

อ่านข้อมูลโดยดูผลของขนาดบริเวณวงใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้น โดยวัดขนาดของวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกและรายงานผลเป็นมิลลิเมตร

9. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดย โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ F-test (ONE WAY ANOVA) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลอง

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด คือ สารสกัดกระเทียม *(Allium sativum)* สารสกัดผลเสม็ดแดง *(Syzygium antisepticum)* และสารสกัดมะระขี้นก *(Momordica charantia)* ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 3.13 เปอร์เซ็นต์ ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อสกุลวิบริโอ (*Vibrio* sp.) ด้วยวิธีการ disc diffusion method มีผลการทดลองดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* sp.) ของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิดและชุดควบคุม

ที่	ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ยวงใส(มิลลิเมตร)
1	สารสกัดจากกระเทียม	7.12± 00.16
2	สารสกัดจากผลเสม็ดแดง	6.88±00.13
3	สารสกัดจากมะระขี้นก	10.81±00.36
4	น้ำกลั่นเติม NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุมทางลบ)	0±00.00
5	ออกซีเตตร้าไซคลิน 30 ไมโครกรัมชุด (ควบคุมทางบวก)	19.17±00.23

จากตารางที่ 1 ผลการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสกุลวิบริโอ (*Vibrio* sp.) ของสารสกัดสมุนไพรชุดการทดลองที่ 3 (สารสกัดมะระขี้นก) มีมากที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยวงใสเท่ากับ 10.81±00.36 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 1 (สารสกัดกระเทียม) และ ชุดการทดลองที่ 2 (สารสกัดผลเสม็ดแดง) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.12±00.16 มิลลิเมตรและ 6.88±00.13 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชุดการทดลอง

ที่	ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ยวงใส(มิลลิเมตร)
1	สารสกัดจากกระเทียม	7.12± 00.16[a]
2	สารสกัดจากผลเสม็ดแดง	6.88±00.13[a]
3	สารสกัดจากมะระขี้นก	10.81±00.36[b]

หมายเหตุ:ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

จากตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า ในชุดการทดลองที่ 3 (สารสกัดจากมะระขี้นก) มีขนาดวงใสมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับทุกชุดการทดลอง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างชุดการทดลองที่ 1 (สารสกัดกระเทียม) และ ชุดการทดลองที่ 2 (สารสกัดผลเสม็ดแดง)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองประสิทธิภาพสารสกัดสมุนไพรด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ของสมุนไพร 3 ชนิด คือ กระเทียม *(Allium sativum)* ผลเสม็ดแดง *(Syzygium antisepticum)* และมะระขี้นก *(Momordica charantia)* ซึ่งเป็นสมุนไพรที่ทำการสกัด ที่ความเข้มข้น 3.13 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า ในชุดการทดลองที่ 3 (สารสกัดจากมะระขี้นก) มีขนาดวงใสมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับทุกชุดการทดลอง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างชุดการทดลองที่ 1 (สารสกัดกระเทียม) และ ชุดการทดลองที่ 2 (สารสกัดผลเสม็ดแดง) น่าจะเป็นเพราะว่าสารซาโปนินในมะระขี้นกออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ดี เนื่องจากซาโปนินคุณสมบัติการลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุจึงทำให้มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ (*Vibrio* sp.) ซึ่งแตกต่างกับสารไดอาดิลซัลเฟอร์ ในกระเทียมและสารแทนนินในผลเสม็ดแดง ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อใกล้เคียงกัน โดยผลการทดลองยังสอดคล้องกับงานวิจัยของสกาพร ดิเรกบุษราคัมและคณะ (2539) ที่ได้ศึกษาสารสกัดสมุนไพร 16 ชนิด ซึ่งพบว่ามะระขี้นกและฝรั่ง สามารถยับยั้งเชื้อวิบริโอได้ แต่มะระขี้นกยับยั้งเชื้อได้สูงกว่าใบฝรั่งที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ด้วยการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี hole-diffusion และนำสารสกัดมาตรวจสอบเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ให้ผลที่ได้มีการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่ากลุ่มการทดลองที่ใช้ กะเพรา กะเม็ง ชุมเห็ดเทศ พญายอ ฟ้าทะลายโจร และลูกใต้ใบ อีกทั้งยังพบว่าอังคณา (2546) ได้ศึกษาสารสกัดมะระขี้นก

(ไม่ระบุส่วนที่ใช้) ด้วยเอธานอล ภายใต้เครื่องซอฟต์เลท และพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อวิบริโอ ที่ MIC เท่ากับ 2.5 ppt นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังพบว่าสารสกัดใบมะระขี้นกมีค่า MIC เท่ากับ 40-70 ppt และสารสกัดผลมะระขี้นกมีค่า MIC เท่ากับ 9 ppt ซึ่งอาจเนื่องมาจากวิธีการสกัดที่ต่างกัน

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิดได้แก่ กระเทียม ผลเสม็ดแดง และมะระขี้นก ที่ใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลายโดยใช้สารสกัดสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้น 3.13 เปอร์เซ็นต์ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* sp.) ด้วยวิธี disc diffusion method สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดจากมะระขี้นก มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับทุกชุดการทดลอง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างสารสกัดกระเทียมและสารสกัดผลเสม็ดแดง โดยมีค่าเฉลี่ยวงใสมากที่สุดอยู่ที่ 10.81±00.36 มิลลิเมตร รองลงมาคือ สารสกัดจากกระเทียมและผลเสม็ดแดงมีค่าเฉลี่ยวงใสเท่ากับ 7.12±00.16 มิลลิเมตรและ 6.88±00.13 มิลลิเมตรตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าประสิทธิภาพของสารสกัดมะระขี้นกยังมีน้อยกว่ายาต้านจุลชีพออกซีเตตร้าไซคลิน แต่ก็น่าจะเป็นอีกทางเลือกที่นำไปใช้ทดแทนยาต้านจุลชีพออกซีเตตร้าไซคลินได้ เพราะสามารถยับยั้งเชื้อได้ดี เป็นการลดต้นทุน และแก้ปัญหาสารตกค้างได้

ข้อเสนอแนะ

1. การทดลองเป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (*Vibrio* sp.) ในห้องปฏิบัติการ ควรนำไปศึกษากับระบบการเลี้ยงจริง

2. ควรเพิ่มสารสกัดสมุนไพรชนิดอื่นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของสมุนไพรชนิดไหนดีที่สุดและในความเข้มข้นที่ดีที่สุด

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2564. ความหนาแน่นของการปล่อยกุ้งขาวแวนนาไม (ออนไลน์). สืบค้นจาก : https://www4.fisheries.go.th/local/index.php/main (20 สิงหาคม 2564)

กันต์ สอนสง, ณัฐนิช ไตรภพ และ พุฒิพงศ์ คงสัตย์. 2557. ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพร 5 ชนิดในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*.จุลนิพนธ์.คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตรมหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

แก้วตา ลิ้มเฮง, จุฑารัตน์ หิรัญวัฒนสุข และ มนฤทัย อินทวัฒน์. 2559. ผลของสารสกัดกระเทียมต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*และ *Vibrio harveyi*. และเทคโนโลยีการเกษตรมหาวิทยาลัยศิลปากร

เกรียงไกร นาคะเกศ. 2549. ข้อควรปฏิบัติในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ ปีที่54. ฉบับที่ 172

คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี. 2564 สมุนไพร (ออนไลน์). สืบค้นจาก :https://med.mahidol.ac.th/poisoncenter/th/pois-cov/Herbal (21 สิงหาคม 2564)

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

ไทยเกษตรศาสตร์. 2564. สรรพคุณของมะระขี้นก (ออนไลน์). สืบค้นจาก : https://www.thaikasetsart.com (22 สิงหาคม 2564)

ทัศนีย์ นลวชัย. 2560. ประสิทธิภาพของมะกรูด (*Citrus hystrix*) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Vibrio spp. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

เนียรวรรณ มีเจริญ. 2560. การแยกเชื้อบริสุทธิ์(ออนไลน์). สืบค้นจาก : https://www.scimath.org/lesson-biology/item (22 สิงหาคม 2564)

นันทพร นิลวิเศษ, วัลลา วามนัฐจินดา, คณิต อธิสุข, พรรณี พิเดช.การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของกระเทียมสกัดชนิด Freeze-dried.วารสารกรมวิทยาศาสตร์.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. 2564.การเจือจางอย่างต่อเนื่อง (ออนไลน์). สืบค้นจาก : https://www.foodnetworksolution.com (27 สิงหาคม 2564)

ภิรมย์วรุณ. 2564. เสม็ดแดง (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://piromwaroon.blogspot.com/2013/01/*syzygium-gratum*-wight-s.html (21สิงหาคม 2564)

ภรภัทร ตั้งงวรกิตติ์ และรังสินี โสธรวิทย์. ปัจจัยที่มีผลต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากกระเทียม.การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 8, 2554. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน. จ.นครปฐม.

ราชบัณฑิตยสถาน. 2538. อนุกรมวิธานพืช อักษร ก. กรุงเทพมหานคร: เพื่อนพิมพ์.

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

สกาพร ดิเรกบุษราคัม, สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์, อังคณา หิรัญสาลี และลิลา เรืองแป้น. 2539. ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยบางชนิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ

สุนันทา ข้องสาย และ ลักษมี วิทยา. 2562. สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเสม็ดขาวและเสม็ดแดง. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมงมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

อัครวิทย์ อิสสะโร. 2554. การพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจเชื้อก่อโรคสเตรปโตคอคโคซีสในปลาเศรษฐกิจของไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อังคณา หิรัญสาลี. 2546. สมุนไพรไทยต้านไวรัสหัวเหลือง. วารสารสัตว์น้ำเศรษฐกิจ. 2.(8):69-72.

Abraham, E.P., Chain, E., Fletcher, C.M., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., 1941, “Further observations on penicillin”, Lancet ii, pp. 177 – 188.

Ali M. Mechanism by which Garlic (*Allium sativum*) Inhibits cyclooxygenase activity. Effect of raw versus boiled garlic extract on the synthesis of prostanoids. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 1995;53:397-400.

Bauer, A.W., Kirby W.M.M., Sherris, J.C. and Turk, M., 1996, “Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method”, Am J Clin Pathol, Vol. 45, pp. 493–6

Disthai. 2564. มะระขี้นก(ออนไลน์). สืบค้นจาก : https://www.disthai.com (12 สิงหาคม 2564)

E.I. 2564. Streak Plate Methods of Isolation (ออนไลน์). สืบค้นจาก : https://www.medical-labs.net/streak-plate-methods (19 สิงหาคม 2564)

Grune T, Scherat T, Behrend H, Conradi E, Brenke R, Siems W. Influence of*Allium sativumon* oxidative stress status a clinical investigation. Phytomedicine 1996;2 (3):205-207.

J.M., Ericsson and J.C., Sherris, 1971, “Antibiotic sensitivity testing: report of an international collaborative study”, Acta Pathol Microbiol Scand, 217 (Suppl):1–90

Joseph B, Jini D. Antidiabetic effects of Momordica charantia (bitter melon) and its medicinal potency. Asian Pac J Trop Dis 2013; 3(2): 93–102

Khan AH, Burney A. A preliminary study of the hypoglycaemic properties of indigenous plants. J Pak Med Res 1962;2:100-16.

Lawal B, Shittu OK, Oibiokpa FI, Mohammed H, Umar SI, Haruna GM. Antimicrobial evaluation, acute and sub-acute toxicity studies of *Allium sativum*. Journal of Acute Disease. 2016;5(4): 296–301.

Lee I-C, Kim S-H, Baek H-S, Moon C, Kang S-S, Kim S-H, et al. The involvement of Nrf2 in the protective effects of diallyl disulfide on carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative damage and inflammatory response in rats. Food and Chemical Toxicology. 2014;63:174-185.

MartinsN, Petropoulos S, Isabel C.F.R. Ferreira. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum*.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. Food Chemistry 2016;211:41-50.

Reddish, G.F., 1992, “Methods of testing antiseptics”, Journal of Laboratory and Clinical, Medicine, Vol. 14, pp. 649 – 658.

Srithaworn, M., Thuyhun, A., Chunhachart, O. and Preecharram, S. 2015. Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts from Ya -Keaw Formula Against Shrimp pathogens. SDU Research Journal Sciences and Technology. 8(2). 117- 132.

Thethan. 2564. กระเทียม (ออนไลน์). สืบค้นจาก : http://www.the-than.com/samonpai/sa_12.html (30 กรกฎาคม 2564)

Thethan. 2564. มะระขี้นก (ออนไลน์). สืบค้นจาก :
http://www.the-than.com/samonpai/sa_24.html (31 กรกฎาคม 2564)
Wikipedia. 2564. แบคทีเรียสกุลวิบริโอ (ออนไลน์). สืบค้นจาก :
https://th.wikipedia.org/wiki/Vibrio (28 กรกฎาคม 2564)

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วัสดุและอุปกรณ์

ภาพที่ 1 เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

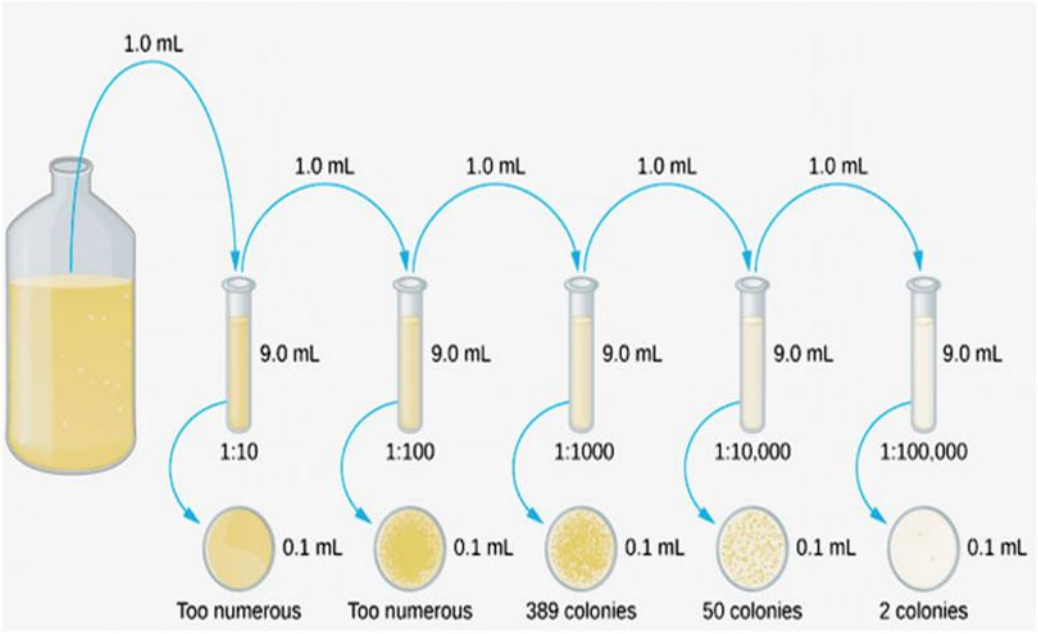
ภาพที่ 2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar

ภาพที่ 3 ออกซีเตตร้าซัยคลิน

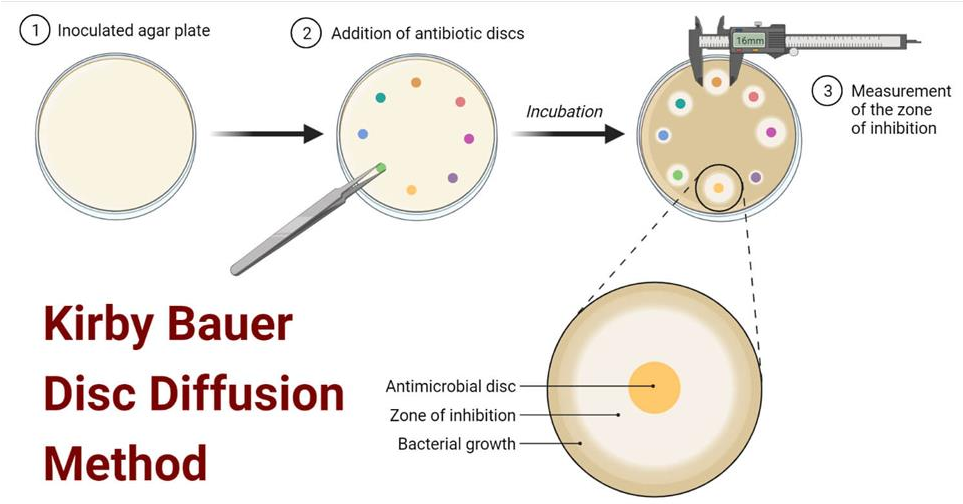
ภาพที่ 4 กระเทียม

ภาพที่ 5 มะระขี้นก

ภาพที่ 6 เสม็ดแดง



ภาพที่ 7 การเจือจางอย่างต่อเนื่อง



ภาพที่ 8 การวัด clearzone

ภาพที่ 9 rotary evaporator

ภาพที่ 10 อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

ภาพที่ 11 Auto clave

ภาพที่ 12 ตู้บ่มเชื้อ

ภาพที่ 13 hot air oven

ภาคผนวก ข
ตารางข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ชุดการทดลองที่ 1	ขนาดวงใส (มม.) (รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ)		
	R1	R2	R3
สารสกัดกระเทียม (ความเข้มข้น 3.13 %)	12.94	13.25	13.18

ตารางที่ 1 สารสกัดกระเทียม

ชุดการทดลองที่ 2	ขนาดวงใส (มม.) (รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ)		
	R1	R2	R3
สารสกัดผลเสม็ดแดง (ความเข้มข้น 3.13 %)	12.75	12.87	13.01

ตารางที่ 2 สารสกัดผลเสม็ดแดง

ชุดการทดลองที่ 3	ขนาดวงใส (มม.) (รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ)		
	R1	R2	R3
สารสกัดมะระขี้นก (ความเข้มข้น 3.13 %)	17.16	16.43	16.84

ตารางที่ 3 สารสกัดมะระขี้นก

ชุดการทดลอง	ขนาดวงใส (มม.) (รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ)		
	R1	R2	R3
น้ำกลั่น (เติมเกลือ 0.85 %)	6	6	6

ตารางที่ 4 น้ำกลั่น+เติมเกลือ 0.85%

ชุดการทดลอง	ขนาดวงใส (มม.) (รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ)		
	R1	R2	R3
ยาต้านจุลชีพ ออกซีเตตร้าไซคลิน (30 ไมโครกรัม)	25.36	24.91	25.23

ตารางที่ 5 ยาต้านจุลชีพ ออกซีเตตร้าไซคลิน

ชุดการทดลอง	R1	R2	R3
ชุดการทดลองที่1	6.94	7.25	7.18
ชุดการทดลองที่2	6.75	6.87	7.01
ชุดการทดลองที่3	11.16	10.43	10.84
ชุดการทดลองที่4	0	0	0
ชุดการทดลองที่5	19.36	18.91	19.23

ตารางที่ 6 วงใส-เส้นผ่านศูนย์กลางกระดาษทดสอบ 6 มม.

Descriptives								
วงใส								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	7.1233	.16258	.09387	6.7195	7.5272	6.94	7.25
2	3	6.8767	.13013	.07513	6.5534	7.1999	6.75	7.01
3	3	10.8100	.36592	.21127	9.9010	11.7190	10.43	11.16
4	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
5	3	19.1667	.23159	.13371	18.5914	19.7420	18.91	19.36
Total	15	8.7953	6.47432	1.67166	5.2100	12.3807	.00	19.36

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์โดยรวมทุกชุดการทดลอง

ANOVA					
วงใส					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	586.375	4	146.594	3174.397	.000
Within Groups	.462	10	.046		
Total	586.836	14			

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์โดยภาพรวมทุกชุดการทดลอง

Descriptives								
วงใส								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	7.1233	.16258	.09387	6.7195	7.5272	6.94	7.25
2	3	6.8767	.13013	.07513	6.5534	7.1999	6.75	7.01
3	3	10.8100	.36592	.21127	9.9010	11.7190	10.43	11.16
Total	9	8.2700	1.91957	.63986	6.7945	9.7455	6.75	11.16

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์โดยภาพรวมของสมุนไพรทั้ง 3 ชุดการทดลอง

ANOVA					
วงใส					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	29.123	2	14.562	246.438	.000
Within Groups	.355	6	.059		
Total	29.478	8			

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์โดยภาพรวมของสมุนไพรทั้ง 3 ชุดการทดลอง

วงใส

	treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan[a]	2	3	6.8767	
	1	3	7.1233	
	3	3		10.8100
	Sig.		.260	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยรายคู่