Proceedings

การประชุมวิชาการระดับชาติ ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเครือข่ายภาคใต้ ครั้งที่ 4

"วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เพื่อบูรณาการท้องถิ่นอย่างยั่งยืน"

NSCIC 2019

7-8 กุมภาพันธ์ 2562

ณ หอประชุมเฉลิมพระเกียรติ 80 พรรษา

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ชื่อหนังสือ รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเครือข่ายภาคใต้ ครั้งที่ 4

จัดทำโดย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
เลขที่ 160 หมู่ 4 ถนนกาญจนวนิช ตำบลเขารูปช้าง
อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา รหัสไปรษณีย์ 90000
โทร 0-7426-0200-4 โทรสาร 0-7426-0230
E-mail: sciencewebmaster@skru.ac.th

พิมพ์ครั้งที่ 1

จัดพิมพ์จำนวน E-Book

เว็บไซต์ http://nscic2019.skru.ac.th/

ปีที่พิมพ์ พ.ศ. 2562

ISBN: 978-616-8018-10-1

บทความฉบับเต็ม : การประชุมวิชาการระดับชาติ ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเครือข่ายภาคใต้ ครั้งที่ 4

ผู้จัดทำ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิวัต กลิ่นงาม	อธิการบดีมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
อาจารย์ ดร.อัจฉรา วงศ์วัฒนามงคล	รองอธิการบดีมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทัศนา ศิริโชติ	รองอธิการบดีมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
อาจารย์ ดร.พิพัฒน์ ลิมปนะพิทยาธร	รองอธิการบดีมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
อาจารย์พิเชษฐ์ จันทวี	รองอธิการบดีมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
อาจารย์จิรภา คงเขียว	รองอธิการบดีมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

คณะกรรมการดำเนินงาน

ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกมหาวิทยาลัย จำนวน 33 คน
ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายในมหาวิทยาลัย จำนวน 15 คน
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ฝ่ายดำเนินงาน

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
เลขที่ 160 ม.4 ถ.กาญจนวนิช ต.เขารูปช้าง อ.เมืองสงขลา จ.สงขลา 90000
โทรศัพท์ติดต่อ (074)260260 และ (074)260-200 ต่อ 1530
อีเมล์ : sciencewebmaster@skru.ac.th

การแพร่กระจายของแบคทีเรียและรา (*Escherichia coli, Staphylococcus aureus Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp.) ในหมวกนิรภัยภายในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

Distribution of Bacteria and Fungi (*Escherichia coli, Staphylococcus aureus Aspergillus* sp. , *Rhizopus* sp.) in the motorcycle helmet in Yala Rajabhat University

ซูไรดา สอมะ[1*] นูรีฮัน กอแล[1] นุรอัยนี หะยียูโซะ[2]
Suraida Soma[1] Nureehan Kolae[1] Nur-ainee Hayeeyusoh[2]

บทคัดย่อ

การศึกษาการแพร่กระจายแบคทีเรียและรา *Escherichia coli (E.coli)*, *Staphylococcus aureus (S. aureus) Aspergillus* sp. , *Rhizopus* sp. ในหมวกนิรภัยบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา โดยจะเก็บตัวอย่างหมวกนิรภัยทั้งหมด 50 ใบ บริเวณอาคารจอดรถ ได้แก่ อาคาร 5 อาคาร 9 อาคาร 20 อาคาร 23 อาคาร 24 และอาคาร 25 โดยทำการทดสอบจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธี Total Variable Cell count Plate และ Total Fungal Count ต่อมาทำการแยกเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะแยกเชื้อ *E. coli* ใช้อาหาร Eosin Methylene Blue agar (EMB) และ *S. aureus* ใช้อาหาร Manital Salt agar (MSA) บ่มไว้ที่ 37 ºC เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ส่วนรา *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp เพาะเลี้ยงโดยใช้อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน และทำทดสอบชีวเคมีเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแบคทีเรียและรา ผลการวิจัยพบว่าปริมาณการแพร่กระจายของแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 0.28 - 1.02 $\times 10^5$ (CFU/cm^2) และปริมาณการแพร่กระจายของราทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.1 – 2.3$\times 10^4$ (CFU/cm^2) เมื่อแยกเชื้อพบการแพร่กระจายของแบคทีเรีย ผลปรากฏว่าพบเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด (ร้อยละ 30%) ไม่พบเชื้อ *E. coli* (ร้อยละ 0%) ส่วนปริมาณที่พบการแพร่กระจายของรา *Aspergillus* sp. (ร้อยละ 14%) และ *Rhizopus* sp. (ร้อยละ 10%) ซึ่งตัวอย่างที่พบชนิดเชื้อมากที่สุด (2 ชนิด) คือ MH6, MH15 และMH18 ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าภายในหมวกนิรภัยมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งบางชนิดอาจส่งผลต่อสุขภาพของผู้ใช้ได้ ดังนั้น ผู้ใช้จึงควรหมั่นดูแล และรักษาความสะอาดในหมวกนิรภัยเพื่อป้องกันปัญหาสุขภาพโดยเฉพาะเชื้อก่อโรค

คำสำคัญ: หมวกนิรภัย, *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp.

Abstract

The study of the distribution bacteria and fungi in helmets at Yala Rajabhat University. Sampling 50 samples; collecting in parking area of building 5, 9, 20, 23, 24 and 25. Investigate method were Total Variable Cell Count and Total Fungal Count. Next, Isolation were cultured on EMB for *E. coli* and MSA for *S. aureus* growth and Potato Dextrose Agar for fungi growth. The plates for bacteria growth were incubated aerobically at 37 ºC for 24-48 h, while plates for fungi at room temperature for 5-7 days. Biochemical tests were used to identify bacteria; while, cultural characteristics were used for fungi

[1] นักศึกษา ระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
[2] อาจารย์ประจำสาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
*** Corresponding author, E-mail:** Suraida.so@yru.ac.th

identification. The results showed that the distribution of bacteria were 0.28 - 1.02 $\times 10^5$ (CFU/cm^2). Fungi distribution were 0.1 – 2.3$\times 10^4$ (CFU/cm^2). *S. aureus* were highest frequency (30%) the quantity found *Aspergillus* sp. (14%) and *Rhizopus* sp.. (10%), respectively. The high of species in helmet (2 species) samples were MH6, MH15 and MH18. This research showed that within the helmet has several types of microbial contamination, some types of which may affect the health of the user. Therefore, the user should exercise care and cleaning in helmet to prevent health problems, especially diseases from pathogenic.

Keywords: Helmet, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* , *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp.

บทนำ

ยานพาหนะมีหลากหลายประเภท ได้แก่ จักรยาน รถยนต์ จักรยานยนต์ รถไฟ เรือ และเครื่องบิน เป็นต้น แต่จักรยานยนต์เป็นหนึ่งในยานพาหนะที่ได้รับความนิยมและมีการใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศไทยเรา คนไทยใช้จักรยานยนต์มากที่สุดเป็นอันดับ 8 ของโลก ราว 17 ล้านคัน คิดเป็นร้อยละ 62 ของรถจดทะเบียนสะสมทั้งหมดทั้งประเทศ สัดส่วนการถือครองจักรยานยนต์สูงถึง 4 คนต่อคัน เพราะราคาไม่แพง และมีความคล่องตัวในการใช้ ในการขับขี่จำเป็นจะต้องมีอุปกรณ์ป้องกันอุบัติเหตุ ซึ่งหมวกนิรภัยถือเป็นอุปกรณ์สำคัญอย่างยิ่งที่จะช่วยป้องกันอันตรายร้ายแรงที่อาจเกิดขึ้นได้ทุกเมื่อ แต่การสวมใส่หมวกนิรภัยในขณะที่อากาศของประเทศไทยเราเป็นแบบร้อนชื้นและอบอ้าวนั้นจะทำให้มีเหงื่อออกมา ซึ่งภายในหมวกนิรภัยที่หุ้มด้วยฟองน้ำและผ้าที่มีคุณสมบัติซับเหงื่อได้ดี จึงเกิดการอมความชื้นและความร้อนเก็บไว้และทำให้เกิดปัญหา เชื้อรา คันหนังศีรษะ รังแค และผมร่วงได้ ซึ่งการดูแลรักษาเรื่องความสะอาดค่อนข้างลำบาก เพราะภายในหมวกนิรภัยบางชิ้นส่วนก็ไม่สามารถถอดออกมาซักได้ จึงเหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคฉวยโอกาส เช่น แบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา โปรโตซัว ซึ่งเชื้อฉวยโอกาสเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะทำให้ร่างกายอ่อนแอ จึงมีโรคติดเชื้อฉวยโอกาส (Opportunistic Infection) โรคติดเชื้อที่มักไม่เกิดขึ้นในคนปกติทั่วไป แต่จะเกิดขึ้นเมื่อร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่ำลง ซึ่งผู้ติดเชื้อจะมีระดับภูมิคุ้มกันลดต่ำลงหรือเกิดภาวะที่เรียกว่า "ภูมิคุ้มกันบกพร่อง" จึงเป็นผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคติดเชื้อฉวยโอกาส ผู้ติดเชื้ออาจป่วยด้วยโรคติดเชื้อฉวยโอกาสได้พร้อมกันมากกว่าหนึ่งโรค และอาจเป็นโรคเดิมซ้ำได้อีกหากภูมิคุ้มกันในร่างกายลดต่ำลง ซึ่งการติดเชื้อโรคฉวยโอกาสนี้อาจมีความรุนแรงจนเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ หากไม่ได้รับการดูแลรักษาอย่างถูกต้องและทันเวลา อาจทำให้หมวกนิรภัยที่มีหน้าที่ป้องกันอุบัติเหตุกลายเป็นแหล่งเพาะเชื้อ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมอาจส่งผลกระทบในด้านสุขภาพต่อมนุษย์ที่อาศัยอยู่บริเวณนั้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งหากจุลินทรีย์เหล่านั้นเป็นเชื้อก่อโรคและรับเชื้อเหล่านี้เข้าสู่ร่างกาย อาจด้วยทางการหายใจเอาอากาศหรือเอาสปอร์ของเชื้อราที่มีเชื้อโรคเข้าไป เช่น *Aspergillus* sp.ทำให้เกิดโรคแพ้เชื้อราหรือโรคเชื้อราชนิดกระจายในปอด (Aspergillosis) หรือการติดเชื้อผ่านทางผิวหนังบริเวณบาดแผลที่เกิดจาก *Staphylococcus aureus* ซึ่งเชื้อก่อโรคเหล่านี้แพร่กระจายหรือปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมรวมถึงติดอยู่ตามพื้นผิวอุปกรณ์เครื่องใช้ต่างๆซึ่งหากมีผู้มาสัมผัสและได้รับเชื้อเหล่านี้เข้าสู่ร่างกายอาจก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ (สมหวัง, 2540) การควบคุมแบคทีเรียและเชื้อราที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวสัมผัสบริเวณสถานที่และอุปกรณ์ต่างๆนั้นมักจะใช้สารเคมีในการฆ่าเชื้อ เช่น สารเคมีในกลุ่ม แอลกอฮอล์ กลูตารัลดีไฮด์ สารประกอบคลอรีน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ทำให้เกิดการระคายเคือง (สุรีย์พร, 2555)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดแบคทีเรียและเชื้อราที่แพร่กระจายภายในหมวกนิรภัย ซึ่งเป็นแหล่งอาศัยของจุลินทรีย์ทุกชนิดจึงง่ายต่อการปนเปื้อนและง่ายต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว จึงเป็นสาเหตุของการเกิดโรคและติดเชื้อ อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้มาสัมผัสได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.เพื่อศึกษาจำนวนเชื้อแบคทีเรียและราทั้งหมดที่แพร่กระจายในหมวกนิรภัย

2.เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และรา *Aspergillus* sp ., *Rhizopus* sp.ที่แพร่กระจายในหมวกนิรภัย

แนวคิด ทฤษฎี กรอบแนวคิด

หมวกนิรภัยถือเป็นอุปกรณ์สำคัญอย่างยิ่งที่จะช่วยป้องกันอันตรายร้ายแรงที่อาจเกิดขึ้นได้ทุกเมื่อ แต่การสวมใส่หมวกนิรภัยในขณะที่อากาศของประเทศไทยของเราเป็นแบบร้อนชื้นและอากาศอบอ้าวนั้นจะทำให้มีเหงื่อออกมา จึงเกิดการอมความชื้นและทำให้เกิดปัญหาการสะสมของจุลินทรีย์ ซึ่งมีการปนเปื้อนของเชื้อโรคต่างๆ จุลินทรีย์ในอากาศสามารถก่อโรคได้ในคนที่สภาวะภูมิคุ้มกันต่ำลงกว่าปกติ เป็นการก่อโรคแบบเชื้อฉวยโอกาส (Opportunistic infection) ในขณะผู้นั้นมีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยพบว่าโรคที่พบบ่อยจากการติดเชื้อส่วนใหญ่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ ซึ่งมักจะอยู่บนตามส่วนต่างๆของผิวหนังหรืออาจเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการสัมผัสมลพิษอากาศ มักเป็นโรคที่เกี่ยวกับระบบทางเดินหายเป็นหลัก ได้แก่ โรคหอบหืด ภูมิแพ้ หรือแม้แต่การเป็นโรคเรื้อรังแต่บางรายอาจเกิดการระคายเคืองที่ผิวหนังได้ เนื่องจากเชื้อสามารถเข้าสู่ร่างกายได้หลายวิธีรวมถึงการสัมผัสเชื้อโรคจากพื้นผิวต่างๆ การที่อยู่ในสถานที่ที่เป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์ก็จะยิ่งได้รับอันตรายเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์ในอากาศแม้ได้รับเพียงเล็กน้อย แต่ถ้าเป็นชนิดก่อโรคสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้ และอากาศยังช่วยให้การแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นไปได้อย่างรวดเร็ว

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการเก็บตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างจากหมวกนิรภัยในมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา โดยเก็บตัวอย่างจากบริเวณกลางศรีษะ ทั้งหมด 50 ใบ ได้แก่ อาคาร 5 อาคาร 9 อาคาร 20 อาคาร 23 อาคาร 24 และอาคาร 25 นำไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงน้ำกลั่นที่ sterile บิดไม้พันสำลีพอหมาดๆ นำไป swab บนพื้นผิวในหมวกนิรภัยให้ได้พื้นที่ 75 ตารางเซนติเมตร (5x15 เซนติเมตร) โดยการป้ายพื้นผิวในลักษณะนี้ให้ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง จนกระทั่งเต็มกรอบบริเวณภายในหมวกนิรภัย นำไปจุ่มลงในสารละลาย 0.85% NaCl 9 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทำการเจือจาง

นำตัวอย่างที่ swab ใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเจือจางใน 0.85% NaCl ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ได้การเจือจาง 10^{-1} ทำตัวอย่างให้เจือจางด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ได้การเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} ตามลำดับ แล้วดูดทิ้ง 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากการเจือจางที่เตรียมไว้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) สำหรับเชื้อราทั้งหมด Plate Count Agar (PCA) สำหรับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด Eosin methylene blue agar (EMB) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ Mannitol salt agar (MSA) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* แล้วทำการ Spread plate นำเชื้อราไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน ส่วนแบคทีเรียบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อนำมาตรวจนับจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์

ทำการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยคัดแยกจาก Eosin methylene blue agar (EMB) และ Mannitol salt agar (MSA) มา Streak บนอาหาร Eosin methylene blue agar (EMB) และ Mannitol salt agar (MSA) อีกครั้ง บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อมาทำการทดสอบชีวเคมี ย้อมแกรม และส่องกล้องจุลทรรศน์ ส่วนการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ หลังจากบ่มครบ 5-7 วัน ทำการคัดแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ นำมาทำ Slide culture ย้อมสี Lactophenol Cotton Blue และส่องกล้องจุลทรรศน์

สรุปผลการวิจัย

จำนวนแบคทีเรียและเชื้อราทั้งหมดที่แพร่กระจายในหมวกนิรภัย

จากการศึกษาการแพร่กระจายของแบคทีเรียและราในหมวกนิรภัยภายในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ได้แก่ อาคาร 5, 9, 20, 23, 24 และ 25 จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ผลปรากฏว่าปริมาณแบคทีเรียสูงสุดพบในหมวกนิรภัยใบที่ MH26 มีค่าปริมาณแพร่กระจายเท่ากับ 102×10^3 (CFU/cm^2) และราสูงสุดพบในหมวกนิรภัยใบที่ MH8 มีค่าปริมาณแพร่กระจายเท่ากับ 23×10^3 (CFU/cm^2) เนื่องจากการเก็บรักษาและลักษณะทางกายภาพของหมวกนิรภัยมีการใช้งานเป็นเวลานาน เพราะภายในหมวกนิรภัยจะมีส่วนที่หุ้มด้วยฟองน้ำและผ้าที่มีคุณสมบัติซับเหงื่อได้ดี จึงเกิดการอบความชื้นและความร้อนเก็บไว้ ทำให้เกิดการสะสมของจุลินทรีย์ สำหรับการแพร่กระจายปริมาณของแบคทีเรียต่ำสุดพบในหมวกนิรภัยใบที่ MH37 มีค่าปริมาณแพร่กระจายเท่ากับ 28×10^3 (CFU/cm^2) ปริมาณแพร่กระจายของราต่ำสุดพบในหมวกนิรภัยใบที่ MH32 มีค่าปริมาณแพร่กระจายเท่ากับ 10×10^3 (CFU/cm^2) จากการเก็บตัวอย่างในหมวกนิรภัย พบว่าปริมาณการแพร่กระจายของแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 0.28 - 1.02 $\times10^5$ (CFU/cm^2) และปริมาณการแพร่กระจายของราทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.1 – 2.3 $\times10^4$ (CFU/cm^2) (ดังตารางที่1)

ตารางที่ 1 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและราทั้งหมด

ตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ($\times10^3$ CFU/cm^2)	จำนวนเชื้อราทั้งหมด ($\times10^3$ CFU/cm^2)	ตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ($\times10^3$ CFU/cm^2)	จำนวนเชื้อราทั้งหมด ($\times10^3$ CFU/cm^2)
MH1	41 ± 2.83	-	MH26	**102 ± 5.66**	-
MH2	33 ± 2.83	-	MH27	73 ± 2.83	-
MH3	<25	-	MH28	99 ± 2.83	-
MH4	42 ± 1.41	-	MH29	<25	-
MH5	37± 2.83	14 ± 0.66	MH30	28.5 ± 2.12	10.5 ± 4.95
MH6	<25	-	MH31	63 ± 2.83	-
MH7	<25	-	MH32	81 ± 2.83	10 ± 1.31
MH8	44 ± 1.41	**23 ± 2.83**	MH33	79 ± 2.83	-
MH9	<25	-	MH34	83 ± 4.24	-
MH10	32 ± 2.83	-	MH35	52 ± 1.41	-
MH11	<25	-	MH36	31 ± 8.49	16 ± 5.66
MH12	46± 4.24	-	MH37	28 ± 1.41	-
MH13	43 ± 2.83	-	MH38	42.5 ± 3.54	-
MH14	<25	-	MH39	40 ± 1.41	-
MH15	42 ± 2.83	-	MH40	30 ± 4.24	-
MH16	<25	-	MH41	31 ± 5.66	-
MH17	44 ± 4.24	-	MH42	30 ± 1.41	-
MH18	<25	-	MH43	69 ± 11.31	12.5 ± 3.54

ตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ($\times10^3$ CFU/cm^2)	จำนวนเชื้อราทั้งหมด ($\times10^3$ CFU/cm^2)	ตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ($\times10^3$ CFU/cm^2)	จำนวนเชื้อราทั้งหมด ($\times10^3$ CFU/cm^2)
MH19	35 ± 2.83	-	MH44	32 ± 4.24	-
MH20	40 ± 1.41	-	MH45	<25	14.5 ± 4.95
MH21	78 ± 4.24	-	MH46	57.5 ± 24.75	16 ± 5.66
MH22	96 ± 2.83	-	MH47	47 ± 8.49	-
MH23	51 ± 2.83	-	MH48	95 ± 49.50	-
MH24	97 ± 2.83	-	MH49	71 ± 5.66	13.5 ± 4.95
MH25	94 ± 4.24	-	MH50	<25	16.5 ± 0.71

หมายเหตุ (–) นับเชื้อไม่ได้

การแยกเชื้อ *S. aureus*, *E. coli*, *Aspergillus* sp. และ *Rhizopus* sp. ที่แพร่กระจายในหมวกนิรภัย

จากการทดลองพบเชื้อประมาณ 1-2 ชนิดต่อตัวอย่าง โดยจะพบจำนวนเชื้อ 2 ชนิด มี 3 ตัวอย่าง คือ MH6, MH15 และ MH18 รองลงมาจะพบเชื้อ 1 ชนิด มี 20 ตัวอย่าง คือ MH1, MH2, MH3, MH4, MH5, MH8, MH9, MH14, MH26, MH30, MH31, MH34, MH36, MH37, MH39, MH45, MH46, MH47, MH49 และ MH50 (ดังตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนชนิดเชื้อที่พบในหมวกนิรภัย

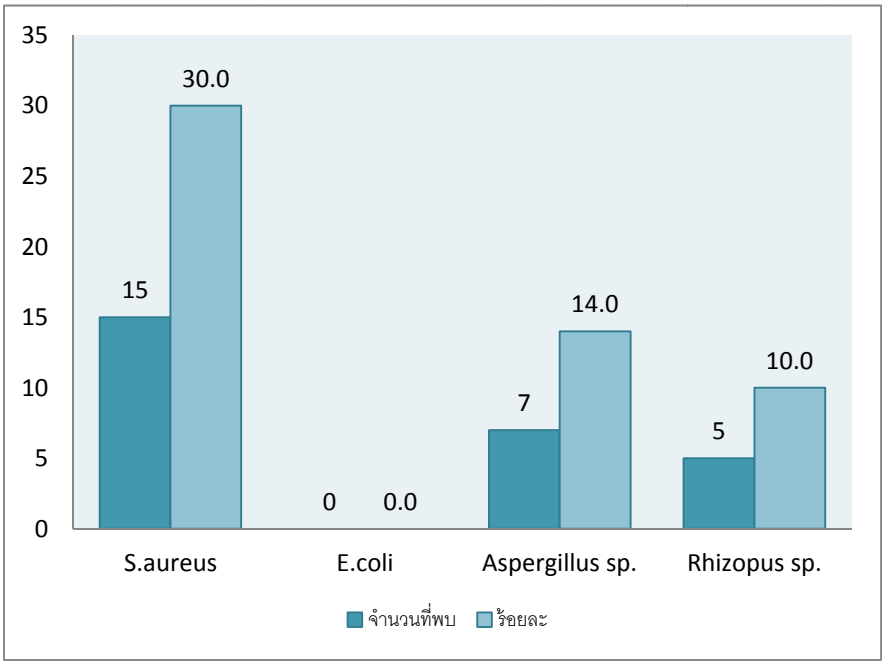
ตัวอย่าง	*S. aureus*	*E. coli*	*Aspergillus* sp.	*Rhizopus* sp.	จำนวนเชื้อที่พบ
MH1	-	-	√	-	1
MH2	-	-	√	-	1
MH3	-	-	-	√	1
MH4	√	-	-	-	1
MH5	-	-	√	-	1
MH6	-	-	√	√	2
MH7	-	-	-	-	0
MH8	-	-	√	-	1
MH9	-	-	-	√	1
MH10	-	-	-	-	0
MH11	-	-	-	-	0
MH12	-	-	-	-	0
MH13	-	-	-	-	0
MH14	√	-	-	-	1
MH15	√	-	√	-	2
MH16	√	-	-	-	1
MH17	-	-	-	-	0

MH18	√	-	√	-	2
MH19	-	-	-	-	0
MH20	-	-	-	-	0
MH21	-	-	-	-	0
MH22	-	-	-	-	0
MH23	-	-	-	-	0
MH24	-	-	-	-	0
MH25	-	-	-	-	0
MH26	-	-	-	-	0
MH27	√	-	-	-	1
MH28	-	-	-	-	0
MH29	-	-	-	-	0
MH30	√	-	-	-	1
MH31	√	-	-	-	1
MH32	-	-	-	-	0
MH33	-	-	-	-	0
MH34	√	-	-	-	1
MH35	-	-	-	-	0
MH36	√	-	-	-	1
MH37	-	-	-	√	1
MH38	-	-	-	-	0
MH39	√	-	-	-	1
MH40	-	-	-	-	0
MH41	-	-	-	-	0
MH42	-	-	-	-	0
MH43	-	-	-	-	0
MH44	-	-	-	-	0
MH45	√	-	-	-	1
MH46	√	-	-	-	1
MH47	√	-	-	-	1
MH48	-	-	-	-	0
MH49	-	-	-	√	1
MH50	√	-	-	-	1

หมายเหตุ (√) พบเชื้อ, (–) ไม่พบเชื้อ

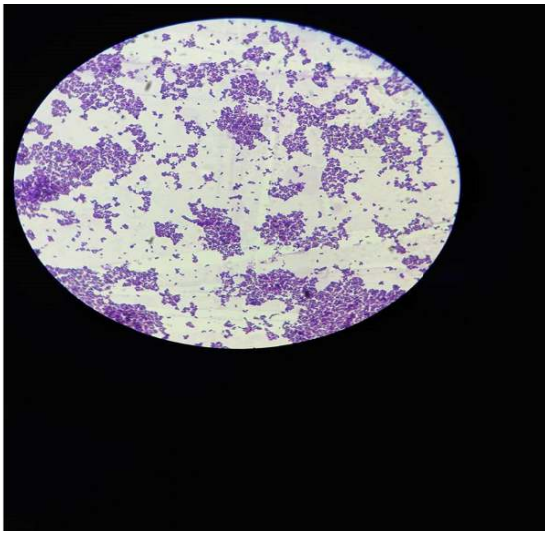
ชนิดของแบคทีเรีย *E. coli, S. aureus* และรา *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. ในตัวอย่างหมวกนิรภัย

จากการทดลองปริมาณการแพร่กระจายของแบคทีเรียผลปรากฏว่าไม่พบเชื้อ *E.coli* จากตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0%) เนื่องจากเป็นเชื้อที่ไม่พบตามผิวหนังแต่จะเป็นเชื้อประจำถิ่นที่อยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ เป็นเชื้อที่ไม่สามารถเจริญได้ในที่ที่มีความเค็ม เพราะการใส่หมวกนิรภัยเมื่ออากาศร้อนจะทำให้มีเหงื่อไหลออกมา ซึ่งเหงื่อจะมีรสชาติเค็ม ทำให้ *E.coli* ไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากไม่มีสารอาหารตามที่ต้องการ แต่จะพบปริมาณการแพร่กระจายของ *S. aureus* มากที่สุด (ร้อยละ 30%) เนื่องจากเป็นเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนังและเป็นเชื้อที่สามารถเจริญได้ดีในที่ที่ชอบความเค็ม ซึ่งการใส่หมวกนิรภัยเมื่ออากาศร้อนจะทำให้มีเหงื่อไหลออกมา ซึ่งเหงื่อจะมีรสชาติเค็มทำให้ *S. aureus* มีสารอาหารเจริญได้ดี ส่วนปริมาณที่พบการแพร่กระจายของรา *Aspergillus* sp. พบปริมาณการแพร่กระจาย (ร้อยละ 14%) และพบปริมาณการแพร่กระจายของ *Rhizopus* sp.(ร้อยละ 10%) (ดังภาพ 1)



ภาพ 1 ร้อยละการพบของแต่ละเชื้อ *S. aureus*, *E. coli* และรา *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp.ในตัวอย่างหมวกนิรภัยภายในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

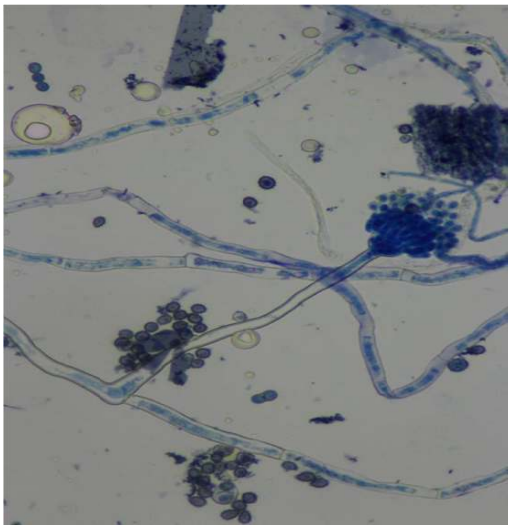
(ก)



(ข)

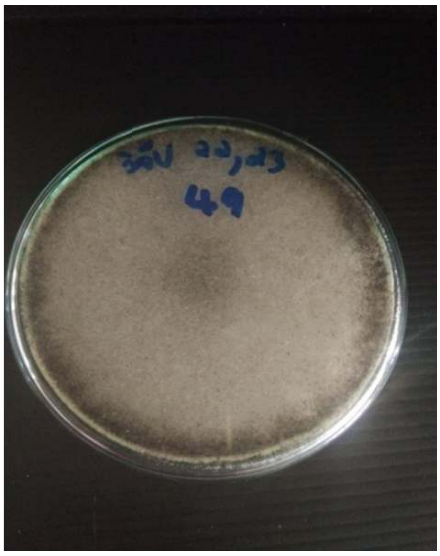
ภาพ 2 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MSA แบคทีเรีย *S. aureus*
(ข) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000x

(ก)



(ข)

ภาพ 3 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA *Aspergillus* sp.
(ข) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400x



(ก) (ข)

ภาพ 4 (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA *Rhizopus*sp.
(ข) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400x

อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาการแพร่กระจายของแบคทีเรียและราในหมวกนิรภัยในแต่ละบริเวณที่จอดรถมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลาทั้งหมด 5 บริเวณอาคารสถานที่จอดรถ จากตัวอย่างทั้งหมด 50 ใบ โดยจะเก็บตัวอย่างหมวกนิรภัยประเภทครึ่งใบ พบว่าการแพร่กระจายของแบคทีเรียและราในหมวกนิรภัย ที่มีปริมาณการแพร่กระจายของแบคทีเรียสูงสุดเท่ากับ 102×10^3 (CFU/cm^2) และปริมาณการแพร่กระจายของราสูงสุดเท่ากับ 23×10^3 (CFU/cm^2) เนื่องจากการเก็บรักษาและลักษณะทางกายภาพของหมวกนิรภัยมีการใช้งานเป็นเวลานาน เพราะภายในหมวกนิรภัยจะมีส่วนที่หุ้มด้วยฟองน้ำและผ้าที่มีคุณสมบัติซับเหงื่อได้ดี จึงเกิดการอบความชื้นและความร้อนเก็บไว้ ทำให้เกิดการสะสมของจุลินทรีย์ สำหรับปริมาณการแพร่กระจายของแบคทีเรียต่ำสุดเท่ากับ 28×10^3 (CFU/cm^2) และปริมาณการแพร่กระจายของราต่ำสุดเท่ากับ 10×10^3 (CFU/cm^2) เนื่องจากการเก็บรักษาและการใช้งานของผู้ใช้อาจพึงใช้หรือไม่ค่อยได้ใช้งานทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์น้อย และพบปริมาณการแพร่กระจายของแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 0.28 - 1.02×10^5 (CFU/cm^2) และปริมาณการแพร่กระจายของราทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.1 – 2.3×10^4 (CFU/cm^2) จากการศึกษาการแพร่กระจายของแบคทีเรียและรา สำหรับการทดลองพบเชื้อประมาณ 1 - 2 ชนิดต่อตัวอย่าง โดยจะพบจำนวนเชื้อ 2 ชนิด มี 3 ตัวอย่าง คือ MH6, MH15 และ MH18 รองลงมาจะพบเชื้อ 1 ชนิด มี 20 ตัวอย่าง คือ MH1, MH2, MH3, MH4, MH5, MH8, MH9, MH14, MH26, MH30, MH31, MH34, MH36, MH37, MH39, MH45, MH46, MH47, MH49 และ MH50

ส่วนจากการทดลองปริมาณการแพร่กระจายของแบคทีเรียผลปรากฏว่าไม่พบเชื้อ *E.coli* จากตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0%) เนื่องจากเป็นเชื้อที่ไม่พบตามผิวหนังแต่จะเป็นเชื้อประจำถิ่นที่อยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ เป็นเชื้อที่ไม่สามารถเจริญได้ในที่ที่มีความเค็ม เพราะการใส่หมวกนิรภัยเมื่ออากาศร้อนจะทำให้มีเหงื่อไหลออกมา ซึ่งเหงื่อจะมีรสชาติ

เค็ม ทำให้ *E.coli* ไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากไม่มีสารอาหารตามที่ต้องการ แต่จะพบปริมาณการแพร่กระจายของ *S. aureus* มากที่สุด (ร้อยละ 30%) เนื่องจากเป็นเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนัง และเป็นเชื้อที่สามารถเจริญได้ดีในที่ที่ชอบความเค็ม ซึ่งการใส่หมวกนิรภัยเมื่ออากาศร้อนจะทำให้มีเหงื่อไหลออกมา ซึ่งเหงื่อจะมีรสชาติเค็มทำให้ *S. aureus* มีสารอาหารเจริญได้ดี ส่วนปริมาณที่พบการแพร่กระจายของรา*Aspergillus* sp. พบปริมาณการแพร่กระจาย (ร้อยละ 14%) และพบปริมาณการแพร่กระจายของ *Rhizopus* sp. (ร้อยละ 10%) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Adamu et al. 2012) ซึ่งรายงานการแพร่กระจายของแบคทีเรียและรา ได้แก่ *Staphylococcus aureus* (80%, 7%), *Escherichia coli* (40%,13%), *Aspergillus* sp. (82%,7%) และ *Rhizopus* sp. (40%, 27%) โดยจะศึกษาการเก็บตัวอย่างในบริเวณมหาวิทยาลัย 2 แห่ง คือวิทยาลัยเทคโนโลยี (YABATECH) และ Lagos University Teaching Hospital (LUTH) จะเก็บตัวอย่างในหมวกนิรภัยทั้งหมด 300 ใบ โดยวิธีการ Simple streak plate และ Pour plate technique ทำให้จุลินทรีย์เหล่านี้มีการปนเปื้อนอยู่ในสถานที่ทั้ง 2 แห่ง และอาจจะเกิดการแพร่กระจายเข้าไปในหมวกนิรภัยผ่านทางผิวหนังและการสัมผัสได้โดยจะพบ *S. aureus* มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องการรายงานของ (Yusha'u et *al.*, 2010; Willey et al., 2011) เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* สามารถทำให้เกิดโรคฝีการติดเชื้อบาดแผลโรคช็อกที่เป็นพิษโรคปอดบวมและโรคอื่นซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Roth and Jenner, 1998). จุลินทรีย์ที่เกี่ยวกับการศึกษาครั้งนี้จะทำให้เกิดโรคมากมาย ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพร่างกาย

ข้อเสนอแนะและการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ควรมีการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียและราที่เกิดในหมวกนิรภัยโดยการต่อยอดเพื่อการศึกษาเกี่ยวกับสาเหตุการปนเปื้อนและการก่อโรคของเชื้อชนิดอื่นๆ
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานต่อผู้ใช้หมวกนิรภัยได้ทราบถึงสาเหตุการปนเปื้อน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณาจารย์หลักสูตรจุลชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตรมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ที่ช่วยสนับสนุนทุนการทำวิจัย จนสามารถปฏิบัติงานวิจัยสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ของการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

สมหวัง ด่านชัยวิจิตร. (2540). **โรคติดเชื้อในโรงพยาบาล** (พิมพ์ครั้งที่ 1). สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.

สุรีย์พร โพธิ์ศรีทอง. (2555). **การดูแลและควบคุมการติดเชื้อจากพื้นผิวต่าง ๆ(Online).** จาก http: samut-prakarndent.files.wordpress.com ,สืบค้นเมื่อ 10 สิงหาคม 2560.

Leonard Adamu, Betty Edeghagba , Funke Olatomi , Obinna Ezeokoli , Aniekpeno Elijah. (2012). **Microorganisms associated with commercial motorcycle helmets in Metropolis**. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences.1(5):1184-1185.

Roth, R. – Jenner, W. 1998. **Microbial Ecology of the skin**. In Annual Review ofmicrobiology, vol. 42, 1998, no. 1, p. 42 - 43.

Willey, J. M. – Sherwood, L. M. – Woolverton**,** C. J. 2011. **PrescottsMicrobiology (8th edition)**. McGraw hill, New York, 2011, p. 969 – 971.

Yusha'U, M. – Bello, M. – Sule, H. 2010. **Isolation of bacteria and fungi from personaland**

public mobile cellphones: A case study of Bayero University, Kano (Old Campus).
In International Journal of Biomedical and Health Sciences, vol. 6, 2010, no. 1, p. 97- 102.View publication

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพรต่อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, และ*Pseudomonas aeruginosa*

Antibacterial activities of herbal extracts against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* University

รอยญาณย์ กาเว[1] , ทัศสุวรรณ แดวอสนุง[1] และซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ[2]
Roiyan Kawe[1] , Thasuwan Daewosnung[1] and Zubaidah Hajiwangoh[2]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากสมุนไพร 10 ชนิด ที่สกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และน้ำ โดยนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี agar well diffusion และ broth microdilution ผลการศึกษาพบว่า มีสารสกัดจำนวน 18 ชนิด (ร้อยละ 60) ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณของวงใสอยู่ในช่วง 6.63-23.46 มิลลิเมตร โดยสารสกัดจากใบพลูและใบสะเดาสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้ง 3 ชนิด เมื่อนำสารสกัดเหล่านี้ไปทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration; MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum bactericidal concentration; MBC) พบว่าสารสกัดจากใบพลูด้วยเอทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด มีค่า MIC อยู่ในช่วง 15.63-31.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมีค่า MBC อยู่ในช่วง 31.25-62.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดที่อาจนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในอนาคต

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย, สารสกัดสมุนไพร, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

This research aimed to study antibacterial activities of herbal extracts. Ten kinds of plant were extracted with methanol, ethanol and water. They were screened for inhibitory effects against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by agar well diffusion and broth microdilution methods. The results showed that 18 extract (60%) showed antimicrobial activity with inhibition zone ranging from 6.63 mm. to 23.46 mm. *Piper betle* and *Azadirachta indica* extracts inhibited all tested microorganisms. Minimum inhibitory concentration (MIC) of extracts were determined and it was found that ethanol extract of *Piper betle* leaves exhibited the most effective against all tests

1 นักศึกษา ระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
2 นักศึกษา ระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
3 อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
* **Corresponding author** E-mail: Roiyan.k@yru.ac.th

microorganisms with MIC value of 15.63-31.25 mg/ml. and MBC value of 31.25-62.50 mg/ml. In addition, extracts of *Piper betle*, *Tamarindus indica* and *Azadirachta indica* with methanol showed that highest antibacterial activities against *E. coli* with MIC value of 15.63 mg/ml. On the basis of these data presented, these plant extracts may be useful for the development of therapeutic treatments of therapeutic treatmen of bacterial infection in the future.

Keywords: Antibacterial activities, Herbal extracts, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

บทนำ

มนุษย์รู้จักนำเอาพืชสมุนไพรมาใช้ในชีวิตประจำวัน ตั้งแต่สมัยโบราณ โดยได้นำพืชสมุนไพรมาใช้รักษาโรค ในรูปแบบต่างๆ เช่น ยาหม้อ ยา ลูกกลอน โดยใช้บำบัดโรคที่มีอาการไม่รุนแรง นอกจากนั้นยังนำมาใช้เป็น เครื่องเทศ เครื่องปรุง และประกอบอาหาร ปัจจุบันโรงพยาบาลหลายแห่ง ในประเทศไทยได้นำสมุนไพรไทยมาพัฒนาเป็นตำรับยาสำหรับแพทย์แผนไทยเพื่อรักษาโรคต่างๆ เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อผู้ป่วยมากกว่ายาแผนปัจจุบันที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี และมีแนวโน้มการนำไปใช้ประโยชน์เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งในประเทศไทยมีสมุนไพรจำนวนมาก หาได้ง่าย ราคาถูก และสามารถปลูกใช้ได้ภายในครัวเรือน การใช้สมุนไพรจึงมีความปลอดภัย ช่วยลดการขาด ดุลการค้าของประเทศในการสั่งซื้อยาได้เป็นจำนวนมาก (Chotchoung-chatchaia et al, 2012)

ปัจจุบันสมุนไพรมีความสำคัญเพิ่มขึ้น เนื่องจากยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ เมื่อใช้เป็นเวลานานจะทำให้เกิดการสะสมสารพิษ นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคสามารถปรับตัวทำให้เกิดการดื้อยา และมีการพัฒนาสายพันธุ์เพื่อการอยู่รอด จึงก่อให้เกิดความรุนแรงและการดื้อยามากขึ้นเป็นลำดับ ยาที่พัฒนามาใหม่จะสามารถต้านการดื้อยาและรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพมีราคาแพงเพราะต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จึงมีผู้นำสารสกัดสมุนไพรมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์มากขึ้น เพราะหาได้ตามธรรมชาติทั่วไปและมีผลข้างเคียงต่อร่างต่อผู้ใช้ได้น้อย และราคาถูกสามารถนำมาใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบันที่มีราคาแพงอีกทั้งยาที่ได้จากพืชสมุนไพรนี้อาจช่วยแก้ปัญหาเรื่องการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้อีกด้วย (อัฐยาพร และนฤมล, 2554) โดยมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสมุนไพรหลายๆ ชนิด ดังเช่น ขมิ้นชัน ชุมเห็ดเทศ พริกไทยดำ ฝาง และอบเชย เป็นต้น (วัชรินทร์ และคณะ)

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากสารสกัดจากสมุนไพรจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ ใบขี้เหล็ก ใบมะกรูด ใบพลู ใบชะพลู ใบชะอม ใบสาบเสือ ใบมะขาม ใบสะเดา ใบโหระพา และใบสะระแหน่ ซึ่งเป็นสมุนไพรที่พบได้ในท้องถิ่น ซึ่งผลการศึกษาที่ได้คาดว่าจะเป็นแนวทางในการนำสมุนไพรใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งจะช่วยทดแทนการใช้สารเคมีในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และเป็นการนำสมุนไพรที่มีในท้องถิ่นมาใช้ให้เกิดประโยชน์

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Staphylococcus aureus, Escherichia coli และ Pseudomonas aeruginosa*
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

แนวคิด ทฤษฎี กรอบแนวคิด

พืชสมุนไพรไทยหลายชนิดมีสรรพคุณทางยา และมีการนำมาใช้ประโยชน์กันมาอย่างยาวนาน รวมถึงการนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ โดยมีการนำมาใช้ในรูปแบบต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการรับประทาน หรือการใช้ภายนอกร่างกาย มีทั้งการนำมาใช้ในรูปแบบสมุนไพรสด สมุนไพรแห้ง หรือมีการใช้ร่วมกับสารอื่นๆ เพื่อให้สมุนไพรออกฤทธิ์ ดีขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ใช้ตัวทำละลายหลายชนิด เพื่อเพิ่มโอกาสการได้มาซึ่งสารสกัดที่มากขึ้น แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการวิจัย

1.การสกัดสมุนไพรด้วย น้ำกลั่น เอทานอล และเมทานอล

การสกัดสารจากพืชสมุนไพร ได้ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของจิราภรณ์ และเรือนแก้ว (2555) โดยนำสมุนไพรสดมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ สกัดด้วยน้ำในอัตราส่วนสมุนไพรต่อน้ำ เท่ากับ 1ต่อ8 นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส ต้มให้เหลือ 50 มิลลิลิตร กรองด้วยผ้าขาวบางแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 เก็บตัวอย่างที่จะทดสอบไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ส่วนสมุนไพรที่จะสกัดด้วย เอทานอล (ความเข้มข้นร้อยละ 95) และเมทานอล จะนำมาล้างให้สะอาด แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำไปบดให้ละเอียด นำมาหมักกับเอทานอลและเมทานอล โดยใช้อัตราส่วนตัวทำละลาย 1ต่อ8 หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเลา 5 วัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 4 แล้วจึงนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

2. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion

เตรียมสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลาย 1% DMSO (Dimethy sulfoxide) จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วย Millipore filter เก็บไว้ในขวด ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบ สำหรับแบคทีเรีย เตรียมโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของแบคทีเรียให้เทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No.0.5

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion ตามวิธีของวัชรินทร์ และคณะ (2558) โดยจุ่มไม้พันสำลีปราศจากเชื้อและบิดสำลีกับหลอดทดลองให้หมาดๆ และป้ายถี่ๆบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) ทิ้งไว้สักครู่แล้วเจาะหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บนผิวหน้าอาหารที่เกลี่ยเชื้อไว้ แล้วดูดสารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอลลงในหลุมๆละ 50 ไมโครลิตร โดยใช้ยาปฏิชีวนะ Tetracycline และ Polymyxin B เป็นชุดควบคุมผลบวก และตัวทำละลาย ซึ่ง ได้แก่ DMSO และน้ำกลั่น เป็นชุดควบคุมลบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดย วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่เกิดวงใสที่เกิดขึ้นรอบหลุม (inhibition zone) โดยทดสอบสารสกัดละ 2 ซ้ำ

3. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal lnhibitory Concentration; MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimum bacterlcidal Concentration; MBC)

เตรียมเชื้อทดสอบเช่นเดียวกับข้อที่ 2 โดยปรับเชื้อให้ได้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5 แล้วเจือจางต่อด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 1ต่อ200 เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียจำนวน $5x10^5$ cfu/ml. นำไปทดสอบการหาค่า MIC ที่ระดับความเข้มข้น 125- 0.24 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามวิธีของวัชรินทร์ และคณะ (2558) โดยดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth (MHB) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใสในทุกหลุม (หลุมที่ 1-12) ดูดสารสกัดสมุนไพร

ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่หลุมที่ 1 แล้วเจือจางต่อในอัตราส่วน 1ต่อ2 จนถึงหลุมที่10 ดูดเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในทุกหลุม ยกเว้นหลุมที่11 (หลุมที่ 11และ12 เป็นชุดควบคุม) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายรีซาซูรีน (resazurin) ความเข้มข้น 0.18% ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงไปในทุกหลุม บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ อ่านผลการทดสอบ เมื่อครบเวลาที่กำหนด โดยสังเกตการณ์เปลี่ยนสีของรีซาซูรีน ถ้าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (ผลบวก) รีซาซูรีนจะเป็นสีน้ำเงินหรือสีม่วงเหมือนเดิม แต่ถ้าสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (ผลลบ) เชื้อจะสามารถเจริญเติบโตและเปลียนรีซาซูรีนให้เป็นสีชมพู (ทดสอบสารสกัดละ 3 ซ้ำ)

สำหรับการทดสอบหาค่า MBC ทำโดยการ streak ตัวอย่างจากทุกหลุมที่ไม่มีเชื้อเจริญ (สีม่วง) ลงบนอาหาร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตการณ์เจริญของเชื้อ ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อและ ไมพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

สรุปผลการวิจัย

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี Agar well diffusion

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด ต่อแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่ามีสารสกัด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้จำนวน 18 ชนิด (ตารางที่ 1) โดยสารสกัดจากใบพลูที่สกัดด้วยเมทานอลและ เอทานอล และสารสกัดจากใบสะเดาที่สกัดด้วยเมทานอล สามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งสารสกัดจากใบพลูที่สกัดด้วยเมทานอล สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสกว้างที่สุด คือ 23.46±0.10 มิลลิเมตร สำหรับสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 2 ชนิด คือ สารสกัดจากใบมะขามและสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเมทานอล ส่วนสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้เพียงชนิดเดียว คือ สารสกัดจากใบพลูที่สกัดด้วยน้ำ สารสกัดจากใบสาบเสือ ที่สกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดจากใบสะระแหน่ที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล

เมื่อพิจารณาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียแต่ละชนิด พบว่าสารสกัดจำนวน 5 ชนิด ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ สารสกัดจำนวน 4 ชนิด ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* และสารสกัดจำนวน 9 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้

ตารางที่ 1 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อของสารสกัดสมุนไพร ด้วยวิธี Agar well diffusion

ชนิดของสมุนไพร	ตัวทำละลาย	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone; mm +SD)		
		E. coli	*P. aeruginosa*	*S. aureus*
ใบขี้เหล็ก	เมทานอล	NI	NI	NI
	เอทานอล	NI	NI	NI
	น้ำ	NI	NI	NI
ใบพลู	เมทานอล	18.83±0.53	12.17±0.38	23.46 ± 0.10
	เอทานอล	12.51±0.18	9.51±0.53	13.51±0.3623
	น้ำ	13.25±0.53	NI	NI
ใบชะพลู	เมทานอล	NI	NI	NI
	เอทานอล	NI	NI	NI

	น้ำ	NI	NI	NI
ใบชะอม	เมทานอล	NI	NI	NI
	เอทานอล	NI	NI	NI
	น้ำ	NI	NI	NI
ใบมะกรูด	เมทานอล	NI	NI	NI
	เอทานอล	NI	NI	NI
	น้ำ	NI	NI	NI
ใบมะขาม	เมทานอล	15.74±0.22	NI	20.14±0.24
	เอทานอล	NI	NI	NI
	น้ำ	NI	NI	NI
ใบสาบเสือ	เมทานอล	NI	9.99±0.14	8.2±0.34
	เอทานอล	NI	NI	6.63±0.53
	น้ำ	NI	NI	NI
ใบโหระพา	เมทานอล	NI	NI	NI
	เอทานอล	NI	NI	NI
	น้ำ	NI	NI	NI
ใบสะระแหน่	เมทานอล	NI	NI	15.34±0.33
	เอทานอล	NI	NI	7.82±0.61
	น้ำ	NI	NI	NI
ใบสะเดา	เมทานอล	NI	NI	NI
	เอทานอล	8.44±0.27	12.63±0.18	9.20±0.80
	น้ำ	NI	NI	15.07±0.35
Tetracycline	-	S	R	S

หมายเหตุ : S = Susceptible (ไวต่อยา), R = Resistant (ดื้อยา), I = Intermediate (ปานกลาง),
NI = No inhibition (ไม่ยับยั้ง)

การทดสอบการหาค่า MIC และ MBC

นำสารสกัดทั้ง 18 ชนิด ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเบื้องต้น จากการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion มาทดสอบหาค่า MIC และ MBC จากผลการทดสอบ พบว่าสารสกัดทั้งหมดมีค่า MIC อยู่ในช่วง 15.63-125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 2) และมีบางสารสกัดที่มีค่า MIC สูงกว่า 125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบ สำหรับสารสกัดที่มีค่า MIC และ MBC ค่อนข้างต่ำ คือ สารสกัดจากใบพลูที่สกัดด้วยเอทานอล มีค่า MIC อยู่ในช่วง 15.63-125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่า MBC อยู่ในช่วง 31.25-62.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC)

ชนิดของสมุนไพร	ตัวทำละลาย	ความเข้มข้น (mg/ml)					
		E.coli		*P.aeruginosa*		*S.aureus*	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
ใบพลู	เมทานอล	15.63	125	31.25	125	31.25	62.5
	เอทานอล	15.63	31.25	31.25	62.5	31.25	62.5
	น้ำ	62.5	125	-	-	-	-
ใบสาบเสือ	เมทานอล	-	-	125	>125	31.25	125
	เอทานอล	-	-	-	-	15.63	62.5
ใบสะระแหน่	เมทานอล	-	-	-	-	31.25	125
	เอทานอล	-	-	-	-	31.25	125
ใบสะเดา	เมทานอล	15.63	125	125	>125	31.25	125
	เอทานอล	-	-	-	-	31.25	62.5
ใบมะขาม	เมทานอล	15.63	31.25			15.63	31.25
Tetracycline	-	0.25	16	8	32	0.25	16
Polymyxin B	-	1	8	1	4	2	8

หมายเหตุ : - ไม่ได้ทำการทดสอบ

อภิปรายผลการวิจัย

สารสกัดสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ โดยสารสกัดถึงร้อยละ 30 สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Parekh และ Chanada (2005) ที่พบว่าสารสกัดสมุนไพรส่วนใหญ่ให้ผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยสารหลัก คือ Peptidoglycan ในขณะที่โครงสร้างของแบคทีเรียแกรมลบมีความซับซ้อนกว่า มี Membraneชั้นนอกคือ Lipopoigsaccharides ซึ่งยอมให้สารผ่านเข้า สู่เซลล์ได้ยากกว่านั้นเอง

สารสกัดจากใบพลู และใบสะเดา สามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้ง 3 ชนิด โดยสารสกัดจากใบพลูมีประสิทธิภาพสูงสุด และพบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอล มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ซึ่ง ใบพลูเป็นพืชที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างยาวนาน มีสรรพคุณในการแก้โรคได้หลายอย่าง เช่น โรคผิวหนัง ลมพิษ และผิวหนังอักเสบ เพราะในพลูมีสาระสำคัญหลายชนิด ที่สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ ได้แก่ Eugenol, Chavibetol acetate, Hydroxychavicol, Fatty acids (Stearic and palmitic) และ Hydroxyl fatty acid esters (Stearic, Palmitic and myristic) (Rugthaworn et al., 2010) ซึ่งการสกัดใบพลู ในตัวละลายที่ต่างชนิดกันสามารถต้านแบคทีเรียได้แตกต่างกัน มีรายงานพบใบพลูที่สกัดด้วยเอทานอล มีประสิทธิภาพในการ ต้านเชื้อจุลินทรีย์และมีปริมาณฟีนอลิกสูง (Ambasta, 1986) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยในครั้งนี้ที่พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดี มีค่า MIC ค่อนข้างต่ำ โดยสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยสารยับยั้งแบคทีเรียมีกลไกในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำลายเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic membrane) และเยื่อหุ้มเซลล์ของโปรตีน (Membrane protein) (Hayriye &

Melissa, 2015) ดังนั้นสารสกัดจากใบพลูจึงเป็นสารสกัดที่มีความน่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อ เพื่อพัฒนาไปสู่การใช้ประโยชน์ต่อไป

ข้อเสนอแนะและการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ ซึ่งพบว่ามีสารสกัดที่น่าสนใจหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดจากใบพลูที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อกว้าง และมีค่า MIC ต่ำกว่าสารสกัดชนิดอื่นๆ ดังนั้น จึงเป็นสารสกัดที่ควรจะนำไปศึกษาต่อ ทั้งในแง่ขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดและฤทธิ์ยับยั้งชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นๆ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์หลักสูตรจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ที่คอยให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะในการทำวิจัย จนสามารถปฏิบัติงานวิจัยสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ของการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

จิราภรณ์ บุราคร เรือนแก้ว **ประพฤติ. ผลของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยจำนวน 7 ชนิด ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย**. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก ปีที่ 10 ฉบับที่ 1มกราคม- เมษายน2555

วัชรินทร์ รังสีภานุรัตน์, พัชรี กัมมารเจษฎากุล และ อิสยา จันทร์วิทยานุชิต (2559). **ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Staphylococcus aureus ATCC 25923, Bacillus cereus และ Escherichia coli ATCC 25922**. วารสาร มฉก. วิชาการ19(38), 35-48

อัฐญาพร ชัยชมพู และนฤมล ทองไว. 2554ใ **การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดโดยใช้สารสกัดสมุนไพรพื้นบ้าน**. การประชุมวิชาการครั้งที่ 8 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน อาหารจากสมุนไพร อร่อย สุขภาพดี. กทม. แม่บ้าน. มปป.หน้า 120 จากเว็บไซต์ http://agriman.doae.go.th/home/kpi006/0227horapa.pdf

Ambasta, S.P.(1986). The Useful Plants of lndia. Naw Delhi: Publications and Information Directorate, CSIR

Hayrie, c.k. & Melissa, c.n. (2015). Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia Coli* Food Bioscience joural, 2, 8-16

Kumar, A., Shukla, R., Singh, P. and Dubey, N.D. (2010). Chemical Composition, Antifungal andAntiaflatoxigenic Activities of Ocimumsanctum L. Essential Oil and Its SafetyAssessment as Plant Based Antimicrobial.Food and Chemical Toxicology 48:539–543.

Rugthaworn, P., Dilokkunant, U & Sukatta, U (2010). Antibacterial and antifungal activities of the essentialoil and crude extract of piper betie linn. Against anti microorganism contrminate contaminated in public toilets. Jourual of Bureau of Althernative medicine, 3 (2), 22-32 in thai

Parekh, J. and Chanda, S.V., 2007, In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis ofsome Indian medicinal plants, J. Turk Biol. 31: 53-58. Jirum, J. and Srihanam, P., 2012, Oxidants and ntioxidants: Sources and mechanism, ISSN 2229-2276

ฤทธิ์ต้านจุลชีพจากสารสกัดหยาบใบพลูต่อเชื้อ *Streptococcus salivarius*

The Antimicrobial Activity of Betel Vine (*Piper betle*) Crude Extract against *Streptococcus salivarius*

พูรกอนนี สาและ[1] อัสมาวาตี มุสตาแม[2] กามีนี ซาราเซะ [3]

Phurkonni Salaeh[1] Asmawatee Mustamae[2] Kameenee Sarasea[3]

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดใบพลูต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก *Streptococcus salivarius* โดยใช้ตัวสารละลาย เอทานอล เมทานอล และน้ำ ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก *S. salivarius* ด้วยวิธี Agar well diffusion Method พบว่า สารสกัดใบพลูด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเมทานอล มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางฤทธิ์ยับยั้งเท่ากับ 23.76± 1.57 และ 22.83 ± 3.16 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ และทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) พบว่าสารกัดใบพลูที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอลมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อเท่ากับ 6.25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC) สารสกัดใบพลู ที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้มีค่าเท่ากับ 6.25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านจุลชีพ สารสกัดสมุนไพร ใบพลู *Streptococcus salivarius*

Abstract

The aim of this research was to study the antibacterial activity against *Streptococcus salivarius* (Oral bacteria) of Betel Vine (*Piper betle*). Ethanol, Methanol and Water were used as the extraction solvents. Antibacterial activities on *S. salivarius* were tested by using Agar Well diffusion method. Result showed that the Ethanol and Methanol crude extract from the Betel Vine (*Piper betle*) with the inhibition zone of 23.76± 1.57 และ 22.83 ± 3.16 mm. respectively. While the water crude extracts has no inhibited the growth of *S. salivarius*. The result showed that the MIC (Minimal Inhibitory Concentration) of the Ethanol and Methanol crude extracts were 12.5 and 6.25 mg/ml. While the MBC (Minimal bactericidal concentration) of the Ethanol and Methanol crude extracts were 12.5 and 6.25 mg/ml.

Key word: Antimicrobial, Crude Extract, Betel Vine (Piper betle), *Streptococcus salivarius*

[1] อาจารย์หลักสูตรจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

[2] นักศึกษาหลักสูตรจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

[3] นักศึกษาหลักสูตรจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

[*]**Corresponding author, E-mail:** Furqannisalaeh@gmail.com

บทนำ

พืชสมุนไพรเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความต้องการสูง เพื่อนำไปใช้ในการสกัดหาตัวยาที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรค ตัวยาในพืชสมุนไพรเป็นสารเคมีธรรมชาติ ที่มีคุณประโยชน์ที่ดีกว่าสารเคมีที่ได้จากการสังเคราะห์ทางกระบวนการวิทยาศาสตร์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการรักษาโรคที่ต่างกัน โรคฟันผุจัดเป็นปัญหาทันตสาธารณสุขที่สำคัญปัญหาหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งเชื้อแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการก่อโรคฟันผุลุกลาม เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่พบในคราบจุลินทรีย์เป็นตัวสำคัญในกระบวนการเกิดฟันผุ ได้แก่กลุ่ม mutans streptococci หรือ MS เช่น *S. sobrinus* นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์ *Lactobacilli actinomysis* กลุ่ม non-mutans streptococci และยีสต์ (Yeast) ความรุนแรงของเชื้อจุลินทรีย์จะสัมพันธ์กับความสามารถในการสร้างกรดต่อเนื่องที่ pH ต่ำๆ ทำให้ฟันสูญเสียแร่ธาตุโดยเมื่อมีการใช้คาร์โบไฮเดรตจากอาหารจนหมด เชื้อจุลินทรีย์จะสามารถสร้างและใช้พอลิแซ็กคาไรด์นอกเซลล์และในเซลล์มาสร้างกรด การสร้างกลูแคนซึ่งไม่ละลายน้ำ จะช่วยในการเกาะของ MS ที่คราบจุลินทรีย์และปรับเปลี่ยนการซึมผ่านของคราบจุลินทรีย์ทำให้ซับสเตรตอาหาร (dietary substrates) ซึมเข้าสู่ชั้นลึกลงไปของคราบจุลินทรีย์ที่ใกล้ผิวฟัน คุณสมบัติของ MS ดังกล่าวจึงมีบทบาทในการเกิดฟันผุมาก นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของกลิ่นปากที่พบมากที่สุดคือ *S. salivarius* บริเวณเนื้อเยื่อในช่องปากและน้ำลาย เนื่องจากสามารถย่อยสลายสารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เช่น ในน้ำลาย และเศษอาหารตกค้างได้สารระเหยที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น hygrogen sulphide, methyl mercaptan และ dimethyl sulphide เป็นต้น (วรายุทธ, 2557; Lee *et al*., 2004) การป้องกันโรคฟันผุสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้น้ำตาลเทียมแทนน้ำตาลซูโคส การใช้ฟลูออไรด์ การใช้ sealants เคลือบหลุมร่องฟัน การใช้สารป้องกันการเกิดโรคฟันผุนั้นต้องใช้ต้นทุนสูง ซึ่งจากรายงานพบว่า 10% ของรายจ่ายภายในประเทศที่เกี่ยวข้องกับการดูแลรักษาฟัน (ศิริลักษณ์, 2557; Peterson, 2005) และในปัจจุบันพบว่าเชื้อก่อโรคในช่องปากหลายชนิดมีความสามารถในการดื้อยาเพิ่มขึ้น และยาปฏิชีวนะหลายชนิดเริ่มใช้ไม่ได้ผล อีกทั้งยังมีผลข้างเคียงจากการใช้ยา หลายๆประเทศทั่วโลกจึงต้องหาผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการรักษาโรค ในช่องปากที่มีความปลอดภัย ไม่มีผลข้างเคียง มีประสิทธิภาพดี จากการศึกษาประเทศกำลังพัฒนามีการใช้พืชสมุนไพรในการดูแลสุขภาพร้อยละ 80 ของประชากร มีการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสารจากธรรมชาติที่แยกได้จากพืชสมุนไพรในการดูแลสุขภาพ (Kim, 2005) จากข้อมูลข้างต้นมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. salivarius* และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. salivarius*

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. salivarius*
2. เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดใบพลูต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. salivarius*

แนวคิด ทฤษฎี กรอบแนวคิด

ในช่องปากของคนเรามีจุลินทรีย์อยู่ประมาณ 750 ชนิด หากอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมสามารถเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและก่อให้เกิดโรคในช่องปากได้ โดยลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่พบมักเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวเป็นสายยาว มีการสร้างคราบจุลินทรีย์หรือไบโอฟิลม์ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคฟันผุ ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีเช่น Chlorhexidine ที่ผสมอยู่ในน้ำยาบ้วนปาก ในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์หรือไบโอฟิลม์ (Sreenivasan and Gaffar, 2002) ผลการศึกษา Chang, *et al*., (2001) และ Beaudouin, *et al*., (2004) พบว่าสาร Chlorhexidine มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ถ้าใช้ในปริมาณมากหรือความเข้มข้นสูงอาจมีผลข้างเคียง เช่น การติดสีที่ฟัน หรือทำให้แสบปากขณะที่บ้วนปากจึงมีการศึกษาสารสกัดจากพืชเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตน้ำยาบ้วนปากในการลดคราบจุลินทรีย์หรือไบโอฟิลม์ ซึ่งเป็นสาเหตุ

ของการเกิดโรคฟันผุ มีรายงานการศึกษาพืชสมุนไพรหลายชนิด พบว่า มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคฟันผุ เช่น สารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Piper cubeba* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. salivarius* และ *S. mitis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 90-200 µg/ml (Silva, *et al*., 2007)

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อหาประสิทธิภาพของใบพลู โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ เอทานอลและเมทานอล ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. Salivarius* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในช่องปาก โดยมีวิธีการดำเนินการวิจัยดังต่อไปนี้

1. การสกัดสารหยาบใบพลู

เตรียมใบพลูสำหรับใช้ในการศึกษาดังนี้ ล้างทำความสะอาดใบพลูสดแล้วเช็ดให้แห้ง นำไปหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วทำให้แห้งโดยอบแห้งในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาบดให้เป็นผง

1.1 การสกัดด้วยการหมัก ตามวิธีการ พรเทพ (2554)

นำสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบที่บดเรียบร้อยแล้ว แช่ด้วยเอทานอลและเมทานอล เป็นเวลา 3 วัน กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman Filter paper No.1 และนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator ทำการหมักซ้ำ 3 รอบ แล้วนำสกัดที่ได้มารวมกันและทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dry และนำสารสกัดที่ได้ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบกับเชื้อต่อไป

1.2 การสกัดด้วยการต้ม ตามวิธีการ พรเทพ (2554)

นำสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบที่บดเรียบร้อยแล้ว เติมน้ำลงไป 3 เท่าของปริมาณสมุนไพร ทำกาต้มเป็นเวลา 15 นาที โดยการทำการต้มซ้ำ 3 รอบแล้วนำสารสกัดที่ได้มารวมกันแล้วเคี่ยวจนเหลือเพียง 1 ส่วนจากน้ำ 3 ส่วน จากนั้นนำสาสกัดที่ได้ไปกรองด้วยผ้าขาวบาง ปั่นด้วยเครื่องปั่นตกตะกอน แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman Filter paper No. 1 แล้วนำสกัดที่ได้มารวมกันและทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dry และนำสารสกัดที่ได้ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศสเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบกับเชื้อต่อไป

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar Well diffusion Method ดัดแปลงจากวิธีการของ ศิริลักษณ์ (2557)

2.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหาร Blood Agar (BA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24-48 ชั่งโมง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วเขี่ยเชื้อมาจำนวน 3-5 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland no. 0.5 ด้วย 0.85% normal saline solution จะมีเชื้อประมาณ 1.5 X 10^{8} CFU/ml

2.2 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร ดัดแปลงจากวิธีการ อัฐญาพร และนฤมล (2553)

เตรียมสารสกัดสมุนไพรที่สกัดอย่างละ 1,000 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวด ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปละลายลงใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

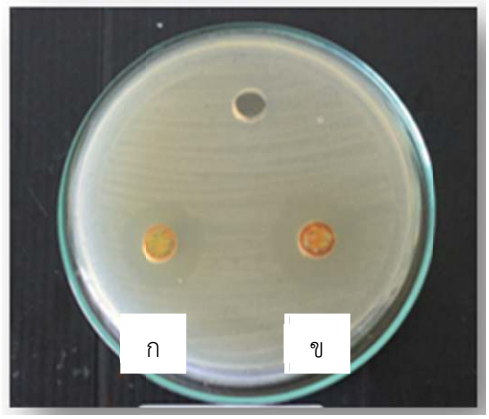
2.3 การทดสอบการยับยั้ง ดัดแปลงจากวิธีการ วรางคณาและวัชรี (2555)

นำเชื้อที่ได้จากการเตรียมมาลงเชื้อด้วยวิธีการ swab โดยใช้ cotton swab ปลอดเชื้อจุ่มสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมไว้ นำมา Swab ให้ทั่วอาหาร MHA ใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm เจาะอาหาร MHA ให้เป็นหลุม แล้วหยดสารสกัดตัวอย่างเข้มข้น ปริมาตร 30 µl ลงในหลุมบนจานอาหาร MHA จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone)

แล้วทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) และ (Minimal bactericidal concentration, MBC)

สรุปผลการวิจัย

ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดใบพลูต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก *Streptococcus salivarius* โดยใช้ตัวสารละลาย เอทานอล เมทานอล และน้ำ ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก *S. salivarius* ด้วยวิธี Agar well diffusion Method พบว่า สารสกัดใบพลูด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเมทานอล มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางฤทธิ์ยับยั้งเท่ากับ 23.76± 1.57 และ 22.83 ± 3.16 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพ 1) ส่วนสารสกัดใบพลูที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ ซึ่งจากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ penicillin G ต่อเชื้อ *S. salivarius* พบว่ามีความไวต่อยาปฏิชีวนะ และทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) พบว่าสารกัดใบพลูที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอลมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อเท่ากับ 6.25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC) สารสกัดใบพลู ที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้มีค่าเท่ากับ 6.25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลทดสอบค่า MIC และ MBC ด้วยยาปฏิชีวนะ penicillin G มีค่าเท่ากับ 0.0156 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 1 ผลการทดสอบการยับยั้งของเชื้อ *S. salivarius* ในสารสกัดหยาบใบพลู
ภาพ ก ผลการยับยั้งด้วยสารสกัดเอทานอล
ภาพ ข ผลการยับยั้งด้วยสารสกัดเมทานอล

อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ซึ่งในช่องปากของคนเรามีอยู่ประมาณ 750 ชนิด หากอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและก่อให้เกิดโรคในช่องปากได้ โดยลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่พบมักเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวเป็นสายยาว มีการสร้างคราบจุลินทรีย์หรือไบโอฟิลม์ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคฟันผุ ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีเช่น Chlorhexidine ที่ผสมอยู่ในน้ำยาบ้วนปาก ในการป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์หรือไบโอฟิลม์ (Sreenivasand and Gaffar, 2009) จากรายงาน Chang, *et al*., (2001) และ Beaudouin, *et al*., (2004) พบว่าสาร Chlorhexidine มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ถ้าใช้ในปริมาณมากหรือความเข้มข้นสูงอาจมีผลข้างเคียง เช่น การติดสีที่ฟัน หรือทำให้แสบปากขณะที่บ้วนปากจึงมีการศึกษาสารสกัดจากพืชเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตน้ำยาบ้วนปากในการลดคราบจุลินทรีย์หรือไบโอฟิลม์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคฟันผุ มีรายงานการศึกษาพืชสมุนไพร

หลายชนิด พบว่า มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคฟันผุ เช่น สารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Piper cubeba* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. salivarius* และ *S. mitis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 90-200 µg/ml (Silva, *et al*., 2007) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า สารกัดใบพลูที่สกัดด้วยเอทานอล และเมทานอลมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อเท่ากับ 6.25 และ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าที่ดีกว่า

ข้อเสนอแนะและการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. การศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น ในอนาคตอาจทำการทดลองเพิ่มเติม โดยการเลือกใช้ตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้วอื่นๆ เพื่อค้นหาตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารออกมาในปริมาณที่มากกว่า

2. ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการสกัดหยาบ ในอนาคตควรเป็นการสกัดแยกให้ได้สารที่สำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ที่มีความบริสุทธิ์เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียต่อไป

เอกสารอ้างอิง

จารีย์ บันสิทธิ์ (2548) **สมุนไพรป้องกันกำจัดแมลงทางการแพทย์ 2 น้ำมันหอมระเหย.** กรุงเทพมหานคร: บริษัทดีไซด์จำกัด.

จิราภรณ์ ปาลี, เรณู อยู่เจริญ, วัฒนา ปัญญามณีศร (2560) **การออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดรางแดง.** การประชุมวิชาการชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยากร อพ.สธ. ครั้งที่ 8. 696-701

นิธิ ตั้งศิริทรัพย์ (2555) **การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกกล้วยหอมดิบต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อสิวและการติดเชื้อผิวหนังที่พบได้บ่อย.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ (2547) **เครื่องสำอางธรรมชาติ ผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหนัง.**กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

วีณา จิรัจฉริยากูล (2534) **ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ.** กรุงเทพมหานคร: ภาคเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย มหิดล.

วรายุทธ จันทร์ปลอด. (2557) **การพัฒนาผลิตภัณฑ์ระงับกลิ่นปาก ด้วยเทคนิคขึ้นรูปเอกซ์ทรูชันและโคอะเซอเวชัน .** มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ.

ศิริลักษณ์ หอมละเอียด (2557) **ฤทธิ์การยับยั้งไบโอฟิลม์ของเชื้อ *Streptococcus mutans* จากสารสกัดใบกระทุ**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อุษาวดี ถาวระ (2546) **สมุนไพรป้องกันกำจัดแมลงทางการแพทย์.** กรุงเทพมหานคร: บริษัทดีไซด์จำกัด.

อนุชิต พลับรู้การ (2545) **การพัฒนาคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพร.** สงขลา: ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรัญญา มโนสร้อย, จีรเดช มโนสร้อย (2548) **น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากสมุนไพรไทย.** เชียงใหม่: โรงพิมพ์ครองช่าง.

อมรรัตน์ สีสุกอง, กัลยาภรณ์ จันตรี, ศรีสุดา หาญภาคภูมิ (2559) **การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเยของสารสกัดจากวัชพืชบางชนิด**. วารสารวิจัยและพัฒนาวไลยลงกรณ์ในพระราชนูชูปถัมภ์. 69-82

Almasi, H., Ghanbarzadeh, B. and Entezami, A.A., (2010) **Physicochemical Properties of**

Starch-CMC-Nanoclay Biodegradable Films, International Journal of Biological Macromolecules, 46: 1-5.

American Standard for Testing and Materials, (1964) **Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, ASTM D 1434-82**, Annual Book of ATSM Standard, Philadelphia.

American Standard for Testing and Materials, (1990) **Standard Test Method for Water Vapor Transmission**, ASTM E 96-80, Annual Book of ATSM Standard, Philadelphia.

Beaudouin E, Kanny G, Morisset M., (2004) **Immediate hypersensitivity to chlorhexidine.** Literature review. European Annals of Allergy and clinical Immunology. 36:123-6.

Broek, A.M., Feenstra, L. and Baat, C., (2008) **A Review of the Current Literature on Management of Halitosis**, Journal of Oral Diseases, 14: 30-39.

Chang, S.-T., Wu, J.-H., Wang, S.-Y., Kang, P.-L., Yang, N.-S., & Shyur, L.-F. (2001). **Antioxidant activity of extracts from Acacia confusa bark and heartwood**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 3420–3424

Dixit, R.P. and Puthli, S.P., (2009) **Oral Strip Technology: Overview and Future Potential,** Journal of Controlled Release, 139: 94-107.

Ghanbarzadeh, B., Almasi, H. and Entezami, A.A., (2010) **Physical Properties of Edible Modified Starch/Carboxymethyl Cellulose Films**, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11: 697-702.

Lee, P.P., Mak, W.Y. and Newsome, P., (2004) **The Aetiology and Treatment of Oral Halitosis**: an Update, Hong Kong Medical Journal, 10: 414-418.

Peterson PE (2005) **The burden of oral disease: challenges to improving oral health in the 21 st century.** Bulletin of the World Health Organizzation 83:3-3

Kim HS (2005) **Do not put too much value on conventional medicine.** J Ethnophamacol 100:37-39.

Sreenivasan P, Gaffar A. (2002) **Antiplaque biocides and bacterial resistance**: a review. J Clin Periodontol.29(11):965-74.

Silva, H. G. de O. ; Pires, A. J. V. ; Cunha Neto, P. A. da; Carvalho, G. G. P. de; Veloso, C. M. ; Silva, F. F. da, (2007). **Digestibility of nutrients in diets containing ammoniated elephant grass and cocoa meal or palm kernel cake fed to sheep.** Rev. Bras. Zootec., 36 (2): 499-506