



โครงการวิทยาศาสตร์ สาขาชีวภาพ

เรื่อง การศึกษาการสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดาเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ E-coli

Inhibit Escherichia coli Growth by extract of neem leaves

โดย

ค.ญ. กัลยกร คำฟูบุตร

ค.ญ. ประเสริฐโสภา ประเสริฐ

ค.ญ. ศรัจจันทร์ สว่างวิทย์

โรงเรียนนุญวาทย์วิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนประกอบโครงการวิทยาศาสตร์ ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น

ในการประกวดโครงการวิทยาศาสตร์ จัดโดย สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

ในพระบรมราชูปถัมภ์องค์การพิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ

เนื่องในวันวิทยาศาสตร์แห่งชาติ วันที่ 18-20 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2565



โครงการวิทยาศาสตร์ สาขาชีวภาพ

เรื่อง การศึกษาการสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดาเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ E-coli

Inhibit *Escherichia coli* Growth by extract of neem leaves

โดย

ค.ญ. กัลยกร คำฟูบุตร

ค.ญ. ประเสริฐโสภา ประเสริฐ

ค.ญ. ศรัจจันทร์ สว่างวิทย์

ครูที่ปรึกษา : นางสาวสุนิสา อินทร์จักร์

ครูที่ปรึกษาพิเศษ : นางรัชนก ตั้งใจ

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การศึกษาการสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดาเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ E-coli

ชื่อนักเรียน : 1. ค.ญ. กัลยกร คำฟูบุตร
2. ค.ญ. ประเสริฐ โสกา ประเสริฐ
3. ค.ญ. ศรีจันทร์ สว่างวิทย์

ชื่อครูที่ปรึกษา : นางสาวสุนิสา อินทร์จักร์

โรงเรียน บุญวาทย์วิทยาลัย

ที่อยู่ : 230 ถนน ลำปาง-แม่ทะ ตำบล หัวเวียง อำเภอเมืองลำปาง ลำปาง 52000

โทรศัพท์ : 054-227603 , 054-315183 , 054-230436-7 โทรสาร 054-222122

ระยะเวลาทำโครงการ ตั้งแต่ วันที่ 17 พฤษภาคม พ.ศ.2565 ถึง วันที่ 22 กรกฎาคม 2565

บทคัดย่อ

โครงการวิทยาศาสตร์ เรื่อง การศึกษาการสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ E-coli จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาว่ากรดออกซาลิกที่สกัดจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ E-coli ได้ เนื่องจาก E. coli เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลื้อยคลาน โดยปกติจะไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรง เมื่ออยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยอาหารที่เรารับประทานเข้าไป แต่หากเชื้อ E. coli ลุกล้ำเข้าสู่ระบบต่างๆ ของร่างกายก็จะทำให้เกิดโรคติดเชื้อรุนแรง เช่น โรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นต้น และมีเชื้อ E. coli บางสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้ โดยการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารหรือน้ำดื่ม ทางคณะผู้จัดทำได้คิดค้นการกำจัดเชื้อ E-coli โดยการสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v เนื่องจากพบว่าเชื้อ E.coli สามารถถูกยับยั้งและทำลายได้ด้วยยาปฏิชีวนะหรือยับยั้งด้วยกรดออกซาลิก ทางผู้จัดทำจึงเลือกใช้ใบสะเดาในการทำโครงการนี้ โดยนำใบสะเดามาปั่นให้ละเอียด แล้วผสมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมล 125 มิลลิลิตร กับ น้ำกลั่น 125 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง สกัดด้วย Hotplate stirrer ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง สกัดโดยใช้เครื่องกลั่นแบบธรรมดา แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อ E-coli ซึ่งจากการทดสอบการยับยั้งเชื้อ E-coli ด้วยกรดออกซาลิกจากใบสะเดาพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ E-coli ได้เป็นลำดับที่สอง รองจากกรดออกซาลิกบริสุทธิ์โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition เฉลี่ยที่ 1.3 เซนติเมตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิทยาศาสตร์ เรื่อง การศึกษาการสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือและการสนับสนุนของครูที่ปรึกษาโครงการคือ ครูสุนิสา อินทร์จักร์ และ ครูที่ปรึกษาพิเศษ คือ ครูรัชนก ตั้งใจ และ ผศ.ดร. หฤทัย ไทยสุชาติ คณบดีวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง และ นางสาวกรรณิกา พิมสิงห์ เอื้อเฟื้อ สถานที่เพาะเชื้อแบคทีเรีย ที่ได้ให้คำปรึกษา แนะนำชี้แนะแนวทางในการศึกษาค้นคว้า แนะนำขั้นตอนและวิธีการจัดทำโครงการจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณไว้อย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ นายนิรันดร์ หมั่นสุข ผู้อำนวยการโรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนในการอำนวยความสะดวกต่อสถานที่ตลอดการสนับสนุนทุกอย่างมาโดยตลอด

ขอขอบคุณสมาชิกในกลุ่มและเพื่อนๆทุกคนที่ให้ความร่วมมือและเป็นกำลังใจให้กันตลอดการทำโครงการครั้งนี้ที่สามารถประสบความสำเร็จด้วยดี คณะผู้จัดทำโครงการวิทยาศาสตร์ ขอขอบคุณทุกท่านอย่างสูง ณ โอกาสนี้

คณะผู้จัดทำ

27 กรกฎาคม 2565

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 สมมติฐานของการวิจัย	2
1.4 ตัวแปรที่ศึกษา	2
1.5 นิยามเชิงปฏิบัติการ	2
1.6 ขอบเขตการศึกษา	2
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 กรดออกซาลิก	3
2.2 เชื้อ E-coli	4
2.3 ไบโสะเดา	4
2.4 วิธีการกำจัดแบคทีเรียโดยทั่วไป	5
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงาน	8
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	8
3.2 วิธีการดำเนินงาน	8
บทที่ 4 ผลการดำเนินการ	10
บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินการข้อเสนอแนะ	12
5.1 สรุปผลการวิจัย	12
5.2 อภิปรายผล	12
3.3 ข้อเสนอแนะ	12
บรรณานุกรม	13
ภาคผนวก	14

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 ตารางแสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition	10
ตารางที่ 2 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition	11

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
รูปที่ 1 กรดออกซาลิก	3
รูปที่ 2 E-coli	4
รูปที่ 3 ไบโสะเดา	4
รูปที่ 4 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ E-coli ที่วาง paper disc ทดสอบการยับยั้งเชื้อ	9
รูปที่ 5 ตัดสับผัก	14
รูปที่ 6 การปั่นผัก	14
รูปที่ 7 อบผักในตู้	14
รูปที่ 8 อบผัก	14
รูปที่ 9 เตรียมสารละลายมาผสม	15
รูปที่ 10 ผสมสารละลาย	15
รูปที่ 11 ต้มบน Hotplate stirrer	15
รูปที่ 12 กรองสารละลาย	15
รูปที่ 13 การกลั่นแบบธรรมดา	16
รูปที่ 14 กรดออกซาลิกจากไบโสะเดา	16
รูปที่ 15 การทำอาหารเลี้ยงเชื้อ (Na)	16
รูปที่ 16 นำเข้าเครื่อง autoclave	16
รูปที่ 17 นำปากขวด Flask ไปรนไฟ	17
รูปที่ 18 นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปเทใส่ plate	17
รูปที่ 19 การวัด clear zone	17
รูปที่ 20 ผลการทดลองแผ่นที่ 1	17
รูปที่ 21 ผลการทดลองแผ่นที่ 2	18
รูปที่ 22 ผลการทดลองแผ่นที่ 3	18
รูปที่ 23 ผลการทดลองแผ่นที่ 4	18

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ

การดำรงชีวิตประจำวันของมนุษย์ในแต่ละวันต้องสัมผัสกับเชื้อโรคและสิ่งสกปรกมากมายทั้งทางตรงและทางอ้อม อย่างไรก็ตามเราอาจจะได้รับเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารซึ่งจัดเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขของไทย โดยมีอุบัติการณ์การเกิดโรคอาหารเป็นพิษถึง 120,000 รายในแต่ละปี เช่น E. coli

Escherichia coli หรือ E. coli เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยปกติจะไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรง เมื่ออยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยอาหารที่เรารับประทานเข้าไป แต่หากเชื้อ E. coli ลุกล้ำเข้าสู่ระบบต่างๆ ของร่างกายก็จะทำให้เกิดโรคติดเชื้อรุนแรง เช่น โรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบและการติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นต้น และมีเชื้อ E. coli บางสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้ โดยการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารหรือน้ำดื่ม ทั้งนี้เชื้อ E. coli ที่สามารถก่อโรคอุจจาระร่วง (Diarrheagenic E. coli) จะมีกลไกการก่อโรคและสามารถสร้างสารพิษได้แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์เช่น เชื้อ Enterotoxigenic E. coli ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ enterotoxin ทำให้เกิดอาการท้องร่วงแบบเฉียบพลัน ถ่ายเหลวเป็นน้ำ หรือเชื้อ Enterohaemorrhagic E. coli ที่สร้างสารพิษ Shiga ทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง ถ่ายเป็นมูกเลือด ก่อให้เกิดกลุ่มอาการเม็ดเลือดแดงแตกและไตวายเฉียบพลัน

การป้องกันเชื้อ E. coli สามารถทำได้โดยล้างมือให้สะอาดทุกครั้งหลังเข้าห้องน้ำ หลังสัมผัสสัตว์ก่อนรับประทานอาหาร และก่อนปรุงอาหาร ดื่มน้ำและรับประทานอาหารที่สะอาดปรุงสุกใหม่ๆ การยับยั้งเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะหรือยับยั้งด้วยกรดออกซาลิก อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะอาจก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียได้

ดังนั้นทางคณะผู้จัดทำจึงได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับพืชพื้นบ้านที่มีกรดออกซาลิกสูงคือใบสะเดา จึงได้นำใบสะเดามาสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบกรดออกซาลิกเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับกรดออกซาลิกสำเร็จรูปในการยับยั้งเชื้อ E. coli

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ E-coli ด้วยสารสกัดหยาบกรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v

1.3 สมมติฐาน

กรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v สามารถยับยั้งเชื้อ E-coli ได้และมีประสิทธิภาพเทียบเคียงกับกรดออกซาลิกสำเร็จรูป

1.4 ตัวแปรการศึกษา

ตัวแปรต้น : กรดออกซาลิกใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v และ กรดออกซาลิกบริสุทธิ์

ตัวแปรตาม : การยับยั้งเชื้อ E-coli ของกรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v

ตัวแปรควบคุม : อุณหภูมิ ปริมาณของสารที่ใช้ทำการทดลอง ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ

1.5 นิยามเชิงปฏิบัติการ

- กรดออกซาลิก คือ เป็นกรดอินทรีย์ มีสูตรทางเคมีคือ $C_2H_2O_4$ พบได้ในอาหารทั่วไป เมื่อรับประทานอาหารที่มีกรดออกซาลิกเข้าสู่ร่างกาย จะไปรวมกับแร่ธาตุอื่นกลายเป็นผลึกออกซาเลต เช่น แคลเซียมออกซาเลต โซเดียมออกซาเลต แมกนีเซียมออกซาเลต และโพแทสเซียมออกซาเลต โดยเฉพาะผลึกของแคลเซียมออกซาเลตสามารถเกิดได้ง่าย

- กรดออกซาลิกจากใบสะเดา คือ การนำใบสะเดามาปั่นให้ละเอียด แล้วผสมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมล 125 มิลลิลิตร กับ น้ำกลั่น 125 มิลลิลิตร นำไปต้มบน Hotplate stirrer ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง สกัดโดยใช้เครื่องกลั่นแบบธรรมดาเพื่อให้ได้สารสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดา

- เชื้อ E-coli คือ เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลื้อยคืบ โดยปกติจะไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรง เมื่ออยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยอาหารที่เรารับประทานเข้าไป แต่หากเชื้อ E. coli ลุกล้ำเข้าสู่ระบบต่างๆ ของร่างกายก็จะทำให้เกิดโรคติดเชื้อรุนแรง เช่น โรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบและการติดเชื้อในกระแสเลือด

1.6 ขอบเขตการศึกษาค้นคว้า

- ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ตั้งแต่วันที่ 17 พฤษภาคม 2565 ถึง 21 กรกฎาคม 2565

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

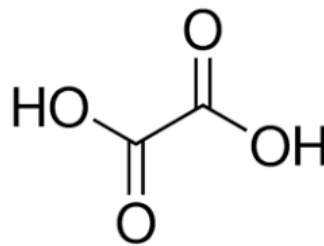
ทราบถึงคุณสมบัติของกรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v สามารถยับยั้งเชื้อ E-coli ได้

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

ในการจัดทำโครงงานวิทยาศาสตร์ เรื่อง การศึกษาการสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ E-coli คณะผู้จัดทำได้ศึกษาเอกสารจากหนังสือและแหล่งข้อมูลต่างๆที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

2.1 กรดออกซาลิก (Oxalic acid)



รูปที่ 1 กรดออกซาลิก

เป็นสารประกอบอินทรีย์ซึ่งมีสูตร โมเลกุล $H_2C_2O_4$ และมีความเป็นกรดสูงกว่ากรดน้ำส้ม 10000 เท่า เมื่ออยู่ในรูปของประจุจะเรียกว่า ออกซาเลต ซึ่งเป็นตัวรีดิวส์ ที่ดีเหมือนกับหมู่ลิแกนด์ ในสารประกอบเชิงซ้อน โลหะไอออนจะไม่ละลายน้ำเมื่อรวมกับออกซาเลต เช่น แคลเซียมออกซาเลต ซึ่งเป็นนิ่วที่พบในไต กรดออกซาลิกจะทำปฏิกิริยาให้สารประกอบ carboxylic acid อื่นๆเช่น สารประกอบ ester(dimethyloxalate) ซึ่งเป็นคู่เบส (conjugate base) ของกรดออกซาลิก ยังเป็นลิแกนด์ที่ดีในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนหรือเป็นยา Oxaliplatin โดยมีโลหะอะตอมกลางเป็นแพลทินัม ใช้ในทางเคมีบำบัดให้กับผู้ป่วยโรคมะเร็ง กรดออกซาลิกสลายตัวได้เมื่อโดนความร้อน 120 องศา ขึ้นไป จะพบมากในพืช เช่น พืชตระกูล Sorrel ในกลุ่ม Oxalis หรือที่รู้จักกันคือ ส้มกบ หรือหญ้าเกิ้ล็ดหอยจิ้น

2.2 เชื้อ E-coli (Escherichia coli)



รูปที่ 2 Escherichia coli

เชื้อ E-coli (อี โค ไล) ย่อมาจาก Escherichia coli เป็นแบคทีเรีย กลุ่มโคลิฟอร์ม รูปแท่ง แบบแกรมลบ ที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ในสกุล Escherichia ซึ่งมักพบในลำไส้ส่วนล่างของสิ่งมีชีวิตเลือดอุ่น เชื้ออีโคไลส่วนใหญ่ไม่เป็นอันตราย แต่ชิโรไทป์บางชนิด อาจทำให้อาหารเป็นพิษร้ายแรงในโฮสต์ และในบางครั้งอาจเป็นเหตุของการปนเปื้อนในอาหาร สายพันธุ์ที่ไม่เป็นอันตรายเป็นส่วนหนึ่งของจุลินทรีย์ปกติของลำไส้ และสามารถให้ประโยชน์แก่โฮสต์โดยการผลิตวิตามิน K₂ และป้องกันการขยายจำนวนของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในลำไส้ โดยใช้การอยู่ร่วมกันแบบอิงอาศัย เชื้ออีโคไลถูกขับออกสู่สิ่งแวดล้อมภายในอุจจาระ แบคทีเรียเติบโตอย่างหนาแน่นในอุจจาระสดภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นจำนวนจะลดลงอย่างช้า ๆ

2.3 ใบสะเดา



รูปที่ 3 ใบสะเดา

จากงานวิจัยของ คุณสุกกาญจน์ พรหมจันทร์, ศุภฤชชญา เหมะธูลิน และ ชนิษฐา วงศ์บาสก์ เรื่อง ผลของสายพันธุ์เม่าหลวงต่อปริมาณกรดออกซาลิก ได้บ่งชี้ว่าการวิเคราะห์ปริมาณกรดออกซาลิกด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่า กรดออกซาลิกที่มาจากใบสะเดามีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของสายพันธุ์แมลงเม่าหลวงมากที่สุด

2.4 วิธีการกำจัดแบคทีเรียโดยทั่วไป

การกำจัดแบคทีเรียรวมถึงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียมีวิธีการจัดอยู่หลายวิธี โดยสามารถแบ่งวิธีการกำจัดออกเป็น 3 วิธีหลัก ได้แก่ ทางกายภาพ ทางเคมี และการใช้ยาปฏิชีวนะ

2.4.1 วิธีการทางกายภาพ (Physical method)

1. การใช้ความร้อน (Heat treatments) ความร้อนจะทำให้โปรตีนและส่วนประกอบภายในเซลล์ของ แบคทีเรียเสียสภาพไป (Irreversible denaturation) และจำพวกที่สร้างสปอร์ การใช้ความร้อนในการฆ่าแบคทีเรียมี 2 วิธี คือ

ก. ความร้อนแห้ง (Dry heat) ได้แก่ ความร้อน จากเปลวไฟ โดยตรง (Flaming) หรือเผาไฟ (Incineration) หรือใช้ความร้อนแห้งที่ได้รับจากการแผ่รังสีความร้อนเช่นในตู้อบไอร้อน (Hot airoven) ซึ่งใช้อุณหภูมิ 160 °C นาน 1-2 hr ฆ่าแบคทีเรียบนวัสดุที่ไม่เสื่อมสลายเมื่อสัมผัสกับความชื้นสูงโดยตรง

ข. ความร้อนชื้น (Moist heat) ใช้ความร้อนฆ่าเชื้อแบคทีเรียในขณะที่มีความชื้นหรือน้ำอยู่ด้วย ได้แก่ การต้ม การนึ่ง การพาสเจอร์ไรส์ (Pasteurization) การนึ่งด้วยความดันไอน้ำโดยเครื่องมือที่เรียกว่า Autoclave การต้ม (Boiling) ที่อุณหภูมิ 100 °C ทำลายเชื้อแบคทีเรียได้เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นแบคทีเรียที่มีสปอร์ การพาสเจอร์ไรส์ ที่อุณหภูมิประมาณ 63°C นาน 30 min หรือประมาณ 75°C นาน 15 min แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว ฆ่าแบคทีเรียที่ก่อโรคน้ำนมและเซลล์เจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของน้ำนมและผลิตภัณฑ์บางอย่าง เช่น นมผง ไม้ ไวน์ เป็นต้น การนึ่งโดยใช้ความดันน้ำ ใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 lb/in² อุณหภูมิ 121 °C นาน 10-15 min เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ทุกชนิด เรียกว่า การสเตอริไลส์ (Sterilization)

2. การฉายรังสี (Radiation) ใช้รังสี UV และรังสีแกมมา (Gamma ray) ในการฆ่าแบคทีเรีย รังสีทำให้กรดนิวคลีอิก และโปรตีนของแบคทีเรียเสียสภาพไป ฆ่าเชื้อในเครื่องมือพลาสติก ในอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรบางชนิด เป็นต้น

3. การกรอง (Filtration) โดยใช้กระดาษกรองหรือแผ่นเยื่อกรองที่มีรูขนาดเล็กกว่าแบคทีเรีย หรือ 0.45 μm สามารถใช้แยกแบคทีเรียออกได้ วิธีนี้ใช้เมื่อต้องการกำจัดเชื้อในอาหารที่สลายตัวเร็วระเหยง่ายเมื่อถูกความร้อน

4. ความเย็น (Cold storage) การเก็บแบคทีเรียในตู้เย็น หรือตู้แช่แข็ง จะยับยั้งการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียได้ เนื่องจากเอ็นไซม์ของแบคทีเรีย ไม่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น ที่ 0°C หรือ -20 °C หรือต่ำกว่า ใช้เป็นหลักในการเก็บแบคทีเรียไว้เป็นเวลานาน และการถนอมอาหาร

5. ความแห้ง (Dehydration) ความแห้งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ใช้เป็นหลักในการเก็บแบคทีเรียไว้นาน ๆ โดยวิธีการที่เรียกว่าการทำแห้ง (Lyophilization)

2.4.2 วิธีการทางเคมี (Chemical method)

เป็นการใช้สารเคมีบางชนิด ที่มีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรีย เช่น สารที่มีคุณสมบัติเป็นแก๊ส อาทิ Formaldehyde และ Ethylene oxide ส่วนสารเคมีที่มักใช้ในรูปสารละลาย เช่น ฟีนอล ฟอร์มาลิน สารเคมีที่ใช้ในการทำลายเซลล์เจริญของแบคทีเรียในสิ่งของเครื่องใช้ สิ่งขับถ่ายของผู้ป่วย และแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเรื้อรังสารนั้นเป็น Disinfectant ส่วนสารเคมีที่ใช้ทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตหรือกิจกรรมของแบคทีเรียตามผิวหนัง เนื้อเยื่อ โดยสารนั้น ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย เรียกว่า Antiseptics เช่น Ethanol 70% ด่างทับทิม ไฮโครเจนเปอร์ออกไซด์ การตายของแบคทีเรียเนื่องจากสารเคมี ทำให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรีย เสียสภาพไป อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีส่วนมาก ไม่มีผลในการทำลายเชื้อ ได้ทั้งหมดถึงแม้จะใช้ความเข้มข้นตามกำหนดมาตรฐานก็ตาม

2.4.3 การใช้ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics)

ยาปฏิชีวนะหรือสารปฏิชีวนะสามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ ยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด จะมีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียเพียงบางชนิดเท่านั้น แต่ยาปฏิชีวนะบางชนิด จะออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียหลายชนิด เรียกว่าเป็น Broad spectrum antibiotics นอกจากนี้ยังขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียด้วย ปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะกันอย่างแพร่หลายทำให้เชื้อแบคทีเรีย หลายชนิดมีการดื้อยาปฏิชีวนะมากขึ้น การตรวจหาความไวของเชื้อต่อยา (Drug sensitivity test) จะทำให้ทราบว่าเชื้อแบคทีเรียไวต่อยา (Sensitive) หรือ (Resist) ต่อยาชนิดใดบ้าง เพื่อจะได้เลือกใช้ยารักษาโรคนั้นๆ ให้ถูกต้อง

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การใช้กรดออกซาลิกและเมทิลจัสโมเนตหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อลดอาการสะท้อนหวานในโหระพา ใบโหระพาเป็นหนึ่งในสมุนไพรที่ได้รับความนิยมและมีประโยชน์ ปัญหาหลักของโหระพามีอายุการเก็บรักษาสั้น ใบมีสีน้ำตาล เกิดอาการสะท้อนหวานเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ มีรายงานว่า การใช้กรดออกซาลิก และสารเมทิลจัสโมเนตเพื่อช่วยยืดอายุโดยกรดออกซาลิก (oxalic acid) เป็นสารธรรมชาติที่อยู่ในพืช เมทิลจัสโมเนตเป็นสารที่กระตุ้นให้พืชเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในการป้องกันตัวเอง การใช้สารนี้ในการรักษาคุณภาพผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวและถูกยอมรับว่าเป็นสารเคมีที่มีความปลอดภัย ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้กรดออกซาลิกและเมทิลจัสโมเนตหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อลดอาการสะท้อนหวานในใบโหระพา

งานวิจัยประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากข่าและโหระพาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจึงมีจุดประสงค์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของไข่ไก่ และ ยืดอายุการเก็บรักษาไข่ไก่ในตู้เย็น โดยใช้สารสกัดหยาบจากข่าและโหระพาในตัวอย่างที่แตกต่างกัน ซึ่งได้แก่ อะทิล แอซีเตต และเอทานอล ท การทดลองโดยการเตรียมสารสกัดด้วยการแช่ข่าและโหระพา จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเข้าเครื่อง rotary evaporator เพื่อแยกสารสกัดหยาบออกจากตัวอย่างที่แตกต่างกัน ซึ่งได้แก่ อะทิลแอซีเตต และเอทานอล ท การทดลองโดยการเตรียมสารสกัดด้วยการแช่ข่าและโหระพา จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเข้าเครื่อง rotary evaporator เพื่อแยกสารสกัดหยาบออกจากตัวอย่าง ทดสอบโดยวิธี paper disc diffusion กับเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus* sp. *Pseudomonas* sp. และ *Serratia* sp. นำเข้าตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ข่าที่แช่ด้วยอะทิลแอซีเตตสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด ซึ่งเกิดวงใสเฉพาะสารสกัดหยาบจากข่าในตัวอย่างอะทิลแอซีเตตในเชื้อทุกตัว ดังนั้นจึงแสดงได้ว่าสารสกัดหยาบของข่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดีที่สุด จากนั้นจึงนำเอาสารสกัดหยาบจากข่ามาทดสอบบนไข่ไก่ เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 15-21 วัน แล้วทำการเก็บผลการทดลอง โดยวัดขนาดความกว้างและความสูงของไข่แดงเพื่อนำมาหาค่าดัชนีของไข่แดง

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้

3.1.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลายและเครื่องมือกลั่นสารละลาย

- | | |
|---------------------------|-----------------------|
| 1. ปีกเกอร์ | 2. แท่งแก้วคนสาร |
| 3. เครื่องกลั่นแบบธรรมดา | 4. ตู้อบลมร้อน |
| 5. Hotplate stirrer | 6. ชุดกรอง filtration |
| 7. กรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมล | 8. น้ำกลั่น |

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียม

1. ใบสะเดา
2. มีด
3. เขียง
4. เครื่องปั่นน้ำผลไม้
5. ถาดสเตนเลส

3.2 วิธีการดำเนินโครงการ

ตอนที่ 1 การสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดา

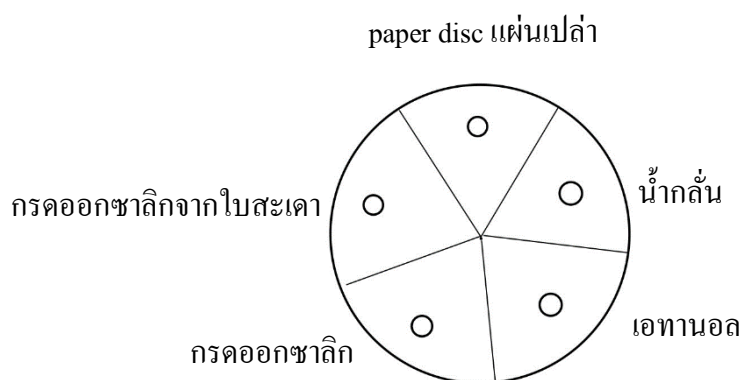
1. นำใบสะเดามาล้างให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วจึงนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น
2. นำใบสะเดาที่เป็นชิ้นละเอียดแล้วไปอบแห้งเพื่อไล่ความชื้นในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 17 ชั่วโมง
3. เทใบสะเดาอบแห้งในปีกเกอร์แล้วเตรียมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.2 โมล ปริมาตร 125 มิลลิลิตร
4. เติมส่วนผสมระหว่างน้ำกลั่นและกรดไฮโดรคลอริกสัดส่วน 1:1 เป็นปริมาตร 250 มิลลิลิตร
5. ผสมให้เข้ากันด้วย Hotplate stirrer หมุนทั้งหมด 3,500 pm ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
6. กรองด้วยเครื่อง filtration system แยกใบสะเดาและสารสกัดกรดออกซาลิก
7. นำสารละลายกรดออกซาลิกจากใบสะเดาเทใส่ปีกเกอร์ และ นำสารละลายกรดออกซาลิกจากใบสะเดาไปใส่ในเครื่องกลั่นแบบธรรมดา

ตอนที่ 2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ E-coli

1. ชั่งอาหาร NA แล้วเทลงใน flask ผสมน้ำ (ตัวทำละลาย) ในอัตราส่วนที่คำนวณได้ เทลงในอาหารที่เราเตรียมไว้ใน flask
2. นำไปนึ่งเพื่อให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่อง autoclave สำหรับ Agar ระหว่างการทดลอง petri dish นำไปอุ่นใน water bath
3. นำปาก flask ไปลงไฟเพื่อฆ่าเชื้อโดยรอบ เตรียม petri dish 3-5 ชั้น และเริ่มจากชั้นล่างเทอาหารให้เป็นสายจนเต็มพื้นที่ก้น water bath หาก agar เริ่มหนืดเป็นวุ้น
4. เตรียม paper antibiotic test และ เตรียมสารสกัดกรดออกซาลิก

ตอนที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อด้วยสารสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v

1. วาง paper disc ลงบน petri dish ที่มีเชื้อ E.coli ตามตำแหน่งดังนี้ คือ ตำแหน่งที่ 1 paper disc แผ่นเปล่า ตำแหน่งที่ 2 paper disc จุ่มน้ำกลั่น ตำแหน่งที่ 3 paper disc จุ่มเอทานอล ตำแหน่งที่ 4 paper disc จุ่มกรดออกซาลิกบริสุทธิ์ และตำแหน่งที่ 5 paper disc จุ่มกรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v
2. บ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. วัดขนาดของ Zone of inhibition และบันทึกผลการทดลอง



รูปที่ 3 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ E-coli ที่วาง paper disc ทดสอบการยับยั้งเชื้อ

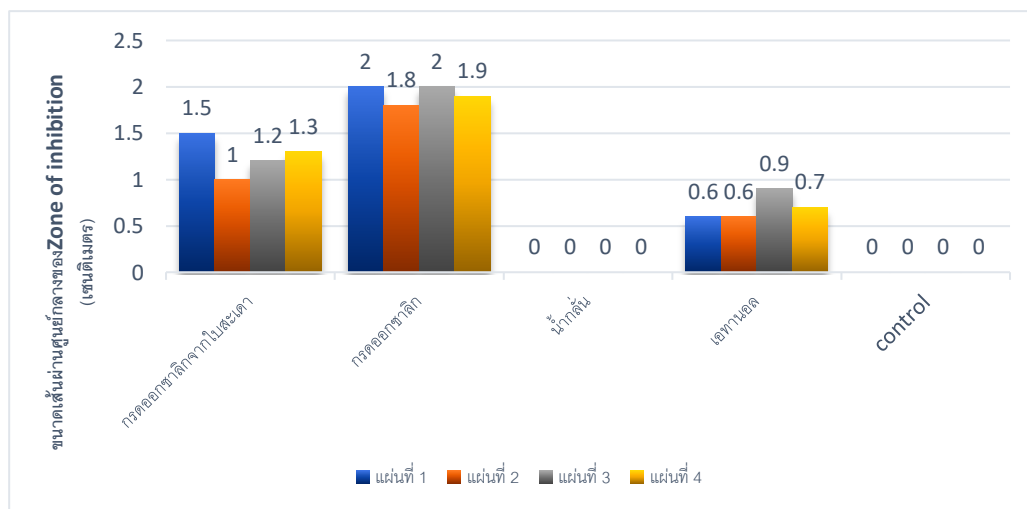
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

ในการจัดทำโครงงานวิทยาศาสตร์เรื่อง การศึกษาการสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ E-coli ได้ทดลองเพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อ E-coli ด้วยสารสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดาโดยมีการเพาะเลี้ยงเชื้อ E-coli และทดสอบโดยวาง paper disc จุ่มสารต่างๆ และวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition ได้ผลการทดลองดังนี้

ชุดทดลอง	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition (เซนติเมตร)					
	แผ่นที่ 1	แผ่นที่ 2	แผ่นที่ 3	แผ่นที่ 4	ค่าเฉลี่ย	คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (%)
Control	0	0	0	0	0	0
น้ำกลั่น	0	0	0	0	0	0
เอทานอล	0.6	0.6	0.9	0.7	0.7	17.95
กรดออกซาลิก	2	1.8	2	1.9	1.9	48.72
กรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v	1.5	1	1.2	1.5	1.3	33.3

ตารางที่ 1 ตารางแสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition

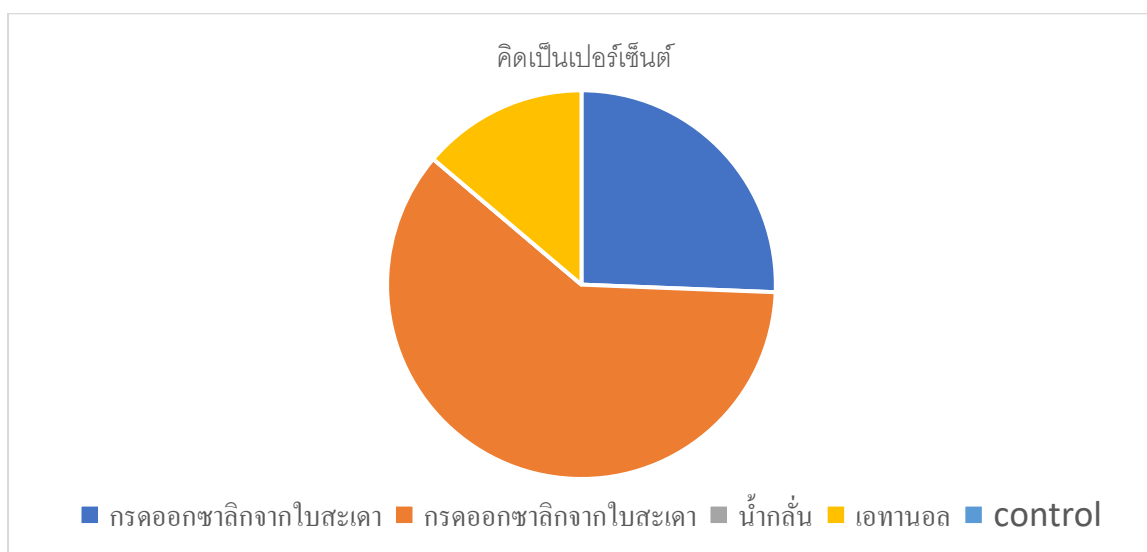


จากการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition ที่ตำแหน่งทดสอบต่างๆ คือ ตำแหน่งที่ 1 paper disc แผ่นเปล่า ตำแหน่งที่ 2 paper disc จุ่มน้ำกลั่น ตำแหน่งที่ 3 paper disc จุ่มเอทานอล ตำแหน่งที่ 4 paper disc จุ่มกรดออกซาลิกสำเร็จรูป และตำแหน่งที่ 5 paper disc จุ่มกรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v พบว่ากรดออกซาลิกสำเร็จรูปมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง E-coli ได้ดีที่สุดโดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition เฉลี่ยที่ 1.9 เซนติเมตร แต่ละตัวเปรียบเทียบดังนี้

ชุดทดลอง	ค่าเฉลี่ยขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition (เซนติเมตร)
กรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v	1.3
กรดออกซาลิก	1.9
น้ำกลั่น	0
เอทานอล	0.7
control	0

ตารางที่ 2 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition

จากการวัดขนาดเส้นผ่านของศูนย์กลางของ Zone of inhibition แล้วหาค่าเฉลี่ยของขนาด Zone of inhibition พบว่า กรดออกซาลิกบริสุทธิ์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ E-coli ได้ดีที่สุด คือ 1.9 เซนติเมตร และรองลงมาคือกรดออกซาลิกจากใบสะเดา คือ 1.3 เซนติเมตร ตามลำดับ



บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อ E-coli จากสารทดสอบต่างๆ กรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ E-coli ได้เป็นลำดับที่สอง รองจากกรดออกซาลิกบริสุทธิ์โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition เฉลี่ยที่ 1.3 เซนติเมตร

5.2 อธิบายผลการทดลอง

จากขั้นตอนแรกปั่นใบสะเดาให้เป็นชิ้นเล็กและอบด้วยตู้อบลมร้อนเพื่อไล่ความชื้นจนแห้ง แล้วนำไปผสมสารละลายด้วยอัตราส่วนของกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมล และ น้ำกลั่น เป็น 1:1 ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ผสมกับใบสะเดาปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มบน Hotplate stirrer ที่ 3,500 ppm เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้สารเข้ากัน จึงได้กรดออกซาลิกออกมา

ในขั้นตอนต่อมาทางคณะผู้จัดทำโครงการได้นำกรดออกซาลิกไปทดสอบกับเชื้อ E-coli เพื่อทดสอบว่ากรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v สามารถกำจัดเชื้อโรคได้หรือไม่ โดยการทำการเลี้ยงเชื้อ E-coli แล้วจึงนำกรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v กรดออกซาลิกบริสุทธิ์ เอทานอล น้ำกลั่น และ control พบว่าสารสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ E-coli ได้

ดังนั้นการทดลองที่มาทั้งหมดทำให้สรุปผลได้ว่า กรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v ที่สกัดโดยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.2 โมล มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ E-coli ได้โดยมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ ได้ดีเป็นอันดับสองรองจากกรดออกซาลิกบริสุทธิ์

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. หากเวลาในการศึกษาเพียงพอควรมีการนำไปทดสอบกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ
2. ควรลองนำกรดออกซาลิกที่สกัดมาจากใบสะเดาไปลองใช้เพื่อประโยชน์อย่างอื่น

บรรณานุกรม

ประสิทธิภาพการสกัดหยาบจากข้าวและใบโหระพา ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ สืบค้นเมื่อ 26 กรกฎาคม 2565 จาก https://sciusforum.mhesi.go.th/file/extended_abstract/907.pdf

การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรฟโตค็อกคัสด้วยกระบวนการโฟโตคะตะลิติก สืบค้นเมื่อ 26 กรกฎาคม 2565 จาก <file:///C:/Users/Dell/Downloads/RMUTT-155536.pdf>

ข้อมูลเบื้องต้นของกรดออกซาลิก สืบค้นวันที่ 25 กรกฎาคม 2565 จาก <https://www.siamchemi.com/%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%94%E0%B8%AD%E0%B8%AD%E0%B8%81%E0%B8%8B%E0%B8%B2%E0%B8%A5%E0%B8%B4%E0%B8%81/>

การใช้กรดออกซาลิกและเมทิลจัสโมเนตหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อลดอาการสั้บนานาในโหระพา สืบค้นเมื่อวันที่ 23 กรกฎาคม 2565 จาก <https://urms.rmutt.ac.th/research?pf=v2x233v2&rs=v2v243y2>

ภาคผนวก



รูปที่ 5 ตัดสับผัก



รูปที่ 6 การปั่นผัก



รูปที่ 7 อบผักในตู้อ



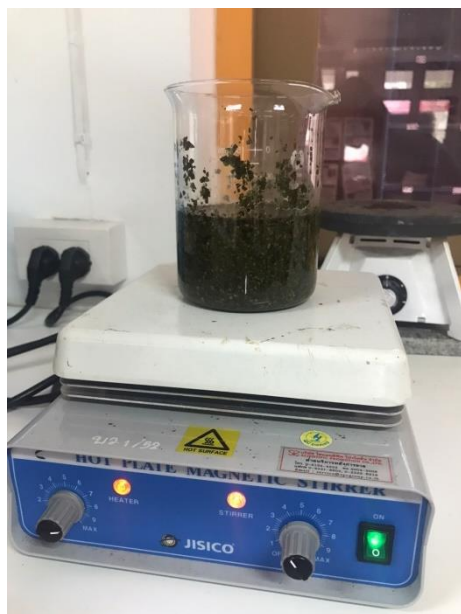
รูปที่ 8 อบผัก



รูปที่ 9 เตรียมสารละลายมาผสม



รูปที่ 10 ผสมสารละลาย



รูปที่ 11 ต้มบน Hotplate stirrer



รูปที่ 12 กรองสารละลาย



รูปที่ 13 การกลั่นแบบธรรมดา



รูปที่ 14 กรดออกซาลิกจากใบสะเดา



รูปที่ 15 การทำอาหารเลี้ยงเชื้อ (Na)



รูปที่ 16 นำเข้าเครื่อง autoclave



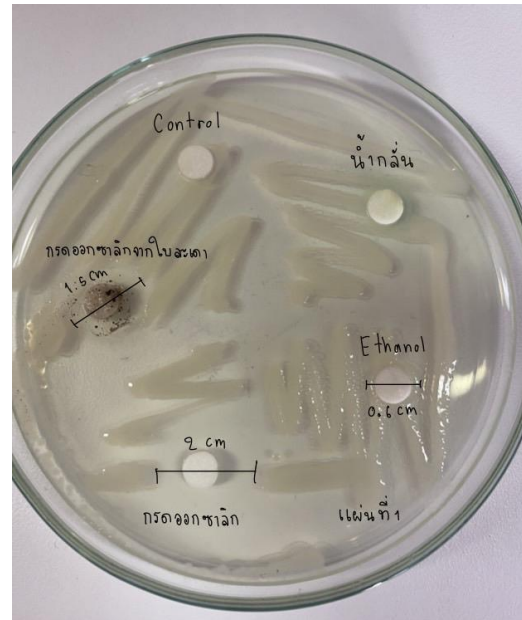
รูปที่ 17 นำปากขวด Flask ไปร่นไฟ



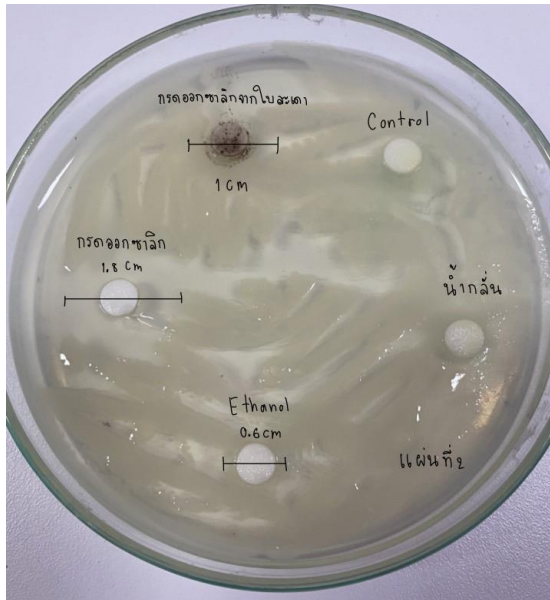
รูปที่ 18 นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปเทใส่ plate



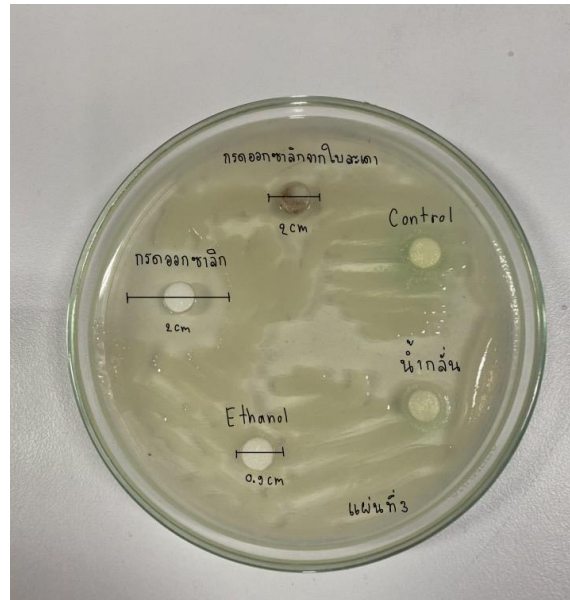
รูปที่ 19 การวัด Zone of inhibition



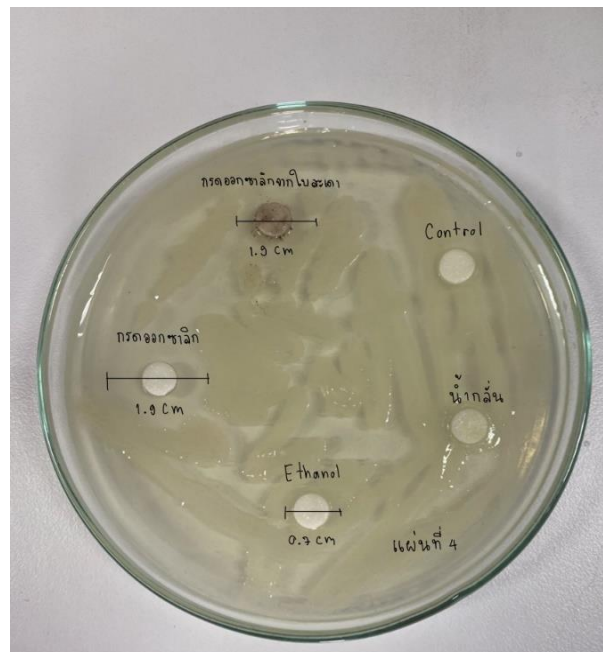
รูปที่ 20 ผลการทดลองแผ่นที่ 1



รูปที่ 21 ผลการทดลองแผ่นที่ 2



รูปที่ 22 ผลการทดลองแผ่นที่ 3



รูปที่ 23 ผลการทดลองแผ่นที่ 4