คณะผู้จัดทำ

เด็กหญิงกัลยกร คำฟูบุตร
เด็กหญิงประเสริฐโสภา ประเสริฐ
เด็กหญิงศรัจจันทร์ สว่างวิทย์

ครูที่ปรึกษา

นางสาวสุนิสา อินทร์จักร์
นางรัชนก ตั้งใจ

Escherichia coli

ที่มาและความสำคัญ

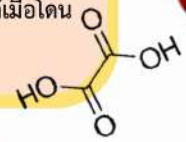
การดำรงชีวิตประจำวันของมนุษย์ในแต่ละวันต้องสัมผัสกับเชื้อโรคและสิ่งสกปรกมากมายทั้งทางตรงและทางอ้อม อย่างไรก็ตามเราอาจจะได้รับเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารซึ่งจัดเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขของไทย

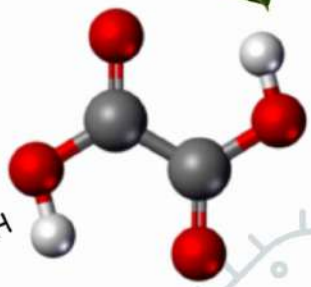
Escherichia coli หรือ E. coli เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นโดยปกติจะไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรง เมื่ออยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยอาหารที่เรารับประทานเข้าไป แต่หากเชื้อ E. coli ลุกล้ำเข้าสู่ระบบต่างๆ ของร่างกายก็จะทำให้เกิดโรคติดเชื้อรุนแรง เช่น โรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบและการติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นต้น

ดังนั้นทางคณะผู้จัดทำจึงได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับพืชพื้นบ้านที่มีกรดออกซาลิกสูงคือใบสะเดา จึงได้นำใบสะเดามาสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบกรดออกซาลิกเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับกรดออกซาลิกสำเร็จรูปในการยับยั้งเชื้อ E. coli

สะเดาจากงานวิจัยเรื่อง ผลของสายพันธุ์เม่าหลวงต่อปริมาณกรดออกซาลิก ได้บ่งชี้ว่าการวิเคราะห์ปริมาณกรดออกซาลิกด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่า กรดออกซาลิกที่มาจากใบสะเดามีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของสายพันธุ์แมลงเม่าหลวงมากที่สุด

กรดออกซาลิกเป็นสารประกอบอินทรีย์ซึ่งมีสูตรโมเลกุล $H_2C_2O_4$ และมีความเป็นกรดสูงกว่ากรดน้ำส้ม 10000 เท่า เมื่ออยู่ในรูปของประจุจะเรียกว่าออกซาเลต ใช้ในทางเคมีบำบัดให้กับผู้ป่วยโรคมะเร็ง กรดออกซาลิกสลายตัวได้เมื่อโดนความร้อน 120 องศา ขึ้นไป





วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ E-coli ด้วยสารสกัดหยาบกรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v

ตัวแปรการศึกษา

ตัวแปรต้น กรดออกซาลิกใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v และกรดออกซาลิกบริสุทธิ์

ตัวแปรตาม การยับยั้งเชื้อ E-coli ของกรดออกซาลิกจากใบสะเดาความเข้มข้น 40%w/v

ตัวแปรควบคุม อุณหภูมิ ปริมาณของสารที่ใช้ทำการทดลอง ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาการสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดาเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออีโคไล
Inhibit Escherichia coli Growth by extract of neem leaves.

โรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย จังหวัดลำปาง

วัสดุ/อุปกรณ์

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลายและเครื่องมือกลั่นสารละลาย

1. บีกเกอร์
2. แท่งแก้วคนสาร
3. เครื่องกลั่นแบบธรรมดา
4. ตู้อบลมร้อน
5. Hotplate strier
6. ชุดกรอง filtration
7. กรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมล
8. น้ำกลั่น
9. petri dish
10. flask

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียม

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

วิธีการดำเนินงาน

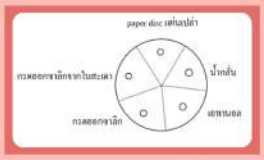
ตอนที่ 1 การสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดา

1. นำใบสะเดามาสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วจึงนำไปปั่น
2. นำใบสะเดาที่เป็นชิ้นละเอียดแล้วไปอบแห้งเพื่อไล่ความชื้นในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 17 ชั่วโมง
3. เทใบสะเดาอบแห้งในบีกเกอร์แล้วเตรียมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 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 fliltation system แยกใบสะเดาและสารสกัดกรดออกซาลิก
7. นำสารละลายกรดออกซาลิกจากใบสะเดาเทใส่บีกเกอร์ และ นำสารละลายกรดออกซาลิกจากใบสะเดาไปใส่ในเครื่องกลั่นแบบธรรมดา

ตอนที่ 2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ E-coli

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

ตอนที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ



1. วาง paper disc ลงบน petri dish ที่มีเชื้อ E.coli ตามตำแหน่งดังนี้ คือ ตำแหน่งที่ 1paper disc แผ่นเปล่า ตำแหน่งที่ 2 paper disc จุ่มน้ำกลั่น ตำแหน่งที่ 3 paper disc จุ่มเอทานอล ตำแหน่งที่ 4 paper disc จุ่มกรดออกซาลิกสำเร็จรูป และ ตำแหน่งที่ 5 paper disc จุ่มกรดออกซาลิกจากใบสะเดา
2. บ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. วัดขนาดของ Zone of inhibition และบันทึกผลการทดลอง

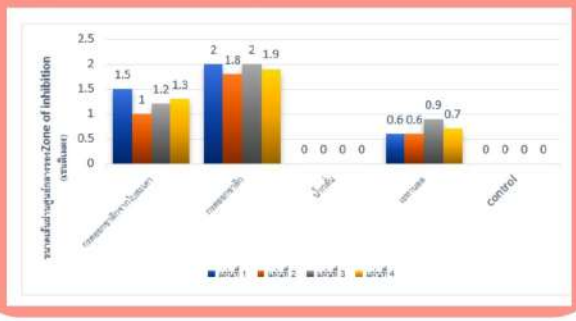
ผลการทดลอง

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อ E-coli ด้วยสารสกัดกรดออกซาลิกจากใบสะเดาโดยมีการเพาะเลี้ยงเชื้อ E-coli และทดสอบโดยวาง paper disc จุ่มสารต่างๆ และวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition ได้ผลการทดลองดังนี้

ตารางแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition

ชุดทดลอง	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition (เซนติเมตร)					
	แผ่นที่ 1	แผ่นที่ 2	แผ่นที่ 3	แผ่นที่ 4	ค่าเฉลี่ย	คิดเป็นเปอร์เซ็น (%)
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
กรดออกซาลิกจากใบสะเดา ความเข้มข้น 40%w/v	1.5	1	1.2	1.5	1.3	33.3

แผนภูมิแสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition



จากการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition ที่ตำแหน่งทดสอบต่างๆ พบว่ากรดออกซาลิกจากใบสะเดามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ E-coli ได้เป็นอันดับที่ 2 รองลงมาจากกรดออกซาลิกบริสุทธิ์

ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition

ชุดทดลอง	ค่าเฉลี่ยขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ Zone of inhibition (เซนติเมตร)
กรดออกซาลิกจากใบสะเดา	1.3
กรดออกซาลิก	1.9
น้ำกลั่น	0
เอทานอล	0.7
control	0

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

ผลการทดสอบซ้ำที่ 1

ผลการทดสอบซ้ำที่ 2

ผลการทดสอบซ้ำที่ 3

ผลการทดสอบซ้ำที่ 4