http://journal.rmutp.ac.th/

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของผ้าย้อมคราม

แก้วกัลยา โสตถิสวัสดิ์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร
680 ถนนนิตโย ตำบลธาตุเชิงชุม อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร 47000

รับบทความ 19 มิถุนายน 2563 แก้ไขบทความ 10 พฤศจิกายน 2563 ตอบรับบทความ 25 ธันวาคม 2563

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของผ้าย้อมครามที่ผลิตและจำหน่ายในจังหวัดสกลนคร จำนวน 16 ตัวอย่าง และผลของความชื้นและค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของผ้าย้อมครามที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรีย จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* TISTR 746 และ *Escherichia coli* TISTR 073 ด้วยวิธี Agar Diffusion Plate Test พบว่าผ้าย้อมครามทุกตัวอย่างสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 746 ได้ (คิดเป็นร้อยละ 100) และมีเพียง 9 ตัวอย่างเท่านั้นที่สามารถยับยั้ง *E. coli* TISTR 073 ได้ (คิดเป็นร้อยละ 56.25) ในขณะที่ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของผ้าย้อมครามตามมาตรฐาน AATCC Test Method 100-2004 ที่ 24 ชั่วโมง พบว่าผ้าย้อมครามธรรมชาติรหัส A3-1 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ได้สูงที่สุด สำหรับการศึกษาผลของความชื้น และค่า pH ของผ้าย้อมครามที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียพบว่า ที่ระดับความชื้นที่เพิ่มสูงขึ้นในผ้าย้อมครามมีผลทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ลดลง ในขณะที่ผ้าย้อมครามที่มีค่า pH 3.0 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สูงที่สุด นอกจากนี้ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) สามารถยืนยันคุณสมบัติการต้าน *S. aureus* TISTR 746 และ *E. coli* TISTR 073 ของผ้าย้อมครามได้อย่างชัดเจน

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย; ผ้าย้อมคราม; สีคราม; ต้นคราม (*Indigofera tinctorial* L.)

** ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทร: +668 1872 0919, ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์: kaewkanlaya@snru.ac.th*

http://journal.rmutp.ac.th/

Antibacterial Activity of Indigo Dyed Fabrics

Kaewkanlaya Sotthisawad*

Faculty of Science and Technology, Sakon Nakhon Rajabhat University
680 Nitayo Road, That Choeng Chum Sub-district, Muang District, Sakon Nakhon 47000

Received 19 June 2020; Revised 10 November 2020; Accepted 25 December 2020

Abstract

The objective of this research was to study the antibacterial activity of 16 samples of indigo dyed fabrics that are produced and sold in Sakon Nakhon Province. Effect of moisture and pH of indigo dyed fabrics on bacterial growth were also determined. The result of the study shows inhibition of *S. aureus* TISTR 746 and *E. coli* TISTR 073 by agar diffusion plate test, all samples could inhibit *S. aureus* TISTR 746 (accounted as 100%), and only 9 samples could inhibit *E. coli* TISTR 073 (accounted as 56.25%). Whereas, the study of antibacterial activity by AATCC test method 100-2004 at 24 hours was found that the natural indigo dyed fabrics code A3-1 could inhibit both bacterial strains in the highest level. The result also shows the effect of moisture and pH of indigo dyed fabrics on bacterial growth, it was found that the increased humidity levels of indigo dyed fabrics have effect on the reduction of the inhibition efficacy of both strains. While indigo dyed fabric with pH 3.0 was found to inhibit most of the growth of both strains. In addition, images obtained using a scanning electron microscope (SEM) could clearly confirm the property of indigo dyed fabric on inhibition of *S. aureus* TISTR 746 and *E. coli* TISTR 073.

Keywords : Antibacterial Activity; Indigo Dyed Fabrics; Indigo Blue; *Indigofera tinctorial* L.

*** Corresponding Author. Tel.: +668 1872 0919, E-mail Address: kaewkanlaya@snru.ac.th***

1. บทนำ

ผ้าย้อมคราม (Indigo Dyed Fabrics) เป็นผลิตภัณฑ์ผ้าพื้นเมืองย้อมด้วยสีครามธรรมชาติ ผ่านวิถีภูมิปัญญาชาวบ้านที่มีนำต้นคราม (*Indigofera tinctorial* L.) มาทำการสกัดสีและย้อมเส้นใยฝ้ายด้วยการหมักเนื้อคราม จนได้ผลิตภัณฑ์ผ้าย้อมครามที่มีช่วงเฉดสีฟ้าถึงสีน้ำเงินเข้ม (Indigo Blue) ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของคราม สีครามจัดเป็นสีย้อมผ้าประเภทสีวัต (Vat Dyes) เป็นสีที่มีความคงทนและติดสีเส้นใยเซลลูโลส โดยโมเลกุลสีอยู่ในรูปไม่ละลายน้ำและถูกขังภายในเส้นใยภายหลังการย้อม [1] สำหรับวัตถุดิบธรรมชาติที่นำมาใช้ในการผลิตผ้าย้อมคราม ส่วนใหญ่นิยมใช้เส้นใยฝ้าย หรืออาจใช้เส้นใยไหม หรือใยกัญชงบ้างเล็กน้อย การผลิตผ้าย้อมครามในอดีตนั้น เกิดขึ้นเพื่อตอบสนองความต้องการในการดำเนินชีวิต แต่ในปัจจุบันได้มีการรื้อฟื้นและฟื้นฟูภูมิปัญญาในการผลิตผ้าย้อมคราม ทำให้ผ้าย้อมครามกลายเป็นสินค้าทางวัฒนธรรมที่สำคัญของจังหวัดสกลนคร [2] และสร้างยอดจำหน่ายสูงมากที่สุดในจังหวัด โดยมีราคาจำหน่ายที่สูงใกล้เคียงกับผ้าไหม และเป็นที่ต้องการจำนวนมากในตลาดผ้าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในประเทศญี่ปุ่น ฝรั่งเศส และอิตาลี [3]

สำหรับคุณภาพของผ้าย้อมครามที่ผลิตขึ้นในแต่ละแหล่งผลิตพบว่ามีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของใยฝ้าย สีคราม และความชำนาญของผู้เตรียมน้ำย้อม มีงานวิจัยที่ระบุว่าผ้าฝ้ายย้อมครามสามารถดูดกลืนทั้งแสงแดดและรังสียูวี (Ultraviolet, UV) ได้ดี จึงทำให้ผ้าย้อมครามมีคุณสมบัติปกป้องผิวหนังจากแสงแดดและรังสียูวีได้ [4] นอกจากนี้ยังพบว่าสีครามจากสารสกัดหยาบ (น้ำคราม) เนื้อคราม (สีครามเกาะปูนขาว) และน้ำย้อมครามด้วยวิธี Zinc Lime Vat (สีครามในน้ำย้อม) สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ได้ [5]

การยืนยันผลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับคุณสมบัติการต้านแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ผ้าย้อมครามจึงเป็นอีกประเด็นที่น่าสนใจ ซึ่งอาจส่งผลต่อการสร้างความมั่นใจให้แก่ผู้บริโภค งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ของเพื่อศึกษาการต้านแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมลบและแกรมบวกของผ้าย้อมครามที่ผลิตและจำหน่ายในจังหวัดสกลนคร โดยใช้แบคทีเรียทดสอบ 2 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* TISTR 746 และ *E. coli* TISTR 073 ที่มีรายงานพบการปนเปื้อนบนผิวหนังมนุษย์ [6] องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากศึกษาครั้งนี้จะเป็นแหล่งข้อมูลทางวิชาการที่มีความน่าเชื่อถือในการเผยแพร่ประชาสัมพันธ์ และนำองค์ความรู้ที่ได้ไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ หรือนวัตกรรมที่เกี่ยวข้องกับการชี้วัดคุณภาพการผลิตผ้าย้อมครามในจังหวัดสกลนครต่อไป

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

ลงพื้นที่สำรวจแหล่งผลิตและจำหน่ายผ้าย้อมครามในพื้นที่จังหวัดสกลนครจำนวน 7 แหล่ง เพื่อดำเนินการเก็บตัวอย่าง โดยใช้วิธีการสุ่มเก็บตัวอย่างแบบเจาะจง (Purposive Sampling) แล้วทำการกำหนดรหัสตัวอย่างก่อนนำผ้าย้อมครามมาตัดให้เป็นวงกลม โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 เซนติเมตร แล้วนำมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที อบผ้าย้อมครามให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง สำหรับเชื้อทดสอบที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* TISTR 746 และ *E. coli* TISTR 073 ที่ได้รับมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

2.2.1 ทดสอบด้วยวิธี Agar Diffusion Plate Test

เพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาเจือจางใน Normal Saline (0.85% (w/v) NaCl) แล้วปรับความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นให้เท่ากับค่า No.0.5 McFarland Standard ($1.5x10^8$ เซลล์/

มิลลิลิตร) หลังจากนั้นทำการกวาดเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อแล้วป้ายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) ก่อนใช้คีมปากคีบ (Forceps) ปลอดเชื้อคีบผ้าย้อมครามที่เตรียมไว้ วางทับลงบนผิวหน้าอาหาร NA ก่อนนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยใช้ผ้าฝ้ายที่ไม่ได้ย้อมสีใด ๆ เป็นตัวควบคุมการทดลอง (ดัดแปลงวิธีของ S. Li และคณะ [7]) ประเมินฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยพิจารณาจากขนาดของบริเวณยับยั้ง (Inhibition Zone) หรือวงใส (Clear Zone) ที่เกิดขึ้นภายหลังจากการบ่ม

2.2.2 ทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน AATCC Test Method 100-2004

เตรียมเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ โดยทำการเจือจางใน Normal Saline ด้วยวิธี Serial Dilution เพื่อปรับความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นให้เท่ากับ 10^3 เซลล์/มิลลิลิตร แล้วใช้คีมปากคีบปลอดเชื้อคีบผ้าย้อมครามแต่ละตัวอย่างใส่ลงในสารละลายเชื้อ (โดยมีสารละลายเชื้อหลอดที่ไม่มีการแช่ผ้าย้อมครามเป็นตัวควบคุมการทดลอง) ก่อนนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการบ่มครบ 24 ชั่วโมง ปิเปตสารละลายเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร NA แล้วใช้ Spreader ปลอดเชื้อกวาดเชื้อให้กระจายทั่วหน้าอาหารด้วยเทคนิค Spread Plate ก่อนนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีทั้งหมด แล้วนำมาคำนวนหาร้อยละการลดลงของแบคทีเรีย (Percent of Reduction; %R) ดังสมการนี้ (ดัดแปลงวิธีจาก G. Pook-In และคณะ [8] กับ S. Jayapriya และ G. Bagyalakshmi [9])

$$\%R = \frac{100\times(B-A)}{B} \quad (1)$$

โดยที่

A = จำนวนโคโลนีที่นับได้ ณ เวลาทดสอบ

B = จำนวนโคโลนีที่นับได้ ณ เวลาเริ่มต้น

2.3 การศึกษาผลของความชื้นและค่า pH ของผ้าย้อมครามที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย

นำผ้าย้อมครามรหัสที่ให้ผลทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดี (สองอันดับสูงสุด) มาทำการศึกษา โดยดัดแปลงวิธีการทดสอบจากวิธี Agar Diffusion Plate Test โดยการเตรียมเชื้อทดสอบในรูปของสารละลายเชื้อใน Normal Saline แล้วปรับความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นให้เท่ากับ ค่า No.0.5 McFarland Standard หลังจากนั้นทำการกวาดเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง NA ก่อนใช้คีมปากคีบปลอดเชื้อคีบผ้าย้อมครามวางทับลงบนผิวหน้าอาหาร NA (ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับข้อ 2.2.1) เพื่อทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.3.1 ผลของความชื้นของผ้าย้อมคราม

หลังจากคีบผ้าย้อมครามวางทับลงบนผิวหน้าอาหาร NA แล้ว ทำการปรับร้อยละความชื้นของผ้าย้อมครามด้วยการเติมน้ำกลั่นในปริมาณที่แตกต่างกัน 3 ระดับ ลงในตำแหน่งตรงกลางของชิ้นผ้าดังนี้ 30 ไมโครลิตร (คิดเป็นความชื้นร้อยละ 60), 60 ไมโครลิตร (คิดเป็นความชื้นร้อยละ 65) และ 90 ไมโครลิตร (คิดเป็นความชื้นร้อยละ 70) โดยมีผ้าที่ไม่มีการเติมน้ำกลั่น (มีความชื้นร้อยละ 5) เป็นตัวควบคุมการทดลอง (Control) หลังจากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วทำการประเมินฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยพิจารณาจากขนาดของบริเวณยับยั้งหรือวงใสที่เกิดขึ้นภายหลังจากการบ่ม สำหรับการปรับค่าร้อยละความชื้นของผ้าย้อมครามนั้นได้มีการศึกษาและคำนวณหาร้อยละความชื้นเฉลี่ยของตัวอย่างผ้าย้อมครามแต่ละชนิดก่อนนำมาใช้ทดสอบ

2.3.2 ผลของความเป็นกรดด่างในผ้าย้อมคราม

หลังจากคีบผ้าย้อมครามวางทับลงบนผิวหน้าอาหาร NA แล้ว ปิเปตน้ำกลั่นที่มีค่า pH ที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ pH 3.0 5.0 7.0 และ 9.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (คิดเป็นความชื้นร้อยละ 60) ลงบนผ้าย้อม

ครามในตำแหน่งตรงกลางของชิ้นผ้า แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ก่อนทำการประเมินฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยพิจารณาจากขนาดของบริเวณยับยั้งหรือวงใสที่เกิดขึ้นภายหลังจากการบ่ม

2.4 ศึกษาการต้านแบคทีเรียของผ้าย้อมครามด้วย SEM

ภายหลังการทดสอบการต้านแบคทีเรียของผ้าย้อมครามด้วยวิธี Agar Diffusion Plate Test ตรวจสอบการเจริญและการคงอยู่ของแบคทีเรียบนผ้าย้อมครามด้วย SEM (ดัดแปลงวิธีจาก H. Cui และคณะ [10] กับ A. K. Tyagi และ A. Malik [11]) โดยใช้ตัวอย่างผ้าย้อมครามที่มีผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงมากที่สุด เปรียบเทียบกับผ้าฝ้ายธรรมชาติที่ไม่มีการย้อมสีใด ๆ โดยหลังจากการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ครบ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างผ้าย้อมครามแช่ในสารละลายร้อยละ 2.5 Glutaraldehyde ที่ละลายใน Phosphate Buffer Saline (pH 7.2) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เพื่อตรึงเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Cell Fixation) แล้วล้างตัวอย่างด้วย Phosphate Buffer Saline 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ทำการดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) ด้วยสารละลายเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 30, 50, 70, 100 และ 100 (โดยปริมาตร) โดยแช่นานระดับความเข้มข้นละ 15 นาที ก่อนทำให้เซลล์แห้ง ณ จุดวิกฤต ด้วยเครื่อง Critical Point Dryer (CPD) (ยี่ห้อ Quorum รุ่น K850, ประเทศอังกฤษ) และนำตัวอย่างติดลงบนแท่นวางตัวอย่าง (Stub) ก่อนทำการฉาบเคลือบตัวอย่างด้วยทองคำด้วยเครื่อง Ion Sputtering Coater (ยี่ห้อ Hitachi รุ่น MC1000, ประเทศญี่ปุ่น) โดยใช้ค่ากระแสไฟฟ้า 15 มิลลิแอมแปร์ นาน 30 วินาที หลังจากนั้นจึงการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อยืนยันผลการศึกษาการต้านแบคทีเรียของผ้าย้อมครามด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ยี่ห้อ Hitachi รุ่น TM4000 Plus, ประเทศญี่ปุ่น) ที่ระดับความต่างศักย์เร่ง (Accelerating Voltage) 10 กิโลโวลต์ และใช้ Back Scattered Electron (BSE) Detector เป็นตัวตรวจจับสัญญาณภาพ

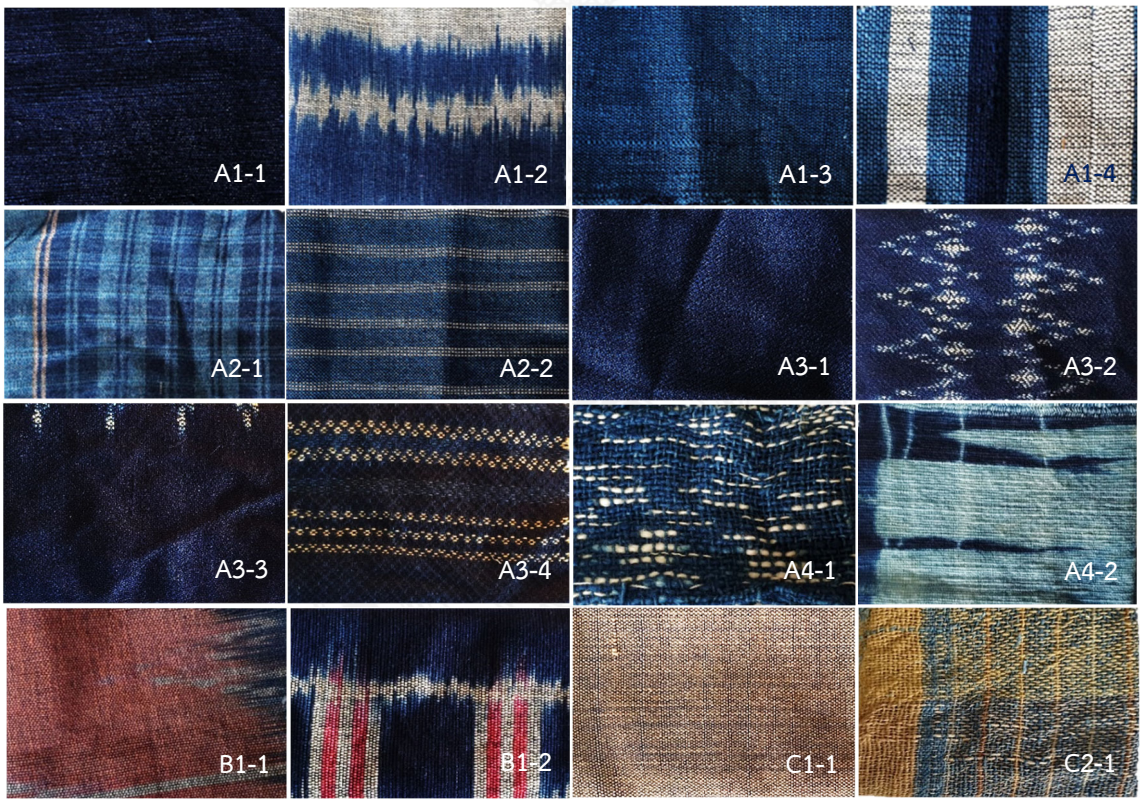
3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

ตัวอย่างผ้าย้อมครามที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีจำนวนทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากการลงพื้นที่เพื่อสำรวจแหล่งผลิตและจำหน่ายผ้าย้อมครามในพื้นที่จังหวัดสกลนคร จำนวน 7 แหล่ง (รูปที่ 1) และจากการสอบถามทำให้ทราบถึงข้อมูลของชนิดหรือประเภทของผ้าย้อมครามซึ่งสัมพันธ์กับรูปแบบของการทอ และวิธีการย้อมสีคราม (ตารางที่ 1) โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการย้อมสีครามมาเป็นเกณฑ์ในการแบ่งประเภทผ้าย้อมครามเพื่อกำหนดรหัสตัวอย่างดังนี้คือ การย้อมครามธรรมชาติ การย้อมครามเคมีหรือครามสังเคราะห์ และการย้อมครามผสม (การย้อมสีครามผสมกับพืชสีชนิดอื่น)

3.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของผ้าย้อมคราม

ผลการศึกษาคุณสมบัติการต้านแบคทีเรียของผ้าย้อมครามด้วยวิธี Agar Diffusion Plate Test พบว่า ตัวอย่างผ้าย้อมครามทุกรหัส (16 รหัส) สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 746 ได้ หรือคิดเป็นร้อยละ 100 (รูปที่ 2ก) ในขณะที่มีตัวอย่างผ้าย้อมครามเพียง 9 รหัสเท่านั้นที่สามารถยับยั้ง *E. coli* TISTR 073 ได้ หรือคิดเป็นร้อยละ 56.25 (รูปที่ 2ข) นอกจากนี้ยังพบว่า ตัวอย่างผ้าย้อมครามรหัส A3-1 ซึ่งเป็นผ้าย้อมครามธรรมชาติให้ผลการยับยั้งทั้ง *S. aureus* TISTR 746 และ *E. coli* TISTR 073 สูงที่สุด และรองลงมาคือรหัส A2-2 (รูปที่ 3) ในขณะที่ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของผ้าย้อมครามด้วยวิธีมาตรฐาน AATCC Test Method 100-2004 พบว่า ตัวอย่างผ้าย้อมครามทุกรหัส สามารถยับยั้งการเจริญของ

S. aureus TISTR 746 และ *E. coli* TISTR 073 ได้ (รูปที่ 4ก และ 4ข ตามลำดับ)โดยที่ผ้าย้อมครามธรรมชาติรหัส A3-1 มีค่าร้อยละการลดลงของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ 24 ชั่วโมง สูงที่สุด มีงานวิจัยที่ได้อธิบายถึงข้อแตกต่างระหว่างผ้าครามธรรมชาติ และผ้าย้อมครามสังเคราะห์ว่าในผ้าย้อมครามธรรมชาติจะมีอินดิโกบลู (Indigo Blue) ที่ให้สีน้ำเงิน และอินดิรูบิน (Indirubin) ที่ให้สีแดง สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า มีค่า Rf เท่ากับ 0.42 และ 0.26 ตามลำดับ โดยใช้ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, CH_2Cl_2) เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการศึกษาด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในขณะที่ผ้าย้อมครามสังเคราะห์ พบเพียงอินดิโกบลูสีเดียว [12] ซึ่งสัมพันธ์กับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าสารสกัดจากใบครามสดมีสารอินดิโกบลูและอินดิรูบิน [13] และมีหลายงานวิจัยที่ระบุว่าทั้งสารอินดิโกบลูและอินดิรูบินจากธรรมชาติมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Antimicrobial Activity) [14]-[16] ด้วยเหตุนี้จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของผ้าย้อมครามด้วยวิธี Agar Diffusion Plate Test และ AATCC Test Method 100-2004 จึงพบว่าตัวอย่างรหัส A3-1 ซึ่งเป็นผ้าย้อมครามธรรมชาตินั้นสามารถยับยั้งทั้ง *S. aureus* TISTR 746 และ *E. coli* TISTR 073 ได้สูงมากที่สุด



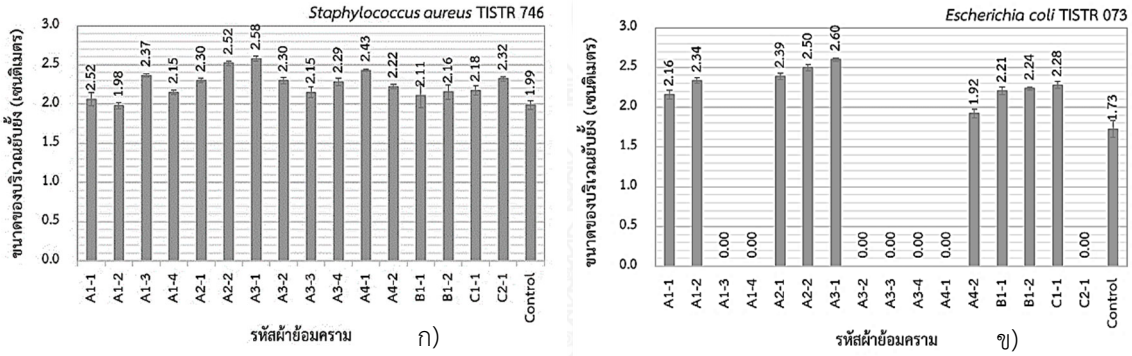
รูปที่ 1 ลักษณะผ้าย้อมครามแต่ละรหัสที่ใช้ในการศึกษา โดยที่รหัสขึ้นต้นด้วย A คือ ผ้าย้อมครามธรรมชาติ B คือ ผ้าย้อมครามเคมี และ C คือ ผ้าย้อมครามผสม

ตารางที่ 1 ข้อมูลและรายละเอียดของตัวอย่างผ้าย้อมครามที่ใช้ในการศึกษา

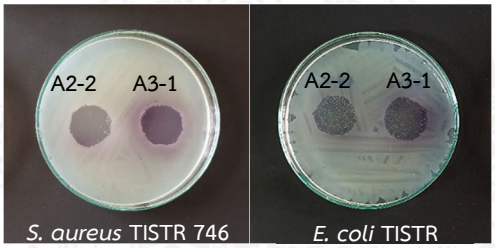
รหัสผ้า	ชนิดผ้าฝ้าย	รูปแบบการทอ	รหัสผ้า	ชนิดผ้าฝ้าย	รูปแบบการทอ
A1-1	ฝ้ายเข็นโรงงาน	2 ตะกอ	A3-3	ฝ้ายเรย่อน (ซีกวง)	4 ตะกอ
A1-2	ฝ้ายเข็นโรงงาน	2 ตะกอ	A3-4	ฝ้ายเรย่อน (ซีกวง)	4 ตะกอ

ตารางที่ 1 ข้อมูลและรายละเอียดของตัวอย่างผ้าย้อมครามที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

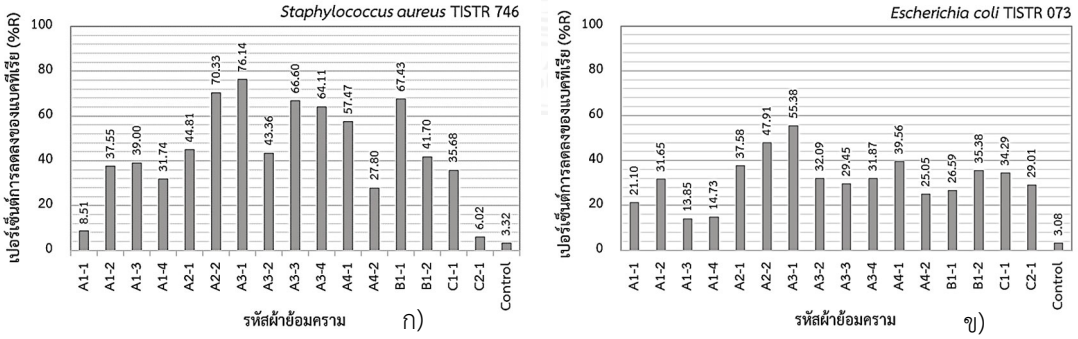
รหัสผ้า	ชนิดผ้าฝ้าย	รูปแบบการทอ	รหัสผ้า	ชนิดผ้าฝ้าย	รูปแบบการทอ
A1-3	ฝ้ายเข็นโรงงาน	2 ตะกอ	A4-1	ฝ้ายเข็นมือ	2 ตะกอ
A1-4	ฝ้ายเข็นโรงงาน	2 ตะกอ	A4-2	ฝ้ายเข็นมือ	2 ตะกอ
A2-1	ฝ้ายเรย่อน (ซีกวง)	2 ตะกอ	B1-1	ฝ้ายเข็นโรงงาน	2 ตะกอ
A2-2	ฝ้ายเรย่อน (ซีกวง)	2 ตะกอ	B1-2	ฝ้ายเข็นโรงงาน	2 ตะกอ
A3-1	ฝ้ายเรย่อน (ซีกวง)	4 ตะกอ	C1-1	ฝ้ายเข็นโรงงาน	2 ตะกอ
A3-2	ฝ้ายเรย่อน (ซีกวง)	4 ตะกอ	C2-1	ฝ้ายเข็นมือ	2 ตะกอ



รูปที่ 2 กิจกรรมการยับยั้งหรือต้าน ก) *S. aureus* TISTR 746 และ ข) *E. coli* TISTR 073 ของผ้าย้อมคราม โดยการศึกษาด้วยวิธี Agar Diffusion Plate Test



รูปที่ 3 ลักษณะการเกิดบริเวณยับยั้ง *S. aureus* TISTR 746 และ *E. coli* TISTR 073 โดยผ้าย้อมครามรหัส A2-2 และ A3-1



รูปที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้าน ก) *S. aureus* TISTR 746 และ ข) *E. coli* TISTR 073 ของผ้าย้อมคราม ตามมาตรฐาน AATCC Test Method 100-2004

3.2 ผลของของความชื้นและค่า pH ของผ้าย้อมครามที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย

จากการศึกษาผลของความชื้น และค่า pH ของผ้าย้อมครามที่มีผลต่อการเจริญของ *S. aureus* TISTR 746 และ *E. coli* TISTR 073 พบว่า ที่ระดับความชื้นที่เพิ่มสูงขึ้นในผ้าย้อมครามมีผลทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ลดลง (ตารางที่ 2) ในขณะที่ผ้าย้อมครามที่มีค่า pH 3.0 พบว่ามีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มากที่สุด รองลงมาคือ pH 9.0, 5.0 และ 7.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) จากการศึกษาผลของความชื้น และค่า pH ของผ้าย้อมครามที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย ชี้ให้เห็นว่าปัจจัยทั้งสองต่างมีผลต่อคุณสมบัติการยับยั้ง *S. aureus* TISTR 746 และ *E. coli* TISTR 073 ของผ้าย้อมครามได้อย่างชัดเจน ระดับความชื้นที่เพิ่มสูงขึ้นถึงร้อยละ 70 ในผ้าย้อมคราม พบว่ามีผลทำให้แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์เจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีความชื้นต่ำกว่า เนื่องจากปริมาณความชื้นมีความเกี่ยวข้องกับแรงดันออสโมติกซึ่งมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียโดยตรง นั่นคือความชื้นซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้ปริมาณน้ำที่มีอยู่ได้ส่งผลต่อค่าความเข้มข้นของสารละลายภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย โดยเมื่อเซลล์เจริญในสภาวะที่มีแรงดันออสโมซิสในภาวะสมดุล เซลล์จะเจริญเป็นปกติ แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อเซลล์เจริญในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารละลายภายนอกเซลล์สูง (สารละลายไฮเปร์โทนิก) หรือต่ำกว่า (สารละลายไฮโปโทนิก) ภายในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เกิดภาวะพลาสโมไลซิส (Plasmolysis) และพลาสมอพไทซิส (Plasmoptysis) ตามลำดับ ในขณะที่ผ้าย้อมครามที่มีค่า pH 3.0 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีที่สุด เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่มักเจริญได้ดีในช่วง pH กลาง (6.5-7.5) และพบน้อยมากที่เจริญได้ในค่า pH ต่ำกว่า 4.0 [17] โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถปรับตัวให้เจริญได้ในช่วงความชื้นหรือค่า pH ที่ต่างกัน ถ้าหากแบคทีเรียเจริญในสภาวะที่ปัจจัยเหล่านี้อยู่นอกช่วงที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ อาจเกิดผลเสียต่อการดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น ความผิดปกติที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ การดูดซึมสารอาหารและแร่ธาตุ และกลไกการสร้าง ATP ในเซลล์บริเวณผนังเซลล์ [17], [18]

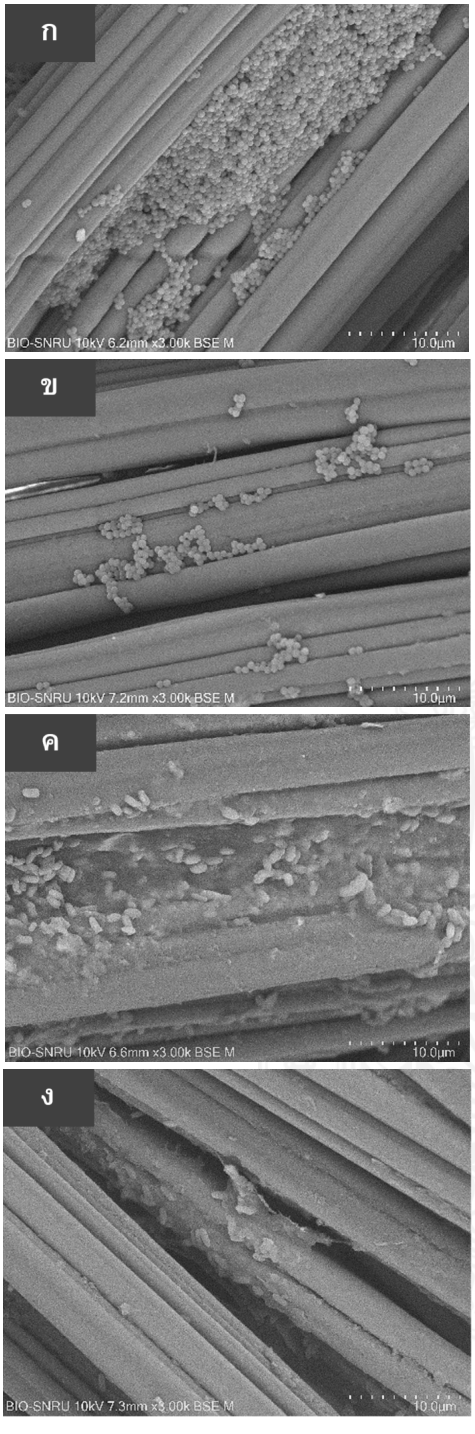
ตารางที่ 2 ผลของความชื้นของผ้าย้อมครามที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	ขนาดของบริเวณยับยั้งที่ระดับความชื้นต่าง ๆ (เซนติเมตร)			
	N	60%	65%	70%
S. aureus TISTR 746	2.48±0.03	2.30±0.00	2.13±0.04	2.06±0.03
E. coli TISTR 073	2.45±0.01	2.34±0.06	2.27±0.04	2.21±0.01

*N คือ ผ้าที่ไม่มีการเติมน้ำกลั่นเพื่อเพิ่มความชื้น เป็นตัวควบคุมการทดลอง (Control)

ตารางที่ 3 ผลของค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของผ้าย้อมครามที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	ขนาดของบริเวณยับยั้งที่ระดับ pH ต่าง ๆ (เซนติเมตร)			
	3.0	5.0	7.0	9.0
S. aureus TISTR 746	2.43±0.04	2.24±0.03	2.17±0.01	2.31±0.04
E. coli TISTR 073	2.40±0.06	2.19±0.01	2.10±0.04	2.29±0.01



รูปที่ 5 ภาพถ่าย SEM ยืนยันผลการทดสอบฤทธิ์ต้าน *S. aureus* TISTR 746 ของผ้าฝ้ายที่ไม่ผ่านการย้อมสี (ก) และผ้าย้อมครามรหัส A3-1 (ข) และการต้าน *E. coli* TISTR 073 ของผ้าฝ้ายที่ไม่ผ่านการย้อมสี (ค) และผ้าย้อมครามรหัส A3-1 (ง) ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า

3.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของผ้าย้อมครามด้วย SEM

ผลการตรวจสอบการเจริญและการคงอยู่ของแบคทีเรียบนตัวอย่างผ้าย้อมครามรหัส A3-1 (รหัสที่ให้ผลทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงมากที่สุด) เปรียบเทียบกับผ้าฝ้ายธรรมชาติที่ไม่มีการย้อมสีใด ๆ ด้วย SEM พบว่าภาพถ่ายจาก SEM สามารถยืนยันลักษณะการเจริญ การเรียงตัว และจำนวนของเซลล์แบคทีเรียที่ลดลงในทั้ง *S. aureus* TISTR 746 และ *E. coli* TISTR 073 ได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 5) โดยเมื่อพิจารณาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าผ้าย้อมครามมีผลต่อการเพิ่มจำนวน รวมถึงการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบการสร้างไบโอฟิล์ม (Biofilm) ของ *E. coli* TISTR 073 บนผ้าย้อมครามและผ้าฝ้ายที่ไม่ผ่านการย้อมสี ซึ่งไบโอฟิล์มเป็นคอมเพล็กซ์ของจุลินทรีย์ที่ยึดติดกับพื้นผิวและห่อหุ้มด้วยสารโพลีเมอร์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นและขับออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular Polymeric Substances, EPS) มีบทบาทหน้าที่ในการป้องกันเซลล์จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญ [19] การก่อตัวของไบโอฟิล์มโดยจุลินทรีย์ ก่อโรคมีส่วนช่วยเพิ่มความอยู่รอดในโฮสต์ และทำให้เกิดการติดเชื้อเรื้อรังที่ทำให้เกิดการอักเสบถาวรและเนื้อเยื่อเสียหายได้ [20] ซึ่งลักษณะการสร้างไบโอฟิล์มบนผ้าย้อมครามของ *E. coli* TISTR 073 นั้นสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่าสารอินดิรูบินที่พบในต้นครามนั้นมีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์หลายชนิด รวมถึงสารสกัดจากพืชหลายชนิดที่พบว่ามีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแกรมลบเช่นกัน [14]

4. สรุป

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของผ้าย้อมครามที่ผลิตและจำหน่ายในจังหวัดสกลนครครั้งนี้ สามารถยืนยันถึงคุณสมบัติของผ้าย้อมครามในการ

ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 746 (แกรมบวก) พบว่าทุกตัวอย่างผ้าย้อมครามที่ผ่านกระบวนการย้อมด้วยครามธรรมชาติครามเคมีและครามผสม (16 ตัวอย่าง) สามารถยับยั้ง *S. aureus* TISTR 746 ได้ หรือคิดเป็นร้อยละ 100 องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดสู่การผลิตผ้าย้อมครามและผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ รวมถึงการขยายผลสู่การสร้างมาตรฐานผ้าย้อมครามในด้านการยับยั้งแบคทีเรียและจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนด้านทุนวิจัยจากทุนสนับสนุนสำหรับบุคลากรมหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

6. เอกสารอ้างอิง

[1] M. Khati, F. Ahmed, I. Shaikh, D. N. Phan, K. Kham, Z. Khati, H. Lee and I. S. Kim, “Dyeing and Characterization of Regenerated cellulose nanofibers with vat dyes,” *Carbohydrate Polymers,* vol. 174, pp. 443-449, Oct. 2017.

[2] D. Chathiphot, “Indigo Dye Fabric: Commodization of Culture in the Tide of Globalization,” *Journal of Thai Studies*, vol. 10, no. 2, pp. 87-153, Aug. 2014- Jan. 2015.

[3] A. Saithong, T. Wanruengrong and U. Sunaprom, “The Development of Indigo - Dyed Cloths’ Pattern for the New Generation People”, *Sakon Nakhon Rajabhat University Journal*, vol. 7, no. 13, pp. 11-20, Jan. – Jun. 2015.

[4] O. Pupatana, “Intensity of Natural Indigo Dyed Cotton Fabrics with UV Protection,” *RMUTI JOURNAL Science and Technology,* vol. 11, no. 2, pp. 129-141, May – Aug. 2018.

[5] P. Chuysoodsakulchai, A. Saithong and A. Phothikanith, “The Study of Underarm Bacterial Inhibition Properties of Indigo Dyed Textiles,” *Sakon Nakhon Graduate Studies Journal*, vol. 7, no. 29, pp. 57-66, Mar.- Apr. 2010.

[6] J. Tapaopong, S. Suwanmanee and N. Luplertlop, “Evaluation of Pathogenic Microorganisms Contaminated in Dermatology Outpatient Clinic During the Midst of Rainy Season,” *Journal of Medicine and Health Sciences,* vol. 22, no. 2, pp. 8-14, Aug. 2015.

[7] S. Li, T. Zhu, J. Huang, Q. Guo, G. Chen and Y. Lai, “Durable Antibacterial and UV-Protective Ag/TiO_2 @ Fabrics for Sustainable Biomedical Application,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 12, pp. 2593–2606, 2017.

[8] G. Pook-In, K. Seansupa and S. Upakut, “Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the Cotton Fabrics Treated with the Crude Finish Produced from *Streptomyces* sp. strain AC4,” *Journal of Food Health and Bioenvironmental Science*, vol. 12, no. 1, pp. 44-53, 2019.

[9] S. Jayapriya and G. Bagyalakshmi, “Textile Antimicrobial Testing and Standards,”

Journal of Textile and Fashion Technology, vol. 4, no. 1, pp. 1-10, 2013.

[10] H. Cui, X. Zhang, H. Zhou, C. Zhao and L. Lin, "Antimicrobial Activity and Mechanisms of *Salvia sclarea* Essential Oil," *Botanical Studies*, vol. 56, pp. 16, 2015.

[11] A.K. Tyagi and A. Malik, "Morphostructural Damage in Food-Spoiling Bacteria due to the Lemon Grass Oil and Its Vapour: SEM, TEM, and AFM Investigations," *Evidence-Based Complementary* and *Alternative Medicine*, vol. 2012, pp. 1-12, 2012.

[12] O. Sangwong, T. Pawong, P. Pudtumma and S. Arthan, "The Simple Natural Indigo fabric test kit by Column Chromato-graphy," *KKU Science Journal,* vol. 47, no. 1, pp. 117-126, 2019.

[13] N. Chanayath, S. Lhieochaiphant and S. Phutrakul, "Pigment Extraction Techniques from the Leaves of *Indigofera tinctorial* Linn. and *Baphicacanthus cusia* Brem. and Chemical Structure Analysis of Their Major Components," *Chiang Mai University Journal,* vol. 1, no. 2, pp. 149-160, 2002.

[14] N. A. Al-Dhabi, C. Balachandran, M. K. Raj, V. Duraipandiyan, C. Muthukumar, S. Ignacimuthu, I. A. Khan and V. S. Rajput "Antimicrobial, Antimycobacterial and Antibiofilm Properties of *Couroupita guianensis* Aubl. Fruit Extract. In *Biofilm Control and Antimicrobial Agent*, S. M. A. Sayem, editor. Oakville, Apple Academic Press, 2014, pp. 223-238.

[15] Y.-R. Chiang, A. Li, Y.-L. Leu, J.-Y. Fang and Y.-K. Lin, "An In Vitro Study of the Antimicrobial Effects of Indigo Naturalis Prepared from *Strobilanthes formosanus* Moore," *Molecules*, vol. 18, no. 11, pp. 14381–14396, 2013.

[16] K. P. Renukadevi and S. S. Sultana, "Detection of Antibacterial, Antioxidant and Cytotoxicity Effect of *Indigofera tinctorial* on Lung Cancer Cell Line NCI-h69," *International Journal* of *Pharmacology*, vol. 7, no. 3, pp. 356-362, 2011.

[17] G. J. Tortora, B. R. Funke and C. L. Case, *Microbiology: An Introduction*, 8th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2004.

[18] L. M. Wheelis, *Principle of Modern Microbiology*. Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers, 2008.

[19] G. Sharma, S. Sharma, P. Sharma, D. Chandola, S. Dang, S. Gupta and R. Gabrani, "*Escherichia coli* Biofilm: Development and Therapeutic Strategies," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 121, pp. 309-319, 2016.

[20] X.-H. Li and J.-H. Lee, "Antibiofilm Agents: A New Perspective for Antimicrobial Strategy," *Journal of Microbiology*, vol. 55, pp. 753–766, 2017.