บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

1.1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Sterile Petri Dishes) ขนาด 50, 90 และ 140 มิลลิเมตร

1.2 ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 250 และ 500 มิลลิลิตร

1.3 หลอดทดลองปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร

1.4 หลอดทดลองฝาเกลียว (Centrifuge Tube) ปริมาตร 15 และ 50 มิลลิลิตร

1.5 หลอดทดลอง (Test Tube) ขนาด 150 × 16 มิลลิเมตร

1.6 Pipette Tip ปริมาตร 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

1.7 Cellulose Acetate Filter ขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร

1.8 Antibiotic Assay Disc (AA disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

1.9 TLC Aluminum Sheets Silica Gel 60 F_{254} (Merck KGaA, Germany)

1.10 ลูปเขี่ยเชื้อ (Inoculated Loop)

1.11 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.12 กระบอกตวง (Cylinder) ปริมาตร 10 และ 500 มิลลิลิตร

1.13 หลอดฉีดยา (Plastic Syringe) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

1.14 ไม้พันปลายสำลีเบอร์ M ที่ปราศจากเชื้อ (Sterile Cotton Swab)

1.15 บีกเกอร์ (Beaker) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

2. เครื่องมือ

2.1 Micropipette P20, P200 และ P1,000 (GILSON, France)

2.2 ตู้บ่ม (Incubator) (TERMARK, Norway)

2.3 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) (TOMY, SS-325, Japan)

2.4 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) (MEMMERT, 700, Germany)

2.5 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow) (SUPER CLEAN, 150VC, Thailand)

2.6 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance) (METTLER, PM6100)

2.7 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) (VORTEX-GENIE 2, G-560E, Switzerland)

2.8 เครื่องไมโครเวฟ (ELECTROLUX, EMM 2005, China)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1 Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco, United State of America)

3.2 Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco, United State of America)

3.3 Mueller Hinton Agar (MHA) (Difco, United State of America)

3.4 Mueller Hinton Broth (MHB) (Himedia, India)

3.5 Sodium Chloride (NaCl) (Univar, New Zealand)

3.6 95% เอทานอล

4. ยาปฏิชีวนะ

4.1 Ampicillin (AM-10) ขนาดบรรจุ 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์

4.2 Cefoxitin (FOX-30) ขนาดบรรจุ 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์

4.3 Erythromycin (E-15) ขนาดบรรจุ 15 ไมโครกรัมต่อดิสก์

4.4 Gentamicin (CN-10) ขนาดบรรจุ 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์

4.5 Oxacillin (OX-1) ขนาดบรรจุ 1 ไมโครกรัมต่อดิสก์

4.6 Tetracycline (TE-30) ขนาดบรรจุ 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์

4.7 Trimethoprim (TMP-5) ขนาดบรรจุ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์

4.8 Vancomycin (V-30) ขนาดบรรจุ 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์

4.9 Oxacillin Sodium Salt Hydrate ชนิดผง (Riedel-deHacR, Germany)

5. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

5.1 แบคทีเรียมาตรฐาน

5.1.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

5.1.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

5.2 แบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ

5.2.1 Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* จำนวน 16 ไอโซเลท

5.2.2 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* จำนวน 25 ไอโซเลท

6. ส่วนสกัดย่อยของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

6.1 กระทือป่า (*Zingiber thorelii* Gagnep.)

6.1.1 ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (Zt-EtOAc)

6.1.2 ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน (Zt-Hx)

6.1.3 ส่วนสกัดย่อยน้ำ (Zt-Aq)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6.2 ขิงแม่โขง (*Zingiber mekongense* Gagnep.)

6.2.1 ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (Zm-EtOAc)

6.2.2 ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน (Zm-Hx)

6.2.3 ส่วนสกัดย่อยน้ำ (Zm-Aq)

6.3 ว่านริดสีดวง (*Curcuma* sp.)

6.3.1 ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท (Cs-EtOAc)

6.3.2 ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน (Cs-Hx)

6.3.3 ส่วนสกัดย่อยน้ำ (Cs-Aq)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

S. aureus ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 (ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา) และ *S.aureus* ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย จำนวน 41 ไอโซเลท ประกอบด้วย Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) จำนวน 25 ไอโซเลท และ Methicillin-Susceptible *S. aureus* (MSSA) จำนวน16 ไอโซเลท (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดวงชีวัน พึ่งสุรินทร์ และศิริวัฒนา ลาภหลาย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา)

ตัวอย่างพืชและการเตรียมตัวอย่างส่วนสกัดจากพืช

ตัวอย่างพืชสมุนไพรวงศ์ขิงข่าจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เหง้ากระทือป่า (*Z. thorelii* Gagnep.) เหง้าขิงแม่โขง (*Z. mekongense* Gagnep.) และ เหง้าว่านริดสีดวง (*Curcuma* sp.) ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนพฤกษศาสตร์ภาคตะวันออก งานสวนพฤกษศาสตร์ ศูนย์การศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนอันเนื่องมาจากโครงการพระราชดำริ ตำบลเขาหินซ้อน อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา ทำการสกัดสารจากเหง้าของพืชสมุนไพรด้วยตัวทำละลายเอทานอลก่อน ต่อจากนั้นนำมาสกัดแยกส่วนด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ตามลำดับ ได้ตัวอย่างส่วนสกัดย่อยของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชทั้งสิ้น 9 ตัวอย่าง ได้แก่ ส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจากกระทือป่า ขิงแม่โขง และว่านริดสีดวง ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากกระทือป่า ขิงแม่โขง และว่านริดสีดวง และส่วนสกัดย่อยน้ำจากกระทือป่า ขิงแม่โขง และว่านริดสีดวง (ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยบูรพา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยบูรพา)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นโดยวิธี Disc Diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี Disc Diffusion (Hanan, 2006 citing CLSI (M100-S9), 1999) ตามมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.1 เตรียมเชื้อทดสอบ

1.1.1 นำแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบจาก Stock Solution ที่เก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียสเลี้ยงในอาหาร TSA โดยวิธีการขีดเชื้อลงผิวหน้าอาหารแข็ง (Streak Plate) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง

1.1.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวมา 5-7 โคโลนี เพาะลงในอาหาร TSB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-4 ชั่วโมง

1.1.3 นำสารแขวนลอยเชื้อในข้อ 1.1.2 มาปรับปริมาณเชื้อให้ได้ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5

1.2 เตรียมสารละลายของส่วนสกัดย่อยของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชสมุนไพร

1.2.1 เตรียม Stock Solution ของส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยน้ำ โดยชั่งส่วนสกัดย่อยของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชแต่ละชนิด ปริมาณ 50 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรให้ครบ 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2.2 บรรจุสารละลายของส่วนสกัดสมุนไพรจากกระทือป่า ขิงแม่โขง และว่านริดสีดวงที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2.1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในแผ่นดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อได้ดิสก์ส่วนสกัดของสมุนไพรเป็น 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ จากนั้นวางทิ้งไว้จนแผ่นดิสก์แห้งเพื่อเตรียมไว้ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นโดยวิธี Disc Diffusion

1.3 ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นของส่วนสกัดย่อยของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชสมุนไพรในการต้านเชื้อ MRSA และ MSSA

1.3.1 ใช้ไม้พันสำลีเบอร์ M ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารแขวนลอยเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1.3 บิดพอหมาดแล้วนำมาป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่เติม 4% NaCl ในแนว 3 ระนาบและตั้งทิ้งไว้สักครู่ แต่ไม่เกิน 15 นาที

1.3.2 คีบแผ่นดิสก์ส่วนสกัดสมุนไพรที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2.2 วางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อกดเบา ๆ ให้แผ่นดิสก์ที่บรรจุส่วนสกัดสมุนไพรดังกล่าวแนบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

และควบคุมคุณภาพของการทดลองโดยใช้ Cefoxitin (FOX) ขนาดบรรจุ 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ เป็นชุดควบคุมผลบวกและดิสก์ที่บรรจุเอทานอลเป็นชุดควบคุมผลลบ

1.3.3 นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุแผ่นดิสก์ส่วนสกัดสมุนไพรจากข้อ 1.3.2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง (ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

1.4 การอ่านผล

ตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของส่วนสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่บริเวณยับยั้ง (Inhibition Zone Diameter) มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร *S. aureus* ATCC 25923 ใช้เป็นชุดควบคุม (ยาปฏิชีวนะ Cefoxitin ของเชื้อต้องมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่บริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 23-29 มิลลิเมตร) บันทึกผลเก็บเป็นข้อมูลเบื้องต้น

2. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะ Oxacillin ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ (Minimal Inhibition Concentration, MIC)

เพื่อตรวจสอบระดับการดื้อยา Methicillin ของเชื้อ MRSA และ MSSA จึงทดสอบหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะ Oxacillin ในการยับยั้ง *S. aureus* ทั้ง 43 ไอโซเลท โดยใช้วิธี Agar Dilution ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI ดังต่อไปนี้ (Palazzo, Rehder, & Darini, 2007 citing CLSI (M100-S17), 2007)

2.1 เตรียม Inoculum ของเชื้อทดสอบ

2.1.1 นำแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบจาก Stock Solution ที่เก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส เลี้ยงในอาหาร TSA โดยวิธีการขีดเชื้อลงผิวหน้าอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.1.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวมา 5-7 โคโลนี เพาะลงในอาหาร TSB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-4 ชั่วโมง

2.1.3 นำมาปรับความขุ่นให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 ด้วย 0.85% NaCl ที่ปราศจากเชื้อได้สารแขวนลอยเชื้อ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.1.4 นำสารแขวนลอยเชื้อจากข้อ 2.1.3 เจือจางด้วยวิธี Ten Fold Dilution ให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.2 เตรียมสารละลายยา Oxacillin

2.2.1 เตรียม Stock Solution ของยา Oxacillin ให้มีความเข้มข้น 10,240 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคำนวณจากค่า HPLC Area ที่กำหนดบนฉลากของ Oxacillin Sodium Salt Hydrate เท่ากับร้อยละ 99.70

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2.2 ชั่ง Oxacillin Sodium Salt Hydrate น้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9.74 มิลลิลิตร ที่คำนวณได้จากข้อ 2.2.1 ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 10,240 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.3 เจือจางยาปฏิชีวนะ Oxacillin ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อด้วยวิธี Two Fold Dilution ได้ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คิดเป็น 20 เท่า ดังนี้ 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1,280, 2,560, 5,120 และ 10,240 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.3 เตรียมอาหาร MHA ที่เติม 4% NaCl ผสม Oxacillin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

2.3.1 นำยาปฏิชีวนะ Oxacillin ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.2.3 เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่เติม 4% NaCl ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1 : 19 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ

2.3.2 ผสมยาปฏิชีวนะ Oxacillin และอาหารเลี้ยงเชื้อให้ผสมกัน จากนั้นเทอาหารที่ผสมยา Oxacillin ลงในจานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

2.4 วิธีทดสอบ

2.4.1 นำจานอาหารจากข้อ 2.3.2 วางทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งก่อนนำไปทดสอบ

2.4.2 ปิเปตเชื้อทดสอบแต่ละไอโซเลทที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1.3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (10^4 เซลล์) หยดลงบนจานอาหาร MHA ที่เติม 4% NaCl ผสมยา Oxacillin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ *S. aureus* ATCC 25923 ซึ่งมีมาตรฐาน MIC ของยา Oxacillin ≤ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Crossley et al., 2009)

2.5 การอ่านผล

ตรวจสอบการเจริญของเชื้อแต่ละไอโซเลทบนจานอาหาร MHA ที่เติม 4% NaCl ผสมยาปฏิชีวนะ Oxacillin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และบันทึกค่า MIC ของยา Oxacillin ต่อเชื้อทดสอบแต่ละไอเลทโดยอ่านผลจากค่าความเข้มข้นของยา Oxacillin ที่ต่ำที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อทดสอบบนผิวหน้าอาหาร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรียทดสอบ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ของตัวอย่างส่วนสกัดจากพืช

การหาค่า MIC ของส่วนสกัดย่อยของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชทั้ง 9 ตัวอย่าง ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ โดยใช้วิธี Modify Agar Dilution ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีมาตรฐานของ CLSI (Sridhar, 2009) มีขั้นตอนดังนี้

3.1 เตรียม Inoculum ของเชื้อทดสอบ

การเตรียม Inoculum ของเชื้อทดสอบปฏิบัติเช่นเดียวกับการหาค่า MIC ของยา Oxacillin ในข้อ 2.1

3.2 เตรียมสารละลายของส่วนสกัดย่อยของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชทั้ง 9 ตัวอย่าง

3.2.1 เตรียม Stock Solution ของส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทโดยชั่งส่วนสกัดของพืชแต่ละชนิดมา 40 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล และปรับปริมาตรให้ครบ 1 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นเป็น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียม Stock Solution ของส่วนสกัดย่อยน้ำโดยชั่งส่วนสกัดย่อยน้ำจากพืชแต่ละชนิดมา 80 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ได้ความเข้มข้นเป็น 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.2 เจือจางส่วนสกัดย่อยของส่วนสกัดเอทานอลทั้ง 9 ตัวอย่างด้วยเอทานอล โดยวิธี Two Fold Dilution ได้ระดับความเข้มข้นของส่วนสกัดย่อยน้ำ คือ 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ได้ระดับความเข้มข้นของส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท คือ 2.5, 5, 10, 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.3 เตรียมอาหาร MHA ที่เติม 4% NaCl ผสมส่วนสกัดย่อยของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชทั้ง 9 ตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

3.3.1 นำส่วนสกัดย่อยของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในข้อ 3.2.2 เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่เติม 4% NaCl ในอัตราส่วน 1 : 19 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ ดังนี้ ส่วนสกัดย่อยน้ำมีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทและส่วนสกัดย่อยเฮกเซนมีระดับความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.125, 0.250, 0.500, 1.000 และ 2.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.3.2 ผสมส่วนสกัดย่อยของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชแต่ละชนิดและอาหารเลี้ยงเชื้อให้ผสมกัน จากนั้นเทอาหารที่ผสมส่วนสกัดลงในจานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.4 วิธีทดสอบ

3.4.1 นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.3.2 มาวางให้ผิวหน้าอาหารแห้งจากนั้น นำแผ่นเยื่อกรอง Cellulose Acetate ขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร ที่ตัดให้มีขนาด 1 × 1 เซนติเมตร วางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลท กดเบา ๆ ให้แผ่นเยื่อกรอง Cellulose Acetate ให้แนบกับอาหาร

3.4.2 ปิเปตเชื้อแต่ละไอโซเลทที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (10^4 เซลล์) หยดลงบนแผ่นเยื่อกรอง Cellulose Acetate บนผิวหน้าอาหารในข้อ 3.4.1 ทิ้งไว้สักครู่ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

<u>หมายเหตุ</u> ชุดควบคุมผลลบใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่เติม 4% NaCl และเอทานอล โดยปราศจากส่วนสกัดจากพืช

ชุดควบคุมคุณภาพของการทดสอบโดยหาค่า MIC ของ Oxacillin ที่ใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมาตรฐาน *S. aureus* ATCC 25923 ควบคู่กับการทดลองทุกครั้ง

3.5 การอ่านผล

ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของส่วนสกัดจากพืชที่ไม่มีเชื้อเจริญบนแผ่นเยื่อกรอง Cellulose Acetate เป็นค่า MIC

การหาค่า MBC ของส่วนสกัดจากพืชทั้ง 9 ตัวอย่าง ทำได้โดยนำแผ่นเยื่อกรอง Cellulose Acetate ที่หยดเชื้อไว้บนจานอาหารที่ตรวจหาค่า MIC ทุกจานที่ไม่มีเชื้อเจริญใส่ลงในอาหารเหลว MHB ที่เติม 4% NaCl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของส่วนสกัดจากพืชที่ไม่มีเชื้อเจริญบนแผ่นเยื่อกรอง Cellulose Acetate และไม่มีเชื้อเจริญเมื่อถ่ายแผ่นเยื่อกรอง Cellulose Acetate ลงใน MHB ที่เติม 4% NaCl เป็นค่า MBC

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. การแยกวิเคราะห์เบื้องต้นเพื่อตรวจหาสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ร่วมกับ Agar Diffusion Bioautography

ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสำคัญในการต้านเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 จากส่วนสกัดย่อยของส่วนสกัดเอทานอลของพืชวงศ์ขิงข่าจำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากกระทือป่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากขิงแม่โขง ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากว่านริดสีดวง ส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจากกระทือป่า ส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจากขิงแม่โขง และส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจากว่านริดสีดวงโดยใช้เทคนิคการแยกสารด้วยวิธี TLC และตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค Agar Diffusion Bioautography ตามวิธีของ (Ha, Nguyen, Nguyen, cheah, & Heng, 2009)

4.1 เตรียมตัวอย่างส่วนสกัดย่อยของส่วนสกัดเอทานอล

4.1.1 ชั่งส่วนสกัดของพืชวงศ์ขิงข่าจำนวน 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 20 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 1 มิลลิลิตร

4.1.2 ผสมส่วนสกัดกับตัวทำละลายให้ผสมกัน ได้ความเข้มข้นของสารละลายส่วนสกัดเป็น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2 เตรียมแผ่น TLC

4.2.1 นำแผ่น TLC Alumina Sheet Silica Gel 60 F_{254} ขนาด 20 × 20 เซนติเมตร ตัดให้มีขนาด 3 × 8 เซนติเมตร

4.2.2 วัดระยะที่ต้องการจุดสารจากขอบด้านล่างและด้านข้างถึงระยะที่ต้องการจุดสารประมาณ 0.5 เซนติเมตร ส่วนขอบด้านบนวัดลงมาประมาณ 0.3 เซนติเมตร

4.2.3 กำหนดจุดตำแหน่งของสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ

4.3 การบรรจุสารตัวอย่างลงบนแผ่น TLC

4.3.1 นำหลอด Capillary จุ่มปลายลงในสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1.2 สารละลายถูกดูดเข้าสู่หลอด Capillary

4.3.2 แตะปลาย Capillary ที่มีสารละลายอยู่ลงเบา ๆ บนแผ่น TLC ณ ตำแหน่งที่ต้องการที่เตรียมไว้ในข้อ 4.2.3 ค่อย ๆ จุดสารซ้ำลงตำแหน่งเดิมประมาณ 20 ครั้ง ควรรอให้ตัวทำละลายระเหยแห้งก่อนการจุดซ้ำครั้งต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.4 เลือกวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม (Mobile Phase)

4.4.1 นำกระบอกตวงปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตวงสารละลายผสมที่เหมาะสม ซึ่งในการทดลองนี้เลือกใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลอะซิเตท

4.4.2 นำสารละลายผสมถ่ายใส่บีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิดให้ผสมทั่วกัน (เลือกอัตราส่วนของตัวทำละลายผสมที่เหมาะสมภายใต้แสงอุตราไวโอเลต โดยสังเกตจากการกระจายตัวของสาร)

4.4.3 นำกระจกนาฬิกาปิดปากบีกเกอร์ ตั้งทิ้งไว้รอจนกว่าสารละลายผสมอิ่มตัวก่อนนำไปใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

4.5 การแยกส่วนสกัดจากแผ่น TLC

4.5.1 หย่อนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้จากข้อ 4.3.2 ลงในบีกเกอร์ที่บรรจุด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อให้เกิดการแยกสารต่าง ๆ ออกจากกันที่เตรียมไว้จากข้อ 4.4.3 (ระวังอย่าให้จุดของสารตัวอย่างจุ่มลงในวัฏภาคเคลื่อนที่)

4.5.2 ปิดบีกเกอร์ด้วยแผ่นกระจกนาฬิกา ปล่อยให้วัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนผ่านแผ่น TLC จากขอบด้านล่างถึงขอบด้านบนที่กำหนดไว้

4.5.3 คีบแผ่น TLC ขึ้นทิ้งให้แห้งก่อนนำมาตรวจสอบดูจุดต่าง ๆ ที่ปรากฏบนแผ่น TLC ต่อไป

4.6 การตรวจพบสาร

4.6.1 นำแผ่น TLC จากข้อ 4.5.3 มาส่องภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบจุดสารต่าง ๆ ที่แยกบนแผ่น TLC เป็นจุดทึบแสงสีม่วง

4.6.2 ทำเครื่องหมายรอบจุดทึบแสงด้วยดินสอบาง ๆ บริเวณขอบที่ตรวจพบบนแผ่น TLC ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

4.7 เตรียมเชื้อทดสอบ

4.7.1 นำแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบจาก Stock Solution ที่เก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงในอาหาร TSA โดยวิธีการขีดเชื้อลงผิวหน้าอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.7.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวมา 5-7 โคโลนีเพาะลงในอาหาร TSB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-4 ชั่วโมง

4.7.3 นำเชื้อมาปรับปริมาณเชื้อให้ได้ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.8 ตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดด้วยเทคนิค Agar Diffusion Bioautography

4.8.1 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อเบอร์ M จุ่มลงในสารแขวนลอยเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 4.7.3 ป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร MHA ที่เติม 4%NaCl ในแนว 3 ระนาบ ทิ้งไว้สักครู่แต่ไม่เกิน 15 นาที

4.8.2 คีบแผ่น TLC ที่เตรียมไว้จากข้อ 4.6.2 วางปิดทับลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 4.8.1

4.8.3 คว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุแผ่น TLC ทิ้งไว้ประมาณ 60 นาที พร้อมวาดตำแหน่งแผ่น TLC และจุดทึบแสงที่ตรวจพบบนแผ่น TLC ไว้ด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.8.4 เมื่อครบ 60 นาที คีบแผ่น TLC ออกก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.9 ตราจพบฤทธิ์ระยะทางการเคลื่อนที่ของส่วนสกัดจากพืชวงศ์ขิงข่าบางชนิดในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์มาตรฐาน 2 สายพันธุ์

4.9.1 เมื่อครบเวลาการบ่มเชื้อ วิเคราะห์ผลโดยดูจากบริเวณที่ปรากฏส่วนใสบนผิวหน้าอาหารจากข้อ 4.8.4 บริเวณจุดของสาร

4.9.2 วัดระยะทางของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยคำนวณเป็นค่า R_f ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

R_f = ระยะทางของสารเคลื่อนที่จากตำแหน่งเริ่มต้นถึงจุดกึ่งกลางของ Spot ต่อระยะทางที่เฟสเคลื่อนที่จากตำแหน่งเริ่มต้นถึงตำแหน่งสุดท้าย

5. ศึกษาแบบแผนความไวของยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อ MSSA และ MRSA เมื่อทดสอบในอาหารที่เติมส่วนสกัดย่อยของส่วนสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ขิงข่า

ค่า MIC จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของส่วนสกัดเอทานอลจากพืช 3 ชนิดแสดงการออกฤทธิ์ต่อการต้านเชื้อดีที่สุดในการทดลอง ในขั้นตอนนี้จึงเลือกใช้ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมาศึกษาแบบแผนความไวของยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ เมื่อทดสอบในอาหารที่เติมส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากพืชทั้ง 3 ชนิด ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ในการศึกษาแบบแผนความไวของยาปฏิชีวนะในการต้านเชื้อ MSSA และ MRSA เมื่อทดสอบในอาหารที่เติมส่วนสกัดย่อยของพืชสมุนไพร โดยมุ่งศึกษาการเปลี่ยนแปลงแบบแผนความไวของยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ในการออกฤทธิ์ร่วมกันต่อการแสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ MSSA และ MRSA สายพันธุ์มาตรฐานใช้ *S. aureus* ATCC

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 ตามลำดับโดยวิธี Agar Disc Diffusion ตามวิธีของ Rand and Houck (2004)

5.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

แบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทดสอบ คือ *S. aureus* สายพันธุ์มาตรฐาน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 ซึ่งมีค่า MIC ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากกระทือป่า ขิงแม่โขง และว่านริดสีดวงเท่ากับ 500, 1,000 และ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ*S. aureus* ATCC 43300 ที่มีค่า MIC ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของเอทานอลจากกระทือป่า ขิงแม่โขง และว่านริดสีดวงเท่ากับ 500, 500 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

5.2 วิธีทดสอบ

5.2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่เติม 4% NaCl และผสมส่วนสกัดจากพืชที่ต้องการทดสอบให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MIC, 1/16 MIC, 1/32 MIC และ 1/64 MIC สำหรับแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

5.2.2 ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มแบคทีเรียทดสอบที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหาร TSB และปรับความขุ่นให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 นำมาป้ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 5.2.1 ทิ้งไว้สักครู่ แต่ไม่เกิน 15 นาที

5.2.3 คีบแผ่นยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Ampicillin (AM-10), Erythromycin (E-15), Cefoxitin (FOX-30), Gentamicin (CN-10), Oxacillin (OX-1), Tetracycline (Tc-30), Trimethoprim (TMP-5) และ Vancomycin (V-30) วางบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วกดเบา ๆ ให้แผ่นยาปฏิชีวนะแนบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ

5.2.4 ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 5.2.2 และ 5.2.3 แต่เปลี่ยนอาหารทดสอบเป็น MHA ที่เติม 4% NaCl แต่ไม่ผสมส่วนสกัด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง

5.2.5 บันทึกผลการทดลอง โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่บริเวณยับยั้งในหน่วยมิลลิเมตร

5.2.6 เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่บริเวณยับยั้งในจานอาหารที่เติมส่วนสกัดจากพืชและจานอาหารที่ไม่เติมส่วนสกัดจากพืช โดยวิธี Student's Pair *t*-test

หมายเหตุ ในขั้นตอนการเตรียมส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากพืชทั้ง 3 ชนิด เพื่อนำมาใช้ศึกษาแบบแผนความไวของยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 2 สายพันธุ์ เลือกใช้ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทที่ระดับความเข้มข้น 1/16 MIC

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เนื่องจากเมื่อได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาแบบแผนความไวของยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 2 สายพันธุ์พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 1/2 MIC, 1/4 MIC และ 1/8 MIC ไม่สามารถตรวจผลได้ เนื่องจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่บริเวณยับยั้งของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดมีขนาดกว้างจนไม่สามารถวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่บริเวณยับยั้งได้ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 1/32 MIC และ 1/64 MIC พบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่บริเวณยับยั้งของยาปฏิชีวนะบางชนิดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่บริเวณยับยั้งไม่แตกต่างจากในสภาวะที่ไม่เติมส่วนสกัด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากกระทือป่า ขิงแม่โขง และว่านริดสีดวงที่ระดับความเข้มข้น 1/16 MIC

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University