บทที่ 3
วิธีการทดลอง

ขั้นตอนการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลพืช

ผลพืชที่ใช้ทดสอบ

1. เทียนข้าวเปลือก (*Foeniculum vulgare* Mill)
2. ผักชี (*Coriandrum sativum* Vern. Dhania)
3. เทียนตาตั๊กแตน (*Anethum graveolens* Linn.)
4. เทียนขาว (*Cuminum cyminum* Linn.)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Stereomicroscope
2. ใบมีดโกน
3. แผ่นสไลด์

วิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลพืช

1. ใช้ใบมีดโกน cross section ผลพืชแต่ละชนิด ให้มีลักษณะบางและสมบูรณ์
2. นำส่วนที่ได้วางบนกระจกสไลด์
3. กระจกสไลด์ไปส่องดูภายใต้กล้อง Stereomicroscope
4. สังเกตภาพที่เห็นไปเปรียบเทียบกับเอกลักษณ์ของผลพืชในหนังสือเครื่องเทศของ นิจศิริ เรืองรังษี
5. บันทึกภาพโดยกล้องถ่ายรูป

ขั้นตอนการสกัดน้ำมันหอมระเหย

สารเคมี

1. น้ำกลั่น

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Round bottom flask
2. Heating mantle
3. Condenser
4. Separating funnel
5. Cooling bath
6. Vial

วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย

1. เปิดเครื่อง cooling bath ประมาณ 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้เครื่องเย็น
2. นำผลพืชที่ต้องการทดสอบใส่ใน round bottom flask แล้วเติมน้ำพอท่วม
3. ต่อ condenser กับ round bottom flask และอีกด้านต่อกับ separating funnel
4. เปิดเครื่อง heating mantle ตั้งอุณหภูมิที่ 200 °C
5. กลั่นเรื่อยๆ จนน้ำมันหอมระเหยหมด
6. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและไขน้ำมันหอมระเหยออกจาก separating funnel ใส่ใน vial
7. เก็บ vial ที่บรรจุน้ำมันหอมระเหยในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-10 °C เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

ขั้นตอนการหาองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหย

สารเคมี

1. Dichloromethane (redistillation commercial grade)
2. Helium (Thai Industrial Gas)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Gas Chromatography (Varian Star 3400 CX , USA)
2. Mass Spectometer (Saturn 3, USA)
3. Capillary column:DB5-MS;30m×0.25 mm film thickness (J&W Scientific, USA)
4. เข็มฉีด (HAMILTON COMPANY, USA)

วิธีการหาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหย

1. ปิเปตน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 20 ไมโครลิตร
2. เติม dichloromethane ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
3. นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC-MS ใช้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
4. นำกราฟที่ได้ไปวิเคราะห์ แล้วนำไปเทียบ mass spectra กับ literature data (N IST)

Condition GC- MS

Carrier gas:	Helium (flow 1.4 ml/ min)
Capillary column:	(DB5- MS; 30 m × 0.251 mm i.d., 0.25 mm film thickness)
อุณหภูมิของ injector และ detector:	260 °C
Oven temperature program:	อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 3 นาที และเพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 3 °C ต่อนาที จนอุณหภูมิ 150 °C และ ให้คงอุณหภูมิ 150 ° C ไว้ 15 นาที
Ion mode:	EI
Fil/ Mul delay:	5.00 นาที

ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

สารเคมี

1. Nutrient Agar (NA) (Lot No. V330150, Merk. Germany)
2. Nutrient Broth (NB) (Lot No. V921143, Merk. Germany)
3. Tryptic Soy Agar (TSA) (Lot No. V125358, Merk. Germany)
4. Tryptic Soy Broth (TSB) (Lot No. V169759, Merk. Germany)
5. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Lot No. VK474038, Merk. Germany)
6. Sabouraud Dextrose Broth (SDB) (Lot No. VL700339, Merk. Germany)
7. Sodium chloride (NaCl) (Lot No. K28555404, Merk. Germany)
8. 70% Ethanol (Commercial grade, Rattana trading, Thailand)
9. Tween 80
10. น้ำกลั่น

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Paper disc (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร) (Lot No. 2017006, Whayman International Ltd., England)
2. Pipette –man ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Gilson Medicol Electronic., France)
3. Hot air oven (Memmert)
4. Autoclave ACV-3167 (IWAKI glass Co. Ltd., Japan)
5. Lamina airflow (Forma Scientific 11185., USA)
6. Hot plate (nuova II STIR Plate, Thermolyke®)
7. Vernier caliper (Whale serial No. 4396, China)
8. Vertex (Scientific industries, INC., USA)
9. Spectrophotometer (cecil instruments., England)
10. Dispenser 511 (socorex, Swiss)
11. Tip ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร
12. Beaker
13. Erlenmayer flask
14. Petri dish
15. Sonicate
16. Forceps
17. Test tube
18. Magnetic bar
19. Inoculation loop
20. เครื่องชั่ง

21. แท่งแก้วรูปตัวแอล
22. กระดาษสีน้ำตาล
23. ตะเกียงแอลกอฮอล์

พืชสมุนไพรที่ทดสอบ

ซื้อผลพืชจากร้านขายยาสมุนไพรเจ้าคุณเป้อ กรุงเทพมหานคร ช่วงเดือนกรกฎาคม 2545

เชื้อจุลชีพที่ทดสอบ

S. aureus, *E. coli* และ *C. albicans* ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

Diffusion method

เชื้อที่ใช้ทดสอบ	- *S. aureus*
สารทดสอบ	- น้ำมันหอมระเหย
อาหารเลี้ยงเชื้อ	- Tryptic Soy Agar (TSA)

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร) (11)

Trypticase (animal peptone)	15.0
Phyptone (soy peptone)	5.0
NaCl	5.0
Agar	15.0
Water q.s. to	1.0

วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่ง TSA 40 กรัม (40 กรัม/ลิตร) นำน้ำ 1 ลิตร ใส่ในบีกเกอร์ตั้งบน hot plate รอจนน้ำร้อน แล้วค่อยๆ โปรย TSA ลงไป และใช้ magnetic bar คนจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส ระวังอย่าให้เกิดฟอง ถ่ายอาหารลง erlenmayer flask แล้วปิดฝาหลวมๆ นำ erlenmayer flask เข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in^2 เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลา ตวงอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตร เทลงในจานเพาะเชื้อ (อาหารเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตร/จานเพาะเชื้อ 1 อัน)

วิธีเตรียมเชื้อ

เตรียม lamina airflow ที่เช็ดด้วย 70% alcohol และเปิด UV light นาน 30 นาที นำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA slant ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง ใช้ inoculation loop เผาไฟจนร้อนแดง รอให้เย็น แล้วเขี่ยเชื้อในหลอดเลี้ยงเชื้อ กระจายใน 0.9% NaCl เขย่าให้เชื้อกระจายให้ทั่ว เปรียบเทียบให้ความขุ่นเท่า Mac Farland No. 0.5

เชื้อที่ใช้ทดสอบ - *E. coli*

สารทดสอบ - น้ำมันหอมระเหย

อาหารเลี้ยงเชื้อ - Nutrient Agar (NA)

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร) (11)

Beef extract	3.0
Peptone	5.0
Agar	15.0
Water q.s. to	1.0
pH	6.8-7.2

วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่ง NA 20 กรัม (20กรัม/ลิตร) นำน้ำ 1 ลิตร ใส่ในบีกเกอร์ตั้งบน hot plate รอจนน้ำร้อน แล้วค่อยๆ โปรย NA ลงไป และใช้ magnetic bar คนจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส ระวังอย่าให้เกิดฟอง ถ่ายอาหารลง erlenmayer flask แล้วปิดฝาหลวมๆ นำ erlenmayer flask เข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in^2 เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลา ตวงอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตร เทลงในจานเพาะเชื้อ (อาหารเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตร/จานเพาะเชื้อ 1 อัน)

วิธีเตรียมเชื้อ

เตรียม lamina airflow ที่เช็ดด้วย 70% alcohol และเปิด UV light นาน 30 นาที นำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร NA slant ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง ใช้ inoculation loop เผาไฟจนร้อนแดง รอให้เย็น แล้วเขี่ยเชื้อในหลอดเลี้ยงเชื้อ กระจายใน 0.9% NaCl เขย่าให้เชื้อกระจายให้ทั่ว เปรียบเทียบให้ความขุ่นเท่า Mac Farland No. 0.5

เชื้อที่ใช้ทดสอบ -*C. albicans*

สารทดสอบ - น้ำมันหอมระเหย

อาหารเลี้ยงเชื้อ - Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร) (9)

Dextrose	40.0
Peptone	10.0
Agar	20.0
Water q.s. to	1.0
pH	5.6

วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่ง SDA 65 กรัม (65กรัม/ลิตร) นำน้ำ 1 ลิตร ใส่ในบีกเกอร์ตั้งบน hot plate รอจนน้ำร้อน แล้วค่อยๆ โปรย SDA ลงไป และใช้ magnetic bar คนจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส ระวังอย่าให้เกิดฟอง ถ่ายอาหารลง erlenmayer flask แล้วปิดฝาหลวมๆ นำ erlenmayer flask เข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in^2 เป็นเวลา15 นาที เมื่อครบเวลา ตวงอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตร เทลงในจานเพาะเชื้อ (อาหารเลี้ยงเชื้อ

20 มิลลิลิตร/จานเพาะเชื้อ 1 อัน)

วิธีเตรียมเชื้อ

เตรียม lamina airflow ที่เช็ดด้วย 70% alcohol และเปิด UV light นาน 30 นาที นำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร SDA slant ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง ใช้ inoculation loop เผาไฟจนร้อนแดง รอให้เย็น แล้วเขี่ยเชื้อในหลอดเลี้ยงเชื้อ กระจายใน 0.9% NaCl เขย่าให้เชื้อกระจายให้ทั่ว เปรียบเทียบให้ความขุ่นเท่า Mac Farland No. 0.5

วิธีเตรียมสารสกัด

ปิเปตน้ำมันหอมระเหยของผลพืชแต่ละชนิด 20 ไมโครลิตร หยดลงบน paper disc ที่ปราศจากเชื้อ ทิ้งไว้จน paper disc แห้ง

วิธีการทดลอง

นำเชื้อที่เตรียมเป็น suspention มา 0.40 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วจานเพาะเชื้อ และนำ paper disc ที่มีสารสกัดที่เตรียมไว้ วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง

Dilution method

เชื้อที่ใช้ทดสอบ	*S. aureus*
สารทดสอบ	น้ำมันหอมระเหย
อาหารเลี้ยงเชื้อ	Tryptic Soy Broth (TSB)
ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร) (11)	
Trypticase (animal peptone)	17.0
Phytone (soy peptone)	3.0
NaCl	5.0
K_2HPO_4	2.5
Glucose	2.5
Water q.s. to	1.0

วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่ง TSB 30 กรัม (30 กรัม/ลิตร) นำน้ำ 1 ลิตร ใส่ในบีกเกอร์ตั้งบน hot plate รอจนน้ำร้อน แล้วค่อยๆ โปรย TSB ลงไป และใช้ magnetic bar คนจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส ระวังอย่าให้เกิดฟอง ถ่ายอาหารลงใน test tube ปริมาณ 4 มิลลิลิตร อุดด้วยสำลีและหุ้มด้วยกระดาษสีน้ำตาล นำเข้า autoclave อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in^2 เป็นเวลา 15 นาที

วิธีเตรียมเชื้อ

เหมือนวิธีเตรียมเชื้อ *S. aureus* ในวิธี Diffusion

เชื้อที่ใช้ทดสอบ - *E. coli*

สารทดสอบ - น้ำมันหอมระเหย

อาหารเลี้ยงเชื้อ - Nutrient Broth (NB)

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร) (11)

Beef extract	3.0
Peptone	5.0
Water q.s. to	1.0
pH	7

วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่ง NB 8 กรัม (8 กรัม/ลิตร) นำน้ำ 1 ลิตร ใส่ในบีกเกอร์ตั้งบน hot plate รอจนน้ำร้อน แล้วค่อยๆ โปรย NB ลงไป และใช้ magnetic bar คนจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส ระวังอย่าให้เกิดฟอง ถ่ายอาหารลงใน test tube ปริมาณ 4 มิลลิลิตร อุดด้วยสำลีและหุ้มด้วยกระดาษสีน้ำตาล นำเข้า autoclave อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in^2 เป็นเวลา 15 นาที

วิธีเตรียมเชื้อ

เหมือนวิธีเตรียมเชื้อ *E. coli* ใน Diffusion

เชื้อที่ใช้ทดสอบ - *C.albicans*

สารทดสอบ - น้ำมันหอมระเหย

อาหารเลี้ยงเชื้อ - Sabouraud Dextrose Broth (SDB)

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร) (9)

Dextrose	40.0
Peptone	10.0
Water q.s. to	1.0
pH	5.6

วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชั่ง SDB 30 กรัม (30 กรัม/ลิตร) นำน้ำ 1 ลิตร ใส่ในบีกเกอร์ตั้งบน hot plate รอจนน้ำร้อน แล้วค่อยๆ โปรย SDB ลงไป และใช้ magnetic bar คนจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อใส ระวังอย่าให้เกิดฟอง ถ่ายอาหารลงใน test tube ปริมาณ 4 มิลลิลิตร อุดด้วยสำลีและหุ้มด้วยกระดาษสีน้ำตาล นำเข้า autoclave อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb/in^2 เป็นเวลา 15 นาที

วิธีเตรียมเชื้อ

เหมือนวิธีเตรียมเชื้อ *C. albicans* ในวิธี Diffusion

วิธีเตรียมน้ำมันหอมระเหย

ปิเปตน้ำมันหอมระเหยของผลพืชแต่ละชนิดลงใน test tube โดยให้มีความเข้มข้นเป็น 0.01 มิลลิลิตร/มิลลิลิตร ใช้ตัวทำละลายคือ tween 80 ปริมาตร 1 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

1. นำหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการสเตอริไลด์ มาจำนวน 8 หลอด
2. ปิเปตน้ำมันหอมระเหย ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1 เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vertex
3. ปิเปตสารหลอดที่ 1 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 2 เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vertex
4. ทำเช่นเดียวกันต่อไปจนถึงหลอดที่ 8 ปิเปตสารจากหลอดที่ 8 ทิ้งไป 4 มิลลิลิตร
5. หลอด control ให้ใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อ
6. ปิเปตเชื้อปริมาตร 0.40 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด
7. นำหลอดทดลองทั้งหมดไปเพาะบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง