บทที่ 3
วิธีการที่ใช้ในการศึกษา

1. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี

1. Methanol
2. Mueller-Hinton broth (MHB)
3. Agar
4. Tween 80
5. 0.85 % NaCl
6. blood agar base
7. nutrient broth (NB)
8. Essential oils
9. Plate Count Agar (PCA)
10. Dimethylsulfoxide (DMSO)
11. น้ำกลั่น

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย
2. seperatory funnel
3. micropipette
4. petri dishes
5. erlenmyer flask
6. aluminium foil
7. sample vial
8. เศษกระเบื้องชิ้นเล็ก
9. test tube
10. tips
11. loop
12. ถุงมือ
13. สำลี
14. ตะเกียง
15. ตะแกรงวางหลอดทดลอง
16. appent drop
17. vortex
18. paper disc
19. gentamicin disc
20. multi-inoculator
21. แท่งแก้วสามเหลี่ยม
22. เครื่อง autoclave
23. เครื่อง hot air oven
24. เครื่องวัดความขุ่นโดยแสง (Spectronic Geneys™5: Milton Roy Company, USA)
25. Larminar Air Flow (Holten Larminar, HVR2472 NO 044279A, Denmark)
26. Larminar Air Flow class II
27. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorious, MG1 Laboratory LC6200S, Scientific Promotion Co., Ltd., Thailand)
28. ตู้บ่มเชื้อ (Refrigerated incubator : Innova™ 4230)
29. Refrigerated incubator shaker (Innova™4330)
30. Vernier calipe

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมน้ำมันระเหยง่ายจากพืช

ผู้ทดลองซื้อตัวอย่างพืชจากร้านขายสมุนไพรภายในวัดพระศรีรัตนมหาธาตุ จังหวัดพิษณุโลก ในระหว่างเดือนมิถุนายน-สิงหาคม โดยเป็นพืชสมุนไพรที่มีแหล่งปลูกในเขตภาคเหนือตอนล่าง การเตรียมพืชเพื่อทดสอบทำได้โดยการนำเหง้าพืชสดที่ได้มาล้างให้สะอาดและนำมาหั่นให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นนำไปกลั่นด้วยเครื่อง Clevenger-type apparatus ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydrodistillation) โดยมีวิธีการกลั่นดังนี้

ใส่ boiling ship ลงใน round-bottom flask

↓

นำพืชที่หั่นแล้วใส่ลงใน round-bottom flask ประมาณครึ่งหนึ่งของ round-bottom flask

↓

ใส่น้ำกลั่นให้พอท่วมพืช

↓

นำ round-bottom flask ตั้งบน heating mantle

↓

เมื่อให้ความร้อนไปช่วงเวลาหนึ่งจะมีไอน้ำควบแน่นที่บริเวณคอ round-bottom flask ให้ลดอุณหภูมิลง

↓

นำกรวยแยกมารองรับเมื่อมีการควบแน่นเกิดขึ้น ปรับอุณหภูมิตามความเหมาะสม เพื่อให้ของเหลวที่กลั่นได้ไหลออกมาเป็นหยดไม่ช้าหรือเร็วเกินไป

↓

นำฟอยล์มาห่อกรวยแยกหรือเก็บไว้ในที่พ้นแสง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 วันเพื่อให้น้ำและน้ำมันแยกชั้น

↓

แยกน้ำมันใส่ขวดสีชาเก็บในตู้เย็นช่องปกติ

เมื่อต้องการเปลี่ยนชนิดของพืชที่กลั่น ให้ล้าง joint และเครื่องแก้วต่างๆ ด้วยน้ำยาล้างเครื่องแก้ว แล้วกลั้วเครื่องแก้วด้วย methanol รอให้แห้งแล้วนำไปใช้ได้ ส่วน condenser ไม่ต้องล้างน้ำ แต่ให้กลั้วด้วย methanol แล้วเป่าด้วยเครื่องเป่าให้แห้ง จนไม่มีกลิ่นน้ำมันระเหยง่ายชนิดเดิมอยู่

25 1
2 8 มี.ค. 2551
ก17 00 ก8

2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 3 สายพันธุ์ คือ MRSA BH1, MRSA BH2 และ MRSA BH3 จากโรงพยาบาลพุทธราช จังหวัดปทุมธานี, *Pseudomonas aeruginosa* 3 สายพันธุ์ คือ DMST 21226, DMST 21135 และ DMST 27853, *Acenitobacter baumannii* สายพันธุ์ DMST 11536, DMST 17699 และ DMST 8583 และ *Streptococcus pneumoniae* 1916 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

การศึกษาครั้งนี้ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยใช้วิธี agar disc diffusion method เพื่อวัดขนาดโซนใสที่เกิดขึ้น โดยโซนใสที่เกิดขึ้นจะแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย การทดสอบวิธีนี้ประหยัด และใช้เวลาน้อย แต่เป็นการทดสอบเชิงคุณภาพไม่สามารถใช้เปรียบเทียบความแรงของฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ และวิธี agar dilution method ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ทดสอบหาค่า Minimum inhibitory Concentration (MIC) โดยจะแสดงถึงความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันระเหยง่ายที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ และวิธีนี้เป็นการทดสอบเชิงปริมาณสามารถใช้เปรียบเทียบความแรงของฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันระเหยง่ายที่นำมาทดสอบได้

2.3.1 agar disc diffusion method

- **การเตรียมเชื้อที่มีความเข้มข้น** 10^8 cfu/mL (**สำหรับ** MRSA, *Pseudomonas aeruginosa* **และ** *Acenitobacter baumannii)*

นำโคโลนีของแบคทีเรียมา เพิ่มจำนวนในอาหารเหลว (NB) 50 mL

↓

บ่มเชื้อไว้ในตู้บ่ม (Refrigerated incubator) ที่อุณหภูมิ 37 °C
ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

นำเชื้อที่บ่มไว้มาเจือจางด้วยน้ำเกลือแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.08-0.10
ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml

↓

เมื่อได้ความเข้มข้นของเชื้อตามต้องการ นำเชื้อไปกระจายให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้สำลีพันก้าน
ด้วยวิธี spread plate technique

↓

นำ disc ยามาตรฐาน 1 แผ่นและ paper disc ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว 2 แผ่นวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
โดยเว้นระยะห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 - 2 **ซม. ห่างระหว่าง** disc 2 **ซม.**

↓

หยดน้ำมันระเหยง่ายปริมาณ 10 μL **ลงบน** paper disc

↓

นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C **เป็นเวลา** 24 **ชั่วโมง**

- ***การเตรียมเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^8 cfu/mL (สำหรับ Streptococcus pneumonia)***

นำ loop ป้ายเชื้อมา 1 โคโลนี ถ่ายเชื้อลงใน NaCl 0.85 %

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.08-0.10 ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml

↓

เมื่อได้ความเข้มข้นของเชื้อตามต้องการ นำเชื้อไปกระจายให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้สำลีพันก้าน ด้วยวิธี spread plate technique

↓

นำ disc ยามาตรฐาน 1 แผ่นและ paper disc ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว 2 แผ่นวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเว้นระยะห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 - 2 ซม. ห่างระหว่าง disc 2 ซม.

↓

หยดน้ำมันระเหยง่ายปริมาณ 10 µL ลงบน paper disc

↓

นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อ (Refrigerated incubator) อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.2 agar dilution method

- ***การเตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อ***

ชั่งผง MHB ลงในบีกเกอร์อะลูมิเนียมตามต้องการ (21 กรัม: 1 ลิตร) ผสม agar 1.5 % w/v และ tween 80 ปริมาณ 0.5 % w/v

↓

ผสมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรตามต้องการนำไปต้มบน hot plate จนอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ากัน สังเกตได้จากสารละลายจะใสเป็นเนื้อเดียวกัน

↓

ใช้กระบอกฉีดยาดูดอาหารเลี้ยงเชื้อถ่ายลงหลอดทดลองปริมาณ 19 มล.

↓

จุกสำลีและปิดกระดาษมัดหนังยางให้แน่น

↓

นำ DMSO ใส่หลอดทดลอง จุกสำลีและปิดกระดาษมัดหนังยางให้แน่น

↓

นำ DMSO และ หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อไปฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave
ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

↓

นำ DMSO และหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อออกมา รอจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ
มีอุณหภูมิประมาณ 50 °C

↓

เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำมันระเหยง่ายดังนี้

ตารางที่ 3-1 แสดงความเข้มข้นของน้ำมันระเหยง่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ความเข้มข้นของน้ำมันระเหยง่าย (%v/v)	ปริมาณ MHA (mL)	ปริมาณ DMSO (mL)	**ปริมาณน้ำมันระเหยง่าย** (mL)
5	19	0	1.000
2.5	19	0.500	0.500
1.25	19	0.750	0.250
0.625	19	0.875	0.125
0.312	19	0.938	0.062
0	19	0	0

- ***การเตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ MIC และวิธีทดสอบหาค่า MIC***

เตรียมเชื้อที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^7 cfu/mL

↓

นำเชื้อที่ต้องการทดสอบแต่ละสายพันธุ์ใส่ลงในหลุมของเครื่อง multi-inoculators

↓

นำขาของเครื่อง multi-inoculators จุ่มลงในส่วนหลุมใส่เชื้อจากนั้นถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
โดยให้ตำแหน่งของเชื้อตรงกับที่ระบุไว้บนเพลท

↓

นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่ตู้อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
(สำหรับ *Streptococcus pneumonia* บ่มในตู้ CO_2)

- ***การนับจำนวนโคโลนี***

นำเชื้อความเข้มข้น 10^8 cfu/mL ที่เตรียมไว้สำหรับการทดสอบฤทธิ์มาเจือจาง

ให้ได้สัดส่วน 1:10^4 และ 1:10^5 ใน appent drop

↓

นำเชื้อที่เตรียมจากข้อ 1 มา 100 µL กระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA

(สำหรับ *Streptococcus pneumoniae* ใช้ BAB)

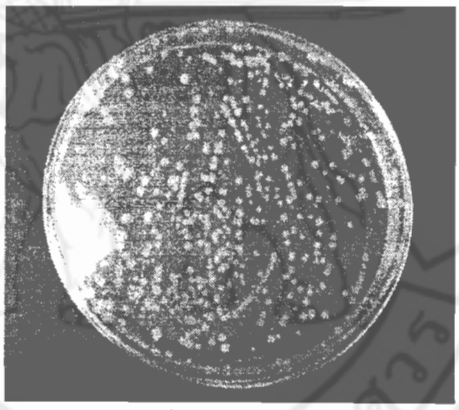
↓

นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่ตู้อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(สำหรับ *Streptococcus pneumoniae* บ่มในตู้ CO_2)

↓

นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อมานับจำนวนโคโลนี



รูปที่ 3-1 รูปแสดงโคโลนีของแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

- ***การวัดขนาดโซนใส***

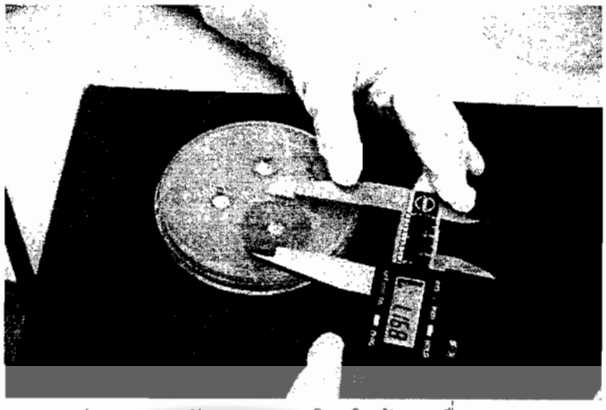
นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มครบ 24 ชั่วโมงแล้วมาวัดโซนใสด้วยเครื่อง Vernier Caliper

↓

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสรวมกับ paper disc ในกรณีที่โซนมีรูปร่างกลมวัด 2 ครั้ง นำมาหาค่าเฉลี่ย

↓

ในกรณีที่โซนมีรูปร่างไม่กลมทำการวัดมากกว่า 2 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย



รูปที่ 3-2 รูปแสดงการวัดขนาดของโซนใสด้วยเครื่อง Vernier Caliper

มหาวิทยาลัยนเรศวร