บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหย (Clevenneaur apparatus)

เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง model L 2200 P ของบริษัท Scientific Industries, Inc. จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) model SS - 325 ของบริษัท TOMY Seiko จำกัด ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) model 240 ของบริษัท P. Intertrade Equipments จำกัด

ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina flow) model H - 122 ของบริษัท International Scientific Supply จำกัด กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

ตู้อบ (Oven) model Contherm series five ของบริษัท แล็ป โฟกัส จำกัด

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV - Visible Spectrophotometer) model Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

Homogenizer

กล้องจุลทรรศน์

ตู้เก็บเชื้อ (- 20 ^{o}C) model Sanyo Medical Freezer

เครื่อง Gas Chromatography model GC - 8000 ของบริษัท Fisons Instruments จำกัด ประเทศสหราชอาณาจักร

เครื่อง Mass Spectrometer model MD - 800 ของบริษัท Fisons Instruments จำกัด ประเทศสหราชอาณาจักร

Column DB - 1 fused silica capillary, Polyethylene Glycol ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.1 ไมครอน

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เครื่องเก็บสารลำดับส่วน (Fraction Collector) model FC 203 B ของบริษัท Gilson จำกัด

Pump model 510 ของบริษัท Waters Associates จำกัด

UV Visible Detector model 112 UV / VIS ของบริษัท Gilson จำกัด

Column fused Lichrosorb Si ขนาดอนุภาค 10 ไมโครเมตร ขนาดคอลัมน์ 8.0 x 125 มิลลิเมตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง x ความยาว)

แผ่นยาเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ของบริษัท Becton Dickinson and Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.2 <u>เคมีภัณฑ์</u>

ตัวทำละลาย (Solvent) ที่ใช้เป็น Commercial grade ได้แก่ เฮกเซน, เมธานอล

เฮกเซน (Analytical grade) ของบริษัท E. Merck จำกัด ประเทศเยอรมัน

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ของบริษัท E. Merck จำกัด ประเทศเยอรมัน

น้ำมันหอมระเหยที่กลั่นจากพืชต่างๆ 20 ชนิด

นีโอเปปโตน (Neopeptone) ของบริษัท Difco Laboratories จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

ดี - กลูโคส (D - glucose) ของบริษัท Difco Laboratories จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

ยีสต์ ไนโตรเจน เบส (Yeast Nitrogen Base) ของบริษัท Difco Laboratories จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck จำกัด ประเทศเยอรมัน

ไฮโดรเจนคลอไรด์ (HCl) ของบริษัท E. Merck จำกัด ประเทศเยอรมัน

2.1.3 <u>เชื้อราทดสอบ</u>

Trichophyton mentagrophytes จากห้องปฏิบัติการเชื้อรา สถาบันโรคผิวหนัง กรุงเทพมหานคร

Trichophyton rubrum จากห้องปฏิบัติการเชื้อรา สถาบันโรคผิวหนัง กรุงเทพมหานคร

Epidermophyton floccosum จากห้องปฏิบัติการเชื้อรา สถาบันโรคผิวหนัง กรุงเทพมหานคร

2.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

2.2.1 นำสมุนไพรมากลั่นด้วยน้ำ ซึ่งเป็นการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยใช้น้ำต้มกับพืช อุณหภูมิที่ใช้กลั่น ประมาณ 100 องศาเซลเซียส เวลา 5 - 7 ชั่วโมง ทำการแยกน้ำมันหอมระเหย ที่กลั่นจากพืชสมุนไพร เช่น กระวาน กะเพรา กานพลู คื่นฉ่าย จันทน์เทศ ผกากรอง ผักชี พริกไทย พลู มะกรูด มะนาว เทียนข้าวเปลือก เทียนตาตั๊กแตน สะระแหน่ โหระพา แห้วหมู อบเชยญวน อบเชยศรีลังกา เป็นต้น ทำให้น้ำมันหอมระเหยปราศจากน้ำ โดยใช้แมกนีเซียมซัลเฟตดูดน้ำออก นำน้ำมันหอมระเหยไปชั่งน้ำหนัก และเก็บไว้ในที่มืดโดยเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 - 6 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบกับเชื้อกลากต่อไป

2.2.2 นำน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ไปทดสอบกับเชื้อกลาก 3 สายพันธุ์ คือ *Trichophyton mentagrophytes, T. rubrum* และ *Epidermophyton floccosum* โดยใช้วิธี Disk Diffusion Technique [50] โดยเลี้ยงเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) เป็นเวลา 14 วัน นำแผ่น disk ที่จุ่มน้ำมันหอมระเหย วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อกลากอยู่ ตรวจสอบบริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) ของเชื้อกลาก รอบแผ่น disk ที่มีน้ำมันหอมระเหยอยู่

2.2.3 หาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibition Concentration, MIC) ของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อกลาก โดยวิธี Agar dilution test [51]

2.2.4 ศึกษาและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย ที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อกลาก ด้วยเครื่องมือ GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry)

2.2.5 แยกองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อกลาก ด้วยเครื่องมือ HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

2.2.6 นำองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่แยกได้กลับไปทดสอบ ฤทธิ์ต้านการเจริญเชื้อกลากอีกครั้ง ทำให้ทราบว่า องค์ประกอบใดในน้ำมันหอมระเหย ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อกลาก

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อรา ของน้ำมันหอมระเหย

Disk diffusion test

วิธีทดลอง

เตรียมน้ำมันหอมระเหยที่มีปริมาณแน่นอน ใส่ในหลอดทดลองที่นึ่งฆ่าเชื้อ (นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที) ทำเจือจางด้วยเมทธานอล โดยให้มีความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า หยดลงบนแผ่น disk ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืน (Overnight) ในตู้ควัน เพื่อระเหยเมทธานอลออกไป เก็บไว้ทดสอบในวันรุ่งขึ้น

เตรียมเชื้อราที่เลี้ยงในอาหาร Sabouraud Dextrose Agar (SDA) อายุ 14 วัน มาทำสารแขวนลอย โดยใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ขูดเชื้อราใส่ในหลอดทดลอง (Sterile capped tubed) บดด้วยเครื่องบด Homogenizer ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อทำให้เป็นสารแขวนลอยที่เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneus) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร ให้ได้ 40 % Transmittance ผลจะได้ความเข้มข้น 1×10^{6} - 1×10^{7} colony - forming units/ml. (cfu/ml)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Nitrogen Base (YNB) Agar เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ให้เย็น นำสารแขวนลอยที่เตรียมไว้มาหยดลงใน YNB Medium ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร spread ด้วยแท่งแก้วงอ ทิ้งไว้ให้สารแขวนลอยแห้ง เป็นเวลา 30 นาที วาง disk ที่เตรียมไว้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวควบคุม ทำ 2 ชนิดคือ Negative control เป็นจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่วาง disk ที่หยด methanol (100% ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาณ 2 µl / disk และ Positive control เป็นจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่วาง disk ที่หยดยา Whitfield® (ประกอบด้วย

กรดเบนโซอิก, Benzoic acid 6.0 % w/w และ กรดซาลิไซลิก, Salicylic acid 3.0 % w/w) และ Nizoral® (ประกอบด้วย คีโตโคนาโซล, Ketoconazole 20 mg/g) ความเข้มข้น 30 μg/ml. ปริมาณ 2 μl/disk บ่มที่อุณหภูมิห้อง 28 - 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการทดลองโดยวัดขอบเขตการยับยั้ง (Clear zone) ที่เกิดรอบๆ disk วัดโดยใช้ไม้บรรทัดอ่าน 2 ครั้ง ในแต่ละ disk โดยอ่านด้านแคบที่สุด และด้านกว้างที่สุด เฉลี่ยหาเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone

Agar dilution method

เป็นการหาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหย ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Minimal Inhibition Concentration, MIC) [52]

วิธีทดลอง

เตรียมเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA อายุ 14 วัน มาทำสารแขวนลอย โดยใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ขูดเชื้อราใส่ในหลอดทดลองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บดด้วยเครื่องบด Homogenizer ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อทำให้เป็นสารแขวนลอย ที่เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร ให้ได้ 40 % Transmittance ผลจะได้ความเข้มข้น 1×10^6 - 1×10^7 colony - forming units/ml.

เตรียมอาหารทดสอบ Yeast Nitrogen Base Agar (YNB Agar)

เตรียมน้ำมันหอมระเหยที่มีปริมาณแน่นอน ใส่ในหลอดทดลองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเจือจางด้วยเมทธานอล โดยให้มีความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า นำน้ำมันหอมระเหยแต่ละ dilution หยดลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อบแล้ว (อบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ YNB Agar ที่อุ่นๆ อุณหภูมิประมาณ 45 - 58 องศาเซลเซียส ทับสารที่หยดลงไปแล้ว ทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อเย็น นำสารแขวนลอย ที่เตรียมไว้มาหยดใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร spread ด้วยแท่งแก้วงอ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวควบคุม (control) คือจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่หยดเมทธานอล (100 % ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งเป็นตัวทำละลายในการทำการเจือจางของน้ำมันหอมระเหย บ่มที่อุณหภูมิห้อง 28 - 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วัดผลโดยดูเชื้อราที่เจริญขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ในจานอาหาร

เลี้ยงเชื้อใดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อราเลย จะเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ บันทึกผล

2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อกลาก โดยวิธี Gas Chromatography/Mass Spectrometry สภาวะของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังนี้

คอลัมน์ : J&W DB - 1 capillary, Polyethylene glycol ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.1 ไมครอน

อุณหภูมิอินเจกเตอร์ : 270 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิทรานสเฟอร์ลายน์ : 240 องศาเซลเซียส

อินเจกชันโหมด : Spilt 1: 30

แก๊สตัวพา : ฮีเลียม 0.8 มิลลิลิตร / นาที

โปรแกรมอุณหภูมิ :

อุณหภูมิเริ่มต้น : 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 นาที

อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ : 6 องศาเซลเซียส / นาที

อุณหภูมิสุดท้าย : 200 องศาเซลเซียส

อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 2 : 10 องศาเซลเซียส / นาที

อุณหภูมิสุดท้าย 2 : 250 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 3 นาที

อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 3 : 20 องศาเซลเซียส / นาที

อุณหภูมิสุดท้าย 3 : 300 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 5 นาที

นำข้อมูลแมสสเปกตรัม ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Library ที่จัดทำโดย Nation Bureau of Standards Library (NIST Database) เพื่อจะได้ทราบว่าแต่ละพีกในโครมาโตแกรมแสดงถึงสารชนิดใดบ้าง

I 16838481

2.5 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

การแยกองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อกลาก ด้วยเทคนิค Normal Phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) สภาวะของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังนี้

Column : Lichrosorb Silica System ขนาดอนุภาค 10 ไมโครเมตร คอลัมน์ขนาด 8.0 x 125 มิลลิเมตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง x ความยาว)

Flow rate : 1.9 ml / min

Solvent : Hexane

Detector : UV Visible Detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

Fraction Collector : 1 min / tube

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย